



ESTUDIOS  
DE  
FITOPATOLOGÍA



## QUITINASAS INDUCIDAS POR CITRUS EXOCORTIS VIROID (CEVd) EN PLANTAS DE TOMATE.

GARCÍA BREJO, F.; GARRO, R.; CONEJERO, V.  
DPTO. BIOTECNOLOGÍA. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.  
MONCADA (VALENCIA).

### RESUMEN

Se han purificado dos quitinasas a partir de hojas de plantas de tomate infectadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus Exocortis Viroid*), CEVd. Estas quitinasas, que tienen unas masas moleculares de 32 kDa y 34 kDa, respectivamente, corresponden a las proteínas PRs (Pathogenesis Related) C<sub>7</sub> and C<sub>6</sub> (Granell et al., 1987) y se han designado como TChy y TCh2. La caracterización de TCh1, que presenta la mayor actividad quitinasa, ha puesto de manifiesto su naturaleza básica (pI 8.5), su bajo pH óptimo (8.2) su relativamente alta estabilidad térmica y su resistencia a la degradación proteolítica. También se ha verificado la relación serológica entre las quitinasas TCh1 y TCh2 y las quitinasas de tabaco.

Asimismo, se ha ensayado "in vitro" la capacidad de la quitinasa TCh1 para inhibir el crecimiento de diferentes hongos patógenos de plantas.

### INTRODUCCIÓN

Las proteínas PR (Pathogenesis Related) son un grupo de proteínas vegetales cuya síntesis es inducida cuando las plantas reaccionan contra infecciones por viroides, virus y otros agentes patógenos. Se producen también como respuesta al tratamiento con determinados productos químicos como ácido poliacrílico, ácido salicílico y etileno, entre otros, y también en otras situaciones de stress e incluso en la senescencia natural de la planta (Bol, 1988; Van Loon, 1985 y 1989).

En los últimos años se ha conseguido una considerable información sobre las propiedades fisicoquímicas de las PRs y la actividad hidrolítica de alguna de ellas. Los datos que se están obteniendo sobre su secuencia de aminoácidos ponen de manifiesto que son proteínas muy conservadas evolutivamente. Aparte de su hipotética participación en fenómenos de protección en relación con el carácter hidrolítico de algunas de ellas, no se les ha podido asignar funciones biológicas específicas (Carr et al, 1985) Cornelissen et al, 1986 a y 1986 b; Hooft van Huijsduijnen et al, 1986 a y 1986 b; Jamet y Fritig, 1986; Lucas et al, 1985; Matsuoka y Ohashi, 1986; Van Loon, 1985).

En plantas de tabaco se probó por primera vez que algunas de las proteínas PR tienen actividad quitinasa (Legrand et al, 1987) Vögeli-Lange et al, 1988) y otras, actividad  $\beta$ -1, 3-glucanasa (Kauffmann et al, 1987), por lo que se sugirió que podrían estar implicadas en la degradación de las paredes fúngicas y bacterianas. Posteriormente también se pudieron demostrar actividades quitinasa y  $\beta$ -1, 3- glucanasa asociadas a otras proteínas PR en diversas plantas (De Wit et al, 1988; Joosten y De Wit, 1989; Kombrink y Hahlbrock, 1986; Kombrink et al, 1988; Pegg y Young, 1982; Métraux et al, 1988).

El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) induce en plantas de tomate la síntesis de 10 proteínas PR (Granell et al, 1987). Una de ellas, la P69, es una endoproteína (Vera y Conejero, 1988).

En este trabajo, describimos la purificación de dos proteínas PR (TCh1 y TCh2), que presentan actividad quitinasa, a partir de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* c.v. Rutgers) infectadas con CEVd o tratadas con ácido 2-cloroetil fosfónico (Ethephon), sustancia que

libera etileno. Se presenta, también, la ulterior caracterización de la Tch1, que es la que de las dos posee mayor actividad, así como los primeros estudios sobre su acción antifúngica "in vitro".

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal.

La inoculación de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, cv. Rutgers) con CEVd se realizó tal como se ha descrito previamente (Semancik y Consejo, 1.987). El tratamiento con ethephon 0.02M (ácido 2- cloroetilfosfónico) se llevó a cabo mediante aspersión foliar a plantas sanas de 4 semanas (Granell et al, 1.987).

