

Luz Nelly Díaz Puentes

Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas
y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión

RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios, vol. 1, núm. 2, julio-diciembre, 2009, pp. 32-55,

Fundación Instituto de Estudios Avanzados

Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179214945004>

RET

RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios,

ISSN (Versión impresa): 1856-9161

publicaciones@idea.gob.ve

Fundación Instituto de Estudios Avanzados

Venezuela

¿Cómo citar?

Fascículo completo

Más información del artículo

Página de la revista

www.redalyc.org

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión

Molecular interactions between plants and microorganisms: saponins as plant chemical defences and their microbial tolerance – a review

Luz Nelly Diaz Puentes

Centro Nacional de Biotecnología Agrícola, Instituto de Estudios Avanzados IDEA.

32

Las defensas de las plantas son una compleja y extensa red con diversos niveles de acción, que responden de forma sincrónica ante la presencia de estrés biótico o abiótico. Las plantas presentan defensas físicas, como la pared celular, y químicas, como las saponinas y fitoalexinas. Estos compuestos son bastante antifúngicos, y la mayoría de los microorganismos que habitan plantas productoras de estas moléculas poseen mecanismos que les permiten tolerar dichas defensas químicas. Tal es el caso de patógenos del tomate como *Septoria lycopersici* y *Fusarium oxysporum*, los cuales poseen tomatinasas que detoxifican la saponina tomatina. De forma similar, el hongo patógeno de la avena *Gaeumannomyces graminis* produce una avenacinasa que detoxifica la saponina avenacina. La presencia de esta enzima en *G. graminis* es esencial para la patogenicidad del hongo en las raíces de avena. Las tomatinasas de *S. lycopersici* y *F. oxysporum* tienen una segunda función en la interacción con sus huéspedes: además de detoxificar las saponinas, las defensas de las plantas son suprimidas por los productos de las dos tomatinasas, los cuales son la β 2-tomatina, la tomatidina y la licotetraosa. La tolerancia a las saponinas de sus huéspedes también ha sido observada en hongos endófitos, en hongos descomponedores de biomasa vegetal y en bacterias fitopatógenas. Este artículo revisa y discute el modo de acción de las saponinas y los mecanismos de tolerancia de los microorganismos que interactúan con las plantas productoras de saponinas.

Palabras clave

saponina, antimicrobiano, tomatina, avenacina, chaconina, interacciones, patógenos, defensas químicas

Plants defend themselves through a complex multi layered system that responses in a synchronized way to biotic or abiotic stress. Cell wall represents a physical barrier, while saponins and phytoalexins represent chemical barriers. These molecules are high antimicrobial and most microorganisms that inhabit plants that produce such kind of compound have tolerance mechanisms against those molecules. For example *Septoria lycopersici* and *Fusarium oxysporum* are tomato pathogens that detoxify the saponin tomatine. In a similar way, the oat pathogen *Gaeumannomyces graminis* produces an avenacinase that detoxifies the saponin avenacin. This enzyme is essential for the full *G. graminis* pathogenesis on oat roots. Tomatinases from *S. lycopersici* and *F. oxysporum* play a second role in their plant interactions. The products of these tomatinases, which are β 2-tomatine, tomatidine and the lycotetraose, suppress plant defences. Tolerance to saponins has been observed also in endophyte fungus, saprophytic fungus that decompose vegetal biomass and in phytopathogenic bacteria. This review discusses the antimicrobial properties of saponins and the tolerance mechanisms on microorganisms that have interactions with plants producing saponins.

Keywords

saponin, antimicrobial, tomatine, avenacin, chaconine, interactions, pathogen, chemical defences

Introducción

33

Las plantas están expuestas a una gran variedad de microorganismos, los cuales pueden ser benéficos, como las micorrizas, o adversos para la planta. Las plantas necesitan reconocer estos microorganismos y responder a ellos de una forma apropiada. En el caso de los organismos adversos, las plantas se defienden a través de un sistema complejo de múltiples niveles de defensa que actúan de forma sincronizada y casi simultáneamente. El sistema de defensa es similar a la protección de la reina en un juego de ajedrez. Algunas defensas son constitutivas, es decir, que se producen durante todo el ciclo de la célula, mientras que otras son inducidas por el estrés generado por agentes patógenos. Entre las defensas constitutivas están las paredes celulares (que son una barrera física) y algunos metabolitos, como son las saponinas, los glicósidos cianogénicos y los ácidos hidroxámicos cíclicos, los cuales representan una barrera química. Estos compuestos se encuentran generalmente almacenados en vacuolas u organelos, y son liberados al citoplasma o extracelularmente. Por el contrario, en las defensas inducidas, los compuestos químicos que actúan como barreras son sintetizados como respuesta al ataque de patógenos o al estrés abiótico, y su actuación está restringida a las células que rodean la zona afectada. Las defensas químicas inducidas de las plantas son llamadas fitoalexinas (Glazebrook, 2005; Morrissey *et al.*, 1999; Mysore *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005). La presente revisión recoge las investigaciones que estudian las interacciones moleculares entre las plantas productoras de saponinas y los microorganismos que habitan en dichas plantas.

Interacciones planta - patógenos

Una vez que el patógeno penetra la planta, ya sea a través de aperturas naturales (estomas), o atravesando directamente la pared celular, hay inducción de cambios en las células cercanas al invasor, y en la mayoría de los casos estos cambios bloquean el avance del patógeno. Las interacciones entre plantas y microorganismos son generalmente llamadas interacción huésped o de no-huésped. En la primera (sistemas huésped), la planta provee de nutrientes al patógeno, mientras que en la segunda, la planta no puede mantener el crecimiento del patógeno. Los sistemas huésped suelen subdividirse en interacciones compatibles o incompatibles. Estas interacciones están basadas en la habilidad de la planta para reconocer patógenos específicos. En la interacción

incompatible, la planta reconoce el patógeno y bloquea su crecimiento inmediatamente después de la penetración. En las interacciones compatibles, el microorganismo suprime o retrasa el reconocimiento de este por la planta, de tal forma que el patógeno puede invadir la planta. Los patógenos biotróficos no causan la muerte celular de su huésped, mientras que los patógenos necrotróficos, que invaden la planta a través de heridas o de tejido muerto, sí matan la célula y se alimentan de sus desechos (Glazebrook, 2005; Mysore *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005). Los patógenos hemibiotróficos combinan las dos formas de crecimiento en la planta (biotrófica y necrotrófica); un ejemplo es el hongo *Septoria lycopersici*, el cual invade el espacio intercelular de las hojas de tomate, y al inicio de la infección crece biotróficamente, mientras que al final de la infección crece como un necrotrófico (Martín-Hernández *et al.*, 2000). Un ejemplo de patógeno biotrófico es el hongo *Cladosporium fulvum*, el cual también crece en el espacio intercelular de las hojas de tomate. Después de doce días de infección hay gran acumulación de micelio alrededor del tejido vascular y los conidióforos del hongo salen por los estomas con muy poca muerte celular en el huésped. (Martín-Hernández *et al.*, 2000; Rivas *et al.*, 2005). *Alternaria alternata* es un buen ejemplo de patógeno necrotrófico; este patógeno produce cáncer del tallo en plantas de tomate y su patogenicidad depende de la producción de la toxina AAL, la cual es específica hacia el tomate (Egusa *et al.*, 2009; Egusa *et al.*, 2008).

Las plantas reconocen Patrones Moleculares Generales Asociados a los Patógenos (PMGAP - siglas en inglés, PAMP-), como la flagelina en las bacterias y la quitina en las paredes celulares de los hongos. Este reconocimiento se realiza por medio de proteínas extracelulares con dominios de transmembrana, las cuales activan cascadas de quinasas e inducen las respuestas de defensa. Las plantas, además, reconocen elicitores específicos de patógenos a través de un sistema de vigilancia mediado por proteínas específicas de resistencia. Este reconocimiento es altamente específico y es conocido como interacción gen-a-gen (Flor, 1971), el cual se basa en el reconocimiento directo o indirecto de un determinante de avirulencia (avr) del patógeno por un correspondiente determinante de resistencia (R) en el huésped, lo que correspondería a una interacción incompatible; si la planta o el patógeno no posee el apropiado determinante de resistencia o de avirulencia, entonces la activación de la respuesta de defensa de la planta puede ser retrasada o inefectiva, lo que correspondería a una interacción com-

patible (Glazebrook, 2005; Mysore *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005).

Ciertas proteasas extracelulares de las plantas participan en la detección de patógenos y en la activación de las respuestas de defensa, mientras que otras degradan proteínas Avr. Algunos patógenos se liberan de dichas proteasas con la producción de inhibidores de proteasas. Durante la detección de patógenos también ocurre un cambio en los flujos de iones en la membrana. Segundos después de detectar al patógeno, el flujo de iones entre $\text{Ca}^{++}/\text{H}^{+}$ y $\text{K}^{+}/\text{Cl}^{-}$ es inducido y la matriz extracelular es alcalinizada. Seguido del flujo de iones, hay un aumento en la expresión de los genes relacionados con las defensas, que llevan a (I) una producción de fitoalexinas, (II) el fortalecimiento físico de las paredes celulares por la producción de callo y ligninas, y (III) la inducción de genes relacionados a la patogenicidad (RP -siglas en inglés, PR-). Algunas respuestas en los sistemas de no-huésped llevan a la producción localizada de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO - siglas en inglés, ROS-), y la célula vegetal muere. A esta muerte inducida se le conoce como Respuesta Hipersensible (RH - siglas en inglés, HR-). Muchas de las respuestas de defensa inducidas en la resistencia de no-huésped son similares a las inducidas en la resistencia de gen-a-gen, sin embargo, no está claro si las dos resistencias involucran las mismas vías de transducción de señales (Glazebrook, 2005; Mysore *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005).

La mayoría de las proteínas relacionadas a la patogenicidad son hidrolasas, como las glucanasas (PR-2), las quitinasas (PR-3) y las peroxidasas (PR-9); las dos primeras liberan fragmentos de la pared celular de los hongos, los cuales, a su vez, activan las respuestas de defensa de la planta. Otras proteínas relacionadas a la patogenicidad son las defensinas (PR-12), las tioninas (PR-13) y las proteínas que transfieren lípidos (PR-14). Las proteínas relacionadas a la patogenicidad actúan coordinadamente y son codificadas por más de un gen, por lo que la inactivación de una de ellas no hace a la planta susceptible a los patógenos (Glazebrook, 2005; Mysore *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005).

Parte de la efectividad del patógeno sobre el huésped se debe a que el patógeno evade o suprime las defensas de la planta. Esto es particularmente probable durante las interacciones compatibles con patógenos biotróficos, ya que ellos tienen que evadir la respuesta hipersensible de la planta. Esta respuesta hipersensible es eficiente para bloquear los patógenos durante interacciones in-

compatibles; sin embargo, no es efectiva en interacción con patógenos necrotróficos, sean compatibles o incompatibles, porque el crecimiento de hongos necrotróficos es favorecido por la respuesta hipersensible de la planta hacia el patógeno: Los hongos necrotróficos poseen un grupo de enzimas, como la superóxido dismutasa, las peroxidadas y las catalasas, que inactivan el oxígeno reactivo producido por la planta durante la reacción hipersensible (Govrin *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, evadir o suprimir las defensas de la planta es importante para la infección por patógenos biotróficos, es así como algunos patógenos escapan al reconocimiento de PMGAP por la planta; por ejemplo, la bacteria simbiote *Bradyrhizobium japonicum* produce un glucan cíclico en su pared celular que podría bloquear el correspondiente receptor PMGAP en la planta. Por otra parte, el hongo *Blumeria graminis f. sp. Hordei* suprime las respuestas de no-huésped y de gen – a – gen, aunque los mecanismos de supresión aún son desconocidos (Glazebrook, 2005; Mysore *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005).

Una variedad de componentes de señalización en la célula vegetal, como el etileno, el ácido salicílico y el ácido jasmónico están involucrados en la resistencia de la planta. El ácido salicílico es requerido para la resistencia a biotrófos y hemibiotrófos y para la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA - siglas en inglés, SAR-). Por el contrario, el ácido jasmónico y el etileno median la resistencia a los necrotróficos. Sin embargo, el ácido jasmónico también puede contribuir a la defensa contra los biotrófos y hemibiotrófos. Existe una gran comunicación cruzada entre la señalización por el ácido salicílico y por el ácido jasmónico – etileno. La mayor parte de dicha comunicación consiste en represión mutua; sin embargo, algunos genes pueden ser inducidos similarmente por los ácidos jasmónico y salicílico. Los perfiles de expresión de los genes en las redes de señalización del ácido salicílico – ácido jasmónico – etileno sugieren la existencia de una ruta hasta ahora no caracterizada, que opera también en el reconocimiento del patógeno y que es independiente del ácido salicílico – ácido jasmónico – etileno, pero que eventualmente puede solaparse con el señalamiento que media el ácido jasmónico-etileno (Glazebrook, 2005; Mysore *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2003; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005).

