

Introducción al sistema inmune en plantas

Katia Ojito-Ramos¹ y Orelvis Portal^{2*} *Autor para correspondencia

¹ Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: orelvis@ibp.co.cu

RESUMEN

Muchas plantas son invadidas por microorganismos patógenos que deterioran su crecimiento y reproducción. Las plantas poseen un sistema de defensa que va desde barreras físicas hasta señales moleculares y sistémicas, similares a la inmunidad innata en animales. Este sistema actúa de dos formas fundamentales: la primera responde a moléculas comunes de muchas clases de microorganismos patógenos y no patógenos y la segunda responde directamente a factores de virulencia de los patógenos o a sus efectores en el hospedante. El conocimiento detallado del sistema inmune de las plantas y las relaciones moleculares evolutivas que se establecen entre los dos organismos permitirá una mejor comprensión de la interacción planta-patógeno. Ello redundaría en una mejor manipulación genética de las plantas con el objetivo de lograr resistencia a patógenos con una mejora de las cosechas para la producción de alimentos. En este trabajo se realiza un compendio sobre las características, interacciones moleculares y bioquímicas de los dos mecanismos de defensa en las plantas, así como las estrategias empleadas por los patógenos para suprimir ambas fases de la inmunidad.

Palabras clave: ETI, interacción planta-patógeno, PTI

ABSTRACT

Many plants are invaded by pathogenic microbes that worsen their growth and reproduction. Plants have a defense system that goes from physical barriers to molecular and systemic signals, similar to the animal innate immunity. This system acts of two fundamental forms; the first responds to common molecules of many kinds of pathogenic and nonpathogenic microbes and the second responds directly to virulence factors of the pathogens or to their effectors in the host. The detailed knowledge of the plant immune system and the evolutionary molecular relations that settle down between both organisms, will allow a better understanding of the plant-pathogen interaction. This will permit a better genetic manipulation of the plants aimed to obtain resistance to pathogens improving the food production. In this work a compendium is realized on the characteristics, molecular and biochemical interactions of both defense mechanisms in the plants, as well as the strategies used by pathogens to suppress both phases of the immunity.

Key works: ETI, plant-pathogen interaction, PTI

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

INMUNIDAD ACTIVADA POR PAMP, PTI

PAMP/MAMP

PAMP en oomycetes y hongos

PAMP en bacterias

PRR

Señalización del reconocimiento PAMP-PRR

Supresión de la PTI por efectores patogénicos

INMUNIDAD ACTIVADA POR EFECTORES PATOGÉNICOS, ETI

Efectores patogénicos

Efectores patogénicos bacterianos

Efectores patogénicos de hongos

Efectores patogénicos de virus

Reconocimiento directo e indirecto de efectores patogénicos
 Resistencia gen por gen
 Resistencia por arquitectura de dominios proteicos
 Activadores endógenos
 Evasión de la ETI por parte de los patógenos
 CONSIDERACIONES FINALES

INTRODUCCIÓN

Las plantas a diferencia de los animales, son organismos sésiles que carecen de un sistema circulatorio, de células móviles para la defensa y de un sistema inmune adaptativo. Además, están sujetas al cambio de condiciones ambientales, incluyendo el constante ataque de agentes patógenos. Sin embargo, poseen mecanismos de defensa que van desde barreras físicas (películas de cera en la superficie de sus órganos, paredes celulares rígidas, etc.), hasta potentes mecanismos moleculares de resistencia en cada célula y señales sistémicas provenientes del sitio de la infección que tienen marcadas similitudes con la inmunidad innata de los animales (Zipfel, 2008; Boller y He, 2009).

Por muchos años las investigaciones sobre la respuesta defensiva de las plantas ante la presencia de patógenos fue muy pobre y muchos aspectos no eran entendidos. Durante la década de los 90 del siglo pasado, muchas investigaciones se encaminaron a estudiar las interacciones moleculares y bioquímicas que tenían lugar en la interacción planta-patógeno. Por ejemplo, Dangl y Jones (2001), realizaron una revisión sobre el polimorfismo de los loci de resistencia a enfermedad (R) en plantas silvestres, la diversidad de las proteínas R, y la respuesta celular provocada por la activación de estas proteínas. Además, ellos propusieron como hipótesis que las proteínas R de las plantas podrían ser activadas indirectamente por efectores codificados por patógenos y no por su reconocimiento directo. Hoy se sabe que el sistema inmune de las plantas está constituido por una inmunidad innata que actúa de dos formas fundamentales: la primera está basada en un reconocimiento de PAMP (del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*), mediante receptores que reconocen estos patrones (PRRs, del inglés: *pattern recognition receptors*) y que se encuentran en la superficie de las células vegetales, y se denomina PTI (del inglés: *PAMP-triggered immunity*). Sin embargo, hay patógenos

exitosos que producen efectores que inhiben la PTI, los cuales son reconocidos por las plantas mediante receptores adicionales, proteínas NB-LRR (del inglés: *nucleotide-binding leucine-rich repeat*), los cuales desencadenan respuestas efectoras contra estos que constituyen la segunda forma de actuación de la inmunidad innata y se denomina ETI (del inglés: *effector-triggered immunity*) (Jones y Dangl, 2006; He *et al.*, 2007; Boller y He, 2009).

Aunque la importancia de la ETI, antiguamente denominada como resistencia gen por gen (Van Der Biezen y Jones, 1998), y su manera de actuación está bien establecida, recientemente es que se comenzaron a realizar investigaciones sobre el papel de la PTI en la interacción planta-patógeno y la relación entre las dos formas de respuesta del sistema inmune. Jones y Dangl (2006), plantearon que la respuesta del sistema inmune en las plantas podía ser representado en un modelo zigzag de cuatro fases (Figura 1).

En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por los PRRs, lo que resulta en la activación de la PTI, que puede detener la colonización adicional del tejido vegetal. En la fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que contribuyen a la virulencia, los que pueden interferir con la PTI, y esto resulta en una ETS (del inglés: *effector-triggered susceptibility*). En la fase 3, determinados efectores son reconocidos por una de las proteínas NB-LRR, resultando en la activación de la ETI, la cual es una respuesta acelerada y amplificada de PTI, lo que conlleva a la resistencia a la enfermedad y casi siempre, a una respuesta de muerte celular programada en el sitio de la infección. En la fase 4, la selección natural conduce al patógeno a evitar la ETI eliminando o diversificando el gen efector reconocido o adquiriendo determinantes antigénicos o efectores adicionales, que les permiten evadir la ETI. A su vez, en las plantas la selección natural da lugar a nuevas especificidades R, que deriva en el accionar la ETI nuevamente.

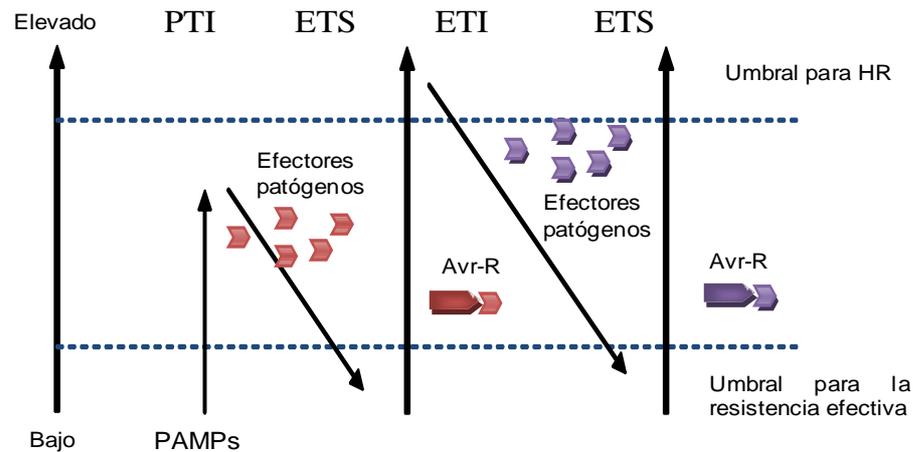


Figura 1. Modelo de zigzag que ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune en plantas (Jones y Dangl, 2006 modificado).

