

Capítulo 11

Expresión del gen *chit42* de *Trichoderma harzianum* en plantas de fresa: obtención de plantas de fresa con mayor resistencia a la infección por *Colletotrichum acutatum*

Caballero JL¹, Juan Muñoz-Blanco J

Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales C6, Planta Baja-Ala Norte, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; Tel: 957218197; Fax: 957218592; ¹CE: <bb1carej@uco.es>

RESUMEN

La antracnosis, causada por diferentes especies del hongo *Colletotrichum*, origina importantes pérdidas de producción en el cultivo de la fresa, un cultivo de gran interés agrícola en Andalucía, que aporta el 92.01% de la producción nacional y que, a su vez, genera más del 10% de la producción mundial total. *C. acutatum* está considerado un organismo de cuarentena en Europa (Directiva EC 77/93, Real Decreto 2071/1993). No se conocen variedades de fresa totalmente resistentes a *C. acutatum* y pese a la importancia agronómica de este cultivo en el mundo, existen muy pocos estudios moleculares de los mecanismos relacionados con la defensa de la planta de fresa a *Colletotrichum* spp. Esta falta de conocimiento molecular afecta negativamente a programas de mejora genética de la resistencia de la fresa a patógenos que, ya en sí, se ven notablemente mermados por el hecho de que la fresa es un cultivo de propagación clonal. Nuestro grupo PAI CVI-278 lleva más de 10 años investigando en fresa a nivel de biología molecular los mecanismos relacionados con diversos procesos bioquímicos, como la maduración del fruto y la defensa y resistencia de la planta a patógenos. Para incrementar la resistencia de la planta a *C. acutatum*, nuestro grupo está produciendo líneas transgénicas de fresa que expresan genes, procedentes de especies del hongo *Trichoderma*, que codifican enzimas que actúan sobre las paredes celulares de hongos ascomicetos y basidiomicetos, y que tienen, sustancialmente, una mayor actividad antifúngica que las propias enzimas de la planta y son activas frente a un rango más amplio de fitopatógenos.

Palabras clave: resistencia de la fresa a patógenos, quitinasas, mejora de la fresa, expresión heteróloga de enzimas hidrolíticas de pared.

Introducción

Durante los últimos años, la modificación de alimentos mediante manipulación génica ha estado en el punto de mira de los medios de comunicación y de la opinión pública en todo el mundo, particularmente en Europa. Sin lugar a dudas el papel que los medios de comunicación (muchas veces por propio interés) han jugado en la percepción y actitud del consumidor de los alimentos genéticamente modificados ha sido muy importante. Sin embargo, tanto la comunicación científico-técnica precisa y verídica como la actitud y percepción del consumidor son necesarias y han de ser tenidas en cuenta para el desarrollo de nuevos alimentos mediante esta tecnología.

El cultivo de la fresa

La fresa cultivada, *Fragaria x ananassa* Duchesne, descrita por primera vez por Duchesne en 1768 en el libro *Histoire Naturelle des Fraisiers*, es un híbrido entre las especies octoploides dioicas *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. y *Fragaria virginiana* Duch. Es una especie muy variable, altamente heterocigótica con una gran capacidad de adaptación a distintas condiciones ambientales (Larson, 1994).

La fresa cultivada, o fresón, ha adquirido una gran importancia económica y social en España, siendo uno de los productos con mayor cuota en la exportación de frutas

y hortalizas. España contribuye en más de un 10% a la producción total mundial y abastece casi en exclusiva a la Comunidad Europea durante los primeros meses del año. La producción se concentra particularmente en la provincia de Huelva con el 92.01% de la producción nacional, probablemente el núcleo productor más importante del mundo.

A pesar de la importancia de este cultivo, desde 1964 la dependencia del sector respecto de la tecnología desarrollada por la Universidad de California (Davis, USA) es muy elevada (López Aranda, 1995). En particular, las sucesivas variedades cultivadas han sido obtenidas por esta Universidad. En los últimos años, como resultado de la investigación del sector público en colaboración con diversas empresas, se están generando variedades autóctonas que ha resultado en el registro de nuevas variedades comerciales de esta especie (ej. cv. Andana, cv. Carisma, cv. Medina, cv. Marina, cv. Aguedilla, etc) y que marca el inicio de una independencia tecnológica del sector viverista y productor español.