### Extracción de proteínas y purificación de las quitinasas.

Las hojas se homogenizaron a 4°C en tampón 50 mM fosfato-citrato (pH 2.8) que contenía mercaptoetanol (50 mM), en un homogenizador Polytron, durante 3x1 minutos a velocidad máxima. Tras filtración el homogenado se centrifugó a 15,000 x g durante 30 minutos. Se añadió sulfato amónico al sobrenadante hasta una concentración del 20 % y, después de 1 hora con agitación a 4°C, el precipitado se separó por centrifugación a 20,000 x g, durante 15 minutos. Se adicionó sulfato amónico al sobrenadante hasta un 75 % de saturación y después de centrifugar a 20,000 x g durante 15 minutos, el sedimento obtenido, se resuspendió en un pequeño volumen de tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.2) y se dializó frente al mismo tampón durante toda la noche a 4°C.

Para la purificación de las quitinasas se añadió carbonato sódico a la muestra hasta una concentración 20 mM y se ajustó el pH a 8.4 con una solución NaOH 0.1 M. Esta muestra se cargó en una columna (30 x 3 cm) que contenía quitina regenerada (Molano et al, 1.977) equilibrada con tampón carbonato sódico 20 mM, pH 8.4 (Molano et al, 1.979). La columna se eluyó sucesivamente con 250 ml de tampón carbonato sódico 20 mM (pH 8.4), 250 ml de tampón acetato sódico 20 mM (pH 5.5) y finalmente con 200 ml de ácido acético 20 mM (pH 3.2). Tras eluir con ácido acético, las fracciones que presentaron actividad quitinasa se recogieron y concentraron con Centrifugal-Ultrafree (Millipore) a 2.500 x g durante 45 minutos y se dializaron frente a tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.2). La fracción con actividad quitinasa se aplicó a una columna (20 x 3 cm) de CM- Sepharosa equilibrada con tampón acetato sódico 20 mM (pH 5.2), y las proteínas absorbidas se eluyeron con un volumen adecuado de un gradiente lineal de NaCl (de 0 a 0.3 M). Dichas fracciones se recogieron y concentraron el Ultrafree-PF (Millipore).

### Determinación de proteínas.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford (1.976) con seroalbúmina bovina como estandar.

### Análisis de la actividad quitinasa.

Las actividades endo - y exoquitinasa se midieron por un ensayo colorimétrico (Boller et al, 1.983). Se utilizó como sustrato quitina regenerada a partir de quitosán - obtenida según el método de Molano et al (1.977). La mezcla de reacción contenía 0.8 ml de quitina regenerada en tampón acetato sódico 0.1 M (pH 5.2) y 0.2 ml de la solución enzimática (muestra, patrón o

blanco). La mezcla se colocaba en un incubador rotatorio durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación los tubos se centrifugaban a 10,000 x g, 30 minutos.

Para la determinación de la actividad endoquitinasa, se incubaban 0.3 ml del sobrenadante a 37°C, 1 hora, con 0.02 ml de citohelicasa al 3% (p/v), para hidrolizar los oligómetros de quitina, y 0.03 ml de tampón fosfato potásico 0.1M pH 7.0 (Boller et al, 1983). El N-acetilglucosamina (GlcNAc) liberado se determina por el método de Reissig et al (1955).

La actividad exoquitinasa se realizó de modo similar pero tras la centrifugación a 10,000 x g, se toman alícuotas de 0.5 ml del sobrenadante y se determina en ellas el GlcNAc liberado, directamente.

#### **Análisis electroforético.**

Las electroforesis en SDS-PAGE se realizaron según el método de Conejero y Semanick (1977). Los marcadores utilizados para la estimación de las masas moleculares fueron: lactoalbúmina (14 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), ovoalbúmina (57 kDa) y seroalbúmina bovina (67 kDa). Las electroforesis catódicas en condiciones no desnaturizantes se realizaron en tubos cilíndricos (80 x 5 mm) según el método de Reisfeld et al (1962).

#### **Determinación de las masas moleculares de las quitinasas.**

Fueron determinadas por filtración en gel sobre una columna (75 x 1.5 cm) de Sephadex G-100 equilibrada con Tris-ClH 50 mM (pH 7.5), ClNa 100 mM. Las masas moleculares de los marcadores usados eran: seroalbúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y citocromo C (12.4 kDa). El volumen muerto se determinó con Blue Dextran (2,000 kDa).

#### **Ensayos inmunológicos.**

Los anticuerpos policlonales contra la TCh1 se obtuvieron como sigue: 0.5 mg de la quitinasa purificada en 1 ml de tampón PBS se mezcló con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Difco) y se inyectó intramuscularmente a conejos. Posteriormente, se realizaron 5 inyecciones, con intervalos de 10 días, conteniendo cada una de ellas 0.1 mg de la quitinasa purificada en 0.5 ml de tampón PBS y 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund. La recuperación del anticuerpo se realizó a los 8-10 días de la última inyección. Como control se había tomado suero preinmune. La purificación de las inmunoglobulinas se realizó de acuerdo a Harboe e Ingild (1973).

