

Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno

Kenneth Madriz Ordeñana¹

RESUMEN. Los patógenos son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola en el trópico y su combate se realiza básicamente mediante métodos químicos. Sin embargo, las plantas también son capaces de reaccionar y defenderse por sí solas, utilizando una serie de mecanismos naturales para esto. Las interacciones planta-patógeno pueden presentar varios tipos de asociaciones, que dependen en gran parte del contenido genético de cada organismo. La resistencia inducida es una forma de defensa activa que involucra la expresión diferencial de genes y cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno. En este trabajo se describen los procesos más importantes que determinan la especificidad de una interacción planta-patógeno. Se incluyen también las etapas que inician con el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, incluyendo la manifestación de la muerte celular programada y culminando con la activación de los diferentes mecanismos de defensa.

Palabras clave: Resistencia inducida, Reacción hipersensible, Genes de resistencia, Resistencia sistémica adquirida.

ABSTRACT. Mechanisms of defense in plant-pathogen interactions. Plant pathogens are responsible for a substantial part of the reduction in agricultural production in the tropics and their control is primarily through chemical methods. However, plants are also capable of reacting and defending themselves, employing a series of natural mechanisms. Plant-pathogen interactions exhibit several types of associations, which largely depend on the genetic content of each organism. Induced resistance is a form of active defense that involves the differential expression of genes and metabolic changes occurring as a consequence of a specific recognition process between the plant and pathogen. This study describes the most important processes that determine the specificity of a plant-pathogen interaction. The stages beginning with the recognition of the pathogen by the plant, the appearance of the programmed cell death and the activation of different defense mechanisms, are also included.

Key words: Induced resistance, Hypersensitive reaction, Resistance genes, Systemic acquired resistance

Introducción

El nivel de producción en la agricultura tropical es bajo debido a factores que van desde situaciones económicas y sociales precarias, hasta la calidad del germoplasma, el ambiente y la alta incidencia de plagas (Norse *et al.* 1992, Oerke *et al.* 1994). El control de estas últimas se realiza principalmente mediante métodos químicos, lo cual tiene un costo tanto económico como ambiental (Arauz 1998). En el caso particular

de las enfermedades que afectan los cultivos, la biología molecular puede proveer instrumentos innovadores para investigar y entender los atributos que permiten a las plantas defenderse y contrarrestar las infecciones producidas por los patógenos. La comprensión de estos procesos a nivel molecular ha permitido diseñar alternativas al control químico basadas en los mecanismos naturales que confieren resistencia a los patógenos. En este trabajo se analizan los aspectos

¹ Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Facultad de Agronomía y Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. kmadriz@cariari.ucr.ac.cr

tos generales de las relaciones entre las plantas y sus patógenos, particularmente la resistencia inducida que incluye los mecanismos de reconocimiento y activación de la defensa. Se discuten aspectos de la fisiología y la biología molecular de la defensa en plantas con el propósito de evaluar estos procesos como fuente para desarrollar nuevas alternativas de control de patógenos.

Las interacciones planta-patógeno

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, ellas interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa. De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados por Browning (1980), la resistencia y la avirulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. El autor propone además que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta. Los genes que determinan la resistencia oligogénica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Browning 1980).

Otros autores como Keen (1992) señalan que para las plantas que se desarrollan bajo condiciones naturales, la enfermedad es la excepción y no la regla, lo cual no siempre es cierto bajo las condiciones que prevalecen en la agricultura moderna

Las interacciones entre una planta y un microorganismo pueden mostrar varios tipos que van desde las relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo. Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, especie y subespecies. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general son susceptibles solamente a pocas especies, aislamientos o razas de patógenos (Heath 2000a).

Nutrición de los patógenos

Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrientes de fuentes existentes y para ello necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de de-

fensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse solo en tejidos de hospedantes vivos son llamados *biótrosos*. Estos patógenos, también conocidos como parásitos obligados, necesitan mantener la célula hospedante viva y emplean para ello mecanismos de invasión sumamente sutiles. Los apresorios son estructuras de penetración usadas por algunos hongos para evitar el daño excesivo del tejido durante las fases iniciales de la patogénesis (Fig. 1). Entre los patógenos biotróficos se encuentran los virus, los nematodos y algunos hongos especializados, tales como las royas.

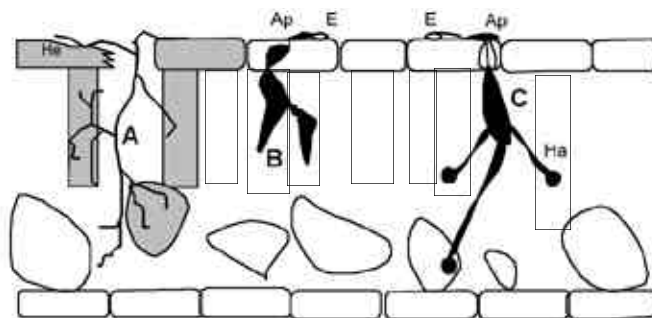


Figura 1. Formas de invasión y nutrición de algunos hongos durante una interacción compatible. A- Penetración por heridas (He) de un hongo necrotrofo, el cual mata la célula hospedante antes de alimentarse. B- Hongo biotrofo intracelular con penetración directa mediante un apresorio (Ap). C- Hongo biotrofo intercelular con penetración por estoma y utilización de haustorios (Ha) para la absorción de nutrientes.

Otro tipo de patógenos, denominados *necrotrofos*, producen la muerte de las células hospedantes obteniendo de esta forma los nutrientes a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenas. Estos muchas veces utilizan diferentes toxinas capaces de degradar el tejido de la planta y facilitar la invasión (Fig. 1) (Collinge *et al.* 2001).