En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por los PRRs, lo que resulta en la activación de la PTI, que puede detener la colonización adicional del tejido vegetal. En la fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que contribuyen a la virulencia, los que pueden interferir con la PTI, y esto resulta en una ETS (del inglés: *effector-triggered susceptibility*). En la fase 3, determinados efectores son reconocidos por una de las proteínas NB-LRR, resultando en la activación de la ETI, la cual es una respuesta acelerada y amplificada de PTI, lo que conlleva a la resistencia a la enfermedad y casi siempre, a una respuesta de muerte celular programada en el sitio de la infección. En la fase 4, la selección natural conduce al patógeno a evitar la ETI eliminando o diversificando el gen efector reconocido o adquiriendo determinantes antigénicos o efectores adicionales, que les permiten evadir la ETI. A su vez, en las plantas la selección natural da lugar a nuevas especificidades R, que deriva en el accionar la ETI nuevamente.

En este trabajo se realiza un compendio de la información encontrada en la literatura científica reciente sobre las características, interacciones moleculares y bioquímicas, y forma de acción tanto de la PTI, como de la ETI, así como las estrategias empleadas por los patógenos para suprimir ambas fases de la inmunidad en plantas.

INMUNIDAD ACTIVADA POR PAMP, PTI

Para que se produzca el proceso de infección, la mayoría de los patógenos deben tener acceso al interior de la planta, penetrando la hoja o la superficie de la raíz, de manera directa o entrando a través de heridas o aberturas naturales como los estomas. Una vez en el interior de la planta, los microorganismos se enfrentan con otro obstáculo: la pared celular de célula vegetal. La penetración de la pared celular expone la membrana plasmática del hospedante al microorganismo, donde se encuentran los receptores superficiales extracelulares que reconocen los PAMPs (Chisholm *et al.*, 2006).

Las plantas detectan inicialmente los microorganismos a través de la percepción de los PAMPs mediante sus PRRs situados en la superficie celular. Este primer nivel de reconocimiento, como se refirió anteriormente, es el asociado con la PTI, cuya importancia se hizo evidente por la gran susceptibilidad a bacterias que presentan mutantes de PRR o de los componentes de la PTI (Schwessinger y Zipfel, 2008).

Las respuestas intracelulares asociadas a la PTI incluyen una rápida difusión de iones a través de la membrana plasmática, la activación de la cascada de proteínas MAPK (del inglés: *mitogen-activated protein kinase*), la producción de especies reactivas del oxígeno, rápidos cambios en la expresión de genes y un reforzamiento de la pared celular (He *et al.*, 2007; Zipfel, 2008).

PAMP/ MAMP

Los PAMPs son definidos como epítomos invariantes dentro de moléculas conservadas, indispensables para los microorganismos patógenos, ausentes en plantas y reconocidos por un gran número de hospedantes potenciales (Schwessinger y Zipfel, 2008), por lo tanto es difícil su transformación o supresión (Jones y Dangl, 2006; Boller y He, 2009). Existen autores que los denominan MAMP (del inglés: *microbe-associated molecular pattern*), pues no los restringen a microorganismos patógenos (Zipfel, 2008).

PAMP en oomycetes y hongos

Pep13 fue la primera molécula claramente definida como un PAMP (He *et al.*, 2007). Es un pequeño péptido de 13 aminoácidos, de un fragmento conservado de la superficie expuesta dentro de una transglutaminasa calcio-dependiente de la membrana celular del oomycete *Phytophthora sojae* que desencadena respuestas defensivas en plantas de la familia *Solanaceae*. También ha sido demostrado que una lectina celulosa-obligada de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* desencadena respuestas defensivas en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Dos dominios de esta proteína, probablemente con importancia en la adhesión celular durante la infección, son suficientes para inducir la defensa (Schwessinger y Zipfel, 2008).

Los restantes PAMP de hongos más ampliamente reconocidos se derivan de los componentes de la membrana celular de estos patógenos, tales como β -glucanos, ergosterol o quitina (He *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007).

PAMP en bacterias

Muchas son las especies de plantas capaces de reconocer gran variedad de PAMP bacterianos, como por ejemplo lipopolisacáridos (LPS) (He *et al.*, 2007). El principal LPS reconocido como PAMP es el lípido A, molécula altamente conservada en las bacterias. Sin embargo, en *A. thaliana* también se reconocen oligosacáridos de base estructural antigénicas O, potencialmente, por un sistema de reconocimiento diferente al del lípido A. Además de estas moléculas, también

los peptidoglicanos son uno de los componentes esenciales de las membranas celulares de bacterias Gram positivas; en *A. thaliana* lo que se reconoce como PAMP son las cadenas de azúcares y no la región proteica (Schwessinger y Zipfel, 2008).

El PAMP mejor caracterizado en plantas es la proteína flagelina, componente importante del flagelo de las eubacterias. La mayoría de las especies de plantas reconocen un epítomo altamente conservado de 22 aminoácidos en el dominio N-terminal, denominado flg22 (Heese *et al.*, 2007; Zipfel, 2008), que es el PAMP arquetipo de la PTI (He *et al.*, 2007; Boller y He, 2009). Esta proteína es la encargada de la motilidad del flagelo bacteriano, característica muy importante para su patogenicidad en plantas. El reconocimiento de este epítomo es suficiente para inducir varias respuestas celulares, incluyendo una rápida (<1h) inducción transcripcional de al menos 1 100 genes en *A. thaliana* (Jones y Dangl, 2006). Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pueden reconocer una versión más corta del mismo epítomo (flg15) y plantas de arroz (*Oriza sativa* L.) parecen insensibles a flg22, pero pueden reconocer la flagelina íntegra (Schwessinger y Zipfel, 2008).

No todos los PAMP forman parte de entidades extracelulares. Las proteínas bacterianas CSP (del inglés: *cold shock protein*) y el factor de elongación Tu (EF-Tu), son las proteínas intracelulares más conocidas como PAMPs (He *et al.*, 2007). La base de 22 aminoácidos (cps22) del dominio 1 ARN-dependiente y los 18 aminoácidos N-acetilados del N-terminal de EF-Tu (elf18), son reconocidos por miembros de las familias *Solanaceae* y *Brassicaceae*, respectivamente (Schwessinger y Zipfel, 2008).

PRR

Los PRRs tienen gran afinidad y especificidad, son capaces de reconocer un PAMP específico a concentraciones por debajo de los nanomoles (Ryan *et al.*, 2007; Boller y He, 2009). En plantas, el PRR mejor estudiado es el FLS2 (del inglés: *flegellin sensitive 2*), y es el responsable del reconocimiento de la flagelina en *A. thaliana*. Son proteínas transmembranales compuestas por un ectodominio de repeticiones ricas en Leu, un dominio transmembrana y otro unido a

proteínas quinasas mediante una unión Ser-Thr (He *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007). Aunque el sitio exacto de unión al flg22 es desconocido, FLS2 se une directamente a este epítipo y contribuye a la especificidad del reconocimiento (Asai *et al.*, 2002; Zipfel, 2008).

En la mayoría de las plantas, de las cuales la información genética está disponible, se ha encontrado que existen ortólogos de FLS2 (Tiffin y Moeller, 2006; Pajonk *et al.*, 2008; Boller y He, 2009), lo que indica que el reconocimiento de esta proteína mediante el FLS2 se ha conservado a lo largo del proceso evolutivo. Comparaciones entre estas proteínas serían útiles para determinar los sitios moleculares de unión, pues en *A. thaliana* y en tomate existen diferentes especificidades de reconocimiento para la flagelina (Schwessinger y Zipfel, 2008). A pesar de la importancia del reconocimiento FLS2-flg22, como modelo para estudiar el reconocimiento PAMP y la señalización asociada, en ciertas especies de plantas, la flagelina parece ser reconocida por otras vías (Zipfel, 2008). En arroz no hay respuesta al epítipo flg22, pero la flagelina induce la muerte celular, indicativa de una respuesta de defensa en esta especie.