Los análisis de doble inmunodifusión (Ouchterlony y Wilson, 1986) se llevaron a cabo en medios que contenían 1 % de agarosa en Tris-ClH 50 mM, pH 7.5, con 0.9 % de ClNa. Las líneas de inmunoprecipitina se teñían con Coomassie Brilliant Blue como describen Mayer y Walker, (1978).

Los inmunoblots se realizaron con membranas de nitrocelulosa de acuerdo con el método de Towbin et al (1979).

#### **Ensayos de la actividad antifúngica.**

La medida de la actividad fungicida y fungistática se realizó en placas Petri de 5 cm de diámetro que contenían agar-malta, pH 5.5, como medio de crecimiento para los hongos ensayados, así como diferentes alícuotas de la fracción a ensayar. Los hongos se inoculaban poste-



riormente de la manera usual y se incubaban a 28-30°C, durante 72 horas. Los hongos ensayados fueron: *Trichothecium roseum*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Alternaria tenuis*, *Penicillium italicum*, *Trichoderma viride* y *Fusarium culmorum*.

## RESULTADOS

### Efecto de la infección por CEVd y del etileno sobre la actividad quitinasa en hojas de tomate.

La actividad endo-y exoquitinasa se midió en extractos de hojas de tomate de plantas: a) infectadas con CEVd, b) tratadas con ethephon (ácido 2-cloroetil-fosfónico, compuesto que libera etileno), y c) sanas, como control. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos. La actividad endoquitinasa en plantas de tomate es muy superior (del orden de 100 veces) a la exoquitinasa, tanto en plantas infectadas o tratadas como en las sanas. En las plantas infectadas por el viroide, las actividades endo-y exoquitinasa se incrementaban unas 12 y 4 veces, respectivamente, mientras que en las tratadas con etileno, dichos incrementos eran del orden de 20 y 5 veces, respectivamente.

TABLA 1. LOS EFECTOS DE LA INFECCIÓN POR CEVD Y DEL TRATAMIENTO CON ETILENO SOBRE LA ACTIVIDAD QUITINASA.

	Actividad (nkat ml <sup>-1</sup> extracto crudo)			Incremento en actividad respecto al control (nº veces)	
	Control	Tratadas etileno	Infectadas con CEVd	Tratadas etileno	Infectadas con CEVd
Exoquitinasa	0.02	0.099	0.086	5.0	4.3
Endoquitinasa	1.90	36.970	19.400	19.4	12.5

Extractos crudos desalados de hojas apicales (4 hojas superiores) tomadas de: a) plantas de tomate infectadas con CEVd y recogidas 1 semana después de la aparición de los síntomas, b) plantas de tomate tratadas con 0.02m ethephon (etileno) recogidas 4 días después del tratamiento, y c) plantas sanas (control). En el momento de los ensayos todas las plantas tenían 6 semanas. Ver Material y Métodos para detalles.

### Purificación de quitinasas inducidas por CEVd.

Las quitinasas se purifican a partir de extractos ácidos de hojas de tomate que habían desarrollado los síntomas característicos después de ser infectadas con CEVd. Estos extractos contienen las proteínas PR inducidas por el viroide (Granell et al, 1.987). La purificación se realizó, primero con una precipitación selectiva con sulfato amónico seguida por una cromatografía de afinidad y otra de intercambio iónico. En la tabla 2 se indican los parámetros más importantes del proceso de purificación.

La quitinasa precipitada con sulfato amónico fué purificada por cromatografía de afinidad en la que se utilizó quitina regenerada como absorbente. La quitinasa fué eluida mediante distintas soluciones tampón (Figura 1). La actividad quitinasa obtenida se pudo separar en dos fracciones por cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de CM-Sepharosa (Figura 2).

TABLA 2. PURIFICACIÓN DE LAS QUITINASAS INDUCIDAS POR CEVd EN HOJAS DE TOMATE.

Fracción	Proteína Total (mg)	Quitinasa Total (nkat)	Actividad Específica (nkat mg <sup>-1</sup> proteína)	Rendimiento	Purificación.
Extracto crudo, pH 2.8:	86.0	4042.0	47.0	100.0	1.0
Precipitación con 75 % de (NH <sub>2</sub> )SO <sub>4</sub> .	42.0	2192.4	52.2	54.2	1.1
Columna de quitina, elución a pH 3.3:	2.1	1930.5	919.3	47.8	19.6
Columna de CM-Sepharaosa, elución con:					
0.16M ClNa	0.4	1806.0	4881.1	44.7	103.8
0.28M ClNa	0.2	20.9	99.3	0.5	2.1

Purificación de quitinasas a partir de hojas apicales de tomate 1 semana después de la aparición de los síntomas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford 81.9769 y la actividad del enzima se midió mediante un ensayo colorimétrico. Ver Material y Métodos para detalles.