Con relación al cultivo hay que indicar que dentro de las características de interés agronómico, el tamaño del fruto ha alcanzado su máximo comercial. En cambio la búsqueda y caracterización de variedades de resistencia a enfermedades producidas por microorganismos patógenos son de enorme importancia para el sector agrícola e incluso, de importancia creciente, para el

consumidor (poscosecha). Así, las características de monocultivo de la fresa, con siembras repetidas en años consecutivos, en el mismo suelo, propician la incidencia de un número importante de enfermedades que conllevan, en muchos casos, pérdidas importantes de producción. Se estima que entre un 25-30% de la pérdidas de producción se deben a infecciones producidas por la acción de diferentes microorganismos patógenos (hongos filamentosos, bacterias, fitoplasmas y virus).

Principales patógenos fúngicos de la fresa

La acción fitopatogena de los hongos es la que causa mayor alarma en el agricultor, siendo los más importantes:

- *Sclerotinia fuckeliana* (estado conidial *Botrytis cinerea*): Este hongo afecta a la flor y fruto de la fresa cultivada y es responsable de las principales podredumbres del fruto (moho gris), especialmente del recolectado (Coley-Smith et al, 1980; Bristow et al, 1986).

- *Phytophthora cactorum*: Este hongo origina colapso vascular por podredumbre de corona ("crown rot") y en algunos casos también en raíces (Reynolds et al, 1988). La especie *P. fragariae* var. *fragariae* está sometida a restricciones de cuarentena (Directiva EC 77/93, Real Decreto 2071/1993), sin embargo no se ha podido demostrar que esté presente en cultivos españoles.

- *Colletotrichum* spp.: Existe un complejo de especies de este género que son causantes de la enfermedad de semillas, plántulas, corona, tallo, hojas, estolones y frutos, conocida como "antracnosis" (Smith y Black, 1987). La especie más frecuente en Europa es *C. acutatum*, sin embargo, también son productoras de antracnosis las especies *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*), restringidas a fresas americanas (Maas y Galletta 1989). Además de fresa, estos hongos tienen un amplio rango de otras plantas hospedadoras, muchas de ellas de gran importancia agronómica (Dyko, 1979).

La podredumbre de corona y fruto por *Colletotrichum* es un serio problema en el cultivo de la fresa ya que llega a afectar hasta el 80% de las plantas en condiciones favorables de crecimiento del patógeno en cultivares muy susceptibles y en Europa *C. acutatum* está considerado como organismo de cuarentena (Directiva EC 77/93, Real Decreto 2071/1993; Denoyes y Baudry 1995; Bosshard, 1997; Freeman y Katan, 1997).

Control de la enfermedad de antracnosis en fresa

El control de enfermedades producidas por hongos patógenos requiere una combinación de métodos químicos, de cultivo y genéticos pero la aplicación continuada de los pesticidas actuales (BrMet, etc) no se considera ya adecuada, puesto que contaminan el medio ambiente, y existe una moratoria Europea a este respecto. En general, el método más deseable de control de la enfermedad es el uso de cultivares resistentes a la

misma (Quirino y Bent, 2003). La resistencia está definida como una interacción incompatible entre hospedador y patógeno. En términos moleculares esta incompatibilidad implica el desarrollo, por parte de la planta, de mecanismos que impiden o retardan el crecimiento del patógeno, y que en muchas ocasiones dependen de una única pareja de genes (gen de resistencia de la planta y gen de avirulencia del patógeno (Van der Biezen y Jones, 1998). Contrariamente, una interacción compatible conduce a la enfermedad y es, frecuentemente, reflejo de la habilidad que tiene el patógeno de sobrepasar las defensas producidas por la planta hospedadora. En último término, el establecimiento de la infección es debido a una respuesta inadecuada, en tiempo e intensidad, de la planta hospedadora (infectada) al patógeno que la invade. Esta respuesta se ha descrito que implica la activación de moléculas señal y rutas de señalización celulares que generan cambios en la expresión génica y respuestas celulares definidas (Maleck y Dietrich, 1999).