El EF-Tu es reconocido como PAMP en *A. thaliana* y otros miembros de la familia *Brassicaceae*, pero no en otras dicotiledóneas o monocotiledóneas, lo que indica que esta interacción es evolutivamente más reciente (Tiffin y Moeller, 2006; Boller y He, 2009). El elf18, es suficiente para accionar la respuesta de defensa inducida por el EF-Tu (Ryan *et al.*, 2007; Zipfel, 2008). Péptidos derivados del EF-Tu de la mitocondria o del plastidio de la planta, son inactivos como PAMP, lo que revela que en las plantas también existe una discriminación entre lo propio y lo no propio. El PRR que reconoce el EF-Tu es el denominado EFR (del inglés: *EF-Tu receptor*), y pertenece a la misma subfamilia que el FLS2 (Jones y Dangl, 2006).

El FLS2 y el EFR son hasta ahora los únicos PRR conocidos en *A. thaliana*, pero también los únicos conocidos que reconocen PAMPs bacterianos en plantas (Zipfel, 2008).

Receptores de MAMP para ciertas proteínas y fragmentos de quitina de hongos han sido identificados como receptores de superficie sin

dominio quinasas en plantas (He *et al.*, 2007). El reconocimiento de la proteína de 22-kDa EIX (del inglés: *ethylene-inducing xylanase*) activa las respuestas de defensa independiente de su actividad enzimática en muchas especies de plantas. En tomate, han sido identificados dos genes, *LeEix1* y *LeEix2*, que codifican para las proteínas receptoras de EIX LeEIX1 y LeEIX2 (Zipfel, 2008). Los RLP (del inglés: *receptor-like proteins*) son proteínas transmembranales con dominios de repeticiones ricos en Leu y una cola citoplasmática corta (He *et al.*, 2007). Aunque ambas proteínas son capaces de unirse a EIX independientemente, solo LeEIX2 confiere señalización cuando está expresada heterológamente en tabaco.

En arroz ha sido identificada una proteína de alta afinidad de unión a la quitina, un α -1,4-polímero de N-acetilglucosamina que es el componente estructural más abundante de la pared celular de los hongos. El receptor para este oligosacárido (CEBiP) es una proteína transmembranal, con dos dominios extracelulares de Lys y una cola citoplasmática corta. Silenciar la expresión de CEBiP, conlleva a la reducción de la especificidad en la unión y en la respuesta desencadenada por la quitina en cultivos celulares de arroz (Zipfel, 2008).

Señalización del reconocimiento PAMP-PRR

Los PRRs, por sí mismos, no pueden emitir la señal al interior de la célula. El reconocimiento de los PAMPs acciona diversos cambios moleculares y fisiológicos. Entre segundos y minutos después de este reconocimiento, se incrementa el flujo de iones a través de la membrana plasmática, y aumenta notablemente la concentración de Ca²⁺, se activan las proteínas MAPK, ocurre la fosforilación de varias proteínas, la producción de especies reactivas del oxígeno, la endocitosis del receptor e interacciones proteínas-proteínas, y ya a los 30 minutos se inducen los cambios transcripcionales (Kwon *et al.*, 2008; Schwessinger y Zipfel, 2008).

Muchos genes que codifican RLK (del inglés: *receptor-like kinase*), tal como *FLS2* y *EFR*, son MAMP-inducibles (Tiffin y Moeller, 2006; He *et al.*, 2007), sin embargo, los niveles de proteínas receptoras son rigurosamente controlados por su unión al ligando. Mediante

análisis de microarreglos se ha observado que la respuesta de defensa en plantas de *A. thaliana* inducidas por elf18 y flg22 son similares a las señales receptor-ligando y convergen en las cascadas de las MAPK. Tratamientos previos de *A. thaliana* con flg22 o elf18 aumentaron la resistencia contra *Pseudomonas syringae* (Asai *et al.*, 2002; Zipfel, 2008; Ryan *et al.*, 2007). Una observación interesante fue que las plantas con un EFR defectuoso eran más susceptibles a la infección por *Agrobacterium tumefaciens* que las plantas silvestres, indicando que las plantas pueden resistir la infección de *A. tumefaciens* por activación de la respuesta inmune natural.

Evidencias sugieren que los receptores experimentan endocitosis después del reconocimiento de la señal de MAMP (He *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2008). En presencia de flg22, la membrana donde se encuentra localizado FLS2, acumula rápidamente vesículas intracelulares que son seguidas probablemente por la degradación (Schwessinger y Zipfel, 2008). Esta internalización depende de la actividad de las quinasas y requiere la ubiquitinación de motivos en el extremo C-terminal del FLS2 (Yun *et al.*, 2008).

El primer paso de la señalización del receptor FLS2 es la interacción de este con BRI1 (del inglés: *brassinosteroid insensitive 1*) asociadas a quinasas (BAK1) (Boller y He, 2009). Este descubrimiento fue una sorpresa pues anteriormente se conocía a BAK1 como un correceptor del receptor de hormonas brasinosteroides BRI1 (Zipfel, 2008). Las BAK1 no están involucradas en la unión de FLS2 con flg22, por lo tanto, BAK no actúa como un correceptor, más bien como una señal de transducción probablemente relacionada con su actividad quinasa (Schwessinger y Zipfel, 2008).

Heese *et al.* (2007) identificaron a un receptor quinasa de embriogénesis somática, SERK3, asociado a BAK1, SERK3/BAK1, como un factor implicado en la PTI. La interacción SERK3/BAK1 se requiere para las respuestas tempranas a PAMPs y para incorporar rápidamente el complejo flg22 inducido. Por ello, se especula que en respuestas a PAMPs, SERK3/BAK1 actúa de forma semejante a su papel en la señalización del BR (brasinoesteroide) asociado al receptor BRI1. La implicación de SERK3/BAK1 en PTI

proporciona evidencia de concordancias entre la inmunidad de la planta y la señalización del BR, consistente con el papel conocido para SR160/tBRI1 en tomate en la señalización sistémica derivado de una invasión o daño (Heese *et al.*, 2007).

El reconocimiento de flg22 por su receptor FLS2 en *A. thaliana*, causa formación de callos, una inhibición fuerte del crecimiento celular, y la expresión de los genes de defensa PDF1.2, PR-1 y PR-5 (Ryan *et al.*, 2007). Estos genes se activan mediante dos vías de señalización, una mediada por el MeJA/Et (del inglés: *methyl jasmonate/ethylene*) y otra por el ácido salicílico (SA) (Schwessinger y Zipfel, 2008), lo que indica que el mismo PAMP puede activar múltiples cascadas de señalización.

En leguminosas, una proteína soluble de unión a β -glucano (GBP), es el punto de enlace específico para los 1,6- β y 1,3- β -heptaglucósidos (HG) presentes en la pared celular del oomycete *Phytophthora sojae*. De modo interesante, GBP también exhibe una actividad endo-1,3- β -glucanasa-intrínseca. Por lo tanto puede, potencialmente, liberar y unir ligandos durante el contacto con *P. sojae*. Esto y el hecho de que existan ortólogos de GBP en muchas especies de plantas insensibles a GBP, sugieren que la señalización después del reconocimiento de HG requiere de componentes adicionales aun no conocidos (Zipfel, 2008).

Supresión de la PTI por efectores patogénicos

A pesar de la efectividad de todos estos mecanismos moleculares que se han descrito anteriormente, existen muchos patógenos exitosos que han desarrollado factores de virulencia para evadir o suprimir la PTI, como pueden ser, incluyendo fitotoxinas, polisacáridos extracelulares y efectores proteicos, la mayoría de los cuales se secretan mediante el sistema de secreción tipo III, denominado TTSS o T3SS (del inglés: *type III secretion system*) (He *et al.*, 2007). Las bacterias patógenas de plantas pueden introducir de 15 a 30 efectores dentro de las células del hospedante usando el TTSS (Jones y Dangl, 2006).