Especificidad de las interacciones planta-patógeno

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. Esta especificidad es más fácil de estudiar a nivel de cultivar, es decir, especies cultivadas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento genético para producir poblaciones de plantas altamente homogéneas en su contenido genético. Como resultado de este proceso, nuevas razas de patógenos, específicas para cada cultivar, aparecen debido a la presión de selección. Una interacción biotrófica se caracteriza por tener un alto grado de especificidad ya que el patóge-

no necesita mantener las células hospedantes vivas, evitando la inducción de defensa, para poder sobrevivir. Se cree que esta especificidad es el resultado de una evolución entre ambos organismos. En general, estas relaciones están determinadas a nivel de razas del patógeno y cultivares del hospedante. La especificidad observada sirve para seleccionar la interacción que proporcione una ventaja para una de las partes (patogénesis o resistencia), o para ambos organismos (simbiosis) (De Wit 1997).

Un patógeno puede ser muy patogénico o poco patogénico para un hospedante dado. El grado de patogenicidad se define frecuentemente como *virulencia* (Collinge *et al.* 2001). De esta forma, y dependiendo de su habilidad de causar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedante y levemente virulento para otro. Estos conceptos han sido discutidos por Van del Plank (1968) quien propuso que el nivel de virulencia se determina con respecto a la resistencia del hospedante. En otras palabras, la virulencia es un concepto estrechamente ligado a la habilidad del patógeno de superar la resistencia de la planta. Por otro lado, la resistencia vertical (monogénica u oligogénica) y la resistencia horizontal (poligénica) son los extremos de todo un espectro de niveles de resistencia. Sin embargo, en términos genéticos, virulencia se utiliza para definir si una variante o raza de un patógeno puede o no causar enfermedad en una variedad o cultivar del hospedante. En otras palabras, una raza de un patógeno es virulenta si produce enfermedad y avirulenta si no produce enfermedad a un cultivar determinado del hospedante. En las interacciones planta-patógeno a nivel de especie, la resistencia del hospedante se conoce como resistencia no-hospedante, mientras que a nivel de raza-cultivar se denomina resistencia determinada por la raza. En este último caso, una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran *resistencia* y otros que muestran *susceptibilidad* a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas tanto virulentas como avirulentas para un cultivar determinado (Collinge *et al.* 1994) (Fig. 2).

Por lo tanto, para estudiar y comprender cualquier interacción planta-patógeno es necesario tomar en cuenta los dos componentes de sistema. En otras palabras, se debe estudiar la virulencia o avirulencia de un patógeno siempre en relación con la resistencia o susceptibilidad del hospedante. Para dar la importancia adecuada a la interrelación entre los dos organismos es conveniente utilizar los términos *interacción*

compatible e *interacción incompatible*. Una relación compatible se refiere a una interacción entre una raza virulenta y un cultivar susceptible, mientras que una relación incompatible se establece cuando el hospedante es resistente y el patógeno es avirulento (Fig. 2).

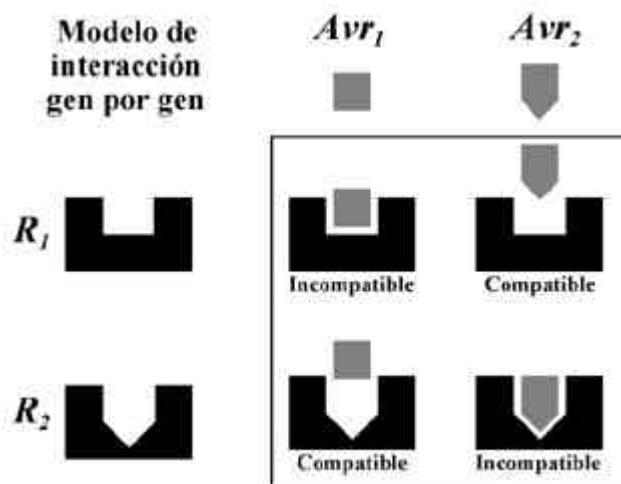


Figura 2. La hipótesis del gen por gen. La figura es un modelo simplificado que ilustra cómo la presencia o ausencia de genes R en el hospedante y los correspondientes genes Avr en el patógeno determinan el reconocimiento y definen si la interacción es compatible o incompatible.

Las interacciones incompatibles (hospedante resistente, patógeno avirulento) se caracterizan por estar mediadas por sistemas de reconocimiento que activan la expresión de mecanismos de defensa que frecuentemente están asociados a la manifestación de la reacción hipersensible (Heath 2000b). Por el contrario, en las interacciones compatibles (hospedante susceptible, patógeno virulento), el reconocimiento no se lleva a cabo, la respuesta de defensa no es activada y la enfermedad se establece (De Wit 1997).

Defensa de las plantas

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas pueden poseer *mecanismos constitutivos* de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa *estructurales constitutivos*, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa *químicos constitutivos*, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Algunos ejemplos

de este tipo son las plantas cianogénicas como el sorgo (*Sorghum* sp.) y la yuca (*Manihot esculenta*) que poseen cantidades considerables de compuestos relacionados con el ácido cianhídrico (HCN) (Osbourn 1996). De esta forma, los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucran una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno.

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como *resistencia inducida*, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.* 1994). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson 1998).