La mayoría de las variedades resistentes a enfermedades de cultivos de plantas de importancia agronómica se han obtenido por métodos clásicos mediante programas de selección por cruzamiento genético tradicional. Este proceso es lento, en la mayoría de los casos, y, lo más importante, a menudo selecciona otras características no deseadas conjuntamente con la característica de resistencia, especialmente cuando ésta se hereda de forma multigénica (Quirino y Bent, 2003). Por otro lado, y frecuentemente, se ha visto que la resistencia a la enfermedad basada en un simple gen R de resistencia no es un carácter perdurable en muchas de las especies de interés agrícola en las que se ha utilizado, ya que en la población de patógenos emergen nuevos miembros que evitan el reconocimiento del "sistema inmune" de la planta y, por tanto, se requiere la selección (de nuevo por programas de mejora genética tradicional) en esta última de nuevos rasgos de resistencia (Denoyes y Baudry, 1995). Además, no siempre existen variedades o cultivares identificadas dentro del banco de germoplasma disponible que presenten resistencia frente a un patógeno determinado y cualquier intento de selección de las mismas mediante programas de mejora genética tradicional, particularmente en especies de interés agrícola de propagación clonal, es prácticamente inviable (Quirino y Bent, 2003).

Este último hecho es el que ocurre en la fresa (*Fragaria x ananassa*), en donde hasta ahora no se han descrito cultivares totalmente resistentes a *Colletotrichum*, si bien sí que existen diferencias sustanciales en cuanto a la susceptibilidad al patógeno entre los cultivares disponibles (Denoyes y Baudry 1995, Khan et al, 1999, 2003). Puesto que fresa es, además, un cultivo de propagación clonal, ciertamente se requiere el desarrollo de estrategias nuevas que complementen o sean alternativas a la mejora genética clásica para mejorar la resistencia de la fresa a la antracnosis.

Estrategias de mejora biotecnológica

En fresa, se conocen muy pocos estudios a nivel molecular de la interacción planta de fresa-patógeno y

sólo alguno de ellos sobre la interacción particular fresa-*Colletotrichum*. A pesar del aislamiento de algunos genes de fresa semejantes a genes implicados en defensa a patógenos en otras plantas, por determinados grupos científicos (Wu et al, 2001; Khan y Shih, 2004; Mehli et al, 2004; Shi et al, 2006; Vellicce et al, 2006; Zhang y Shih, 2007), no existe información alguna respecto a los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de la fresa a la infección por *Colletotrichum* o cualquier otro patógeno a excepción de la recientemente publicada por nuestro grupo (Folta, Staton et al, 2005; Casado-Díaz et al, 2006).

Nuestro grupo de investigación de la Universidad de Córdoba (PAI CVI-278) lleva más de 10 años estudiando la fresa a nivel molecular. A lo largo de este tiempo y durante el desarrollo de proyectos de investigación financiados por el MEC, la CICYT, y la Comunidad Europea (proyectos PTR1995-0956-OP-04-02, MEC-BIO2004-04885-C02-02, PETRI 1995-0790.OP.03.03, BIO2001-1958-CO4-02, BIO2000-1092-CO2-01, BIO98-0496-CO2-02, EC-FAIR-CT97 PL3005, CICYT ALI97-0836-CO-03, CAO00-018-C7-3, CICYT OLI96-2185-CO4-02) ha desarrollado la metodología y tecnología propias, así como las herramientas moleculares adecuadas y ha acumulado un "know-how" específico para el estudio y conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en procesos de importancia agronómica en la fresa relacionados con la calidad del fruto y otros procesos de interés agronómico, como la resistencia a enfermedades. Esto ha llevado al aislamiento y caracterización de una gran cantidad de genes y ESTs de fresa, mediante expresión diferencial, escrutinios diferenciales de genotecas de ADNc, construcción de genotecas de ESTs sustractivas, estudio de expresión espacio-temporal en la planta de fresa de genes de interés mediante cuantificación de la expresión de los mismos a tiempo real (QRT-PCR) y análisis de perfiles de expresión globales (transcriptómica) mediante desarrollo y uso de "microarrays". Igualmente se ha identificado la función de muchos de estos genes aislados por sobreexpresión de los mismos en fresa y uso de tecnología de RNAi y transformación de diversos cultivares de fresa.