Los efectores bacterianos contribuyen a la virulencia del patógeno, ya sea mimetizando o

inhibiendo las funciones celulares. Dos efectores secretados por *P. syringae*: AvrPto y AvrPtoB, interactúan físicamente con el dominio quinasa de FLS2, EFR y BAK1 (Heese *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007; Shen y Schulze, 2007), e inhiben la actividad quinasa de los PRRs (Boller y He, 2009) o interfieren con la formación del complejo FLS2-BAK1 (Boller y He, 2009). El extremo N-terminal de las proteínas AvrPto y AvrPtoB contribuye a la virulencia y el C-terminal, que se parece al de la ubiquitina ligasa; inicia la degradación de los PRRs, siendo este el papel más importante en la evasión de la PTI (Jones y Dangl, 2006; Schwessinger y Zipfel, 2008). No todas las bacterias, incluso no todas las cepas de *P. syringae*, expresan estas proteínas, lo cual sugiere que existen otras estrategias para inhibir las señales de los PRRs. De hecho, el efector HopAl1, presente en muchas pero no todas las cepas de *P. syringae*, es una fosfotreonina-liasa que desfosforila las proteínas quinasas MPK3 y MPK6, terminales en la cascada de señalización de los PRRs (Boller y He, 2009). Igualmente, existen otras proteínas de esta misma familia de las desfosforilasas-quinatas involucradas en la respuesta inmune innata de animales, lo que muestra que los patógenos emplean las mismas formas para evadir y modular la respuesta inmune de los hospedantes ya sea plantas o animales.

Otros tipos de efectores atacan directamente los procesos que están por debajo de la cascada de señalización, y traen otras consecuencias (Boller y He, 2009). Por ejemplo, el efector HopU1 de *P. syringae* modifica varias proteínas unidas a ácido ribonucleico (ARN) de *A. thaliana*, incluyendo GRP7, por ribosilación del disfosfato de adenisina. HopM1, otro efector de *P. syringae*, desencadena la degradación de la proteína MIN7 de *A. thaliana*, la cual es miembro de la familia ARF de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina involucrados en el tráfico vesicular. Las plantas que no expresan *grp7* o *min7* son susceptibles a las infecciones bacterianas, lo que implica el metabolismo del ARN y el tráfico vesicular, como parte de la respuesta inmune de la planta a patógenos. El efector HopI1 de *P. syringae* reside en los cloroplastos, su acción, presumiblemente ocurre a través de interacciones con las chaperonas Hsp70 y suprime la acumulación de SA. Estos y otros efectores de *P. syringae*, como son: AvrRpm1, AvrB y AvrRpt2, interactúan con proteínas

modificadas como RIN4 y RAR1 que participan en la respuesta inmune contra patógenos (He *et al.*, 2007).

Los efectores de patógenos eucarióticos de plantas han sido menos estudiados. Efectores de hongos y de oomycetes pueden actuar tanto en la matriz extracelular o en el interior de la célula del hospedante. Por ejemplo, los RLP de tomate, Cf-2, Cf-4, Cf-5 y Cf-9 responden específicamente a los efectores extracelulares producidos por *Cladosporium fulvum* (Bednarek *et al.*, 2009). Otros, a su vez, actúan probablemente dentro de la célula del hospedante y son reconocidos por las proteínas de NB-LRR. Por ejemplo, el gen que codifica para el efector Atr13 de *Hyaloperonospora parasitica* exhibe una gran diversidad alélica entre las cepas de *H. parasitica* marcadas por la diversidad correspondiente al locus RPP13 NB-LRR de *A. thaliana* (Jones y Dangl, 2006). Aun se desconoce cómo estos efectores de hongos y oomycetes son liberados al interior de la célula y cómo contribuyen a la virulencia.

Varias bacterias patógenas pueden evadir la PTI, interfiriendo en el reconocimiento de los PAMPs. La flagelina de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* tiene polimorfismo dentro de la especie que conlleva que *A. thaliana* no pueda reconocer el epítipo «disfrazado» (Schwessinger y Zipfel, 2008), de manera tal que se hace irreconocible por el FLS2.

INMUNIDAD ACTIVADA POR EFECTORES PATOGENICOS, ETI

Durante el proceso evolutivo, una vez que los patógenos adquirieron la capacidad de suprimir las defensas primarias, las plantas desarrollaron un mecanismo especializado para detectarlos, entre éstos está un sistema de reconocimiento genético del patógeno, controlado por los genes de resistencia del hospedante. En este sistema de resistencia denominado gen-por-gen, los genes R de la planta confieren resistencia al patógeno que contiene, a su vez, los genes correspondientes de avirulencia (Avr), llamados así, porque su presencia previene el desarrollo de la enfermedad. Los eventos de reconocimiento implican los productos de los genes R y Avr desencadenantes de las respuestas de la defensa del hospedante, incluyendo la muerte

localizada de la célula hospedante o una respuesta hipersensible (HR) que limita la propagación del patógeno. Se conoce que las proteínas de resistencia de la planta, proteínas NB-LRR, contienen un sitio de enlace a nucleótidos (NB) y dominios ricos de repetición de Leu (LRR), este último implicado en el reconocimiento del patógeno. En cambio, las proteínas Avr son diversas, y muchas tienen funciones importantes en el proceso de infección. La relación antagónica entre los genes de R y Avr da lugar a conflictos co-evolutivos, la selección favorece la evolución de la resistencia en plantas y de la virulencia en los patógenos (Dodds *et al.*, 2006).

La ETI es, probablemente, una de las formas de mayor alcance en respuestas de defensa en plantas (He *et al.*, 2007). La mayoría de los genes R codifican para las proteínas NB-LRR; existen aproximadamente 125 en el genoma de *A. thaliana*. Si un efector es reconocido por la proteína NB-LRR correspondiente, se activa ETI, que es más rápida y fuerte que PTI y a menudo culmina en una HR. La HR no se extiende normalmente más allá de la célula infectada: puede retardar el crecimiento del patógeno en algunas interacciones, particularmente las que involucran patógenos formadores de haustorios, pero no siempre se puede observar, ni se requieren, para ETI (Jones y Dangl, 2006).

Efectores patogénicos

Se conoce que los patógenos bacterianos de animales pueden secretar solamente un número limitado de efectores dentro de las células del hospedante. Sin embargo, los patógenos de las plantas tales como *P. syringae* pueden secretar aproximadamente de 20 a 30 efectores durante la infección. Los efectores promueven la patogenicidad, y el TTSS es esencial para el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y la multiplicación bacteriana (Chisholm *et al.*, 2006). Por su acción colectiva, se ha considerado la hipótesis de que los efectores alteran la fisiología vegetal en hospedantes susceptibles para sostener el crecimiento del patógeno. Las proteínas efectoras de hongos y bacterias, que se liberan a las plantas pueden poseer actividad enzimática (Tabla 1). Estas enzimas son responsables de modificar las proteínas del hospedante para aumentar la virulencia del patógeno y evadir su detección. Los patógenos se deben proteger contra estas actividades

enzimáticas efectoras potencialmente perjudiciales.

Del gran número de proteínas efectoras bacterianas que han sido clonadas, sólo unas pocas se han caracterizado bioquímicamente (Chisholm *et al.*, 2006).

Se ha comprobado que los efectores de *P. syringae*, AvrPto, AvrRpt2 y AvrRpm1, inhiben las respuestas de defensa desencadenadas por el reconocimiento de PAMPs (Hauck *et al.*, 2003). Además, los efectores de una cepa de *Xanthomonas campestris* suprimen la respuesta de defensa de la planta al PAMP lipopolisacárido bacteriano.

Las proteínas efectoras bacterianas también están implicadas en la activación de la transcripción en plantas. Miembros de la familia de efectores AvrBs3 de *Xanthomonas* (AvrBs3, AvrXa10, y AvrXa7) contienen un C-terminal NLS (del inglés: *nuclear localization signal*) y un dominio DAA (del inglés: *acidic transcriptional activation domain*), características que presuponen que actúen en el núcleo de la célula vegetal. De hecho, el NLS de AvrBs3 es funcional, y el DAA de AvrXa10 es capaz de activar la transcripción de los genes reporteros en *A. thaliana*. Además, AvrXa7 une dA/dT a las secuencias de doble cadena del ADN (Chisholm *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que la familia de efectores AvrBs3 altera la transcripción nuclear de genes de la planta durante la infección del patógeno.