Por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se comprobó que la fracción I (componente mayoritaria de la actividad quitinasa) corresponde a un polipéptido de 32 kDa (TCh1) y la fracción II, a uno de 34 kDa (TCh2) (Figura 3). Los enzimas nativos tienen masas moleculares de 23 kDa y 25 kDa determinadas por filtración en gel. Estos resultados sugieren que estos enzimas son monoméricos. Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante, para proteínas básicas, se pudo identificar la TCh1 y la TCh2, respectivamente, con las proteínas PR C7 y C6, previamente descritas (Grancell et al, 1.987) en nuestro laboratorio (Figura 4).

#### Estudios serológicos.

Mediante ensayos de Western blot se ha comprobado que el antisuero obtenido en conejos inyectados con la quitinasa TCh1 purificada, reacciona específicamente con ambas quitinasas TCh1 y TCh2, sin presentar reactividad cruzada con las otras proteínas del extracto (Figura 5A). También se ha estudiado la relación serológica entre estas quitinasas y la IgG antiquitinasa P33 de tabaco (generosamente donada por el DR. Meins, del Friedrich-Miescher-Institut de Basilea). Como se ve en la Figura 5B, esta IgG presenta una alta especificidad con las quitinasas de tomate.

Se realizaron también ensayos de inmunodifusión tanto con extractos crudos como con las quitinasas purificadas. Estos estudios nos confirmaron la relación serológica entre las dos quitinasas inducidas por CEVd en tomate (Figura 6) y la quitinasa de tabaco (resultados no mostrados).

#### Propiedades de la quitinasa TCh1 inducida por CEVd en tomate.

La TCh1 tiene un pH óptimo alrededor de 5.5. A este pH la actividad es estable a temperaturas de hasta 40°C durante 2 horas, presentando la máxima actividad entre 35° y 40°C. El enzima tiene un pI de 8.5-9.0 demostrado por electroenfoque.

Se investigó la resistencia de TCh1 a varias proteasas y carbohidrasas. Para ello se trató con 5 proteasas (pronasa, proteinasa K, tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina y papaína) y dos carbohidrasas ( $\alpha$ -manosidasa y  $\beta$ -glucosidasa) y con una aspartil proteinasa nativa de tomate descubierta

en nuestro laboratorio (Rodrigo et al, 1.989). La TCh1 es resistente a las carbohidrasas y proteasas convencionales (únicamente con la proteinasa K se producía un descenso del 30 % en la actividad enzimática). No obstante, la inhibición producida por la aspartil proteinasa nativa a su pH óptimo (2.8) es completa. La actividad TCh1 es inhibida por su antisuero específico y también, como era de esperar, por el antisuero de la quitinasa P33 de tabaco. (Figura 7).

#### Actividad antifúngica de TCh1.

Los resultados obtenidos "in vitro" se presentan en las Figuras 8 y 9. 10 µl inhiben parcialmente el crecimiento de *Alternaria tenuis*, *Collectotrichum gloeosporoides*, *Thichothecium roseum* y *Trichoderma viride* a las 72 horas, en las condiciones del ensayo.

#### DISCUSIÓN.

La producción de proteínas PR (Pathogenesis Related) es parte de la respuesta que produce en ciertas plantas la infección por hongos, bacterias, virus, viroides y otros agentes estresantes. Tales proteínas fueron identificadas por primera vez en plantas de tabaco que reaccionaban hipersensiblemente contra el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Gianinazzi et al, 1.970; Van Loon y Van Kammen, 1.970). Este tipo de proteínas fueron encontradas después en otras especies vegetales. La síntesis de estas proteínas no está especificada por el patógeno sino que son proteínas codificadas por la planta huésped (Gianinazzi, 1.982, Granell et al, 1.987, Jamet y Fritig, 1.986, Semancik et al, 1.975; Van Loon, 1.982, 1.983, 1.985 y 1.989; Van Loon y Callow, 1.983).