Igualmente se están realizando enfoques de mejora de la resistencia a patógenos fúngicos mediante la expresión de genes en fresa, procedentes de especies del hongo *Trichoderma*, que codifican enzimas que actúan sobre las paredes celulares de otros hongos ascomicetos y basidiomicetos, y que tienen, sustancialmente, una mayor actividad antifúngica que las enzimas de la planta y son activas en un rango más amplio de fitopatógenos.

Mejora de la resistencia de la fresa a patógenos fúngicos mediante expresión heteróloga del gen *chit42* de *Trichoderma harzianum*

La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina (NAGa) unidos mediante enlaces β -1,4 glucosídicos además de ser el segundo compuesto más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Organismos tanto procariotas como eucariotas degradan a este polímero mediante la actuación de enzimas hidrolíticas como

endoquitinasas y exoquitinasas (EC 3.2.1.14). Las especies del hongo *Trichoderma* spp. producen una gran variedad de estas enzimas quitinolíticas que actúan sobre las paredes celulares de hongos ascomicetos y basidiomicetos que tienen, sustancialmente, una mayor actividad antifúngica que las quitinasas de plantas y son activas en un rango más amplio de fitopatógenos (Lorito et al, 1993, 1994). De hecho, el gen *chit42* de *Trichoderma harzianum* se ha expresado en plantas de tabaco y patata y se ha documentado un aumento en la resistencia de las mismas a patógenos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Lorito et al, 1998).

Hemos expresado el gen que codifica a la endoquitinasa CHIT42 del *T. harzianum* en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* c.v. Camarosa) para aumentar la resistencia de esta planta, de gran importancia agronómica en nuestro país, hacia hongos fitopatógenos tales como *Colletotrichum acutatum*. Para ello, se ha realizado una construcción sobre el vector binario pBINPLUS que contenía la región estructural del gen *chit42* flanqueada por la región correspondiente al péptido señal de transporte al exterior celular y a la de corte y poliadenilación de un gen endógeno de fresa (gen *Faltp*) y todo ello bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV-35S). El objeto de esta construcción fue la de asegurar la maduración del ARNm producido en las células de los diferentes tejidos de la planta de fresa y dirigir a la proteína recombinante resultante al exterior de las mismas.

En la mayoría de las líneas transgénicas de fresa obtenidas que expresan la endoquitinasa CHIT42 no se han observado grandes alteraciones a nivel agronómico (producción, calidad de los frutos, etc). Estas líneas transgénicas de fresa se han caracterizado molecularmente mediante determinación de la actividad quitinasa, detección y cuantificación ("Western blot") y localización tisular y celular (técnicas de inmunolocalización) de la proteína CHIT-42. Los resultados obtenidos indican que la proteína CHIT-42 de *T. harzianum*, presente en las diferentes líneas transgénicas, se procesa correctamente y se localiza en la pared celular o fuera de la misma, de manera general, en todos los tejidos y tipos celulares analizados de la planta de fresa.

Los análisis de susceptibilidad/resistencia de las diferentes líneas transgénicas de fresa frente al patógeno *C. acutatum*, realizados en condiciones controladas de infección, no mostraron una relación directa entre actividad quitinasa y una mayor resistencia de la planta frente al patógeno. Sin embargo, ensayos en placa de inhibición de crecimiento de *C. acutatum* con extractos crudos de peciolo de las diferentes líneas transgénicas CHIT-42, sí mostraron una correlación directa entre una mayor actividad quitinasa y un mayor grado de inhibición del crecimiento del hongo. Estos resultados sugieren que la enzima CHIT42 de *T. harzianum* expresada en la planta de fresa requiere de algún factor adicional o necesita de la acción sinérgica de otras enzimas hidrolíticas de pared, para ser biotecnológicamente eficiente en fresa frente a la

infección de la planta por *C. acutatum*.

Agradecimientos

Personal de otros Grupos Colaboradores: Dr. Fernando Romero Muñoz y Dra. Berta de los Santos (Dep. Protección Vegetal, IFAPA "Las Torres-Tomejil", Alcalá del Río, 41200 Sevilla); Dr. Fernando Pliego Alfaro y Dr. José A. Mercado (Dep. Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga); Dr. Manuel Rey (Newbiotechnic). Financiado por Proyecto PETRI 1995-0792.OP.02.01.