Activación de la defensa

La activación de la defensa en plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta determina la presencia del patógeno. Ciertas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas son capaces de actuar como *inductores* de defensa. Los *inductores no-específicos* son cualquier sustancia que induce la activación de defensa de forma no específica. Por ejemplo, los polímeros de azúcar que conforman la pared celular tanto de hongos como de las células vegetales, son reconocidos desde hace varios años como agentes capaces de inducir la expresión de genes de defensa en plantas (Darvill y Albersheim 1984). Esto es congruente con el hecho de que la muerte del tejido hospedante, causada por el ataque del patógeno o por una reacción de hipersensibilidad, libera componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensa en tejidos adyacentes. De manera similar, la actividad de algunas enzimas hidrolíticas, producidas por la célula vegetal como reacción de defensa, liberan componentes de la pared celular de ciertos hongos que tienen un efecto inductor de defensa en los tejidos vegetales. La reacción de defensa también se puede activar de forma no específica por factores abióticos como el choque térmico, la sequía, diversas sustancias químicas y la luz ultravioleta. En general, este tipo de inductores abióticos activan respuestas de defensa ya que provocan heridas y daño físico en los tejidos (Collinge *et al.* 2001).

La inducción de la reacción de defensa de una manera específica ha sido observada en las interacciones del tipo raza-cultivar, donde el proceso de reconocimiento del patógeno por parte de la planta parece estar determinado por genes correspondientes y presentes tanto en el patógeno como en la planta. La investigación exhaustiva iniciada en los años 40 en el cultivo del lino y la roya de ese cultivo causada por *Melampsora lini*, generaron la hipótesis de gen por gen (Flor 1971) en la cual se evidencia la existencia de genes en la planta que confieren resistencia a una raza particular de un patógeno. Por otro lado, la presencia o ausencia de genes de avirulencia en el patógeno le confieren la habilidad de causar o no la enfermedad en un cultivar determinado (Fig. 2) (De Wit 1997).

La hipótesis de gen por gen tuvo mayor fundamento genético hasta después de varios años. Posteriormente, la base molecular de la hipótesis gen-por-gen también fue descubierta. Se ha propuesto que los inductores específicos son proteínas codificadas por los genes *Avr* de avirulencia presentes en el patógeno y que son capaces de inducir las repuestas de defensa en cultivares que posean los correspondientes genes *R* de resistencia (Parker y Coleman 1997). De esta forma, el reconocimiento tiene lugar cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes *R* y los correspondientes productos de los genes *Avr* del patógeno. Esta interacción da origen a una cascada de señales y otras vías de transducción que finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Hammond-Kosack y Jones 1996).

Mecanismos de reconocimiento

Se han propuesto varios modelos para explicar los mecanismos moleculares de reconocimiento basados en los sistemas gen-por-gen. Los primeros modelos consideraron la interacción entre los productos R-Avr mediante un receptor transmembranario (codificado por el gen R de la planta) y un "ligando" (codificado por el gen Arv del patógeno) (Gabriel y Rolfe 1990). Recientemente, se reafirmaron los modelos basados en la generación de una cascada de reacciones de defensa, las cuales son activadas por la interacción "ligando"-receptor (Lamb 1996). Con el aislamiento, clonaje y caracterización molecular de varios genes *R* y genes *Avr* de diferentes especies de plantas y patógenos (Cuadro 1) (Takken y Joosten 2000), ha sido posible predecir la estructura, localización y posibles mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la interacción entre las proteínas R y Avr (De Wit 1997).

Cuadro 1. Ejemplos de genes de resistencia y avirulencia clonados (Takken y Joosten 2000).

Planta	Gen R	Localización	Gen Avr	Patógeno
Tomate	Prf	Intracelular	AvrPto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Arabidopsis	RPS2	Intracelular	AvrRpt2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Arabidopsis	RPM1	Intracelular	AvrRpm1, avrB	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
Arabidopsis	RPS5	Intracelular	AvrPphB	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000
Arabidopsis	RPP8	Intracelular	AvrRpp8	<i>Peronospora parasitica</i>
Tomate	Mi	Intracelular	-	<i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Macrosiphum euphorbia</i>
Tomate	I2c	Intracelular	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
Tomate	I2	Intracelular	-	<i>Fusarium oxysporum</i>
Arroz	Xa1	Intracelular	-	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Arroz	Pib	Intracelular	-	<i>Magnaporthe grisea</i>
Papa	Rx	Intracelular	Proteína de cápside	Virus X de la papa
Papa	Gpa2	Intracelular	-	<i>Globodera rostochiensis</i>
Trigo	Cre3	Intracelular	-	<i>Heterodera avenae</i>
<i>Capsicum</i>	Bs2	Intracelular	AcrBs2	<i>Xanthomonas campestris</i>
Maíz	Rpl-D	Intracelular	-	<i>Puccinia sorghi</i>
Arroz	Pi-ta	Intracelular	AvrPITA	<i>Magnaporthe grisea</i>
Cebada	Mla	Intracelular	-	<i>Erysiphe graminis</i>
Tabaco	N	Intracelular	Replicasa	Virus del mosaico del tabaco
Arabidopsis	RPP1	Intracelular	-	<i>Peronospora parasitica</i>
Lino	L6 L1-12	Intracelular	-	<i>Melampsora lini</i>
Lino	M	Intracelular	-	<i>Melampsora lini</i>
Arabidopsis	RPP5	Intracelular	-	<i>Peronospora parasitica</i>
Arabidopsis	RPS4	Intracelular	AvrRps4	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>
Arroz	Xa21	Extracelular	-	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
Tomate	Cf-2	Extracelular	Avr2	<i>Cladosporium fulvum</i>
Tomate	Cf-4	Extracelular	Avr4	<i>Cladosporium fulvum</i>
Tomate	Hcr9-4E	Extracelular	Avr4E	<i>Cladosporium fulvum</i>
Tomate	Cf-5	Extracelular	Avr5	<i>Cladosporium fulvum</i>
Tomate	Cf-9	Extracelular	Avr9	<i>Cladosporium fulvum</i>
Remolacha	HSI pro-1	Extracelular	-	<i>Heterodera schachtii</i>