Muchos patógenos producen pequeñas moléculas efectoras que mimetizan las hormonas de las plantas (Jones y Dangl, 2006). Existen tres moléculas señalizadoras que regulan la defensa de la planta contra los ataques microbianos: el SA, el ácido jasmónico (JA), y el etileno (Wiermer *et al.*, 2005). La señalización etileno-dependiente es importante para la respuesta de la planta ante el ataque de los patógenos, ante una herida mecánica y/o inducida por herbívoros. La señalización SA-dependiente es crítica en el establecimiento de resistencia bacteriana local y sistémica, mientras que la señalización JA-dependiente se induce en respuesta a la herida y a la depredación mecánica de herbívoros. Las rutas de señalización de la defensa a través del SA y de JA son, generalmente, antagónicas, y los patógenos bacterianos se han desarrollado para suprimir las respuestas de la defensa mediadas por el SA (Chisholm *et al.*, 2006).

Tabla 1. Actividad enzimática de efectores y activadores de hongos y bacterias liberados contra las plantas (Chisholm *et al.*, 2006 modificado).

Efactor	Organismo	Función bioquímica	Genes R	Referencias
AvrRpt2	<i>Pseudomonas syringae</i>	Proteasa	<i>RPS2</i>	Mudgett, 2005
AvrB	<i>P. syringae</i>	-	<i>RPM1</i>	Mudgett, 2005
AvrRpm1	<i>P. syringae</i>	-	<i>RPM1</i>	Mudgett, 2005
HopPtoD2	<i>P. syringae</i>	Proteína fosfatasa	-	Mudgett, 2005
AvrPphB	<i>P. syringae</i>	Proteasa	<i>RPS5</i>	Mudgett, 2005
AvrPtoB	<i>P. syringae</i>	E3 ligasa y enzima ubiquitin-conjugasa	<i>Pto</i>	Janjusevic <i>et al.</i> , 2005
XopD	<i>Xanthomonas campestris</i>	Cys-proteasa	-	Mudgett, 2005
AvrXv4	<i>X. campestris</i>	Cys-proteasa	<i>XV4</i>	Mudgett, 2005
AvrBsT	<i>X. campestris</i>	Cys-proteasa	-	Mudgett, 2005
Avr2	<i>Cladosporium fulvum</i>	Inhibidor de proteasas	<i>Cf-2</i>	Rooney <i>et al.</i> , 2005
Avr4	<i>C. fulvum</i>	Quitina ligando	<i>Cf-4</i>	van den Burg <i>et al.</i> , 2003
Avr-Pita	<i>Magnaporthe grisea</i>	Metaloproteasas	<i>Pi-ta</i>	Jia <i>et al.</i> , 2000
Pep-13	<i>Phytophthora sojae</i>	Trasglutaminasa calcio dependiente de la pared celular	Activador	Brunner <i>et al.</i> , 2002
EPI10	<i>Phytophthora infestans</i>	Inhibidor de proteasas	Activador	Tian <i>et al.</i> , 2005
EPI1	<i>P. infestans</i>	Inhibidor de proteasas	Activador	Tian <i>et al.</i> , 2004

Efectores patogénicos bacterianos

Del gran número de proteínas efectoras bacterianas que han sido clonadas, sólo unas pocas se han caracterizado bioquímicamente (Chisholm *et al.*, 2006).

Se ha comprobado que los efectores de *P. syringae*, AvrPto, AvrRpt2 y AvrRpm1, inhiben las respuestas de defensa desencadenadas por el reconocimiento de PAMPs (Hauck *et al.*, 2003). Además, los efectores de una cepa de *Xanthomonas campestris* suprimen la respuesta de defensa de la planta al PAMP lipopolisacárido bacteriano.

Las proteínas efectoras bacterianas también están implicadas en la activación

de la transcripción en plantas. Miembros de la familia de efectores AvrBs3 de *Xanthomonas* (AvrBs3, AvrXa10, y AvrXa7) contienen un C-terminal NLS (del inglés: *nuclear localization signal*) y un dominio DAA (del inglés: *acidic transcriptional activation domain*), características que presuponen que actúen en el núcleo de la célula vegetal. De hecho, el NLS de AvrBs3 es funcional, y el DAA de AvrXa10 es capaz de activar la transcripción de los genes reporteros en *A. thaliana*. Además, AvrXa7 une dA/dT a las secuencias de doble cadena del ADN (Chisholm *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que la familia de efectores AvrBs3 altera la transcripción nuclear de genes de la planta durante la infección del patógeno.

Muchos patógenos producen pequeñas moléculas efectoras que mimetizan las hormonas de las plantas (Jones y Dangl, 2006). Existen tres moléculas señalizadoras que regulan la defensa de la planta contra los ataques microbianos: el SA, el ácido jasmónico (JA), y el etileno (Wiermer *et al.*, 2005). La señalización etileno-dependiente es importante para la respuesta de la planta ante el ataque de los patógenos, ante una herida mecánica y/o inducida por herbívoros. La señalización SA-dependiente es crítica en el establecimiento de resistencia bacteriana local y sistémica, mientras que la señalización JA-dependiente se induce en respuesta a la herida y a la depredación mecánica de herbívoros. Las rutas de señalización de la defensa a través del SA y de JA son, generalmente, antagónicas, y los patógenos bacterianos se han desarrollado para suprimir las respuestas de la defensa mediadas por el SA (Chisholm *et al.*, 2006).

Durante la infección, las *Pseudomonas* producen coronatina, que consiste en dos componentes, ácido coronafácico y ácido coronámico, que son similares estructuralmente al JA y al ácido carboxílico aminociclopropano, precursor inmediato del etileno, respectivamente. De esta manera, la coronatina funciona como un imitador molecular de JA y suprime las respuestas del hospedante mediadas por SA lo que contribuye a la virulencia del patógeno. La coronatina no es el único efector bacteriano que interfiere con las respuestas de la defensa mediadas por SA, múltiples proteínas efectoras han sido utilizadas para manipular la vía de acción del JA, tales como: AvrB, AvrRpt2, AvrPphB, HopPtoK, y AvrPphEpt0 (He *et al.*, 2007).

Para ser exitosos, los patógenos necesitan superar múltiples respuestas de defensa. El fortalecimiento de la pared celular durante la infección, alcanzada por la deposición de calosa justo debajo del sitio de penetración, es una respuesta de defensa usual. Tres efectores de *P. syringae* evitan que las células de la planta establezcan tales defensas. AvrPto suprime la formación de papilas, mientras que AvrE y HopPtoM suprimen la deposición calosa durante la infección (Chisholm *et al.*, 2006).

Un componente central de la respuesta de resistencia de las plantas es la HR, una forma de muerte celular programada localizada en los sitios de infección. Se ha demostrado que algunas proteínas efectoras de *P. syringae* inhiben la HR,

aunque en la mayoría de los casos las bases moleculares de esta inhibición no son bien conocidas. Estos efectores podrían también inhibir la muerte celular desencadenada por la proteína pro-apoptótica Bax (Chisholm *et al.*, 2006).

Se ha informado que los efectores de *P. syringae*, AvrPtoB inhiben la ETI asociada a la muerte celular programada en plantas susceptibles de tomate, aunque este fenotipo no permite la predicción de la actividad enzimática. La cristalización del dominio del C-terminal de AvrPtoB, responsable de la inhibición de la muerte celular programada, reveló homología con componentes de proteínas E3, ubiquitina-ligasas eucarióticas (Jones y Takemoto, 2004). Además, se demostró que AvrPtoB posee actividad ubiquitina-ligasa *in vitro*, y que la mutación de los residuos dominantes eliminó esta actividad y su capacidad de inhibir la muerte celular *in vivo* (Chisholm *et al.*, 2006). Estos resultados sugirieron que AvrPtoB actúa como imitador de las ubiquitinas-ligasas en el hospedante, transfiriendo ubiquitina a las proteínas implicadas en la regulación de muerte celular programada en plantas.

El efector AvrRpt2 de *P. syringae* es una Cys-proteasa (Jones y Takemoto, 2004). La actividad de la proteasa de AvrRpt2 es esencial para el funcionamiento propio del patógeno y para la virulencia en el hospedante. Durante la infección, AvrRpt2 escinde el regulador RIN4 de la resistencia en *A. thaliana*.

Las proteínas AvrPto y AvrPtoB contienen un dominio C-terminal que se parece al de la ubiquitina-ligasa; la ubiquitinación de este dominio inicia la degradación de la quinasa en tomate (Fen) la cual forma parte de la vía de la ETI en esta planta (Jones y Dangl, 2006; Boller y He, 2009).

