

MI PROYECTO DE TESIS

Estudiando los entresijos detrás de la grasa de la alubia

Alfonso Gonzalo de la Rubia
algor@unileon.es

De la misma manera que no se podría entender el epicureísmo sin conocer las dolencias renales que padecía el pensador, o el desarrollo de la idea de medio ambiente global sin la carrera técnica espacial que concluiría en la primera foto de nuestro planeta, tampoco se podría comprender esta tesis sin explicar la importancia que tiene para la provincia de León la producción de alubia. Y es que León supone el 44,32% del total del área cultivada de esta leguminosa en España y el 49,12% de la producción nacional, lo que ha llevado a la creación del sello Indicación Geográfica Protegida (IGP) Alubia de La Bañeza-León, que agrupa a 4 variedades (Canela, Plancheta, Pinta y Riñón), de las cuales, la variedad Riñón ha sido el sujeto de estudio de esta tesis. Sin embargo, dicha producción se ve perjudicada por una enfermedad conocida como enfermedad de la grasa (o simplemente “la grasa”), producida por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pph). Frente a esta patología de la alubia, cuyo agente causal describió Burkholder hace 100 años, seguimos sin contar con una solución eficaz, posiblemente por el hecho de que esta bacteria patógena sobreviva en la semilla, de manera que en la siguiente cosecha podrá volver a desencadenarse la enfermedad, aunque la proporción de semillas contaminadas sea muy baja (Arnold *et al.*, 2011).

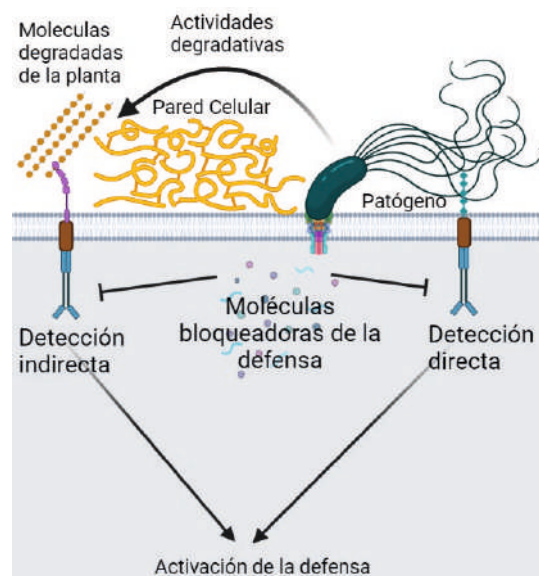


Figura 1. Esquema de las dos formas de detección de un patógeno por parte de las células de la planta: directa, a partir de moléculas conservadas en el patógeno; indirecta, a partir de moléculas degradadas de la propia planta. En cualquier caso, dicha detección conducirá a la activación de rutas de defensa, que pueden ser inhibidas por moléculas del propio patógeno.

Los mecanismos de patogenicidad (es decir, todos aquellos procesos que van a desencadenar la enfermedad en la planta) de esta bacteria son múltiples, pero resalta la gran producción de moléculas destinadas a bloquear el sistema de defensa de la alubia. Y es que las plantas y, por tanto, la alubia, presentan un verdadero sistema inmune, ya que sus células son capaces de percibir a un patógeno determinado y desarrollar respuestas defensivas específicas contra él (Jones y Dangl, 2006). Sin embargo, este sistema tiene una particularidad: estos organismos sésiles no contienen células inmunes móviles especializadas y cada célula es capaz de participar en los procesos de inmunidad. Es decir, cada una de ellas puede percibir al patógeno directamente (cuando logra reconocer en éste moléculas estructurales y muy conservadas por los grandes grupos de microorganismos) o indirectamente (**Figura 1**). Cuando aparece el agente infeccioso y empieza a degradar componentes celulares como consecuencia de su intento de colonización, se liberan moléculas de la propia planta que pueden ser percibidas por la planta también. En la mayoría de los casos, estas moléculas propias proceden de la pared celular, una estructura formada principalmente por polisacáridos y siendo ésta la más externa de todas las células de la planta. Y aquí es donde viene lo interesante: hoy sabemos que, aplicando dichas moléculas, aunque no haya aparecido todavía el patógeno, podemos lograr la activación del sistema inmune en la planta, de manera que cuando comience la infección, los mecanismos de defensa ya estarán desplegados y en forma, lo que resultará en un menor desarrollo de la enfermedad (Bacete et al., 2018). De esto se puede extraer una gran aplicación para proteger los cultivos de alubia: activar su sistema inmune para que ella mismo acabe con la bacteria Pph y no se desarrolle la enfermedad de la grasa. Pero, para ello, debe responderse a una serie de preguntas.