(Fig. 3). De acuerdo a la secuencia de aminoácidos inferida a partir de los genes R, se han observado varios rasgos distintivos comunes a la mayoría de las proteínas R. Entre ellos está la presencia de repeticiones ricas en leucina o LRR (por sus siglas en inglés), de entre 20 y 30 aminoácidos. Estas LRR son comunes también en sistemas animales en donde también parecen ser mediadoras de las interacciones proteína-proteína (Takken y Joosten 2000). La variabilidad observada en la secuencia de aminoácidos de las LRR, aparentemente confiere la especificidad del reconocimiento (Ellis *et al.* 2000). Algunas de las proteínas R que poseen LRR pueden además contener regiones o sitios de unión a nucleótidos o NBS (por sus siglas en inglés), capaces de unirse a GTP y ATP y que participan en la transducción de señales (Pan *et al.* 2000).

Considerando las características estructurales de las proteínas R, se ha podido predecir tanto su localización como su función en el reconocimiento de las

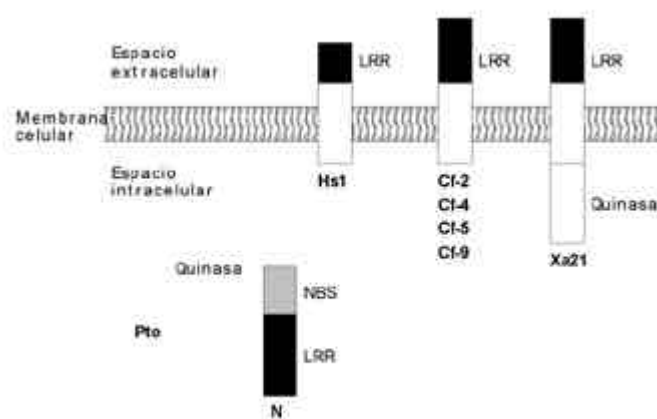


Figura 3. Representación esquemática de la localización de los productos de algunos de los genes R clonados. La localización se basa en las características estructurales inferidas a partir de las secuencias de los genes. LRR: repeticiones ricas en leucina, NBS: sitios de unión a nucleótidos. Ver cuadro 1 y el texto para mayor detalle de cada gen. Adaptado de: De Wit (1997).

proteínas Avr (Fig. 3). Algunas de las proteínas R poseen dominios transmembranarios, por lo tanto su localización en la célula así como la disposición de los LRR de reconocimiento situados en la parte externa, le puede conferir a este tipo de proteínas una función de centinela, capaz de realizar el reconocimiento extra-celular (Gabriel 1999). Este es el caso de los genes *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* y *Cf-9* de tomate, los cuales confieren resistencia contra las razas de hongo biótrofo *Cladosporium fulvum* que poseen los genes correspondientes *Avr2*, *Avr4*, *Avr5* y *Avr9*. Los genes de resistencia *Cf* codifican para proteínas transmembranarias con una LRR extra celular. Otras proteínas R que también muestran dominios extracelulares son la Hs1^{pro1} de remolacha que confiere resistencia al nematodo *Heterodera schachtii* y Xa21 de resistencia a *Xanthomonas oryzae* en arroz (Fig. 3) (Takken y Joosten 2000).

Otros genes *R* codifican para las proteínas que se localizan en el citoplasma que parecen reconocer los productos Avr que llegan hasta el interior de la célula hospedante. Las partículas virales típicamente deben penetrar al citoplasma para iniciar la patogénesis. De esta forma, no es de extrañar que el gen de resistencia *N* del tabaco codifique para una proteína de localización citoplasmática encargada de reconocer la replicasa del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Whitham *et al.* 1994). En este caso, la replicasa de TMV posee una función dual, ya que participa en la replicación viral y actúa a su vez como gen *Avr* para los cultivares de tabaco que poseen el gen *N* de resistencia (Whitham *et al.* 1996). Por otro lado, el gen *Pto* de tomate confiere resistencia contra las razas de *Pseudomonas syringae* que poseen el gen de avirulencia *avrPto*. La proteína *Pto* también tiene una localización citoplasmática pero no contiene regiones LRR. Sin embargo, *Pto* posee una región con actividad quinasa, por lo cual se le ha asignado una función clave en las vías de señales mediadas por cascadas de fosforilación. Además, *Pto* es la única proteína R que ha demostrado que interactúa directamente con la proteína de avirulencia *AvrPto* (Tang *et al.* 1996).

A la fecha se han caracterizado varios genes *R* y *Avr* de diferentes especies (Cuadro 1). La información obtenida es cada vez más consistente e indica que la activación de la defensa contra patógenos en plantas, al menos en los sistemas raza-cultivar, está mediada por la interacción de proteínas Avr y R siguiendo la hipótesis gen-por-gen (Flor 1971). Esta es la base del reconocimiento y tiene como consecuencia la activación de una cascada de señales que, en última instan-

cia, induce la defensa (Martin 1999). En otras palabras, los genes *R* no son responsables directos de la resistencia, pero sí tienen una función determinante de la especificidad del reconocimiento, actuando como iniciadores de la defensa (De Wit 1997).

Mecanismos de defensa

Una vez que el patógeno ha sido reconocido se activan una serie de mecanismos de defensa mediante cascadas de señales que aún no han sido completamente caracterizadas. Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, son los responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensible, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre otros (Collinge *et al.* 1994).