Efectores patogénicos de hongos

La mayoría de los hongos biotróficos tienen la capacidad de formar haustorios, una estructura especializada en la infección. Contrariamente a las bacterias Gram negativas, no se ha descubierto ningún TTSS para hongos patógenos, y sus efectores se pueden liberar a partir de los haustorios en el espacio intercelular (apoplasto) de la planta. Mientras que la actividad enzimática se ha demostrado para algunos determinantes de estos organismos, existe poca evidencia de su papel en la virulencia o la supresión de PTI (Chisholm *et al.*, 2006).

Un análisis a gran escala de proteínas secretadas por *Melampsora lini* identificó 21 proteínas secretadas (Tabla 2). Fue identificado el determinante AvrP123, dos secretaron las proteínas efectoras, AvrP4 y AvrM, que podían inducir ETI con muerte celular programada cuando se estaban expresando dentro de la célula de la planta, lo que sugiere que AvrP4 y AvrM secretadas están desplazados dentro de las células de la planta durante la infección.

Dos proteínas efectoras, Avr2 y Avr4, de *C. fulvum* se han caracterizado (Tablas 1 y 2). Avr2 codifica para una proteína rica en Cys que se une e inhibe la Cys-proteasa Rcr3 secretada por las plantas de tomate. El determinante Avr4 contiene un dominio obligatorio que une quitina, el componente mayoritario de las paredes celulares de los hongos (Chisholm *et al.*, 2006). Como mecanismo para percibir la quitina como PAMP, las plantas desarrollaron probablemente quitinasas para aumentar los polímeros activos de las membranas celulares de patógenos invasores, de manera tal que accionaran las respuestas de defensa. Para evadir el reconocimiento y la activación de las respuestas específicas de las plantas inducidas por quitina, el Avr4 de *C. fulvum* se une a las quitinasas del hongo en la pared celular.

Efectores patogénicos de virus

El principal medio a través del cual las plantas se defienden contra la infección viral es el silenciamiento del ARN viral, que regula la acumulación de moléculas endógenas y exógenas. La mayoría de los virus de las plantas tiene genomas de ARN, y las estructuras secundarias de doble cadena pueden accionar el silenciamiento del genoma viral en el hospedante, y prevenir la diseminación viral sistémica. Los efectores de la virulencia viral se pueden considerar los encargados de suprimir la respuesta silenciadora del ARN del hospedante. Se han identificado supresores en muchos virus de las plantas, y las funciones moleculares de varios de ellos han sido caracterizadas detalladamente (Chisholm *et al.*, 2006). Estos estudios determinaron que diversos supresores interfieren con los componentes únicos de la maquinaria silenciadora del hospedante, lo que sugiere que muchos virus desarrollaron independiente los medios para suprimir el silenciamiento. Naturalmente, las plantas utilizan un segundo mecanismo de defensa para reconocer y para restringir el movimiento del virus.

Las proteínas R específicas reconocen componentes virales de cualquier supresor y lo silencian; además pueden reconocer otras proteínas que se acumulen como resultado de la replicación viral.

Reconocimiento directo e indirecto de efectores patogénicos

Resistencia gen-por-gen

Como se ha descrito anteriormente, la evolución de las proteínas efectoras secretadas por los patógenos de plantas, llevó en última instancia a la adquisición de proteínas que reconocen específicamente estos determinantes bacterianos, de hongos y virales. Esta asociación en parejas que describe el reconocimiento de efectores dentro de la célula de la planta se ha caracterizado genéticamente como resistencia gen-por-gen (Van Der Biezen y Jones, 1998; Dang y Jones 2001). En presencia de una asociación efector-proteína R, la resistencia se activa, dando como resultado la iniciación de la señalización de defensa y de resistencia del hospedante. La resistencia se manifiesta como muerte celular localizada en el sitio de la infección y la inhibición del crecimiento del patógeno. Inversamente, en la ausencia de esta interacción, el patógeno elude la detección por la planta, dando por resultado la proliferación del patógeno y el inicio de la enfermedad.

Resistencia por arquitectura de dominios proteicos

Los efectores introducidos por los patógenos que evaden la PTI son reconocidos por los genes específicos R, la mayoría de los cuales codifican para las proteínas NB-LRR que constituyen la clase mayoritaria de proteínas resistentes de la resistencia gen-por-gen de las plantas (Jones y Takemoto, 2004; Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006). Más de 30 genes codifican para este tipo de proteínas. Esta familia multigénica ha sido aislada en varias especies de plantas, y constituyen un mecanismo de defensa eficiente que provee resistencia frente a diversos patógenos como insectos, nemátodos, hongos, bacterias y virus (Van Der Biezen y Jones, 1998). Estas proteínas de resistencia se expresan constitutivamente en la mayoría de las células con potencialidad de ser atacadas por patógenos, de esta manera se compensa la ausencia de un sistema circulatorio en las plantas.

Tabla 2. Resumen de efectores clonados de hongos y oomycetes (Chisholm *et al.*, 2006 modificado).

Efactor	Organismo	Características bioquímicas	Genes R	Referencias
Avr2	<i>Cladoposrium fulvum</i>	58 aa, proteína rica en Cys, inhibidor de proteasas	<i>Cf-2</i>	Rivas y Thomas, 2005
Avr4	<i>C. fulvum</i>	104 aa, proteína rica en Cys, dominios unidos a quitinas	<i>Cf-4</i>	Rivas y Thomas, 2005
Avr9	<i>C. fulvum</i>	63 aa, motivos de Cys	<i>Cf-9</i>	Rivas y Thomas, 2005
Ecp2	<i>C. fulvum</i>	165 aa, proteína rica en Cys	<i>Cf-ECP2</i>	Rivas y Thomas, 2005
Avr-Pita	<i>Magnaporthe grisea</i>	233 aa, metaloproteasas, protease	<i>Pi-ta</i>	Orbach <i>et al.</i> , 2000
PWL1, PWL2	<i>M. griseae</i>	145 aa, proteína rica en, Gly hidrofóbicas.	-	Lauge y De Wit, 1998
AVR2- YAMO	<i>M. griseae</i>	223 aa, homóloga a proteasas neutrales de Zn	-	Lauge y De Wit, 1998
AvrM	<i>Melampsora lini</i>	343-377 aa, múltiple residuos de Cys homólogos	<i>M</i>	Catanzariti <i>et al.</i> , 2005
AvrP4	<i>M. lini</i>	95 aa, proteína rica en Cys	<i>P4</i>	Catanzariti <i>et al.</i> , 2005
AvrP123	<i>M. lini</i>	117 aa, proteína rica en Cys, homologas de inhibidor de proteasas	<i>P1, P2, P3</i>	Catanzariti <i>et al.</i> , 2005
Nip1	<i>Rhynchosporium secalis</i>	82 aa, proteína rica en CysPasa, toxina	<i>Rrs1</i>	Lauge y De Wit, 1998
AvrL567	<i>M. lini</i>	150 aa, 285 aa, 225 aa, polimórficas	<i>L5, L6, L7</i>	Dodds <i>et al.</i> , 2004
ATR1	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	310 aa	<i>RPP1</i>	Rehmany <i>et al.</i> , 2005
ATR13	<i>H. parasitica</i>	153 aa	-	Allen <i>et al.</i> , 2004
Avr3a	<i>Phytophthora infestans</i>	147 aa	<i>R3a</i>	Armstrong <i>et al.</i> , 2005
Avr1b	<i>Phytophthora sojae</i>	138 aa	<i>Rps1b</i>	Shan <i>et al.</i> , 2004

Numerosas proteínas R han sido identificadas. Son moléculas citoplasmáticas, y además de las regiones NB y LRR mencionadas con anterioridad tiene varios dominios efectores en el extremo N-terminal (Takken *et al.*, 2006). Análisis comparativos de proteínas NB-LRR mostraron que los residuos de lámina a polares expuesto son hipervariables y sujetos a una presión selectiva para su diversificación, lo que indica que la especificidad de reconocimiento

reside en esta parte de los LRR (Jones y Takemoto, 2004; He *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007).