Defensas químicas de las plantas

Parte de la comunicación de las plantas con su entorno se da por medio de compuestos químicos, conocidos tradicionalmente como metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son los que la planta utiliza para desarrollarse, crecer y reproducirse. Un metabolito producido en la misma vía metabólica puede ser considerado primario o secundario, dependiendo de la función que cumpla en la célula. Un buen ejemplo es el ácido kaurenoico y el ácido abiético y la prolina y el ácido pipercolico (Fig. 1). Debido a que la línea de división entre los metabolitos primarios y secundarios es bastante tenue, algunos autores prefieren llamarlos como productos naturales. Las defensas químicas de las plantas han sido consideradas usualmente como metabolitos secundarios, porque aunque son importantes para la interacción de la planta con su entorno, no son indispensables para la vida de la planta, como sí es el caso de la glucosa; de hecho, sin glucosa no hay metabolitos secundarios (Croteau *et al.*, 2000). Sin embargo, el dividir los metabolitos de la célula vegetal en metabolitos primarios y secundarios, hace divisiones en la célula que no existen: en la célula vegetal todos los metabolitos funcionan coordinadamente para el buen desempeño de la misma. En lo que

se describe a continuación, los metabolitos secundarios o productos naturales serán referidos como compuestos o metabolitos químicos.

Las plantas poseen unas defensas químicas constitutivas y unas inducidas; sin embargo, en ciertas condiciones y en algunas plantas, un compuesto puede ser producido constitutivamente, pero sus niveles se incrementan en respuesta a un ataque externo. En algunos casos, un compuesto puede ser constitutivo en las raíces pero inducido en las hojas de la misma planta, o viceversa. Se considera que la mayoría de las saponinas, los glicósidos cianogénicos y los ácidos hidroxámicos cíclicos son defensas constitutivas de las plantas, mientras que las fitoalexinas se consideran defensas inducidas (Morrissey *et al.*, 1999). Uno de los compuestos constitutivos que puede ser visualizado fácilmente es la saponina *avenacina A-1*, la cual es fluorescente bajo la luz UV, por la presencia de un anillo fenil en su molécula (Fig. 2-A) (Morrissey *et al.*, 1999; Osbourn *et al.*, 1994). La acumulación de la fitoalexina del sorgo también es fácilmente observada bajo el microscopio de luz (fig. 2-B) (Snyder *et al.*, 1991; Snyder *et al.*, 1990). El azufre elemental es uno de los primeros fungicidas conocidos y es considerado una fitoalexina. Su acumulación se ha observado en el tejido vascular de plantas de cacao resistentes a *Verticillium dahliae*, por medio de un microscopio electrónico de escaneo acoplado a un microanálisis de rayos-X con dispersión de energía (fig. 2-C) (Cooper *et al.*, 1996). Por otro lado, aunque las saponinas son moléculas producidas constitutivamente, su concentración puede aumentar como respuesta a un estímulo. Tal es el caso de suspensiones celulares de *Panax ginseng* C. A. Meyer que fueron estimuladas con extractos de lavaduras, ácido oligogalacturónico (derivado de las paredes celulares vegetales) o con metil jasmonato. Las suspensiones celulares acumulan saponinas (Lu *et al.*, 2001), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ácido jasmónico; además producen óxido nítrico sintasa y la sintasa β-amirina y, adicionalmente, expresan los genes que codifican para la escualeno sintasa y la epoxidasa escualeno, enzimas involucradas en la biosíntesis de las saponinas (Hu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2003).

Las evidencias indican que los microorganismos que viven en las plantas poseen algún mecanismo de tolerancia a las defensas químicas de ellas. Dicha tolerancia puede estar dada por cualquiera de los siguientes mecanismos: (I) modificación enzimática del compuesto, (II) transportadores de membrana implicados en la tolerancia a compuestos naturales tóxicos y a fungicidas, (III) cambios en las concentraciones celulares de los com-

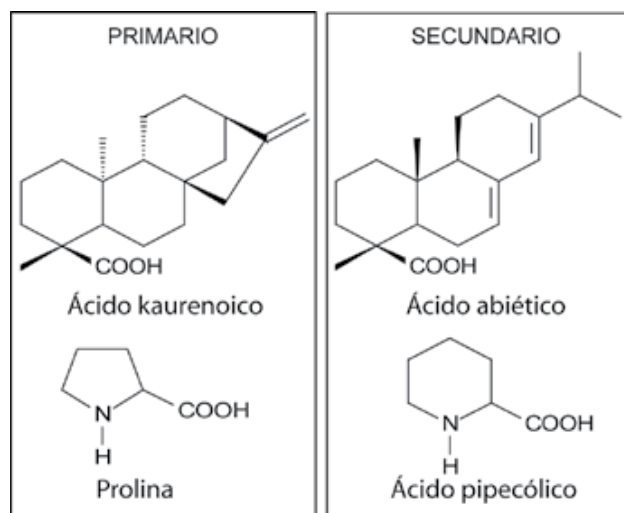


FIGURA 1. Metabolitos de plantas primarios o secundarios con el mismo origen biosintético. El ácido kaurenoico y la prolina son considerados metabolitos primarios porque son esenciales para el desarrollo de la célula. El ácido kaurenoico es un intermediario en la síntesis de la fitohormona giberelina, mientras que la prolina es un aminoácido esencial. Los ácidos abiético y pipercolico son considerados metabolitos secundarios porque no son primordiales para el desarrollo de la célula. El ácido abiético es una resina presente en los miembros de plantas Fabaceae y Pinaceae; mientras que el ácido pipercolico es considerado un alcaloide (Croteau *et al.*, 2000).

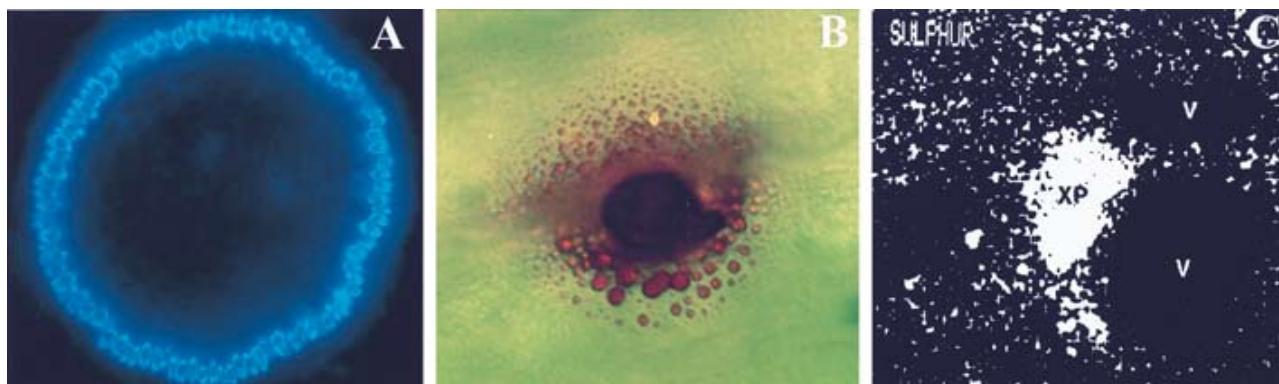


FIGURA 2. Localización de compuestos antimicrobianos en las plantas. (A) fluorescencia de la saponina avenacina A-1 bajo la luz UV. Este compuesto está localizado en la capa de células de la epidermis de las raíces de avena (Osborn, 1996; Osborn et al., 1994). La reproducción fue tomada de Osborn, 1996. (B) Una línea de sorgo resistente al ataque por *Colletotrichum graminicola*. Se observa la movilización de vesículas que contienen la fitoalexina pigmentada 3-deoxiantocianidina hacia el sitio por el que intentó penetrar el apresorio (Snyder et al., 1991; Snyder et al., 1990). La reproducción fue tomada de Morrissey et al., 1999. (C) Acumulación de azufre elemental (S₈) en el tejido vascular de una línea de cacao resistente, en respuesta al ataque por el hongo invasor de xilema *Verticillium dahliae*. Un mapa de rayos-X muestra la acumulación de azufre (blanco) en las células parenquimales del xilema (XP), vasos del xilema (V) (Cooper et al., 1996). La reproducción fue tomada de Cooper et al., 1996.

ponentes afectados por los compuestos vegetales y (IV) ausencia en la célula del blanco de acción del compuesto vegetal (Del Sorbo *et al.*, 2000; Morrissey *et al.*, 1999).

A continuación se hace una descripción detallada del papel de las saponinas en la defensa de las plantas y su interacción con los microorganismos que habitan en ellas. Para una descripción de los ácidos hidroxámicos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos como moléculas de defensa en las plantas y sus interacciones con los microorganismos, remito a los trabajos de Fomsgaard, Morrissey y Muller (Fomsgaard *et al.*, 2004; Morrissey *et al.*, 1999; Muller, 2009).

Saponinas

Las saponinas son glicósidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpenico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa (Fig. 3). Algunas saponinas tienen adicionalmente un motivo de azúcar, el cual es generalmente glucosa, unido al carbono-26 ó 28 (Fig.3 –avenacosido B). Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en monocotiledóneas, mientras que las saponinas terpénicas se encuentran especialmente en dicotiledóneas (Morrissey *et al.*, 1999; Muller, 2009). La gran diversidad estructural de las saponinas se refleja en sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas, y en el uso que se hace de ellas en jabones, antimicrobianos, anticancerígenos y

hemolíticos, entre otros. A pesar de su gran aplicación industrial y farmacéutica, las saponinas glicoalcaloides, en determinadas concentraciones, son tóxicas para microorganismos, insectos, animales y humanos, y por ello cuando están presentes en los alimentos se consideran como factores antinutricionales. Recientemente, las investigaciones se han centrado en desarrollar técnicas para remover las saponinas de los alimentos (Friedman, 2006; Güçlü-Üstündağ *et al.*, 2007; Wallace, 2004). Para

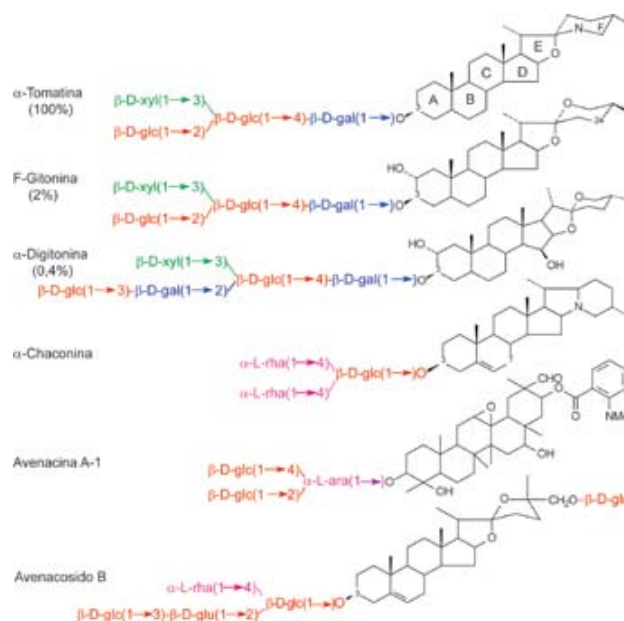


FIGURA 3. Ejemplos de saponinas antifúngicas. Los valores en paréntesis indican la actividad de la enzima tomatinasa sobre cada sustrato (Osborn et al., 1995; Sandrock et al., 1995). Gal=galactosa, glc=glucosa, xyl=xilosa, ara= arabinosa.

una comprensión detallada de las propiedades referidas de las saponinas remito a Güçlü-Üstündağ, Friedman, Ghisalberti, Rietjens y Wallace (Friedman, 2002; , 2004; Friedman, 2006; Ghisalberti, 2006; Güçlü-Üstündağ *et al.*, 2007; Rietjens *et al.*, 2005; Wallace, 2004)

Las saponinas, ya sean esteroidales o terpenoides, son sintetizadas a partir de la vía de los isoprenoides (terpenoides) (Camareri *et al.*, 2008; Krits *et al.*, 2007). La biosíntesis de las saponinas se está empezando a comprender gracias al avance en las técnicas para caracterizar proteínas y genes de la ruta biosintética de los terpenoides en células vegetales. Los estudios en *avena* (Mylona *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2006; Trojanowska *et al.*, 2000; , 2001; Trojanowska *et al.*, 1999), papa (Kohara *et al.*, 2005; Kohara *et al.*, 2007; Moehs *et al.*, 1997) y en la planta modelo *Medicago truncatula* (Suzuki *et al.*, 2002) son los que más han aportado a su entendimiento. También son importantes las investigaciones en la biosíntesis de las saponinas esteroidales en las plantas de *Aster sedifolius* (Bowdy *et al.*, 2004; Camareri *et al.*, 2008; Swenson *et al.*, 2005) y *Saponaria vaccaria* (Meesapyodsuk *et al.*, 2007).

Las saponinas de *M. truncatula* son glicósidos de por lo menos cinco agliconas terpenoides diferentes: soyasapogenol-B, soyasapogenol-E, ácido medicagénico, hederagenina y bayogenina. Estas agliconas son posiblemente derivadas de la β -amirina, la cual es el producto de la ciclización del 2,3-oxidoescualeno. Los genes de la sintasa escualeno, la epoxidasa escualeno y la β -amirina sintasa de *M. truncatula*, han sido clonados, y las proteínas que codifican estos genes han sido funcionalmente caracterizadas por expresión de la sintasa escualeno en *Escherichia coli*, la sintasa β -amirina en levadura y la complementación de la levadura mutante-erg1 con el gen de la epoxidasa escualeno. Cuando las suspensiones celulares de *M. truncatula* son expuestas al metil jasmonato, hay una fuerte inducción de estos genes y también acumulación de triterpenoides; sin embargo, la composición de esteroides no es afectada (Suzuki *et al.*, 2002), lo que indica que estos triterpenoides podrían ser canalizados para la producción de saponinas.