En este trabajo hemos presentado la purificación de dos proteínas con actividad quitinasa, TCh1 y TCh2, a partir de plantas de tomate infectadas pro CEVd o tratadas con ethephon. También hemos mostrado pruebas de que dichas quitinasas coinciden con las proteínas PR C7 y C6, respectivamente, descritas previamente en nuestro laboratorio. Las quitinasas TCh1 y TCh2 tienen en común una serie de características con las quitinasas inducidas en otras plantas por otros patógenos: la preeminencia de su carácter endoquitinasa comparado con la actividad exoquitinasa, sus relaciones antigénicas (entre sí y con una quitinasa de tabaco) y sus masas moleculares (32 kDa y 34 kDa). La caracterización posterior de TCh1 extiende la similitud a otras propiedades adicionales: su naturaleza básica (pI 8.5-9.0), su bajo pH óptimo (5.2), su alta estabilidad térmica y su resistencia a la degradación proteolítica.

Desde el punto de vista biológico, la capacidad de la TCh1 para inhibir el crecimiento de diferentes hongos fitopatogénicos en relación con su carácter de endoquitinasa merecen un comentario especial. La actividad endohidrolítica sería más apropiada en funciones de defensa que la actividad exohidrolítica, por su mayor efectividad en la destrucción de la quitina de la pared celular de los hongos (Mauch et al, 1.986 a y 1.986 b, Schlumbaum et al, 1.986).

La idea de que los viroides son elicitores de respuestas no específicas del huésped, mediadas por etileno, de la que la síntesis de proteínas PR es un componente, ya ha sido postulada previamente en nuestro laboratorio (Belles et al, 1.989; Granell et al, 1.987). Esta respuesta también puede ser estimulada por otros agentes bióticos y abióticos (Belles y Conejero, 1.989).

Las quitinasas no pueden estar implicadas directamente en mecanismos de defensa contra viroides. Sin embargo, son herramientas específicas de defensa de las plantas desarrolladas por la coevolución de las mismas con patógenos que contienen quitina como parte fundamental de su estructura. El hecho de que nuestros resultados demuestren que un viroide estimula la síntesis de quitinasa indica que la inducción de esta defensa antifúngica específica está conectada a una red de sucesos que son disparados coordinadamente como respuesta a una amplia variedad de patógenos y factores estresantes.

## BIBLIOGRAFÍA

- BELLES, J.M. & CONEJERO, V. (1989). Ethylene mediation of the viroid-like syndrome induced by Ag<sup>+</sup> ions in *Gynura aurantiaca* DC plants. *Journal of Phytopathology*, 124, 275-284.
- BELLES, J.M., GRANELL, A., DURAN-VILA, N. & CONEJERO, V. (1989). ACC synthesis as the activated step responsible for the rise of ethylene production accompanying Citrus Exocortis Viroid infection in tomato plants. *Journal of Phytopathology* (en prensa).
- BOLLER, T., GEHRI, A., MAUCH, F. & VÖGELI, U. (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22-31.
- BOL, J.F. (1988). Structure and expression of plant genes encoding pathogenesis-related proteins. En *Plant Gene Research: Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*. Ed. por D.P.S. Ver y R. Goldberg. Springer-Verlag, Wien, New York.
- BRADFORD, M. (1986). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- CARR, J. P., DIXON, D.C. & KLESSIG, D.F. (1985). Synthesis of pathogenesis-related proteins in tobacco is regulated at the level of mRNA accumulation and occurs on membrane bound polysomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 82, 7999-8003.
- CORNELISSEN, B.J.C., HOFT VAN HUIJSDUINJEN, R.A.M. & BOL, J.F. (1986 a). A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature* 321, 531-532.
- CORNELISSEN, B.J.C., HOOFT VAN HUIJSDUINJEN, R.A.M., VAN LOON, L.C. & BOL, J.F. (1986 b). Molecular cloning of messenger RNAs for "pathogenesis-related proteins 1a, 1b and 1c induced by TMV infection of tobacco. *The EMBO Journal* 5, 37-40.
- CONEJERO, V. & SEMANCIK, J.S. (1977). Analysis of the proteins in crude plant extracts by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathology* 67, 1424-1426.
- DE WIT, P.J.G.M., TOMA, I.M.J. & JOOSTEN, M.H.A.J. (1988). RAcE specific elicitors and pathogenicity in the *Cladosporium fulvum* tomato interactions. En *Physiology and Biochemistry of Plant Microbial Interactions*. Ed. por N.T. Keen, T. Koruige y L.L. Walling. The American Society of Plant Physiological and Molecular Plant Pathology 31, 83-90.
- GRANELL, A., BELLES, J.M., & CONEJERO, V. (1978). Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver and ethephon. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31, 83-90.
- GIANINAZZI, S., MARTIN, C. & VALLEE, J.C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la repression de la synthèse virale. *CR Academie du Sciences. Paris d270*, 2383-2386.
- GIANINAZZI, S. (1982). Antiviral agents and inducers of virus resistance: analogies with interferon. En *Active Defense Mechanisms in Plants*. Ed. por R.K.S. Wood, págs. 275-298. Plenum Press, New York.
- HARBOE, N. & INGILD, A. (1973). Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. En *A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis*. Ed. por N. H. Axelsen, J. Krøl y B. Weeke, págs. 161-164. universitetsforlaget, Oslo.
- HOOFT VAN HUIJSDUINJEN, R.A.M., VAN LOON, L.C. & BOL, J.F. (1986 a). c