La reacción hipersensible. En las interacciones raza-cultivar del tipo incompatible, muchas veces ocurre una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección. Estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada o reacción hipersensible (**HR**). La reacción hipersensible además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR (Fig. 4) (Ryals *et al.* 1996). A pesar de que HR es un mecanismo sumamente efectivo que produce una reacción de resistencia casi absoluta, aún no existe consenso que defina si la HR es directamente responsable de la resistencia, al privar de tejido vivo y nutrientes al patógeno, o si más bien su acción está basada en la acumulación de compuestos dañinos que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospedantes (Heath 2000b). Sin embargo, cada vez existe más evidencia de que el proceso de HR ocurre como resultado de una necrosis controlada de forma similar a la apoptosis o muerte celular programada conocida en los tejidos animales (Raff 1998).

El fenómeno de *muerte celular programada* o PCD está mediado por una explosión oxidativa que li-

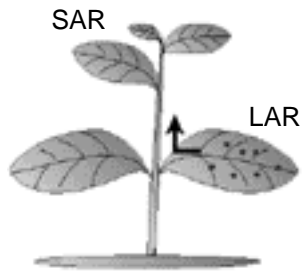


Figura 4. La resistencia sistémica adquirida (SAR) se manifiesta típicamente cuando la planta es atacada por un patógeno incompatible que induce lesiones locales hipersensibles produciendo una resistencia local (LAR) en el tejido infectado. Una serie de señales, principalmente mediadas por el ácido salicílico, induce resistencia en el resto de la planta.

bera agentes altamente oxidantes llamados AOS "active oxygen species", tales como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Levine *et al.* 1994)

La reacción hipersensible parece ocurrir como un programa suicida activo y organizado, y no como consecuencia de un colapso celular pasivo producido por el ataque del patógeno o por toxinas derivadas de éste (Gilchrist 1998). La generación de la PCD está relacionada mediante señales con la activación y coordinación de los otros mecanismos de defensa. Se ha demostrado que el H_2O_2 tiene además una función como señal difundible implicada en la inducción de otros mecanismos de defensa (Orozco-Cárdenas *et al.* 2001).

Producción de fitoalexinas. Las fitoalexinas se definieron originalmente como metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con propiedades antimicrobianas y que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos (Paxton 1981). Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la HR (Hammerschmidt 1999a). Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenilpropanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina (Fig. 5).

La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis (Fig 5). Entre ellas la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI). La síntesis de *novo* de estas enzimas, como respuesta a la infección se ha demostrado anteriormente (Cuyper *et al.* 1988). Sin embargo, una evidencia del

papel de las fitoalexinas en mecanismos de defensa se obtuvo cuando se demostró la capacidad de ciertos fitopatógenos, como el hongo *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*) de detoxificar las fitoalexinas (VanEtten *et al.* 1995).

Formación de barreras estructurales. Uno de los mecanismos de defensa más evidentes es la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance de patógenos. La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daño físico. La lignificación también se manifiesta durante la defensa a patógenos. La acumulación de lignina en grandes cantidades puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos (Nicholson y Hammerschmidt 1992). La síntesis de lignina, al igual que la síntesis de ciertas fitoalexinas, se deriva del metabolismo de los fenilpropanoides en donde la enzima PAL juega un importante papel regulador (Fig. 5). Sin embargo, la síntesis de *novo* de otras enzimas, como la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y algunas peroxidasas, también ocurre durante la activación de la defensa contra los patógenos. Ciertas peroxidasas son encargadas de la polimerización de las unidades de fenilpropanoides que da lugar a la lignina (Barber *et al.* 1997).

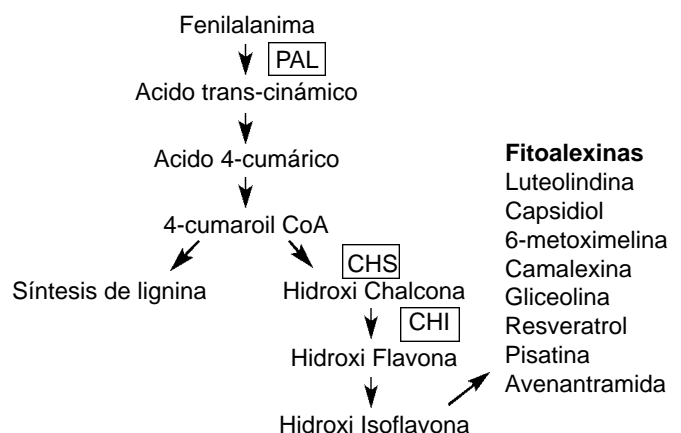


Figura 5. Vía biosintética de las fitoalexinas isoflavonoides iniciándose a partir del aminoácido fenilalanina. Los sitios más importantes de regulación se indican con la enzima correspondiente: PAL = fenilalanina amonio liasa; CHS = Chalcona sintasa; CHI = Chalcona isomerasa. Nótese que PAL también regula la biosíntesis de lignina. Adaptado de: De Wit (1997).

Aparte del proceso de lignificación, las plantas producen y depositan otras sustancias que previenen el avance de ciertos patógenos. Entre ellas se puede mencionar las proteínas ricas en hidroxiprolina o HRGP "hydroxyproline-rich glycoproteins", las cuales se acumulan alrededor de los sitios de ataque del patógeno evitando su penetración (Benhamou *et al.* 1990). Otro mecanismo estructural de defensa es la formación de papilas. La papila es una estructura de resistencia que se produce por modificaciones de las células de la epidermis. Las papilas están compuestas principalmente de calosa (β -1,3-glucano) y se asocian a la resistencia porque evitan la penetración de los hongos (Skalamera *et al.* 1997).