Kohara y colaboradores clonaron el gen de una glucosiltransferasa de *Solanum aculeatissimum*. Este gen ha sido expresado en *E. coli* y la proteína recombinante purificada; dicha enzima cataliza la 3-O-glucosilación de las saponinas esteroidales diosgenina, nuatigenina y tigogenina. Además, la enzima glucosila los alcaloides esteroidales solanidina, solasodina y tomatidina. Los análisis de la expresión del gen que codifica para esta glucosiltransferasa indican que hay una acumulación de transcritos como respuesta al estrés mecánico en la

planta, lo que sugiere que las saponinas y las enzimas involucradas en su biosíntesis hacen parte del sistema de defensas de la planta (Kohara *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha observado que las secuencias de aminoácidos de una glucosiltransferasa de *Solanum tuberosum*, aislada previamente por el mismo grupo de investigación, comparte un 75% de homología con la glucosiltransferasa de *S. aculeatissimum*; y adicionalmente las dos enzimas tienen la misma especificidad de sustrato (Kohara *et al.*, 2007; Moehs *et al.*, 1997).

Actividad antimicrobiana de las saponinas

Las saponinas con una cadena de azúcares unida al carbono-3 tienen gran actividad microbicida. Esta actividad depende de la ramificación de los azúcares (fig. 3) (Hostettmann *et al.*, 1995; Morrissey *et al.*, 1999), ya que cuando la saponina pierde un azúcar terminal, la cadena de azúcares queda linearizada y la saponina pierde la actividad microbicida (Armah *et al.*, 1999; Fewell *et al.*, 1997; Keukens *et al.*, 1995; Nishikawa *et al.*, 1984; Roddick, 1974; , 1975; Roddick *et al.*, 1984; Roddick *et al.*, 1986; Roddick *et al.*, 1988; Roddick *et al.*, 1992). Si se observan con el microscopio electrónico preparados de membranas lipídicas artificiales en presencia de saponinas, las membranas muestran grandes poros. Por lo tanto, se cree que la saponina forma complejos con los esteroides de las membranas celulares y produce grandes poros en las mismas que alteran su permeabilidad y la célula se lisa. Los poros no se forman cuando una o más azúcares de la cadena de la saponina se eliminan (Baumann *et al.*, 2000; LacailleDubois *et al.*, 1996; Roddick, 1975; , 1978; Simons, 2003; Simons *et al.*, 2005; Steel *et al.*, 1988). La saponina SC-2 de *Solanum chrysotrichum* causa grandes cambios en las membranas celulares de numerosas especies de la levadura *Candida* y afecta también la morfología de la pared celular: la membrana citoplasmática se separa de la pared y se desintegra. Además de una degradación total de los componentes celulares, los autores también reportan que la saponina SC-2 tiene una actividad fungicida o fungistática según la especie de *Candida* probada (Herrera-Arellano *et al.*, 2007). De forma similar, se ha observado por el microscopio electrónico de transmisión que las saponinas de *Yucca schidigera* alteran la pared celular de bacterias no celulolíticas (Wang *et al.*, 2000). Observaciones bajo el microscopio de las interacciones entre la saponina tomatina y las monocapas de diferentes esteroides indican que la interacción cambia dependiendo de la estructura del esteroide (Stine *et al.*, 2006). Algunas parejas de glicoal-

caloides esteroidales que tienen una aglicona en común, pero que se diferencian por las cadenas de azúcares, por ejemplo, la solanina y la chaconina (que son saponinas de la papa), muestran sinergismo en su actividad antifúngica y membranólítica, lo que indica que posiblemente exista una complementación entre los motivos de azúcares. Este sinergismo es particularmente efectivo cuando las proporciones son similares a las presentes naturalmente (Fewell *et al.*, 1993; Keukens *et al.*, 1995; Roddick *et al.*, 1987).

Recientemente, Ito y colaboradores (2007) mostraron que la saponina tomatina no induce la lisis celular en las cepas del hongo *Fusarium oxysporum* sensibles a la tomatina *in vitro*. Esta saponina induce la muerte celular programada por la posible activación de las vías de señalización, a través de la tirosina quinasa y la proteína G, la cual lleva a una acumulación intracelular de Ca^{++} y a la producción de oxígeno reactivo como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ito *et al.*, 2007).

Existen numerosos reportes de la existencia de saponinas con actividad antimicrobiana, por ejemplo, las saponinas aisladas de *S. chrysotrichum* (Charlet *et al.*, 2000; Herrera-Arellano *et al.*, 2007), *Quillaja saponaria*, *Yucca schidigera* (Chapagain *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000) *Capsicum frutescens* (De Lucca *et al.*, 2008; Stergiopoulou *et al.*, 2008); de hojas de *Gymnema silvestre*, *Eclipta prostrata* (Khanna *et al.*, 2008), *Yucca smalliana* Fern (Jin *et al.*, 2007), *Lepidagathis hyaline* (Yadava, 2001), *Solanum leucocarpum* (Niño *et al.*, 2009); de tallos de *Lactuca scariola* (Yadava *et al.*, 2008), *Erythrina sigmoidea* (Kouam *et al.*, 2007), de frutas de *Sapindus saponaria* (Amaral *et al.*, 2008; Murgu *et al.*, 2008), *Balanites aegyptiaca* (Chapagain *et al.*, 2007), *Capsicum frutescens* (De Lucca *et al.*, 2002); de rizomas de *Dioscorea cayenensis* (Sautour *et al.*, 2004); de semillas de *Cassia angustifolia* (Khan *et al.*, 2009), *Laúnaea pinnatifida* Cass (Yadava *et al.*, 2009) y *L. scariola* (Yadava *et al.*, 2007). La digitonina presente en las semillas de *Digitalis* spp. es una de las saponinas con mayor actividad antimicrobiana. Concentraciones de esta saponina, mucho menores a las encontradas en las semillas, son capaces de inhibir el crecimiento de los hongos *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* (Pavlik *et al.*, 2000).

Se ha descrito que algunas enzimas microbianas modifican las saponinas de sus plantas huéspedes, tal es el caso del hongo *Neocosmospora vasinfecta* var. *vasinfecta*, el cual hidroliza la soyasaponina-I de *M. truncatula* para producir la aglicona soyasapogenol-B (Watanabe *et al.*, 2004). El gen que codifica para esta hidrolasa ha sido clonado y

la enzima purificada. El análisis de la secuencia de nucleótidos indica que la proteína consta de 612 aminoácidos con una masa molecular de 65.724 Da, la hidrolasa pura es un monómero glicosilado de 77 KDa. El gen de esta hidrolasa ha sido expresado en *Trichoderma viride*; su producto hidrolizó soyasaponina-I a soyasapogenol-B y la triosa α -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)-D-glucuronopiranosidel. La enzima fue probada para su especificidad contra las saponinas soyasaponina-II y -V; estas dos saponinas, junto con la soyasaponina-I, comparten la aglicona y se diferencian sólo por la cadena de azúcares. Las velocidades de hidrólisis de la enzima fueron de 2.680:886:1 en soyasaponina-I, -II y -V respectivamente, lo que indica que la enzima es altamente específica (Watanabe *et al.*, 2004; , 2005). Resultados similares, relacionados a la especificidad de las saponinasas, se han observado en la tomatinasa y la avenacinasa (Osbourn *et al.*, 1995).

La secuencia de aminoácidos de la soyasaponinasa-I comparte un 50% de similitudes con las saponinasas de *Aspergillus oryzae* y *Eupenicillium brefeldianum* (Watanabe *et al.*, 2004; , 2005). Las enzimas de estos dos hongos han sido también purificadas y sus correspondientes genes clonados. Estas hidrolasas son asimismo glicoproteínas, con unas masas moleculares de 82 KDa y 90 KDa, respectivamente. Los genes de estas enzimas fueron también expresados en *T. viride*; las proteínas recombinantes tuvieron unas masas de 77 KDa y 67 KDa, respectivamente. Las dos proteínas hidrolizaron soyasaponina-I a soyasapogenol-B, y las actividades específicas de estas enzimas fueron menores que la actividad de la enzima de *N. vasinfecta* var. *vasinfecta* sobre el mismo sustrato (Watanabe *et al.*, 2005).

Las saponinas más estudiadas, en lo concerniente a su papel potencial en las defensas de las plantas contra hongos fitopatógenos, son la tomatina de tomates, la avenacina A-1 de la avena y la solanina y chaconina de la papa (fig. 3). Estas cuatro saponinas tienen una sola cadena de azúcares unida al grupo hidroxilo del carbono-3 de la aglicona; mientras que los avenacosidos A y B de las hojas de avena tienen dos cadenas de azúcares, una en el carbono-3 y otra en el carbono-26 (fig. 3). Los avenacosidos son biológicamente inactivos, estos compuestos son convertidos en antifúngicos por una glucosil hidrolasa vegetal que hidroliza el azúcar unida al carbono-26 en respuesta al ataque de patógenos o al daño en el tejido (Morrissey *et al.*, 1999).

Adicionalmente, se ha observado que hongos endófitos, los cuales no inducen síntomas de infección aparente en sus huéspedes, toleran las defensas químicas de

sus huéspedes, tal es el caso del hongo endófito *Xylareaceous* spp. presente en la parte interna de las frutas de *Sapindus saponaria*. Este hongo hidroxila la saponina 3-O-(β -D-xilopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -arabinopiranosil-hederagenina presente en las frutas de *S. saponaria* (Amaral *et al.*, 2008; Murgu *et al.*, 2008).

Detoxificación de las saponinas de la avena

39 La avenacina A-1 es una saponina glicoterpenoide que se encuentra en las células de la epidermis de las raíces de la avena (fig. 2-A). Esta saponina se evidenciada fácilmente porque la aglicona posee un anillo fenil que hace que la molécula emita luz bajo la luz UV (fig. 3) (Papadopoulou *et al.*, 1999; Trojanowska *et al.*, 1999). Investigaciones en la biosíntesis de la saponina avenacina mostraron que, en eucariotes, esta clase de metabolitos son producidos por un grupo de genes presentes en el mismo cromosoma, similar a los operones de los procarotes. Para la biosíntesis de avenacina son requeridos nueve locus, ocho de ellos se encuentran agrupados. Mutantes afectados en siete de estos locus tienen una raíz morfológicamente normal pero con reducida fluorescencia. Los mutantes en los genes Sad₃ (dentro del grupo de genes) y Sad₄ (no en el grupo) acumulan el monodeglucosilado de la avenacina A-1, el cual es avenacina A-1 sin una molécula de D-glucosa Terminal (fig. 3); la acumulación de este monodeglucosilado afecta el crecimiento de las raíces y muestra un defecto en el tráfico de las membranas y en los pelos de las raíces (Mylona *et al.*, 2008).

Experimentos que apoyan la idea de que la saponina avenacina protege las raíces de la avena del ataque de hongos han sido reportados (Trojanowska *et al.*, 1999). Aunque hay poca variación natural en el contenido de avenacina en el género *Avena*, se ha encontrado una especie diploide (*Avena longiglumis*) que no contiene avenacina. Esta especie es susceptible a la infección por el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, el cual es sensible a la avenacina y normalmente es incapaz de infectar las raíces de la avena (Thomas *et al.*, 2006). Adicionalmente, mutantes naturales deficientes en la síntesis de avenacina A-1 y reducida fluorescencia bajo la luz UV son más sensibles a *G. graminis* var. *tritici* y a otros hongos patógenos (Morrissey *et al.*, 1999; Papadopoulou *et al.*, 1999; Trojanowska *et al.*, 2000; , 2001; Trojanowska *et al.*, 1999).

La importancia de la detoxificación de las saponinas para la patogenicidad de hongos fitopatógenos ha sido demostrada en el hongo *Gaeumannomyces graminis* var.

avenae, el cual produce una enzima extracelular llamada avenacinasa, la cual detoxifica la saponina avenacina A-1 por la liberación de la molécula de D-glucosa terminal de la cadena de azúcares unida al carbono-3 (fig. 3). La avenacinasa es una hidrolasa β -glucosil relacionada a las enzimas que degradan celobiosa y a las xilosidasas de hongos. Mutantes de *G. graminis* var. *avenae* producidos por interrupción específica del gen de la avenacinasa no producen avenacinasa y son incapaces de infectar las raíces de avena, lo que indica que la avenacinasa es un determinante de patogenicidad esencial en el rango de huéspedes de este hongo (Bowyer *et al.*, 1995; Carter *et al.*, 1999; Morrissey *et al.*, 1999).

La detoxificación de la saponina avenacina A-1 ha sido descrita también en el hongo *Fusarium avenaceum*, el cual es otro patógeno de avena. La presencia de avenacinasas en otros hongos ha sido demostrada por ensayos en una colección de hongos aislados de las raíces de plantas de avena crecidas en el campo, lo que podría representar un mecanismo de resistencia común en los hongos que habitan las raíces de la avena (Morrissey *et al.*, 1999; Papadopoulou *et al.*, 1999).