- DNA cloning of six mRNAs induced by TMV infection of tobacco and characterization of their translation products. The EMBO Journal 5, 2057-2061.
- HOOFT VAN HUIJSWIJNEN, R.A.M., ALBLAS, S.W., DE RIJK, R.H. & BOL, J.F. (1.986 b).** Induction by salicylic acid of pathogenesis related proteins and resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species. Journal of General Virology 67, 2135-2143.
- JOOSTEN, M.H.A.J. & DE WIT, P.J.G.M. (1.989).** Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1, 3- $\beta$ -glucanases and chitinases. Plant physiology 89, 945-951.
- KAUFFMANN, S., LEGRAND, M., GEOFFROY, P. & FRITIG, B. (1.987)** Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have 1, 3- $\beta$ -glucanase activity. The Embo Journal 6 (11), 3209-3212.
- KOMBRINK, E. & HAHNBROCK, K. (1.986).** Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytophogenic fungi. Plant Physiology 81, 216-221.
- KOMBRINK, E., SCHRÖDER, M. & HAHNBROCK, K. (1.988).** Several "pathogenesis-related" proteins in potato are  $\beta$ -1, 3-glucanases and chitinases. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 85, 782-786.
- LEGRAND, M., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P. & FRITIG, B. (1.987).** Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84, 6750-6754.
- LUCAS, J., CAMACHO-HENRIQUEZ, A., LOTTSPREICH, F., HENSCHEN, A. & SANGER, H.L. (1.985).** Amino acid sequence of the "pathogenesis related" leaf protein p14 from viroid-infected tomato reveals a new type of structurally unfamiliar proteins. The EMBO Journal 4, 2745-2749.
- MATSOUKA, M. & OHASHI, Y. (1.986).** Induction of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves. Plant Physiology 76, 607-611.
- MAUCH, F., HADWIGER, L.A. & BOLLER, T. (1.988 B).** Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two  $\beta$ -1, 3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. Plant Physiology 87, 325-333.
- MAUCH, F., MAUCH-MANI, b. & BOLLER, T. (1.988 B).** Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase. Plant physiology 88, 936-942.
- MAYER, R.J. & WALKER, J.H. (1.978).** Techniques in the Life Sciences: Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry, Parte II. Ed. por H.L. Kornberg, J.C. Metcalf, C.I. Pogson y K.F. Tipton, pags. 1-32. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- MÉTRAUX, J.P. & BOLLER, T. (1.986).** Local a systemic induction of chitinase of cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infections. Physiological and Molecular Plant Pathology 28, 161-169.
- MÉTRAUX, J.P., STREIT, L. & STAUB, Th. (1.988).** A pathogenesis related protein in cucumber is a chitinase. Physiological and Molecular Plant Pathology 33, 1-9.
- MOLANO, J., DURAN, A. & CABIB, E. (1.977).** A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. Analytical Biochemistry 83, 648-656.
- MOLANO, J., POLACHECK, I., DURAN, A. & CABIB, E. (1.979).** An endochitinase from wheat germ. Journal of Biological Chemistry 254, 4901-4907.
- OUCHTERLONY, O. & WILSON, L.A. (1.968).** Handbook of Experimental Immunology, 2a edn., Vol. I. Ed. por D.M. Weir, pags. 19.1 - 19.39. Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1.973.
- PEGG, G.F. & YOUNG, J.H. (1.982).** Purification and characterization of chitinase enzymes