La región N-terminal está involucrada en la cascada de señalización, mientras que los sitios LRR, parecen estar implicados en la formación de interacciones proteína-proteína (Chisholm *et al.*, 2006) y en el reconocimiento específico del efector (Takken *et al.*, 2006). La

región N-terminal de algunas de estas proteínas es similar al dominio efector citoplasmático del receptor de IL-1 de *Drosophila melanogaster* y de humanos y se les conoce como dominios TIR (Wiermer *et al.*, 2005; Chisholm *et al.*, 2006). Otras proteínas NB-LRR tienen diferentes dominios N-terminal, que contienen frecuentemente motivos de Leu (LZ). Análisis de mutaciones en *A. thaliana* han revelado que las proteínas TIR-NB-LRR y las LZ-NB-LRR emplean diferentes vías de señalización; las que tienen el dominio efector TIR señalizan mediante lipasas mientras que la mayoría de las LZ-NB-LRR examinadas emplean proteínas asociadas a membranas. Sin embargo, ambas clases de proteínas confieren resistencia a más de un tipo de patógeno, lo que sugiere que no existe relación entre la estructura particular de las proteínas y la clase de patógeno, y que la planta puede emplear diferentes vías de resistencia contra el mismo patógeno (Van Der Biezen y Jones, 1998).

El dominio central NB comprende tres motivos para la unión al ATP o GTP y varios motivos conservados. Esta región de 320 residuos de aminoácidos tiene homología con dos activadores de apoptosis en células animales: APAF-1 y CED-4, por analogía con estos, se infiere que este dominio esté involucrado en la transducción de señales intramoleculares (Van Der Biezen y Jones, 1998).

Las LRR tienen un papel importante en la regulación negativa y positiva de actividad de las proteínas NB-LRR. La regulación negativa ocurre por varias mutaciones autoactivas que fueron identificadas en este dominio. La delección del dominio entero de LRR, sin embargo, da lugar normalmente a la actividad constitutiva (Takken *et al.*, 2006).

Las proteínas NB-LRR pueden servir como moléculas adaptadoras que unen el reconocimiento con la transducción de la señal. Por ejemplo, cuando las señales son percibidas por los LRR, se inicia la hidrólisis nucleotídica del dominio NB. Esto puede proveer la energía necesaria para un cambio conformacional en la proteína NB-LRR, y se expone la porción efectora N-terminal, lo que dispararía la respuesta de defensa.

La activación de NB-LRR produce una red de interrelaciones entre las vías de respuestas

inmunes activadas, en parte, para diferenciar el ataque de patógenos biotróficos y necrotrofos. Esto se mantiene por el equilibrio entre el SA, una señal local y sistémica para la resistencia contra muchos biotrofos, y la acumulación de la combinación de JA y del etileno como señales que promueven la defensa contra necrotrofos. La activación de NB-LRR induce respuestas diferenciales entre el SA y respuestas dependientes de especies reactivas del oxígeno. El comienzo de las oxidaciones de oxidasa NADPH-dependiente que acompaña a la activación de la ETI reprime la muerte celular SA-dependiente en las células circundantes al sitio de la infección (Jones y Dangl, 2006). Los cambios locales y sistémicos en la expresión genética son mediados, en gran medida, por los factores de transcripción de la familia WRKY y TGA. La reprogramación transcritiva de las células de la planta después de un ataque patógeno es extenso y afecta entre el 3 y 12% de los 24 000 genes probados de *A. thaliana* sobre ataques de hongos y bacterias, respectivamente (Shen y Schulze, 2007).

Varias proteínas NB-LRR reconocen efectores tipo III indirectamente, a través de la detección de los productos de su acción en blancos del hospedante, consistentemente con la 'hipótesis guardiana'. Los principios dominantes de esta hipótesis son: (1) un efector actúa como factor de virulencia cuando tiene un blanco en el hospedante; (2) el efector contribuye al éxito del patógeno y altera este blanco en genotipos susceptibles del hospedante; y (3) la perturbación del blanco en el hospedante, genera una modificación propia patógeno-inducida del patrón molecular, que activa las proteínas NB-LRR correspondiente. De este modelo se derivan consecuencias importantes: múltiples efectores podrían desarrollarse de forma independiente para manipular el mismo blanco en el hospedante, lo cual podría conducir a la evolución de más de una proteína NB-LRR asociada a un blanco de efectores múltiples; además, estas proteínas NB-LRR serían activadas por el reconocimiento de diversos patrones propios modificados producidos en el mismo blanco por la acción de estos efectores (Jones y Dangl, 2006).

Una segunda clase importante de genes R codifica para las proteínas extracelulares LRR (eLRR). Tres subclases de eLRR se han

clasificado según sus estructuras de dominio (Chisholm *et al.*, 2006). Estas subclases incluyen proteínas RLP (del inglés: *receptor-like proteins*) con un dominio LRR extracelular y uno transmembrana (TM), proteínas RLK (del inglés: *extracellular LRR*) con un dominio TM y una quinasa citoplasmática y la proteína PGIP (del inglés: *polygalacturonase inhibiting protein*) con un dominio LRR en la pared celular. La RLP mejor caracterizada son los genes *Cf* del tomate, que confieren resistencia a la infección por *C. fulvum*. El análisis bioquímico de las proteínas secretadas por *C. fulvum* durante su crecimiento dentro del apoplasto de las hojas de tomate llevó a la identificación de los activadores específicos Avr2, Avr4, y Avr9. Estos activadores gobiernan el reconocimiento del hongo por las plantas resistentes que llevan los genes de resistencia *Cf-2*, *Cf-4* y *Cf-9*, respectivamente. Aunque las proteínas *Cf* carezcan del dominio de señalización, se cree que la señalización de la defensa está mediada por interacciones con otras proteínas. Xa21, una RLK presente en arroz, responde a las moléculas efectoras secretadas por *Xanthomonas oryzae*, una bacteria Gram negativa y proporciona resistencia a una gama amplia de patógenos de este género.

Mientras que la mayoría de las proteínas R caracterizadas pertenecen a las clases antedichas, hay ejemplos de proteínas R con arquitectura del dominio diferente. RRS1-R que reconoce un efector de *Ralstonia solanacearum* es una proteína TIR-NB-LRR que también contiene un dominio C-terminal de localización de la señal y un dominio de activación transcripcional (Chisholm *et al.*, 2006). La proteína R Xa27 de arroz no comparte la homología con otras proteínas R, la expresión del alelo resistente Xa27 ocurre solamente en la vecindad del tejido infectado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* que expresan la proteína efectora avrXa27. La identificación de Xa27 marca el primer ejemplo de una proteína R diferente cuya especificidad de inducción está asociada a la resistencia.

Activadores endógenos

Los activadores endógenos en plantas son típicamente fragmentos de oligosacáridos, tales como los derivados de membranas celulares de la planta por las carbohidrasas producidas por los patógenos o por las enzimas

endógenas de la planta, que se sintetizan en respuesta a ataques de patógenos (Ryan *et al.*, 2007).

Un péptido de 23 aminoácidos, llamado AtPep1, fue aislado de *A. thaliana* y representa un nuevo tipo de péptido activador endógeno, que activa los genes de defensa asociados a la respuesta inmune natural. *AtPep1* se deriva de una proteína precursora cuyo gen es expresado en respuesta a heridas. La expresión de un gen 35S:*PROPEP1* en *A. thaliana* produce un fenotipo que expresa constitutivamente *PDF1.2* y muestra un incremento en la resistencia al oomycete *Pythium irregulare*. *PROPEP1* es un miembro de una pequeña familia de genes que consisten en seis genes que codifican los precursores que contienen las secuencias que son homólogos de *AtPep1* en sus C-terminales. Algunos de estos genes se expresan en respuesta a PAMP, y producen péptidos AtPep que se unen en un lazo de retroalimentación para amplificar las señales de defensa mediante las vías de JA, etileno y SA. AtPep1 y sus homólogos regulan la expresión de la proteína de defensa PDF1.2 a través de la vía de señalización JA-etileno. AtPep1 y sus homólogos son los primeros péptidos endógenos de señales de defensa encontrados en *A. thaliana* (Ryan *et al.*, 2007).