Referencias

- Bosshard E (1997): Why is *Colletotrichum acutatum* a quarantine organism, and *C. gloeosporoides* and *C. fragariae* are not? *Acta Horticulturae* 439: 799-802.
- Bristow PR, McNicol RJ, Williamson B (1986): Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development. *Annu Appl Biol* 109: 545-554.
- Casado-Díaz A, Encinas-Villarejo S, De los Santos B, Schilirò E, Yubero-Serrano EM, Amil-Ruiz F, Pocovi MI, Pliego-Alfaro F, Dorado G, Rey M, Romero F, Muñoz-Blanco J, Caballero JL (2006): Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiol Plantarum* 128: 633-650.
- Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR (eds) (1980): "The biology of *Botrytis*". Academic Press (Nueva York).
- Denoyes B, Baudry A (1995): Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characters. *Phytopathol* 85: 53-57.
- Dyko BJ, Mordue JEM (1979) *Colletotrichum acutatum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 639 Commonwealth Mycological Institute (Kew).
- Folta KM, Staton M, Stewart PJ, Jung S, Bies DH, Jesdurai C, Main D (2005): Expressed sequence tags (ESTs) and simple sequence repeat (SSR) markers from octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*). *BMC Plant Biol* 5:12.
- Freeman S, Katan T (1997): Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathol* 87: 516-521.
- Khan AA, Shi YL, Shih DS (2003): Cloning and partial characterization of a β -1,3-glucanase gene from strawberry. *DNA sequence* 14: 406-412.
- Khan AA, Shih DS (2004): Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from strawberry plant. *Plant Sci* 166: 753-762.
- Khan AA, Wu J, Shih DS (1999): Cloning and sequence analysis of a class III chitinase gene (accession no. AF134347) from *Fragaria ananassa* Dutch (PGR99-069). *Plant Physiol* 120: 340.
- Larson KD (1994): "Strawberry. Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops. Temperate Crops". CRC (Boca Raton).
- López Aranda JM (1995): El cultivo de la frutilla en España. *Publicaciones Misceláneas Agrícolas*. Universidad de Concepción (Concepción).
- Lorito M, Harman G, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL, Di Pietro A (1993): Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitinobiosidase. *Phytopathol* 83: 302-307.
- Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Woo SL, Harman GE (1994): Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol* 84: 398-405.
- Lorito M, Woo SL, García-Fernández I, Colucci G, Harman G, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence C, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998): Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7860-7865.
- Maas JL, Galletta GJ (1989): Germplasm evaluation for resistance to fungus-incited diseases. *Acta Horticulturae* 265: 461-472.
- Maleck K, Dietrich RA (1999): Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?" *Trends Plant Sci* 4: 215-219.
- Mehli L, Schaart JG, Kjellsen TD, Tran DH, Salentijn EMJ, Schouten HJ, Iversen TH (2004): A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry." *New Phytol* 163: 99-110.
- Quirino BF, Bent AF (2003): Deciphering host resistance and pathogen virulence: the Arabidopsis/Pseudomonas interaction as a model. *Mol Plant Pathol* 4: 517-530.
- Reynolds KM, Madden LV, Ellis MA (1988): Effect of weather variables on strawberry leather rot epidemics. *Phytopathol* 78: 822-827.
- Shi Y, Zhang Y, Shih DS (2006): Cloning and expression analysis of two β -1,3-glucanase genes from Strawberry. *J Plant Physiol* 163: 956-967.
- Smith BJ, Black LL (1987): Resistance of strawberry plants to *Colletotrichum fragariae* affected by environmental conditions. *Plant Disease* 71: 834-837.
- Van der Biezen EA, Jones JDG (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 23: 454-456.
- Vellicce G, Ricci J, Hernández L, Castagnaro A (2006): Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in Strawberry. *Transgenic Res* 15: 57-68.
- Wu J, Khan AA, Shih CY T, Shih DS (2001): Cloning and sequence determination of a gene encoding an osmotin-like protein from strawberry (*Fragaria ananassa* Dutch.). *DNA sequence* 12: 447-453.
- Zhang Y, Shih DS (2007): Isolation of an osmotin-like protein gene from strawberry and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *J Plant Physiol* 164: 68-77.