¿Por qué la alubia es susceptible al ataque de Pph?

A lo largo de esta tesis, hemos intentado responder a esta pregunta, analizando una serie de respuestas fisiológicas y moleculares en la alubia, que deberían tener lugar después de la infección para resistir al patógeno, desde la percepción, pasando por las rutas celulares necesarias para activar genes implicados en defensa, así como la síntesis de grandes reguladores, como son las fitohormonas (sí, las plantas también presentan hormonas). De la misma manera que, y salvando todas las diferencias, si queremos averiguar por qué no tenemos acceso a internet en el móvil, debemos ir comprobando el estado del “router”, si llega señal al móvil, la capacidad del móvil para captarla, etc. Así, comprobamos entre otras cosas que la alubia no es capaz de sintetizar de forma efectiva una fitohormona muy importante para responder a la infección: el ácido salicílico (De la Rubia *et al.*, 2021a).

En cuanto conocimos este impedimento que tiene la alubia para responder al ataque, lo siguiente que quisimos comprobar fue si era posible activar el sistema inmune previamente a la infección, superando esa interrupción del sistema de defensa. Para ello, utilizamos una molécula sintética, análoga del ácido salicílico, conocida como ácido 2,6-dicloro-isonicotínico. Su aplicación dio lugar a, después de la inoculación posterior con la bacteria, un menor desarrollo de lesio-

nes debidas al patógeno, lo que abría una posibilidad enorme: pese a su susceptibilidad a Pph, si previamente activamos el sistema inmune de la alubia Riñón, repercutirá en una mayor resistencia cuando la bacteria ataque posteriormente (De la Rubia *et al.*, 2021b).

¿Qué cambios produce en la planta la activación de la defensa? Poniendo el foco en las pectinas

Sin embargo, esta tesis no solamente buscó tener una aplicación clara en el campo de forma inmediata (que también). A menudo en el laboratorio, buscamos responder a preguntas más amplias, otros dirán más teóricas o más fundamentales, que dan un poco de pausa a ese carácter práctico de la investigación; pero, ojo, los descubrimientos fruto de esas preguntas serán, sin lugar a duda, el punto de apoyo sobre el que se desarrollen las aplicaciones del futuro. Y es por eso por lo que nos detuvimos a investigar qué cambios acontecían en la planta cuando activábamos su sistema inmune, para explicar esa mayor resistencia a Pph observada.

Los análisis posteriores nos llevaron a confirmar que la pared celular cumple un papel capital en los procesos de defensa. ¿Por qué? Porque, tras la activación del sistema inmune en alubia, observamos un drástico remodelado de esta estructura: mayor contenido en celulosa (principal componente de la mayoría de las paredes celulares), pero también cambios en el entrecruzamiento entre los polisacáridos matriciales (hemicelulosas y pectinas), lo que puede repercutir en una pared celular más resistente al ataque del patógeno (De la Rubia *et al.*, 2021b). Si entendiéramos esta estructura como una madeja con diferentes fibras de lana formando una red, la activación del sistema inmune produciría una mayor cantidad de enlaces entre esas fibras, que aquí serían los polisacáridos de pared, lo que impediría una fácil entrada de la bacteria hacia la célula. Según nuestras observaciones, cuando se producía la infección en una planta cuyo sistema inmune no había sido activado con anterioridad, la pared celular sufría algunos cambios, sobre todo en pectinas, pero más sutiles, lo que repercutía en una estructura que no impedía la colonización por parte del patógeno.