Botrytis cinerea es un hongo que afecta a muchos cultivos, especialmente en invernadero. Este hongo detoxifica las saponinas avenacina-A1, avenacosidos, tomatina y digitonina. El gen de la avenacinasa en *B. cinerea* ha sido clonado y la proteína codificada también ha sido purificada. La secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de nucleótidos indica que la proteína tiene una masa molecular de 83 KDa y comparte homología significativa con la tomatinasa de *Septoria lycopersici* y la avenacinasa de *G. graminis*. Mutantes de *B. cinerea* que tienen interrumpido el gen de la avenacinasa no tienen habilidad para hidrolizar la saponina avenacina, sin embargo, los mutantes pueden deglicosilar los avenacosidos, la tomatina y la digitonina, indicando que dicha enzima es específica para avenacina A-1. La avenacinasa pura de *B. cinerea* tiene una masa molecular de 90 KDa (indicando que la enzima sufre modificaciones post-traduccionales), un punto isoeléctrico de 5,2 y no tiene actividad hacia los avenacosidos. Mutantes naturales de *B. cinerea* deficientes en tomatinasa tampoco pueden deglicosilar la digitonina, sin embargo, estos mutantes sí pueden hidrolizar azúcares de avenacina y avenacosidos. Estos resultados confirman la existencia en *B. cinerea* de por lo menos tres enzimas degradadoras de saponinas (Quidde *et al.*, 1999).

Los patógenos foliares de avena se encuentran con un grupo diferente de saponinas antifúngicas, los glicosteroles 26-desglucoavenacosidos A y B (fig. 3). Estos

compuestos son generados a partir de *avenacosidos* en respuesta al daño del tejido o al ataque de patógenos, recordemos que los *avenacosidos* no tienen actividad biológica. La degradación enzimática de los 26-desglucoavenacosidos ha sido descrita para los patógenos foliares de avena, *Dreschleria avenacea* y *Stagonospora avenae* (Hughes *et al.*, 2004; Morrissey *et al.*, 1999). Los dos hongos convierten la saponina de las hojas de *avena* a la aglicona nuatigenina por hidrólisis secuencial de L-ramnosa y D-glucosa. El liberar sólo la molécula de L-ramnosa terminal es suficiente para quitarle la actividad antifúngica de los 26-desglucoavenacosidos. Una enzima llamada *avenacosidasa* ha sido purificada de los filtrados de cultivos de *S. avenae*; sin embargo, aún no es conocido si la enzima es necesaria para la resistencia a los 26-desglucoavenacosidos y para la patogenicidad en *avena* (Hughes *et al.*, 2004).

Recientemente Collins y colaboradores mostraron la presencia de una *avenacinasa* en *Talaromyces emersonii*, un hongo termófilo saprofito. Este hongo es un decomponedor de biomasa vegetal y produce la *avenacinasa* cuando crece en biomasa de *avena* y en presencia de *avenacina* A-1. La secuencia de aminoácidos, deducida de la secuencia de nucleótidos, comparte homología con otras hidrolasas de saponinas pertenecientes a la familia-3 de las glicosil hidrolasas (Collins *et al.*, 2007) en la clasificación de las enzimas con actividad en carbohidratos (Coutinho *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 1995; Henrissat, 1991; Henrissat *et al.*, 1993; , 1996).

Detoxificación de las saponinas del tomate

Tomatina es el principal glicoalcaloide esteroide producido por tomate y está presente en toda la planta (Roddick, 1974), pero su concentración cambia en los diferentes órganos: el contenido de tomatina es mayor en los tejidos jóvenes y en los frutos verdes. El principal sitio de síntesis de tomatina es en el tejido meristemático (Friedman, 2002; Roddick, 1974), el glicoalcaloide esteroide es producido en organelos microsomales y acumulados en vacuolas o en la fase soluble del citoplasma, el compuesto es sintetizado a partir de colesterol; sin embargo, la vía de colesterol a glicoalcaloide no es conocida. Estudios en la solanidina, la aglicona de las saponinas de papa, muestran que éste es glicosilado consecutivamente por glicosiltransferasas, para formar las saponinas solanina y chaconina (Friedman, 2002). El contenido de tomatina en frutos verdes es de 0.07 – 1.14 mg/g de peso fresco, pero el compuesto se degrada conforme el tomate madura: en tomates rojos, la

concentración es de ~0.005 mg/g de tomatina por peso fresco (Friedman, 2002; Roddick, 1974). Los productos de degradación son canalizados en pigmentos como los carotenoides y licopenos. Las enzimas responsables de esta transformación son activadas o sintetizadas durante la maduración del fruto (Friedman, 2002). Yamanaka y colaboradores encontraron que en frutos verdes del cultivar Cedrico, los compuestos mayoritarios son las saponinas tomatosido-A (0,749 mg/g por peso seco), el esculeosido-A (0,427 mg/g por peso seco) y la tomatina (0,196 mg/g por peso seco). Tomatosido-A y esculeosido-A poseen una tercera molécula de glucosa unida al carbono-26; el tomatosido-A también ha sido aislado de semillas de tomate (Yamanaka *et al.*, 2008). No es conocido si estos dos compuestos son modificados como respuesta a la infección de microorganismos. Otros compuestos relacionados a la tomatina han sido aislados del tomate, pero en muy baja concentración en comparación con la tomatina, esos compuestos son los siguientes: γ -tomatina, dehidrotomatina, solanina, licopersido A – H, esculeosido-B, licopersiconolido, licopersiconol y tomatidina (Fontaine *et al.*, 1948; Friedman, 2002; Fujiwara *et al.*, 2004; Meher *et al.*, 2003; Meher *et al.*, 2003; Nagaoka *et al.*, 1993; Nagaoka *et al.*, 1987; Yahara *et al.*, 1996; Yahara *et al.*, 2004; Yoshihara *et al.*, 1988). El contenido foliar de tomatina se encuentra entre 2 y 23 mg/g de peso seco. *In vitro* estas concentraciones inhiben el crecimiento de microorganismos que no son patógenos de tomate (Friedman, 2002; Friedman *et al.*, 2009; Morrissey *et al.*, 1999). Propiedades biológicas de tomatina diferentes a las antimicrobianas, como, por ejemplo, anticancerígenos, son revisadas por Friedman y colaboradores (Friedman, 2002; Friedman *et al.*, 2009). La saponina tomatina consta de cuatro residuos de carbohidratos unidos al grupo alcohol del carbono-3 del alcaloide esteroide tomatidina (fig. 3). La cadena de azúcares de tomatina ha sido caracterizada como O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-tomatidina. La hidrólisis secuencial de los azúcares de la licotetraosa produce β 1- β 2- γ - y δ -tomatina y la aglicona tomatidina. Los carbohidratos en las saponinas se nombran en letras griegas, empezando desde el extremo terminal hasta la aglicona; así, tomatina también es conocida como α -tomatina (Friedman, 2002; Roddick, 1974).

α -Tomatina tiene un grupo –NH polar en el anillo-F de la aglicona (fig. 3) que participa en un equilibrio ácido-base, e *in vitro* afecta la actividad lítica del compuesto, porque el valor de pKa de α -tomatina es de ~6.0 y la acti-

vidad lítica es mayor a un pH alto, cuando el compuesto no está protonado; sin embargo, la solubilidad de la saponina aumenta cuando el pH disminuye (Roddick, 1974).

La pérdida de carbohidratos de la saponina está asociada con la pérdida de la actividad biológica (Roddick, 1974; Sandrock *et al.*, 1998), sin embargo, las agliconas de los alcaloides esteroidales, como la tomatidina de tomates y la solanidina de papas, tienen una potente actividad antifúngica contra levaduras que no depende de la permeabilidad de la membrana (Moehs *et al.*, 1997; Simons, 2003; Simons *et al.*, 2005), por lo que el mecanismo de acción de estas agliconas es diferente al de sus saponinas. Las agliconas son fungistáticas, mientras que las saponinas son fungicidas (Simons, 2003; Simons *et al.*, 2005). Las evidencias indican que tomatidina inhibe la metiltransferasa C-24 de la vía biosintética del ergosterol en *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2002). Simons y colaboradores (2003, 2005) confirmaron que la tomatidina interfiere con la vía metabólica de los esteroides, ellos observaron que en presencia de tomatidina las células de *S. cerevisiae* acumulan zimosterol en lugar de ergosterol, el principal esteroide en la membrana de los hongos (Simons, 2003; Simons *et al.*, 2005).

Hidrólisis de α -tomatina por hongos fitopatogénicos

La mayoría de patógenos del tomate pueden tolerar altas concentraciones de α -tomatina *in vitro* (Sandrock *et al.*, 1998). Algunos de estos patógenos producen enzimas extracelulares que hidrolizan α -tomatina; estas enzimas son llamadas tomatinasas (fig. 4). Las especies de *Pythium* y *Phytophthora* no son afectadas por α -tomatina, presumiblemente porque estos Oomycetes no poseen esteroides en sus membranas (Friedman, 2002). Se ha observado que mutantes de *Nectria haematococca* (estado teleomórfico de *Fusarium solani*), deficientes en esteroides, son más tolerantes a α -tomatina *in vitro* y pueden infectar frutos verdes ricos en α -tomatina, mientras que la cepa silvestre es sólo patogénica en frutas maduras (Morrissey *et al.*, 1999; Sandrock *et al.*, 2001). Estos resultados apoyan la idea de que los esteroides de la membrana confieren sensibilidad a los glicoalcaloides esteroidales. También se ha sugerido que algunos patógenos pueden bajar el pH en el sitio de infección y por lo tanto inactivan la saponina (Friedman, 2002).

La mayoría de las tomatinasas son producidas constitutivamente; sin embargo, algunas pueden ser inducidas en la presencia de α -tomatina o de otro glicoalcaloide es-

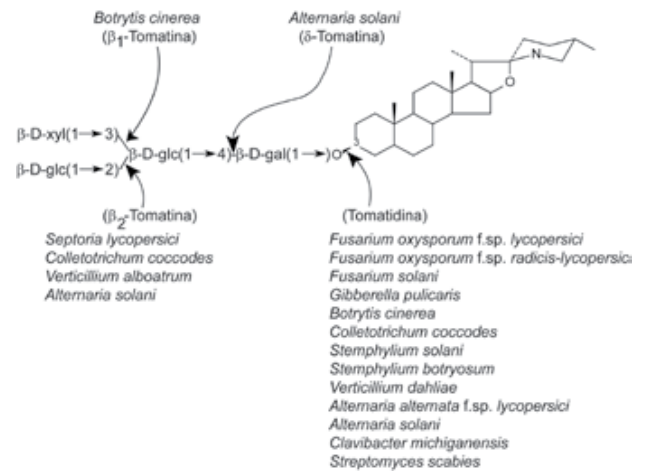


FIGURA 4. Hidrólisis de α -tomatina por microorganismos patógenos de tomate. Los productos de hidrólisis están indicados entre paréntesis.

teroidal, como la α -solanina o digitonina (Lairini *et al.*, 1996; Osbourn *et al.*, 1995; Quidde *et al.*, 1998; Sandrock *et al.*, 1995). Las tomatinasas hidrolizan α -tomatina a β 1-, β 2-, δ -tomatina o a la aglicona tomatidina (fig. 4). Esta hidrólisis reduce el efecto tóxico de α -tomatina, ya que los patógenos de tomate son menos sensibles a los productos de las tomatinasas que a la α -tomatina (Sandrock *et al.*, 1998). Los genes que codifican para las tomatinasas y sus respectivas enzimas han sido caracterizadas en los hongos *S. lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lairini *et al.*, 1996; Roldan-Arjona *et al.*, 1999), mientras que en *B. cinerea* sólo la tomatinasa (β -xylosidasa) ha sido caracterizada (Quidde *et al.*, 1998).