Proteínas relacionadas con la patogénesis. Estas proteínas también llamadas *proteínas PR*, son un grupo variable que se acumulan en las plantas después y durante la infección con patógenos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Estas se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas, de localización extracelular y con valores de pH extremos (Van Loon y Van Kammen 1970). La clasificación más simple se basa en los cinco grupos originalmente identificados para las proteínas PR de tabaco. Sin embargo, éstas han sido identificadas tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, lo que ha generado una nueva clasificación (Van Loon y Van Strien 1999). Algunas de las proteínas PR poseen actividades definidas tal como las PR-2 (β -1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas). Esto sugiere que la alta expresión de las glucanasas y las quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra patógenos que contienen β -1,3-glucano y quitina (Fig. 6). De hecho, plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente para sobre expresar ciertas quitinasas demostraron ser más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea* respectivamente (Bliffeld *et al.* 1999, Nishizawa *et al.* 1999). A pesar de que algunas proteínas PR como las PR-2 y PR-3 poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que tienen el resto de ellas durante la respuesta de defensa a patógenos y particularmente a patógenos virales.

La resistencia sistémica. La inoculación localizada con patógenos virulentos y avirulentos capaces de producir lesiones necróticas puede resultar en la inducción local o sistémica de resistencia. En ambos fenómenos, la planta muestra resistencia local (LAR) o sistémica (SAR) a un ataque subsecuente del patógeno (Fig. 4).

La resistencia sistémica adquirida es una respuesta de defensa activa, sistémica, de amplio espectro que se asocia a una alta expresión de genes PR (Hammerschmidt 1999b). En la mayoría de los casos, SAR es igualmente efectiva contra hongos, bacterias, virus o nematodos, independientemente del organismo inductor (Ryals *et al.* 1996). Los primeros estudios acerca del fenómeno SAR se realizaron en tabaco infectado con virus (Ross 1961). Sin embargo, recientemente se trabaja intensivamente con la planta modelo *Arabidopsis* (Glazebrook *et al.* 1997) y en menor grado con especies monocotiledóneas (Morris *et al.* 1998, Molina *et al.* 1999). La manifestación de SAR de manera sistémica en la planta implica la existencia de algún sistema de señales capaces de transmitirse a través de los tejidos. Las investigaciones realizadas indican que el ácido salicílico (SA) es la molécula que ha mostrado mayores evidencias de estar involucrada en las vías de SAR (Mauch-Mani y Métraux 1998). De esta forma, la inducción de SAR generalmente se correlaciona con incrementos en la acumulación de SA tanto localmente como sistémicamente (Lawton *et al.* 1995).

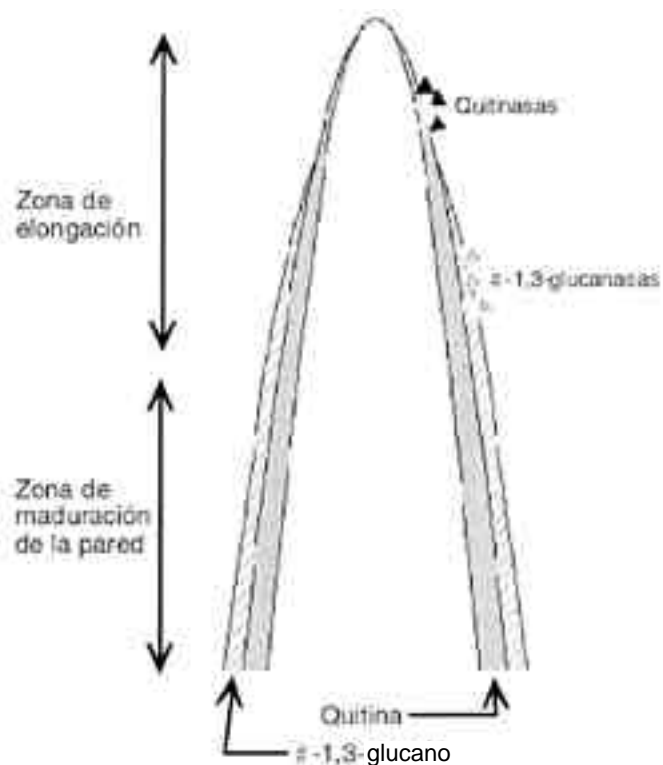


Figura 6. Modelo de la composición de la pared de una hifa en crecimiento. Las quitinasas y las β -1,3-glucanasas son capaces de inhibir el crecimiento del hongo mediante la hidrólisis de las capas de quitina y β -1,3-glucano. Adaptado de Boller (1987).

La acumulación debida a la síntesis de *nov* de las proteínas PR como parte de los mecanismos de resistencia inducida, está estrechamente asociada a la manifestación de SAR, que es un fenómeno de resistencia sistémica de amplio espectro (Ryals *et al.* 1996, Uknes *et al.* 1996).

Otro tipo de resistencia sistémica inducida se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos de la rizosfera, particularmente rizobacterias. Este tipo de resistencia es conocida como *resistencia sistémica inducida* (ISR) y se caracteriza por estar mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico y al etileno y ser independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico (Pieterse y Van Loon 1999).