- from healthy and *Verticillium albo-atrum* infected tomato plants and from *V. albo-atrum*- Physiological Plant Pathology 21, 389-409.
- REISFELD, R.A., LEWIS, V.J. & WILLIAMS, D.J. (1962). Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195, 156-160.
- REISSIG, J.L., STROMINGER, J.L. & LELOIR, L.F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. Journal of Biological Chemistry 217, 959-966.
- RODRIGO, I., VERA, P. & CONEJERO, V. (1989). Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase. European Journal of Biochemistry (en prensa).
- SCHLUMBAUM, A., MAUCH, F., VÖGELI, U. & BOLLER, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. Nature 324, 237-251.
- SEMANCIK, J.S., MORRIS, R.J., WEATHERS, L.G., RODORF, G.F. & KEARNS, D.D. (1975) Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. Virology 80, 218-221.
- SEMANCIK, J.S. & CONEJERO, V. (1978). Viroid pathogenesis and expression of biological activity. En Viroids and Viroid-like Pathogens. Ed. por J.S. Semancik, pags. 71-126. CRS Press, Inc., Boca Ratón, Florida.
- TOWBIN, H., STAHLIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76, 4350-4354.
- VAN LOON, L.C. (1982). Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. En Active Defense Mechanism in Plants. Ed. por R.K.S. Wood, págs. 247-272. Plenum Press, New York.
- VAN LOON, L.C. (1983). The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. Netherland Journal of plant Pathology 89, 265-273.
- VAN LOON, L.C. (1985). Pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology 4, 111-116.
- VAN LOON, L.C. (1989). Stress proteins in infected plants. En Plant Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives, Vol. 3. Ed. por T. Kosuya y E.W. Nestar. McGraw-Hill, New York (En prensa).
- VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN" II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40, 199-221.
- VERA, P. & CONEJERO, V. (1988). Pathogenesis-related proteins in tomato. P69 as an alkaline endoproteinase. Plant Physiology 87, 58-63.
- VÖGELY-LANGE, R., HANSEN-GEHRI, A., BOLLER, T. & MEINS, F. Jr. (1988). Induction of the defense-related glucanohydrolases,  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase, by tobacco mosaic virus infection of tobacco leaves. Plant Science 54, 171-176.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. F. Meins (Friedrich-Miescher-Institut, Basilea) la donación del anticuerpo contra la quitinasa P33 de tabaco. Esta investigación ha sido subvencionada por ayudas de la CICYT, Ministerio de Educación y Ciencia y de la Institució Valenciana D' Estudis i Investigació (Generalitat Valenciana, Diputació Provincial de Valencia). F.G.B. agradece al Ministerio de Educación y Ciencia (Programa Nacional de Formación de Personal Investigador) la concesión de una beca postdoctoral.

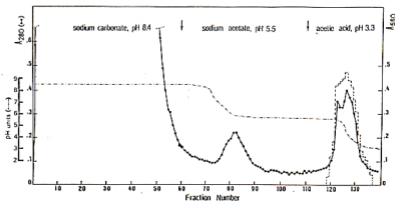


Fig. 1.- Fraccionamiento de la actividad quitinasa en una columna de quitina.

Los extractos eran cargados en una columna de quitina regenerada (30 x 3 cm) equilibrada con tampón 20 mM carbonato sódico, pH 8.4. La columna fué desarrollada a temperatura ambiente con un flujo de 100 ml por hora. Las fracciones recogidas tenían un volumen de 8 ml. La actividad quitinasa se eluyó mediante cambios del pH, usando diferentes tampones. Las proteínas se midieron espectrofotométricamente a 278 nm (•—•). La actividad quitinasa (histograma) se ensayó tal como se describe en Material y Métodos. El gradiente de pH está representado por (---).

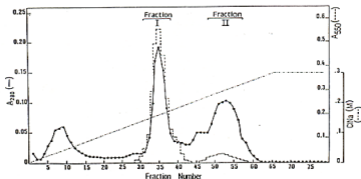


Fig. 2.- Perfil de elución de la actividad quitinasa después de la cromatografía de intercambio iónico.

La columna de CM-Sepharosa se equilibró, cargó y eluyó tal como se describe en Material y Métodos. Las proteínas se midieron espectrofotométricamente a 278 nm (•—•). La actividad quitinasa (histograma) se ensayó tal como se indica en Material y Métodos. El gradiente de NaCl se representa como: (---).

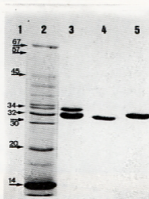


Fig. 3.- SDS-PAGE de las quitinasas.

Carrera 1, masas moleculares; carrera 2, extracto crudo obtenido de hojas de tomate infectadas con CEVd; carrera 3, fracción de quitinasas después de la cromatografía de afinidad sobre quitina regenerada; carreras 4 y 5, quitinasas purificadas, fracciones I (TCh 1) y II (TCh2), respectivamente, después de la cromatografía de intercambio iónico sobre CM-Sepharosa.