Por esta razón, se continuó estudiando más en profundidad los cambios que tenían lugar en la pared celular después de la infección. Para ello, nos embarcamos en una colaboración con un grupo de investigación de Santiago de Chile, donde llegué a disfrutar de una estancia de investigación de 3 meses. Durante ese período, nos apoyamos en un estudio transcriptómico (esto es, un análisis masivo del nivel de expresión de todos los genes de la alubia) que nos permitió conocer los genes que podían participar en los procesos de inmunidad, entre los que observamos genes relacionados con la pared celular, en concreto con pectinas. Además, detectamos cambios en los estados de metilación entre los que se puede encontrar el homogalacturonano (un tipo de pectina) que es indicativo de su facilidad para ser degradado. Estos cambios son producto de unas enzimas, llamadas pectin metil esterases, de y sus inhibidores. De todas las proteínas que existen con esta actividad, nuestros resultados señalaron una en particular (PMEI3), cuya función podría ser muy relevante en estos procesos. Dicha importancia, se

demostró en mutantes de *Arabidopsis thaliana*, una planta de referencia fácil de manipular genéticamente. Al eliminar el gen que codificaba para esa proteína en concreto, observamos que Pph era capaz de desarrollar la enfermedad en esta planta icuando en principio *Arabidopsis* era resistente a esta bacteria!

Resumiendo... ¿qué repercusiones tienen estos estudios?

Estos descubrimientos pueden tener una gran importancia en un futuro para entender los procesos de resistencia y susceptibilidad, pero no solo en la alubia (que también), sino los de otras especies de plantas ante otros patógenos. Es más: dicho conocimiento nos puede servir para desarrollar soluciones eficaces. En nuestro caso, como punto final a la tesis, probamos diferentes extractos naturales que han sido usados en la agricultura tradicional. De todos ellos, proponemos que preparaciones en base a ortiga común podrían ser usadas para frenar la enfermedad de la grasa, ya que se ha comprobado una activación de rutas de defensa en la variedad Riñón y una mayor resistencia en ensayos de infección preliminares hasta cierto punto (De la Rubia *et al.*, 2022). Sin embargo, todavía no sabemos cómo se activa esa protección, ni los compuestos de la ortiga que la promueven: ¿Es por qué estamos añadiendo moléculas asociadas a daño que mencionábamos más arriba? Si es así, ¿cuáles son esas moléculas y cómo las detectaría la planta? Es más, ¿la activación produce cambios en la pared celular similares a los observados con el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico? ¿Influye en la actividad de la enzima PME13? ¿Se produce una resistencia interespecífica? ¿Se puede aplicar en campo?... Son algunas de las preguntas que nos animan a continuar investigando. Seguiremos informando.

Directora: Dra. Penélope García Angulo (**Fig. 2**)



Figura 2. El doctor Alfonso Gonzalo de la Rubia con la directora de la tesis, la doctora Penélope García Angulo, tras la defensa de la tesis, el 1 de abril de 2022.

Bibliografía:

Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W. y Mansfield, J. W. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean' to supermodel. *Molecular Plant Pathology*, 12(7):617–627.

- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E. y Molina, A. 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* 93(4):614–636.
- De la Rubia, A. G., Centeno, M. L., Moreno-González, V., De Castro, M. y García-Angulo, P. 2021a. Perception and first defense responses against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris*: Identification of wall-associated kinase receptors. *Phytopathology*, 111(12):2332–2342.
- De la Rubia, A. G., Mérida, H., Centeno, M. L., Encina, A. y García-Angulo, P. 2021b. Immune priming triggers cell wall remodeling and increased resistance to halo blight disease in common bean. *Plants*, 10(8):1514.
- De la Rubia, A. G.; De Castro, M.; Medina-Lozano, I. y García-Angulo, P. 2022. Using plant-based preparations to protect common bean against halo blight disease: The potential of nettle to trigger the immune system. *Agronomy*, 12:63.
- Jones, J. D. y Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.