Consideraciones finales

El uso de las técnicas de la biología y la genética molecular ha generado gran cantidad información acerca de los mecanismos utilizados por las plantas para defenderse de los fitopatógenos. Los nuevos conocimientos confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación coordinada de un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos responden a

la expresión o represión de genes cuyos productos participan en las diferentes vías metabólicas que participan en la defensa. Estos genes, llamados genes de defensa, conforman la base de la resistencia horizontal o poligénica conocida por los fitopatólogos y mejoradores de plantas. Los mecanismos de defensa de la *resistencia horizontal*, sean estos la producción de fitoalexinas, proteínas PR, deposición de lignina, reacción hipersensible o SAR; son los responsables de actuar en detrimento del patógeno invasor. En otras palabras, la defensa en plantas es básicamente poligénica.

Por otro lado, los genes *R* conforman la base de la *resistencia vertical* o monogénica u oligogénica. Los genes de resistencia se han utilizado en los programas de fitomejoramiento porque su incorporación en un cultivar dado es fenotípicamente detectable pues es determinante para la manifestación de la resistencia. A pesar de lo que sugiere su nombre, los genes *R* no son directamente responsables de la resistencia, sino que actúan como receptores de las señales (proteínas Avr) originadas del patógeno. Esto conlleva a la activación de diferentes cascadas de señales que en última instancia inician la expresión de genes responsables de los mecanismos de defensa (Fig. 7).

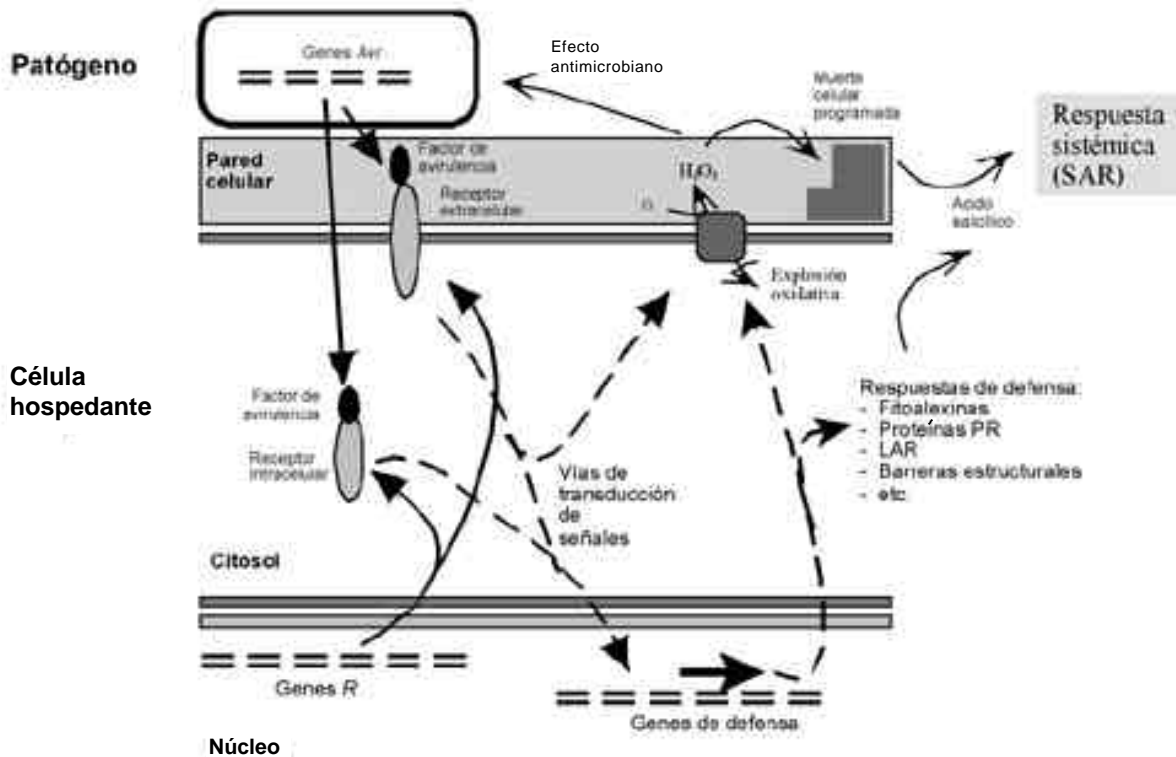


Figura 7. Modelo simplificado de la activación de las respuestas de defensa de la célula hospedante. El modelo se basa en una etapa de reconocimiento gen-por-gen que activa los mecanismos de defensa mediante vías de transducción de señales. Fuente: Collinge *et al.* (2001).

La utilización de mecanismos de defensa en plantas, particularmente la expresión y regulación de la resistencia de amplio espectro asociada al fenómeno SAR, surge como una alternativa viable para diseñar estrategias para el control de patógenos. La comprensión de los mecanismos naturales mediante los cuales las plantas son capaces de defenderse, permitirá producir plantas con mayores niveles de resistencia, sin que sea necesario hacer uso de genes foráneos o extraños a la especie. A pesar de que aún queda mucho por investigar, los esquemas basados en la regulación de los mecanismos naturales de respuesta al ataque de patógenos, representa una forma más viable y duradera de producir plantas genéticamente modificadas. En contraste con las estrategias que tienden a introducir genes foráneos y únicos de resistencia a patógenos; cuya capacidad de conferir resistencia es superada rápidamente por las poblaciones de patógenos o insectos.