Tomatinasa de "*Septoria lycopersici*"

El hongo *S. lycopersici* tolera altas concentraciones de α -tomatina *in vitro*. Uno de los mecanismos de tolerancia es por degradación de la saponina por una tomatinasa. Esta tomatinasa es una β -D-glucosidasa que hidroliza la molécula D-glucosa terminal de α -tomatina para producir β 2-tomatina (fig.4) (Arneson *et al.*, 1967; Durbin *et al.*, 1969; Osbourn *et al.*, 1995; Sandrock *et al.*, 1995; Sandrock *et al.*, 1998; Simons, 2003). La enzima es una glicoproteína secretada de aproximadamente 113 KDa, con un punto isoelectrico de 4.6 (Osbourn *et al.*, 1995; Sandrock *et al.*, 1995). El gen correspondiente ha sido clonado (Osbourn *et al.*, 1995; Sandrock *et al.*, 1995). Este gen es expresado constitutivamente; sin embargo, puede también ser inducido ante la presencia de α -tomatina. La secuencia de amino ácidos de la tomatinasa de *S. lycopersici* comparte un 60% de homología con la secuencia de la avenacinasa, una enzima que degrada la saponina avenacina A-1 de *avena* y es requerida para la patogeni-

cidad de *G. graminis* var. *avenae* (Osbourn *et al.*, 1995). La tomatinasa también es similar a las β -glucosidasas de hongos como *Trichoderma reesei*, *Candida pelliculosa* y *Kluyveromyces fragilis*, las cuales están involucradas en la degradación de celobiosas. Todas estas glucosidasas pertenecen a la familia-3 de las glicosil hidrolasas, de acuerdo con la clasificación de las glicosil hidrolasas del servidor de enzimas con actividad en carbohidratos (Coutinho *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 1995; Henrissat, 1991; Henrissat *et al.*, 1993; , 1996). La tomatinasa de *S. lycopersici* es altamente específica hacia α -tomatina: con un valor Km de 0.06 mM, la enzima tiene muy poca actividad hacia saponinas estructuralmente similares a α -tomatina, como la F-gitonina (2%), digitonina (0.4%) (fig. 3) y *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (0.43%), en comparación a su actividad hacia α -tomatina. No se ha detectado actividad de la enzima hacia α -solasonina, gitonina, β -escina, esteviosido, floridzina melezitosa, sofrosa, celobiosa y maltosa (Osbourn *et al.*, 1995; Sandrock *et al.*, 1995). Durbin y Uchytel reportaron actividad hacia α -tomatina y α -demessina con una preparación enzimática parcialmente purificada, esta misma preparación parcialmente purificada no hidrolizó β 1-tomatina, soforosa, β -D-1,2-glucano, laminarindextrinas, celobiosa, β -gentiobiosa, *p*-fenil-D-glucopiranosido y *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (Durbin *et al.*, 1969).

La introducción del gen de la tomatinasa de *S. lycopersici* en patógenos de tomate que normalmente no degradan α -tomatina, como, por ejemplo, *Cladosporium fulvum* y *N. haematococca*, resultó en transformantes que fueron más tolerantes a α -tomatina *in vitro* y fueron también más patógenos que las correspondientes cepas silvestres (Melton *et al.*, 1998; Sandrock *et al.*, 2001). Los transformantes de *C. fulvum* que expresaban la tomatinasa fueron más patógenos en líneas de tomate susceptibles (compatible). Además, estos transformantes también fueron más invasivos durante interacciones incompatibles; sin embargo, éstos fueron incapaces de esporular, lo que muestra que la tomatinasa de *S. lycopersici* favorece el crecimiento de *C. fulvum* en las interacciones compatibles e incompatibles con tomate (Melton *et al.*, 1998). Adicionalmente, estos resultados sugieren que α -tomatina está presente en el espacio intercelular de plantas de tomate infectadas. De forma similar, *N. haematococca* infecta sólo frutos de tomate maduros. Una vez que el gen de la tomatinasa de *S. lycopersici* es introducido en *N. haematococca*, se generan transformantes capaces de producir infecciones de tamaño grande (~9 mm) en tomates verdes. Los resultados expuestos sugieren que la tomatinasa de *S. lycopersici* es impor-

tante para la colonización de tomate (Sandrock *et al.*, 2001). Mutantes de *S. lycopersici*, *B. cinerea* y *Clavibacter michiganensis* que no poseen la tomatinasa son más sensibles a α -tomatina que sus cepas silvestres *in vitro*, sin embargo, estos mutantes siguen infectando hojas de tomates y no hay diferencias obvias en los síntomas de infección entre los mutantes y las cepas silvestres (Kaup *et al.*, 2005; Melton *et al.*, 1998; Quidde *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que además de la hidrólisis de α -tomatina, estos patógenos podrían tener otro mecanismo de tolerancia a dicha saponina. De forma contraria, en patógenos como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, la enzima es importante para su patogenicidad, ya que el silenciamiento post-transcripcional del gen de la tomatinasa resulta en mutantes con reducida patogenicidad en plantas de tomate (Pareja-Jaime *et al.*, 2008).

Los síntomas de infección de hojas de tomate por *S. lycopersici* y por sus mutantes sin tomatinasa no muestran diferencias obvias entre ellos. Sin embargo, al observar las hojas bajo el microscopio, es posible ver que durante la infección temprana, los mutantes sin la tomatinasa inducen más la muerte celular del huésped que la cepa silvestre. Además, las hojas de tomate infectadas con los mutantes tienen mayor expresión de los genes relacionados con la defensa (como la β -1,3-glucanasa) que las hojas infectadas con la cepa silvestre. Martín-Hernández y colaboradores (2000) sugirieron que esta respuesta puede ser debida a la diferencia sutil en el crecimiento de las cepas silvestre y mutante, o alternativamente que la tomatinasa y/o β 2-tomatina podrían estar involucradas en la supresión de las defensas de la planta (Martín-Hernández *et al.*, 2000).

Experimentos posteriores mostraron que la cepa silvestre de *S. lycopersici* infecta hojas de *Nicotiana benthamiana*, mientras que los mutantes sin tomatinasa inducen una respuesta hipersensible en hojas de la misma planta. Estos mutantes fueron capaces de infectar las hojas una vez que ellas fueron infiltradas con una preparación pura de la tomatinasa de *S. lycopersici* o con β 2-tomatina, el producto de dicha tomatinasa. Los mutantes sin tomatinasa también crecieron en hojas de *N. benthamiana* que habían sido silenciadas para SGT1, el cual está involucrado en la señalización de resistencia y es requerido para la resistencia de no-huésped y de gen-a-gen. Estos experimentos sugieren un papel importante para β 2-tomatina en la supresión de las defensas de la planta (Bouarab *et al.*, 2002).

Tomatinasa de "*Fusarium oxysporum*"

43

Fusarium oxysporum es un hongo del suelo que posee cepas patogénicas y no-patogénicas; pero todas las cepas son saprófitas y pueden crecer y sobrevivir por largos períodos en materia orgánica del suelo y en la rizósfera de las plantas. Las cepas no-patogénicas colonizan sólo la corteza de las raíces de las plantas sin causar síntomas de enfermedad, mientras que las cepas patogénicas invaden el tejido vascular de los huéspedes susceptibles y producen marchitez vascular. Las cepas patogénicas son altamente específicas para sus huéspedes y están subdivididas en formas especiales que se basan en las especies vegetales atacadas y en razas basadas en los cultivares atacados. Las cepas patogénicas en tomate se clasifican en dos formas especiales (f. sp.), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, el cual causa marchitez vascular, y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, el cual causa agallas y pudrición de las raíces (Ito *et al.*, 2005).

La comparación sobre patogenicidad en tomate y tolerancia a α -tomatina de diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* indican que los aislamientos no patogénicos son generalmente más sensibles a α -tomatina, mientras que los aislamientos con alta patogenicidad son relativamente más tolerantes. Estos resultados sugirieron que para la patogenicidad de tomate es requerida una tolerancia a α -tomatina tres veces mayor que la de las cepas no patogénicas.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* produce una tomatinasa extracelular inducible que detoxifica α -tomatina por la liberación completa de la cadena de azúcar licotetraosa y la producción de la aglicona tomatidina (fig. 4). El ADN complementario (ADNc), que codifica para la tomatinasa de este hongo, ha sido obtenido por la búsqueda en una librería de expresión de ADN. Su identidad ha sido confirmada por la expresión del ADNc en la bacteria *E. coli*. El ADNc clonado ha sido llamado Tom1 y no tiene homología con las glicosil hidrolasas de la familia-3, la cual contiene la avenacinasa de *G. graminis* var. *avenae* y la tomatinasa de *S. lycopersici*. El gen Tom1 se expresa en raíces y tallos a lo largo de todo el ciclo de infección de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ito *et al.*, 2005; Morrissey *et al.*, 1999). Sobre expresión del gen Tom1 genera transformantes que producen constitutivamente la enzima, y durante la infección de tomates por dichos transformantes hay un aumento en el desarrollo de los síntomas de infección. En contraste, cuando las plantas de tomate son infectadas por un mutante de *F. oxysporum*, en el cual el gen Tom1 se interrumpe (Δ FolTom1), hay un retraso en el proceso de infección, lo que indica

que aunque la tomatinasa no es esencial para la patogenicidad, sí es requerida para la completa virulencia de *F. oxysporum* en tomates. La actividad total de la tomatinasa en el mutante- Δ FolTom1 se reduce sólo un 25%. Experimentos *in vitro* demostraron que el mutante- Δ FolTom1 metaboliza α -tomatina a β 2-tomatina principalmente.

Análisis del genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no mostró otros genes similares al Tom1; no obstante, se encontraron secuencias para por lo menos cuatro genes diferentes que codifican proteínas putativas que comparten gran homología con la β 2-tomatinasa de *S. lycopersici*; estos genes fueron llamados tom2, tom3, tom4 y tom5. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los nucleótidos indican que estas cuatro proteínas son más de 50% idénticas a otras saponinas presentes en la familia-3 de las glicosil hidrolasas (Pareja-Jaime *et al.*, 2008), en la clasificación de las enzimas con actividad en carbohidratos (Coutinho *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 1995; Henrissat, 1991; Henrissat *et al.*, 1993; , 1996). Estos cuatro genes pueden ser los responsables de la actividad tomatinasa en el mutante- Δ FolTom1. Estos resultados indican que la detoxificación de α -tomatina en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es llevada a cabo por numerosas tomatinasas, lo que sugiere una gran importancia de estas enzimas en el proceso de infección de este hongo en tomate (Pareja-Jaime *et al.*, 2008).

El gen Tom1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ha sido expresado en la levadura *S. cerevisiae*. La cepa silvestre de esta levadura tolera hasta 50 μ M de α -tomatina *in vitro*, los mutantes que expresan el gen Tom1 toleran hasta 200 μ M de la saponina (fig. 5). Estos mutantes de *S. cerevisiae*+Tom1 podrían tener una aplicación industrial en la producción de mezcal, la bebida alcohólica mexicana, porque estos mutantes son capaces de crecer y fermentar extractos de las plantas de Agave tequilana y Agave salmiana, ricas en saponinas, por lo que a veces la levadura silvestre no puede crecer y por lo tanto disminuye la eficacia de la fermentación (Cira *et al.*, 2008). Los autores no reportan la clase de saponina presente en los extractos de agave, sería interesante conocer la clase de saponinas para así entender la especificidad de la tomatinasa, ya que se cree que las enzimas que degradan saponinas son altamente específicas por sus sustratos naturales.

De forma similar a la tomatinasa de *S. lycopersici* (Bouarab *et al.*, 2002), la tomatinasa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* también media la supresión de las defensas de la planta (Ito *et al.*, 2004). Las suspensiones de células de tomate en cultivo acumulan H₂O₂ e inducen la alcalinización del medio extracelular después de 20 minutos

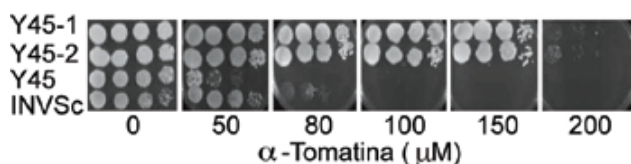


FIGURA 5. Efecto de α -tomatina en *Saccharomyces cerevisiae*. La sensibilidad de las cepas silvestres de *S. cerevisiae* (Y45, Invs.) y de los transformantes *S. cerevisiae*+Tom1 (Y45-1, Y45-2) fue determinada en placas de agar (Cira et al., 2008). La reproducción fue tomada de Cira et al, 2008

persici (tomatidina y licotetraosa). Estos dos compuestos, tomatidina y licotetraosa, suprimen las respuestas de defensas inducidas por el elicitor en la planta. Los dos compuestos inhiben por vías diferentes la acumulación de H_2O_2 , sin embargo, los mecanismos de esta inhibición todavía no son entendidos (Ito et al., 2004). Recientemente, Simons y colaboradores (2003, 2005) demostraron que la aglicona tomatidina es más antifúngica que α -tomatina en la levadura *S. cerevisiae*, y que los mecanismos de acción de estos dos compuestos son diferentes, mientras que α -tomatina induce lisis celular, la tomatidina interfiere con la biosíntesis de esteroides, pero aún no es conocido si tomatidina también afecta la vía de los esteroides en las células de tomate (Simons, 2003; Simons et al., 2005). Es importante tener en cuenta que la tomatidina tiene un efecto en células animales (Chiu et al., 2008; Friedman et al., 2003), en las cuales tiene actividad anti-inflamatoria por el bloqueo en el señalamiento de quinasas en macrófagos (Chiu et al., 2008). El gen de la tomatinasa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se ha encontrado también en algunas cepas de *F. oxysporum* que pertenecen a las formas especiales no-patogénicas de tomate (f. sp. *batatas*, f. sp. *gladioli*, f. sp. *melonis*), las enzimas de estos hongos hidrolizan *in vitro* la saponina α -tomatina de la misma forma que las tomatinasas de las formas especiales patogénicas de tomate (fig.4). Estas tres formas especiales no-patogénicas de tomate son capaces de colonizar el tejido vascular desde las raíces hasta los tallos superiores de plantas de tomate sin producir síntomas de enfermedad (fig. 6). Los genes de las tomatinasas de las tres formas especiales no-patogénicas son expresados durante la colonización de la planta de tomates, lo que indica que las tomatinasas son importantes para que el hongo sobreviva en la planta. *F. oxysporum* f.sp. *batatas* induce las defensas de tomate, ya que plantas inoculadas expresan altos niveles del gen de la quitinasa ácida (extracelular) como respuesta a la infección. Adicionalmente, la infección previa de plantas de tomate por la forma especial *batatas* reduce el marchitamiento vascular generado por infecciones pos-

teriores de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ito et al., 2005), lo que es indicativo de que *F. oxysporum* f. sp. *batatas* podría inducir las defensas sistémicas de resistencia (que se conoce en inglés por las siglas SAR).

F. oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici* también posee una tomatinasa con el mismo mecanismo de acción de la tomatinasa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (fig.5); sin embargo, los genes que codifican para las dos enzimas son diferentes (Ito et al., 2005; Lairini et al., 1996).

Algunos aislamientos de *Fusarium solani* también hidrolizan α -tomatina para producir la aglicona y la licotetraosa, pero esta enzima difiere de la de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en la masa molecular y en las propiedades inmunológicas (Lairini et al., 1998; Morrissey et al., 1999).

Tomatinasas de otros patógenos de tomate

Botrytis cinerea es un hongo necrotrófo que infecta un amplio rango de huéspedes, entre ellos las hojas de to-



FIGURA 6. Infección de plantas de tomate por una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* marcada con GUS. El hongo fue transformado con el gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS). Las raíces que debían ser observadas bajo el microscopio de luz fueron transferidas a una solución 1 mM de X-Glu por una hora. (A) Crecimiento del hongo en la zona de elongación de la raíz y (B) en la parte media de la raíz (Ito et al., 2005). Reproducción tomada de Ito et al, 2005.

mate. Se han descrito dos mecanismos de degradación de α -tomatina por diferentes cepas de *B. cinerea*, uno de ellos es la liberación completa de la cadena de azúcar licotetraosa del carbono-3 de la aglicona (Morrissey *et al.*, 1999). Un segundo mecanismo es la hidrólisis de la molécula terminal D-xilosa de α -tomatina para producir β 1-tomatina (Quidde *et al.*, 1998). Una xilosidasa de *B. cinerea* que hidroliza α -tomatina ha sido purificada, sin embargo, el gen que codifica para la enzima no ha sido clonado (Morrissey *et al.*, 1999).

45 Aunque *Gibberella pulicaris* es raramente aislada de plantas de tomate, este hongo también es capaz de hidrolizar la cadena de azúcares licotetraosa de α -tomatina para dar la aglicona tomatidina. El gen de la tomatinasa de *G. pulicaris* ha sido aislado a partir de una librería genómica en *Aspergillus nidulans* y luego probada por su habilidad para metabolizar α -tomatina. El análisis de la secuencia de ADN indican que el producto previsible del gen está estrechamente relacionada a las xilanasas (Morrissey *et al.*, 1999).

Otros microorganismos diferentes a los hongos también metabolizan la saponina α -tomatina, por ejemplo, los actinomicetos *Clavibacter michiganense* susp. *michiganense* y *Streptomyces scabies* (fig. 4) (Kaup *et al.*, 2005; Seipke *et al.*, 2008). Kaup y colaboradores (2005) clonaron el gen de la tomatinasa del patógeno del tomate *C. michiganense* susp. *michiganense*, el cual codifica para una tomatinasa que hidroliza la cadena de azúcares de α -tomatina para producir tomatidina, mutantes de la tomatinasa no están comprometidos en la virulencia del actinomiceto en tomates (Kaup *et al.*, 2005).

Ha de señalarse, no obstante, un hecho curioso: *S. scabies* es un patógeno de papa pero no de tomate, lo que revela que la función de la tomatinasa en este actinomiceto no ha sido comprendida. Análisis del ADN genómico mostró que el actinomiceto posee secuencias que son 58% y 60% idénticas a las tomatinasas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *C. michiganense* susp. *michiganense*, respectivamente. El gen de la tomatinasa se ha expresado en la bacteria *E. coli* y la proteína recombinante hidroliza α -tomatina para producir la aglicona tomatidina y la licotetraosa. Esta enzima recombinante es altamente específica hacia α -tomatina, con un Km de 0,65 mM, en comparación con la tomatinasa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cuyo Km es de 1,1 mM. La tomatinasa de este actinomiceto no tiene actividad xilosidasa y no hidroliza las saponinas de la papa α -chaconina y α -solanina. Esta tomatinasa no parece ser inducida por α -tomatina y el análisis del promotor del gen indica que el promotor es idéntico a los promotores de resistencia a antibióticos de

estreptomicetos.

Ensayos *in vitro* muestran que α -tomatina inhibe el crecimiento del micelio aéreo de *S. scabies*, pero no al micelio vegetativo. Es oportuno anotar que estos actinomicetos son sensibles a α -tomatina, pero no producen esteroides. El análisis de las secuencias genómicas de los dos actinomicetos no revelan la presencia de genes involucrados en la biosíntesis de esteroides, lo que indica que α -tomatina interactúa con otra molécula blanco que es crítica para el crecimiento normal de estas bacterias. El análisis de la secuencia genómica de *S. scabies* reveló un grupo de genes putativos a los hopanoides, los cuales tienen una función análoga a los esteroides y tienen estructuras similares, por lo que podrían ser blancos para la α -tomatina (Seipke *et al.*, 2008).

Detoxificación de las saponinas de la papa

Las principales saponinas en la papa doméstica (*Solanum tuberosum*) son α -solanina y α -chaconina, las dos son glicoalcaloides esteroidales y comparten la misma aglicona solanidina (Friedman, 2006). Muchos de los estudios en las saponinas de papa se han llevado a cabo porque a concentraciones adecuadas los glicoalcaloides α -solanina y α -chaconina tienen un efecto tóxico en los humanos, el contenido de estos glicoalcaloides en tubérculos para consumo humano no debe ser mayor a 0,2 mg/g de peso fresco. Es por esto que muchos de los esfuerzos se centran en tener condiciones óptimas de almacenamiento y en encontrar mecanismos que disminuyan la concentración de estos compuestos en los tubérculos (Bacigalupo *et al.*, 2004; Friedman, 2006; Korpan *et al.*, 2004; Korpan *et al.*, 2002; Krits *et al.*, 2007; Lachman *et al.*, 2001; Nema *et al.*, 2008). α -Solanina y α -chaconina son producidas en todos los tejidos de la planta de papa, en los tubérculos se encuentran principalmente en la epidermis, con altos niveles en los brotes; no obstante al pelar los tubérculos se remueven casi todas las saponinas (Friedman, 2006).

En α -solanina la cadena de azúcares que está unida al grupo hidroxilo del carbono-3 de la aglicona solanidina es α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3), y es llamada β -solatriosa, mientras que la cadena de α -chaconina es llamada β -chacotriosa y está formada por α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopiranosil. Estas saponinas son generadas a partir de colesterol a través de la ruta biosintética de los terpenoides. Estudios sobre su biosíntesis han indicado que (I) la biosíntesis generalmente comienza durante la germinación y alcanza su

pico máximo durante el período de floración, (II) glicosiltransferasas catalizan la glicosilación de la aglicona solanidina para formar los glicósidos finales, (III) los glicoalcaloides producidos en los tubérculos y raíces no son transportados a las partes aéreas de la planta, (IV) la degradación de ellas también ocurre en la planta, (V) la luz, el calor y el daño mecánico inducen la síntesis de glicoalcaloides en tubérculos cosechados (Friedman, 2006; McCue *et al.*, 2005).

El silenciamiento del gen de la glucosiltransferasa que genera γ -chaconina produjo una planta de papa con bajo contenido de glicoalcaloides (Friedman, 2006; McCue *et al.*, 2005). El silenciamiento de otra glicosiltransferasa en papa generó algunas líneas con casi inhibición completa en la acumulación de α -solanina. Esta inhibición fue compensada en las plantas transformadas con altos niveles de α -chaconina, niveles que eran similares a los glicoalcaloides totales de la planta silvestre. La expresión heteróloga del gen de esta glicosiltransferasa generó una enzima con actividad glucosiltransferasa y galactosiltransferasa, con una preferencia por UDP-galactosa, como el azúcar donador. Estos resultados indican que esta enzima es la responsable *in vivo* de adicionar UDP-galactosa a la aglicona solanidina (McCue *et al.*, 2005).

Las dos saponinas de papa muestran una actividad membranolítica *in vitro*: α -chaconina es más tóxica que α -solanina; pero la actividad lítica de estas dos es más baja en comparación con la actividad de α -tomatina. Estas dos saponinas, α -solanina y α -chaconina, tienen actividad sinérgica, y su actividad lítica es mayor cuando se usan en combinación. Friedman (2006) y Kohara y colaboradores (2007) han descrito con detalle el efecto de la α -solanina, la α -chaconina y de otras moléculas biológicamente activas de papa en animales y humanos (Friedman, 2006; Kohara *et al.*, 2007).

El hongo *Gibberella pulicaris* produce pudrición de la papa durante el almacenamiento del tubérculo y puede metabolizar los dos glicoalcaloides esteroideos. Una enzima que es capaz de hidrolizar la molécula de ramnosa terminal en la unión α -1,2 de α -chaconina para producir β 2-chaconina ha sido purificada a partir de este hongo. La hidrólisis de cualquiera de las moléculas de ramnosa terminales de α -chaconina acaba con la habilidad de α -chaconina para lisar las membranas, por lo que representaría un evento de detoxificación de la saponina. Sin embargo, la importancia de la degradación de α -chaconina para la patogenicidad de *G. pulicaris* en papa no ha sido determinada por la generación de mutantes sin chaconinasa (Becker *et al.*, 1998; Morrissey *et al.*, 1999; Weltring *et al.*, 1997).

De los brotes de tubérculos almacenados se ha obtenido el hongo *Plectosphaerella cucumerina*, el cual produce una chaconinasa extracelular que hidroliza la molécula α -L-ramnosa terminal (1 $\rightarrow$ 4) de la α -chaconina para producir la β 1-chaconina. La enzima es altamente específica para la α -chaconina, ya que no hidroliza la otra molécula α -L-ramnosa terminal (1 $\rightarrow$ 2) de la saponina, ni la molécula α -L-ramnosa terminal (1 $\rightarrow$ 2) de la α -solanina (Oda *et al.*, 2002).

Phytophthora infestans es un Oomiceto responsable del mayor daño a los cultivos de papa en el planeta. Sin embargo, no es clara la relación de este Oomiceto con las saponinas de papa, debido a que hay reportes con resultados diferentes. Por ejemplo, *P. infestans* induce acumulación de glicoalcaloides en hojas de papa crecidas en Rusia, pero no en clones de papa crecidos en Estados Unidos (Friedman, 2006). Otros estudios encontraron que *P. infestans* induce en tubérculos la expresión de la ciclasa sesquiterpeno y la sintasa escualeno, enzimas presentes en la ruta biosintética para la producción de saponinas y las fitoalexinas rishitina y lubimina (Fewell *et al.*, 1997; Friedman, 2006; Mucharromah *et al.*, 1995; Yoshioka *et al.*, 1999).

Conclusiones

En las interacciones entre los microorganismos y sus plantas huéspedes hay sin duda una gran comunicación a nivel molecular, en el que dialogan, discuten y batallan al mismo tiempo muchos y variados actores moleculares de la planta y de los microorganismos. Estos actores moleculares se encargan de reconocerse entre sí, de evitar que el otro lo reconozca, de doblegar las defensas del otro y de utilizar al otro para su beneficio. Todos los actores en juego son importantes, ya sea para que la planta detenga el avance de los microorganismos patógenos, para que los microorganismos vivan en la planta y le paguen el alquiler a ésta con ayuda, o para que los microorganismos vivan en la planta sin que ella se entere. Hay un gran número de evidencias que indican que los metabolitos químicos con actividad antimicrobiana son actores importantes en las defensas de las plantas; de la misma forma, en las interacciones planta-microorganismo son actores importantes los mecanismos de tolerancia en los microorganismos hacia dichos compuestos químicos. Las evidencias presentadas en esta revisión fortalecen la hipótesis de que los microorganismos que habitan en las plantas deben poseer mecanismos de tolerancia a los compuestos químicos antimicrobianos de dichas plantas. La tolerancia es un requisito base en los procesos de

infección compatibles, ya sean deterioras o benéficas y sintomáticas o no-sintomáticas. Este planteamiento se basa en que no sólo los hongos fitopatógenos detoxifican saponinas, sino también hongos endófitos (Amaral *et al.*, 2008; Murgu *et al.*, 2008), hongos descomponedores de biomasa vegetal (Collins *et al.*, 2007) y bacterias fitopatógenas (Kaup *et al.*, 2005; Seipke *et al.*, 2008). Los reportes de que las bacterias son capaces de hidrolizar saponinas abren una nueva ventana para entender su modo de acción, ya que por muchos años se ha creído que las saponinas permeabilizan las membranas celulares porque forman complejos con los esteroides de las membranas (Baumann *et al.*, 2000; Roddick, 1975). Ya que las bacterias no poseen esteroides, ni son conocidas secuencias genéticas para la biosíntesis de ellos en procariotes, surge un nuevo campo de estudio sobre los modos de acción de las saponinas en los procariotes y para encontrar otros mecanismos de acción antimicrobiana para las saponinas. Recientemente, Ito y colaboradores (2007) mostraron que la saponina tomatina no induce lisis celular en cepas del hongo *F. oxysporum*, sino que la saponina induce muerte celular programada (Ito *et al.*, 2007).