Evación de la ETI por parte de los patógenos

La ETI es menos efectiva para los microorganismos que pueden evadir el reconocimiento mediado por las NB-LRR de un efector particular. Las frecuencias alélicas del efector son probablemente influenciadas por su modo de acción. La diversidad de los alelos de *AvrL* de *M. lini* y de los alelos *Atr13* y *Atr1* del oomycete sugiere más de una forma de evolución del efector. Los alelos de estos efectores tienen un alto nivel de selección diversificada, probablemente, son seleccionados por el reconocimiento del hospedante, y por lo tanto actúan en los residuos efectores que no se requieren para la función efectora (Jones y Dangl, 2006).

La activación de NB-LRR por la vía del reconocimiento patógeno-inducido proporciona modificaciones propias, y facilita un mecanismo para el reconocimiento de múltiples efectores involucrados en

comprometer el mismo blanco del hospedante. Para que la selección genere un efector que escape a la ETI, el efector tiene que tener la probabilidad de perder su función nominal. La respuesta más simple del patógeno al reconocimiento del hospedante es desechar el gen efector detectado, con tal de que el repertorio de la población efectora pueda cubrir la pérdida potencial de aptitud en los hospedantes susceptibles. De hecho, los genes efectores se asocian a menudo a los elementos genéticos móviles o a los telómeros y se observan comúnmente como presencia/ausencia de polimorfismo a través de cepas bacterianas y fúngicas.

La ETI se puede superar también con la evolución de los efectores del patógeno que la suprimen directamente. Por ejemplo, en *P. syringae* pv. *phaseolicola*, el efector AvrPphC suprime la ETI activada por el efector AvrPphF en algunos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), mientras que, la AvrPphC en sí misma puede provocar avirulencia en diferentes cultivares de frijol (Jones y Dangl, 2006). El análisis genético en *M. lini* reveló genes inhibidores que funcionan para suprimir la ETI activada por otros genes de avirulencia. Por lo tanto, probablemente algunos efectores suprimen la ETI activada por otros efectores.

La evolución microbiana en respuesta a la ETI puede dar lugar a dos extremos de la evolución de NB-LRR. Algunos genes de NB-LRR no son duplicados y se han desarrollando de manera relativamente lenta, sus productos quizás se asocian establemente con proteínas del hospedante y retardan la diversificación. Otros microorganismos se están desarrollando más rápido y pueden interactuar directamente con efectores en plena evolución (Jones y Dangl, 2006). En poblaciones de patógenos, la frecuencia de un gen efector podrá ser aumentada según su capacidad de promover virulencia, y reducida por el reconocimiento del hospedante. Por lo tanto, la selección natural debe mantener la función efectora en ausencia del reconocimiento. Pero la función efectora tiene un costo dependiente de la frecuencia de genes R correspondientes. Así, si la frecuencia efectora cae en una población del patógeno, las plantas hospedantes se pudieran seleccionar para la pérdida del alelo R correspondiente, y el ciclo dependiente de la frecuencia continuaría.

CONSIDERACIONES FINALES

En los últimos años se han incrementado las investigaciones en el campo de las interacciones planta-patógeno. Estos avances han contribuido a demostrar el papel funcional de los PRRs en la resistencia a microbios y el descubrimiento de muchos factores de virulencia bacterianos, que están implicados en la supresión de la señalización de los PRRs y de las inmuno respuestas asociadas a la PTI. No obstante, la mayoría de las investigaciones se basan en el estudio de un solo patosistema (*A. thaliana*-*P. syringae*), por lo que falta por demostrar que estos pueden extrapolarse a otras interacciones. La diversidad de interacciones entre plantas y patógenos sugieren que otros sistemas tengan nuevos mecanismos, que podrían corroborar o contradecir los modelos existentes. El hecho de que todos los patógenos posean MAMPs, que pueden ser potencialmente reconocidos por todas las plantas, y además, que aun existan plantas susceptibles a los patógenos, apoya la evidencia de que la activación y supresión de la PTI, es un principio general en las interacciones planta-patógeno. Continuar con la dilucidación de los mecanismos del sistema inmune en plantas y sus puntos de contacto con el sistema inmune en animales constituye un gran reto para los científicos en la actualidad.

REFERENCIAS

- Allen, RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, Rose LE y Beynon JL (2004) Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* 306: 1957-1960
- Armstrong, MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JI, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Bohme U, Brooks K y Cherevach I (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102: 7766-7771
- Asai, T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gómez-Gómez L, Boller T, Ausubel FM y Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-83
- Bednarek, P, Piótlewska-Bednarek M, Svatoš A, Schneider B, Doubský J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A y Schulze-Lefert P (2009) A Glucosinolate

- metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323: 101-106
- Boller, T y He ShY (2009) Effectors in microbial pathogens pattern recognition receptors in plants and innate immunity in plants: An arms race between. *Science* 324: 742-44
- Brunner, F, Rosahl S, Lee J, Rudd JJ, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D y Nurnberger T (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO Journal* 21: 6681-6688
- Catanzariti, AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA y Ellis JG (2005) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18: 243-256
- Chisholm, ST, Coaker G, Day B y Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814
- Dangl, JL y Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33
- Dodds, PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA y Ellis JG (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16: 755-768
- Dodds, PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Then T, Wang ChA, Ayliffe MA, Kobe B y Ellis JG (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Plant Biology* 103: 8888-8893
- He, P, Shan L y Sheen J (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microorganismology* 9: 1385-96
- Heese, A, Hann DR, Giménez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC y Rathjen JP (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Plant Biology* 104: 12217-12222
- Janjusevic, R, Abramovitch RB, Martin GB y Strebbs CE (2005) A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311: 222-226
- Jia, Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP y Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* 19: 4004-4014
- Jones, DA y Takemoto D (2004) Plant innate immunity direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* 16: 48-62
- Jones, JD y Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Kwon, C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, Kasmi F, Jurgens G, Parker J, Panstruga R, Lipka V y Schulze-Lefert P (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature* 451: 835-40
- Lauge, R y De Wit PJ (1998) Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genetics and Biology* 24: 285-297
- Mudgett, MB (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Biology* 56: 509-531
- Orbach, MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG y Valent B (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pita. *Plant Cell* 12: 2019-2032
- Pajonk, S, Kwon C, Clemens N, Panstruga R y Schulze-Lefert P (2008) Activity determinants and functional specialization of *Arabidopsis* PEN1 syntaxin in innate immunity. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 26974-26984
- Rehmany, AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BM, Birch PR y Beynon JL (2005) Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* 17: 1839-1850
- Rivas, S y Thomas CM (2005) Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* 43: 395-436
- Rooney, HC, Van't Klooster JW, van der Hoorn RA, Joosten MH, Jones JD y de Wit PJ (2005) *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308: 1783-1786
- Ryan, CA, Huffaker A y Yamaguchi Y (2007) New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cellular Microorganismology* 9: 1902-1908
- Schwessinger, B y Zipfel C (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 389-395

- Shan, W, Cao M, Leung D y Tyler BM (2004) The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b. *Molecular Plant Microbe Interaction* 17: 394-403
- Shen, QH y Schulze P (2007) Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *The EMBO Journal* 26: 4293-4301
- Takken, FW, Albrecht M y Tameling WL (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 383-390
- Tian, M, Benedetti B y Kamoun S (2005) A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiology* 138: 1785-1793
- Tian, M, Huitema E, Da Cunha L, Torto-Alalibo T y Kamoun S (2004) A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 26370-26377
- Tiffin, P y Moeller DA (2006) Molecular evolution of plant immune system genes. *Trends in Genetics* 22: 662-70
- van den Burg, HA, Westerink N, Francoijs KJ, Roth R, Woestenenk E, Boeren S, de Wit PJ, Joosten MH y Vervoort J (2003) Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 27340-27346
- Van Der Biezen, EA y Jones JD (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Frontlines* 23: 454-456
- Wiermer, M, Feys BJ y Parker JE (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 383-389
- Yun, HS, Panstruga R, Schulze-Lefert P y Kwon C (2008) Secretion in plant. *Plant Signaling and Behavior* 3: 505-508
- Zipfel, C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 20: 10-16