Literatura citada

- Arauz Cavallini, F. 1998. Fitopatología, Un enfoque agroecológico. San José, Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Barber, MS; Mitchell, HJ. 1997 Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *International Review Of Cytology - A Survey Of Cell Biology* 172:243-293.
- Benhamou, N; Mazau, D; Esquerré-Tugayé, MT. 1990. Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato root-cells infected by *Fusarium oxysporum* f sp *radicis-lycopersici* - study of a compatible interaction. *Phytopathology* 80:163-173.
- Bliffeld, M; Mundy, J; Potrykus, I; Futterer, J. 1999. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1079-1086.
- Boller T. 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. *In* Kosuge T; Nester EW Ed. *Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives*. New York, Alan R. Liss.p. 247-262.
- Browning, JA. 1980. Genetic protective mechanism of plant-pathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. *In* Harris, MK. Ed. *Biology and Breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants*. Texas Agric. Sta. College Station, TX. p 52-75.
- Collinge, DB; Gregersen, P; Thordal-Christensen, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *In* Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker.p. 391-433.
- Collinge, DB; Borch, J; Madriz-Ordeñana, K; Newman, M-A. 2001. The responses of plants to pathogens. *In* Hawkesford, MJ; Buchner, P. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers.
- Cuyper, B; Schmelzer, E; Hahlbrock, K. 1988. *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Molecular Plant Microbe Interactions* 1:157-160.
- Darvill, AG; Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors- A defence against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:243-275.
- De Wit, PJGM. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science* 2:452-458.
- Ellis, J; Dodds, P; Pryor, T. 2000. The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends in Plant Science* 5:373-379.
- Flor, HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Gabriel, DW; Rolfe, BG. 1990. Working Models of Specific Recognition in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology* 28:365-391.
- Gabriel, DW. 1999. Why do pathogens carry avirulence genes?. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:205-214.
- Gilchrist, DG. 1998. Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414.
- Glazebrook, J; Rogers, EE; Ausubel, FM. 1997. Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics* 31:547-569.
- Hammerschmidt, R. 1999a. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37:285-306.
- Hammerschmidt, R. 1999b. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- Hammond-Kosack, KE; Jones, JDG. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8:1773-1791.
- Heath, MC. 2000a. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Heath, MC. 2000b. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334.
- Hutcheson, SW. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36:59-90.
- Keen, N. 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Molecular Biology* 19:109-122.
- Lamb, C. 1996. A ligand-receptor mechanism in plant-pathogen recognition. *Science* 274:2038-2039.
- Lawton, K; Weymann, K; Friedrich, L; Vernooij, B; Uknes, S; Ryals, J. 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:863-870.
- Levine, A; Tenhaken, R; Dixon, RA; Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Martin, GB. 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 2:273-279.
- Mauch-Mani, B; Métraux, JP. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535-540.
- Molina, A; Görlach, J; Volrath, S; Ryals, J. 1999. Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but not respond to activators of systemic acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:53-58.

- Morris, SW; Vernooij, B; Titatarn, S; Starrett, M; Thomas, S; Wiltse, CC; Frederiksen, RA; Bhanhufalck, A; Julbert, S; Uknes, S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:643-658.
- Nicholson, RL; Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Nishizawa, Y; Nishio, Z; Nakazono, K; Soma, M; Nakajima, E; Ugaki, M; Hibi, T. 1999 Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics* 99:383-390.
- Norse, D; James, C; Skinner, B.J; Zhao Q. 1992 Problems of environment and development: Agriculture land use and degradation. *In An Agenda for Science and Development into the 21st Century*. Reino Unido, Cambridge Univ. Press. Cambridge. p. 79-89.
- Orke, EC; Dehne HW; Schönbeck F; Weber A. 1994. Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam, Holanda, Elsevier. 808 p.
- Orozco-Cárdenas, ML; Narváez-Vásquez, J; Ryan, CA. 2001. Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell* 13:179-191.
- Osborn, AE. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Pan, Q; Wendel, J; Fluhr, R. 2000. Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. *Journal of Molecular Evolution* 50: 203-213.
- Parker, JE; Coleman, M. 1997. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends in Biochemical Science* 22:291-296.
- Paxton, JD. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology* 71:106-109.
- Pieterse, CMJ; Van Loon, LC. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Raff, M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-122.
- Ross, AF. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection of plants. *Virology* 14:340-358.
- Ryals, JA; Neuenschwander, UH; Willits, MG; Molina, A; Steiner, H-Y; Hunt, MD. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1009-1819.
- Skalamera, D; Jibodh, S; Heath, MC. 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytologist* 136:511-524.
- Takken, FLW; Joosten, MHAJ. 2000. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology* 106: 699-713.
- Tang, X; Frederik, RD; Zhou, J; Harlerman, DA; Jia, Y; Martin, GB. 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of avrPto and Pto kinase. *Science* 274: 2060-2063.
- Uknes, S; Vernooij, B; Morris, S; Chandler, D; Steiner, H-Y; Specker, N; Hunt, M; Neuenschwander, UH; Lawton, K; Starrett, M; Friedrich, L; Weymann, K; Negrotto, D; Görlach, J; Lanahn, M; Salmeron, J; Ward, E; Kessmann, H; Ryals, J. 1996. Reduction of risk for growers: Methods for development of disease-resistant crops. *New Phytologist* 133:3-10.
- Van Etten, HD; Sandrock, RW; Wasmann, CC; Soby, SD; McCluskey, K; Wang, P. 1995. Detoxification of phytoalexins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany* 73: 518-525.
- Van Loon, LC; Van Kammen, RT. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- Van Loon, LC; Van Strien, EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97
- Vand der Plank, JE. 1968. Disease resistance in plants. New York, Academic Press. 206 p.
- Whitham, S; Dinesh-Kumar, SP; Choi, D; Hehl, R; Corr, C; Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-1115.
- Whitham, S; McCormick, S; Baker. 1996. The N of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 93:8776-8781.