La importancia de la detoxificación de saponinas ha sido demostrada con la *avenacinasa* de *G. graminis* var. *avenae*, ya que mutantes de este hongo que no poseen la enzima son incapaces de infectar las raíces de *avena* (Bowyer *et al.*, 1995; Carter *et al.*, 1999; Morrissey *et al.*, 1999), y aunque en los hongos *S. lycopersici* y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* las tomatinasas no son esenciales para la patogenicidad de tomates (Martín-Hernández *et al.*, 2000; Pareja-Jaime *et al.*, 2008), estas enzimas sí son importantes para la completa virulencia de los hongos en la planta. Los mutantes de tomatinasas de estos dos hongos pudieran no ser afectados en su patogenicidad, porque ellos podrían poseer diferentes mecanismos de tolerancia a la saponina tomatina, y esto quedó evidenciado en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, el cual posee secuencias génicas para cinco tomatinasas diferentes (Pareja-Jaime *et al.*, 2008). Por otro lado, las tomatinasas de estos dos hongos (*S. lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) tienen un segundo papel en la interacción con tomates; además de detoxificar la saponina tomatina, los productos de estas enzimas suprimen las defensas de las plantas (Bouarab *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Martín-Hernández *et al.*, 2000).

Finalmente, aunque hay un mayor entendimiento del papel de los compuestos químicos en las defensas de las plantas, aún son innumerables las incógnitas; por ejemplo, ¿por qué y cómo un compuesto que es inter-

mediario de una ruta biosintética puede suprimir las defensas de la misma planta? ¿Cómo evolucionaron los compuestos químicos antimicrobianos de las plantas y las enzimas microbianas que los detoxifican? ¿Qué otros mecanismos de tolerancia a los antimicrobianos de las plantas están presentes en microorganismos eucariotes y procariotes?

Referencias Bibliográficas

1. Amaral, L. S., Murgu, M., Rodrigues-Fo, E., de Souza, A. Q. L. and Sarquis, M. I. D. (2008). A saponin tolerant and glycoside producer xylariaceous fungus isolated from fruits of *Sapindus saponaria*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(8), 1341-1348.
2. Armah, C. N., Mackie, A. R., Roy, C., Price, K., Osbourn, A. E., Bowyer, P. and Ladha, S. (1999). The membrane-permeabilizing effect of *avenacin* A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophysical Journal*, 76(1), 281-290.
3. Arneson, P. A. and Durbin, R. D. (1967). Hydrolysis of Tomatine by *Septoria Lycopersici* - a Detoxification Mechanism. *Phytopathology*, 57(12), 1358-&.
4. Bacigalupo, M. A., Longhi, R. and Meroni, G. (2004). Alpha-solanine and alpha-chaconine glycoalkaloid assay in *Solanum tuberosum* extracts by liposomes and time-resolved fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 665-673.
5. Baumann, E., Stoya, G., Volkner, A., Richter, W., Lemke, C. and Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, 102(1), 21-35.
6. Becker, P. and Weltring, K. M. (1998). Purification and characterization of alpha-chaconinase of *Gibberella pulicaris*. *Fems Microbiology Letters*, 167(2), 197-202.
7. Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D. and Osbourn, A. (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature*, 418(6900), 889-892.
8. Bowdy, K. L. and Jursic, B. S. (2004). Synthesis of CAY-1, an antifungal steroidal saponin. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 228, 149-MEDI.
9. Bowyer, P., Clarke, B. R., Lunness, P., Daniels, M. J. and Osbourn, A. E. (1995). Host-Range of a Plant-Pathogenic Fungus Determined by a Saponin Detoxifying Enzyme. *Science*, 267(5196), 371-374.
10. Cammareri, M., Consiglio, M. F., Pecchia, P., Corea, G., Lanzotti, V., Ibeas, J. I., Tava, A. and Conicella, C. (2008). Molecular characterization of beta-amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis. *Plant Science*, 175(3), 255-261.
11. Carter, J. P., Spink, J., Cannon, P. F., Daniels, M. J. and Osbourn, A. E. (1999). Isolation, characterization, and *avenacin* sensitivity of a diverse collection of cereal-root-colonizing fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3364-3372.
12. Cira, L. A., Gonzalez, G. A., Torres, J. C., Pelayo, C., Gutierrez, M. and Ramirez, J. (2008). Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of Agave tequilana Weber var. azul and Agave salmiana must. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 93(3), 259-266.
13. Collins, C. M., Murray, P. G., Denman, S., Morrissey, J. P., Byrnes, L., Teeri, T. T. and Tuohy, M. G. (2007). Molecular cloning and expression analysis of two distinct beta-glucosidase genes, *bg1* and *aven1*, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. *Mycological Research*, 111, 840-849.
14. Cooper, R. M., Resende, M. L. V., Flood, J., Rowan, M. G., Beale, M. H. and Potter, U. (1996). Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature*, 379, 159-162.
15. Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (1999, 25 April 2005). "Carbohydrate-Active Enzymes Server." Retrieved April, 2005, from <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
16. Croteau, R., Kutchan, T. and Lewis, N. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan, B., B., G. and Gruissem, J., *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1250-1318), American Society of Plant Physiologists.
17. Chapagain, B. P., Wiesman, Z. and Tsrer, L. (2007). *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 109-115.
18. Charlet, S., Gillet, F., Villarreal, M. L., Barbotin, J. N., Fliniaux, M. A. and Nava-Saucedo, J. E. (2000). Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells within Ca-

alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(11), 875-880.

19. Chiu, F. L. and Lin, J. K. (2008). Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF-kappa B and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages. *Febs Letters*, 582(16), 2407-2412.

20. Davies, G. and Henrissat, B. (1995). Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859.

49

21. De Lucca, A. J., Bland, J. M., Vigo, C. B., Cushion, M., Selitrennikoff, C. P., Peter, J. and Walsh, T. J. (2002). CAY-1, a fungicidal saponin from *Capsicum* sp fruit. *Medical Mycology*, 40(2), 131-137.

22. De Lucca, A. J., Klich, M., Boue, S., Cleveland, T. E., Sien, T. and Walsh, T. J. (2008). Fungicidal activity of plant saponin CAY-1 for fungi isolated from diseased *Vitis* fruit and stems. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(1), 67-72.

23. Del Sorbo, G., Schoonbeek, H.-j. and De Waard, M. A. (2000). Fungal Transporters Involved in Efflux of Natural Toxic Compounds and Fungicides. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1), 1-15.

24. Durbin, R. D. and Uchytel, T. F. (1969). Purification and Properties of a Fungal Beta-Glucosidase Acting on Alpha-Tomatine. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 191(1), 176-180.

25. Egusa, M., Ozawa, R., Takabayashi, J., Otani, H. and Kodama, M. (2009). The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen. *Planta*, 229(4), 965-976.

26. Egusaa, M., Akamatsub, H., Tsugec, T., Otanib, H. and Kodama, M. (2008). Induced resistance in tomato plants to the toxin-dependent necrotrophic pathogen *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73(4-5), 67-77.

27. Fewell, A. M. and Roddick, J. G. (1993). Interactive Antifungal Activity of the Glycoalkaloids Alpha-Solanine and Alpha-Chaconine. *Phytochemistry*, 33(2), 323-328.

28. Fewell, A. M. and Roddick, J. G. (1997). Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. *Mycological Research*, 101, 597-603.

29. Flor, H. (1971). Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-296.

30. Fomsgaard, I. S., Mortensen, A. G. and Carlsen, S. C. K. (2004). Microbial transformation products of benzoxazolinone and benzoxazinone allelochemicals - a review. *Chemosphere*, 54(8), 1025-1038.

31. Fontaine, T. D., Irving, G. W., Ma, R., Poole, J. B. and Doolittle, S. P. (1948). Isolation and Partial Characterization of Crystalline Tomatine, an Antibiotic Agent from the Tomato Plant. *Archives of Biochemistry*, 18(3), 467-475.

32. Friedman, M. (2002). Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5751-5780.

33. Friedman, M. (2004). Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 143-155.

34. Friedman, M., Henika, P. R. and Mackey, B. E. (2003). Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 61-71.

35. Friedman, M., Levin, C. E., Lee, S. U., Kim, H. J., Lee, I. S., Byun, J. O. and Kozukue, N. (2009). Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5727-5733.

36. Friedman, M. A. C. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet, review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8655-8681.

37. Fujiwara, Y., Takaki, A., Uehara, Y., Ikeda, T., Okawa, M., Yamauchi, K., Ono, M., Yoshimitsu, H. and Nohara, T. (2004). Tomato steroidal alkaloid glycosides, esculeosides A and B, from ripe fruits. *Tetrahedron*, 60(22), 4915-4920.

38. Ghisalberti, E. L. (2006). Steroidal glycoalkaloids: Isolation, structure, analysis, and biosynthesis. *Natural Product Communications*, 1(10), 859-884.
39. Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic And Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205-227.
40. Govrin, E. and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic-next term pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13), 751-757.
41. Güçlü-Üstündağ, Ö. and Giuseppe, M. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231-258.
42. Hassan, S. M., Byrd, J. A., Berhow, A. M., Bailey, C. A. and Cartwright, A. L. (2007). Saponin rich extracts from quillaja, yucca, soybean, and guar differ in antimicrobial and hemolytic activities. *Journal of Dairy Science*, 90, 225-225.
43. Henrissat, B. (1991). A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochemical Journal*, 280, 309-316.
44. Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochemical Journal*, 293, 781-788.
45. Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 316, 695-696.
46. Herrera-Arellano, A., Martinez-Rivera, M. D., Hernandez-Cruz, M., Lopez-Villegas, E. O., Rodriguez-Tovar, A. V., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Navarro-Garcia, V. M. and Tortoriello, J. (2007). Mycological and electron microscopic study of *Solanum chrysotrichum* saponin SC-2 antifungal activity on *candida* species of medical significance. *Planta Medica*, 73(15), 1568-1573.
47. Hostettmann, K. and Marston, A. (1995). *Saponins*, Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge.
48. Hu, X. Y., Neill, S., Cai, W. M. and Tang, Z. C. (2003). Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin accumulation in suspension-cultured cells of *Panax ginseng*. *Physiologia Plantarum*, 118(3), 414-421.
49. Hu, X. Y., Neill, S. J., Cai, W. M. and Tang, Z. C. (2003). Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures of *Panax ginseng*. *Functional Plant Biology*, 30(8), 901-907.
50. Hughes, H. B., Morrissey, J. P. and Osbourn, A. E. (2004). Characterisation of the saponin hydrolysing enzyme *avenacoside-alpha-L-rhamnosidase* from the fungal pathogen of cereals, *Stagonospora avenae*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(4), 421-427.
51. Ito, S., Eto, T., Tanaka, S., Yamauchi, N., Takahara, H. and Ikeda, T. (2004). Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of alpha- tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *Febs Letters*, 571(1-3), 31-34.
52. Ito, S., Ihara, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ikeda, T., Kajihara, H., Dissanayake, C., Abdel-Motaal, F. F. and El-Sayed, M. A. (2007). alpha-tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *Febs Letters*, 581(17), 3217-3222.
53. Ito, S., Nagata, A., Kai, T., Takahara, H. and Tanaka, S. (2005). Symptomless infection of tomato plants by tomatinase producing *Fusarium oxysporum* formae speciales nonpathogenic on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(5), 183-191.
54. Jin, Y. L., Kuk, J. H., Oh, K. T., Kim, Y. J., Piao, X. L. and Park, R. D. (2007). A new steroidal saponin, yuccalan, from the leaves of *Yucca smalliana*. *Archives of Pharmacal Research*, 30(5), 543-546.
55. Kaup, O., Grafen, I., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R. and Gartemann, K. H. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* NCPPB382. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(10), 1090-1098.
56. Keukens, E. A. J., deVrije, T., vandenBoom, C., deWaard, P., Plasman, H. H., Thiel, F., Chupin, V., Jongen, W. M. F. and deKruijff, B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1240(2), 216-228.