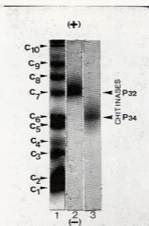


Fig. 4.- Electroforesis catódica de las quitinasas utilizando el sistema no-desnaturalizante de Reisfeld et al. (1962).

Carrera 1, extracto ácido de hojas de tomate infectadas con CEVd; carreras 2 y 3, quitinasas purificadas, fracciones I, TCh1 (aquí marcada como P32), y II, TCh2 (marcada como P34), respectivamente después de la cromatografía de intercambio iónico sobre CM-Sepharosa.



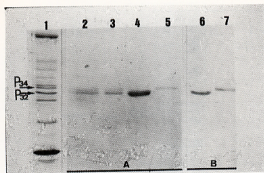


Fig. 5.- Inmuno blots de extractos crudos y quitinasas purificadas a partir de hojas de tomate infectadas por CEVd realizadas con antisueros contra quitinasa de tomate y de tabaco.

Carrera 1, SDS-PAGE de un extracto crudo de hojas de tomate infectadas por CEVd. Las carreras 2 a 7 se hicieron reaccionar con (A) antisuero contra quitinasa de tomate, (B) con antisuero contra quitinasa de tabaco. Carrera 2, extracto crudo; carrera 3, preparación de quitinasa después de cromatografía de afinidad sobre quitinasa regenerada, carreras 4 y 6, quitinasa purificada, fracción I (TCh1); carrera 5 y 7, quitinasa purificada, fracción II (TCh2).

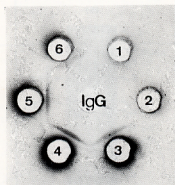


Fig. 6.- Ensayos de doble inmunodifusión entre la quitinasa TCh1 y el antisuero preparado contra la misma.

El pocillo central contenía 10  $\mu$ l de IgG obtenida a partir de conejos inmunizados contra la quitinasa purificada TCh 1. Los pocillos exteriores contenían: (1) control, sin muestra; (2) 10  $\mu$ l extracto crudo de plantas sanas, (3) 10  $\mu$ l de extracto crudo de plantas tratadas con ethephon; (4) 10  $\mu$ l de extracto crudo de plantas infectadas con CEVd; (5) 10  $\mu$ l de quitinasa purificada TCh1; (6) 10  $\mu$ l de quitinasa purificada TCh2. Tras 24 horas a 6°C. Las muestras eran teñidas con Coomassie Brilliant Blue como describen Mayer y Walker (1.978).

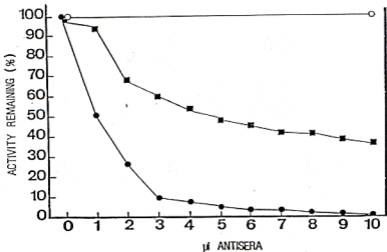


Fig. 7.- Inhibición de la actividad quitinasa purificada TCh1 por el antisuero.

Diferentes cantidades de antisuero de tomate (●) y de antisuero de tabaco (■) fueron añadidos a una cantidad determinada del enzima purificado en un ensayo estándar 5 minutos antes de la adición del sustrato. La actividad se indica como porcentaje respecto a la actividad que se obtiene cuando se trata con suero preinmune (○).

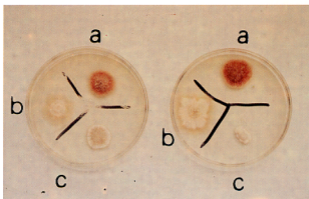


Fig. 8.- Inhibición del crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos por la quitinasa purificada TCh1.

Placa de la izquierda, ensayos de actividad contra: a) *Penicillium italicum*, b) *Colletotrichum gloeosporoides* y c) *Alternaria tenuis*. Placa de la derecha, ensayo control. Los ensayos se realizaron tal como se indica en Material y Métodos, incluyendo 10 µl de la quitinasa purificada TCh1 al medio de cultivo antes de la inoculación de los hongos.

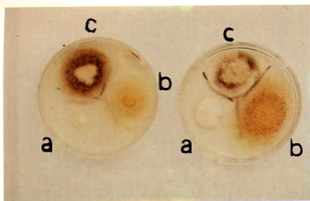


Fig. 9.- Inhibición del crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos por la quitinasa purificada TChI. Placa de la izquierda, ensayos de actividad contra: a) *Trichotecium roseum*, b) *Trichoderma viride* y c) *Fusarium culmorum*. Placa de la derecha, ensayo control. Los ensayos se realizaron tal como se indica en Material y Métodos, incluyendo 10  $\mu$ l de quitinasa purificada TChI al medio de cultivo antes de la inoculación de los hongos.