57. Khan, N. A. and Srivastava, A. (2009). Antifungal activity of bioactive triterpenoid saponin from the seeds of *Cassia angustifolia*. *Natural Product Research*, 23(12), 1128-1133.
58. Khanna, V. G. and Kannabiran, K. (2008). Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(11), 2737-2740.
59. Kohara, A., Nakajima, C., Hashimoto, K., Ikenaga, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., Yoshida, S. and Muranaka, T. (2005). A novel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanum aculeatissimum*. *Plant Molecular Biology*, 57(2), 225-239.
60. Kohara, A., Nakajima, C., Yoshida, S. and Muranaka, T. (2007). Characterization and engineering of glucosyltransferases responsible for steroid saponin biosynthesis in Solanaceous plants. *Phytochemistry*, 68, 478-486.
61. Korpan, Y. I., Nazarenko, E. A., Skryshevskaya, I. V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N. and El'skaya, A. V. (2004). Potato glycoalkaloids: true safety or false sense of security? *Trends in Biotechnology*, 22(3), 147-151.
62. Korpan, Y. I., Volotovskiy, V. V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Nazarenko, E. A., El'skaya, A. V. and Soldatkin, A. P. (2002). A novel enzyme biosensor for steroidal glycoalkaloids detection based on pH-sensitive field effect transistors. *Bioelectrochemistry*, 55(1-2), 9-11.
63. Kouam, J., Noundou, X. S., Mabeku, L. B. K., Lanang, A. M., Choudhary, M. I. and Fomum, Z. T. (2007). Sigmoidside E: A new antibacterial triterpenoid saponin from *Erythrina sigmoidea* (Hua). *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 21(3), 373-378.
64. Krits, P., Fogelman, E. and Ginzberg, I. (2007). Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes. *Planta*, 227(1), 143-150.
65. LacailleDubois, M. A. and Wagner, H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2(4), 363-386.
66. Lachman, J., Hamouz, K., Orsak, M. and Pivec, V. (2001). Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition - review. *Rostlinna Vyroba*, 47(4), 181-191.
67. Lairini, K., PerezEspinosa, A., Pineda, M. and RuizRubio, M. (1996). Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1604-1609.
68. Lairini, K. and Ruiz-Rubio, M. (1998). Detoxification of alpha-tomatine by *Fusarium solani*. *Mycological Research*, 102, 1375-1380.
69. Lu, M. B., Wong, H. L. and Teng, W. L. (2001). Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports*, 20(7), 674-677.
70. Martín-Hernández, A. M., Dufresne, M., Huguovieux, V., Melton, R. and Osbourn, A. (2000). Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(12), 1301-1311.
71. Mayer, A. M., Staples, R. C. and Gil-ad, N. L. (2001). Mechanisms of survival of necrotrophic next term fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, 58(1), 33-41.
72. McCue, K. F., Shepherd, L. V. T., Allen, P. V., MacCree, M. M., Rockhold, D. R., Corsini, D. L., Davies, H. V. and Belknap, W. R. (2005). Metabolic compensation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in transgenic potato tubers: using reverse genetics to confirm the *in vivo* enzyme function of a steroidal alkaloid galactosyltransferase. *Plant Science*, 168(1), 267-273.
73. Meesapyodsuk, D., Balsevich, J., Reed, D. W. and Covello, P. S. (2007). Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs encoding beta-amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiology*, 143(2), 959-969.
74. Meher, H. C. and Gaur, H. S. (2003). A new UV-LC method for estimation of α -tomatine and α -solanine in tomato. *Indian Journal Nematology*, 33(1), 24-28.
75. Meher, H. C., Gaur, H. S. and Singh, G. (2003). α -tomatine and α -solanine levels in *Meloidogyne incognita* resistant and susceptible tomato cultivars. *International Journal of Nematology*, 13(1), 93-96.
76. Melton, R. E., Flegg, L. M., Brown, J. K. M., Oliver, R. P., Daniels, M. J. and Osbourn, A. E. (1998). Hete-

rologous expression of *Septoria lycopersici* tomatinase in *Cladosporium fulvum*: Effects on compatible and incompatible interactions with tomato seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(3), 228-236.

77. Moehs, C. P., Allen, P. V. and Belknap, W. R. (1997). Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant Journal*, 11, 227-236.

78. Morrissey, J. P. and Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 708-+.

79. Mucharromah, B. and Kuc, J. (1995). The effect of sterols on phytoalexin, steroid glycoalkaloid, and sterol accumulation in potato tuber discs inoculated with *Phytophthora infestans* or treated with arachidonic acid. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 47, 13-27.

80. Muller, C. (2009). Role of glucosinolates in plant invasiveness. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 227-242.

81. Murgu, M., Santos, L. F. A., de Souza, G. D., Dao-lio, C., Schneider, B., Ferreira, A. G. and Rodrigues, E. (2008). Hydroxylation of a hederagenin derived saponin by a *Xylareaceous* fungus found in fruits of *Sapindus saponaria*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(5), 831-835.

82. Mylona, P., Owatworakit, A., Papadopoulou, K., Jenner, H., Qin, B., Findlay, K., Hill, L., Qi, X., Bakht, S., Melton, R. and Osbourn, A. (2008). Sad3 and Sad4 are required for saponin biosynthesis and root development in oat. *Plant Cell*, 20(1), 201-212.

83. Mysore, K. S. and Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2), 97-104.

84. Nagaoka, T., Yoshihara, T., Ohra, J. and Sakamura, S. (1993). Steroidal Alkaloids from Roots of Tomato Stock. *Phytochemistry*, 34(4), 1153-1157.

85. Nagaoka, T., Yoshihara, T. and Sakamura, S. (1987). Lycopersiconolide, a Steroid Lactone from Tomato Roots. *Phytochemistry*, 26(7), 2113-2114.

86. Nema, P. K., Ramayya, N., Duncan, E. and Niranjana, K. (2008). Potato glycoalkaloids: formation and strategies

for mitigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 1869-1881.

87. Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt Iii, B. F. and Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 579-609.

88. Niño, J., Correa, Y. M. and Mosquera, O. M. (2009). - Biological activities of steroidal alkaloids isolated from *Solanum leucocarpum*. - 47(- 3), - 259.

89. Nishikawa, M., Nojima, S., Akiyama, T., Sankawa, U. and Inoue, K. (1984). Interaction of Digitonin and Its Analogs with Membrane Cholesterol. *Journal of Biochemistry*, 96(4), 1231-1239.

90. Oda, Y., Saito, K., Ohara-Takada, A. and Mori, M. (2002). Hydrolysis of the potato glycoalkaloid alpha-chaconine by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(4), 321-325.

91. Osbourn, A. (1996). Saponins and plant defence - A soap story. *Trends in Plant Science*, 1(1), 4-9.

92. Osbourn, A., Bowyer, P., Lunness, P., Clarke, B. and Daniels, M. (1995). Fungal pathogens of oat roots and tomato leaves employ closely related enzymes to detoxify different host plant saponins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(6), 971-978.

93. Osbourn, A. E., Clarke, B. R., Lunness, P., Scott, P. R. and Daniels, M. J. (1994). An Oat Species Lacking *Avenacin* Is Susceptible to Infection by *Gaeumannomyces Graminis* Var *Tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45(6), 457-467.

94. Papadopoulou, K., Melton, R. E., Leggett, M., Daniels, M. J. and Osbourn, A. E. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12923-12928.

95. Pareja-Jaime, Y., Roncero, M. I. G. and Ruiz-Roldan, M. C. (2008). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 728-736.

96. Pavlik, M., Vanova, M., Laudova, V. and Harmatha, J. (2000). Digitonin as a model biologically active saponin forming specific quality of *Digitalis* sp in bioassays *in vitro*. *Rostlinna Vyroba*, 46(8), 343-347.

97. Qi, X., Bakht, S., Qin, B., Leggett, M., Hemmings, A., Mellon, F., Eagles, J., Werck-Reichhart, D., Schaller, H., Lesot, A., Melton, R. and Osbourn, A. (2006). A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18848-18853.
98. Quidde, T., Buttner, P. and Tudzynski, P. (1999). Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative *avenacinase*. *European Journal of Plant Pathology*, 105(3), 273-283.
99. Quidde, T., Osbourn, A. E. and Tudzynski, P. (1998). Detoxification of alpha-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52(3), 151-165.
100. Rietjens, I., Martena, M. J., Boersma, M. G., Spiegelberg, W. and Alink, G. M. (2005). Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(2), 131-158.
101. Rivas, S. and Thomas, C. M. (2005). Molecular Interactions Between Tomato and the Leaf Mold Pathogen *Cladosporium Fulvum*. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 395-436.
102. vRoddick, J. G. (1974). Steroidal Glycoalkaloid Alpha-Tomatine. *Phytochemistry*, 13(1), 9-25.
103. Roddick, J. G. (1975). Effect of Alpha-Tomatine on Permeability of Plant Storage Tissues. *Journal of Experimental Botany*, 26(91), 221-227.
104. Roddick, J. G. (1978). Effect of Alpha-Tomatine on the Integrity and Biochemical Activities of Isolated Plant-Cell Organelles. *Journal of Experimental Botany*, 29(113), 1371-1381.
105. Roddick, J. G. and Drysdale, R. B. (1984). Destabilization of Liposome Membranes by the Steroidal Glycoalkaloid Alpha-Tomatine. *Phytochemistry*, 23(3), 543-547.
106. Roddick, J. G. and Rijnenberg, A. L. (1986). Effect of Steroidal Glycoalkaloids of the Potato on the Permeability of Liposome Membranes. *Physiologia Plantarum*, 68(3), 436-440.
107. Roddick, J. G. and Rijnenberg, A. L. (1987). Synergistic Interaction between the Potato Glycoalkaloids Alpha-Solanine and Alpha-Chaconine in Relation to Lysis of Phospholipid Sterol Liposomes. *Phytochemistry*, 26(5), 1325-1328.
108. Roddick, J. G., Rijnenberg, A. L. and Osman, S. F. (1988). Synergistic Interaction between Potato Glycoalkaloids Alpha-Solanine and Alpha-Chaconine in Relation to Destabilization of Cell-Membranes - Ecological Implications. *Journal of Chemical Ecology*, 14(3), 889-902.
109. Roddick, J. G., Rijnenberg, A. L. and Weissenberg, M. (1992). Alterations to the Permeability of Liposome Membranes by the Solasodine-Based Glycoalkaloids Solasonine and Solamargine. *Phytochemistry*, 31(6), 1951-1954.
110. Roldan-Arjona, T., Perez-Espinosa, A. and Ruiz-Rubio, M. (1999). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(10), 852-861.
111. Sandrock, R. W., DellaPenna, D. and VanEtten, H. D. (1995). Purification and characterization of beta(2)-tomatinase, an enzyme involved in the degradation of alpha-tomatine and isolation of the gene encoding beta(2)-tomatinase from *Septoria lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(6), 960-970.
112. Sandrock, R. W. and VanEtten, H. D. (1998). Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin alpha-tomatine. *Phytopathology*, 88(2), 137-143.
113. Sandrock, R. W. and Vanetten, H. D. (2001). The relevance of tomatinase activity in pathogens of tomato: disruption of the beta(2)-tomatinase gene in *Colletotrichum coccodes* and *Septoria lycopersici* and heterologous expression of the *Septoria lycopersici* beta(2)-tomatinase in *Nectria haematococca*, a pathogen of tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58(4), 159-171.
114. Sautour, M., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Dongmo, A. and Lacaille-Dubois, M. A. (2004). A new steroidal saponin from *Dioscorea cayenensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52(11), 1353-1355.
115. Seipke, R. F. and Loria, R. (2008). *Streptomyces scabies* 87-22 Possesses a Functional Tomatinase. *Journal of Bacteriology*, 190(23), 7684-7692.

116. Simons, V. (2003). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to investigate the biological properties of saponins. The Sainsbury Laboratory-John Innes Centre. Norwich, University of East Anglia. Doctor of Philosophy: 78.
117. Simons, V., Morrissey, J. P., Latijnhouwers, M., Csukai, M., Cleaver, A., Yarrow, C. and Osbourn, A. (2005). Dual effects of plant steroidal alkaloids on yeast. Submitted for publication
118. Snyder, B., Leite, B., Hipskind, J., Butler, L. G. and Nicholson, R. L. (1991). Accumulation of sorghum phytoalexins induced by *Colletotrichum graminicola* at the infection site. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 39, 463-470.
119. Snyder, B. and Nicholson, R. L. (1990). Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science*, 248, 1637-1639.
120. Steel, C. C. and Drysdale, R. B. (1988). Electrolyte Leakage from Plant and Fungal Tissues and Disruption of Liposome Membranes by Alpha-Tomatine. *Phytochemistry*, 27(4), 1025-1030.
121. Stergiopoulou, T., De Lucca, A. J., Meletiadiis, J., Sein, T., Boue, S. M., Schaufele, R., Roilides, E., Ghanoun, M. and Walsh, T. J. (2008). *In vitro* activity of CAY-1, a saponin from *Capsicum frutescens*, against *Microsporum* and *Trichophyton* species. *Medical Mycology*, 46(8), 805-810.
122. Stine, K. J., Hercules, R. K., Duff, J. D. and Walker, B. W. (2006). Interaction of the glycoalkaloid tomatine with DMPC and sterol monolayers studied by surface pressure measurements and Brewster angle microscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(44), 22220-22229.
123. Suzuki, H., Achnine, L., Xu, R., Matsuda, S. P. T. and Dixon, R. A. (2002). A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 32(6), 1033-1048.
124. Swenson, J. D., Bowdy, K. L. and Jursic, B. S. (2005). Toward the synthesis of the pentasaccharide moiety of CAY-1, antifungal steroidal saponin. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 229, 1166-CHED.
125. Thatcher, L. F., Anderson, J. P. and Singh, K. B. (2005). Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? *Functional Plant Biology*, 32(1), 1-19.
126. Thomas, S. L., Bonello, P., Lipps, P. E. and Boehm, M. J. (2006). Avenacin production in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) and its influence on the host range of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Disease*, 90(1), 33-38.
127. Trojanowska, M. R., Osbourn, A. E., Daniels, M. J. and Threlfall, D. R. (2000). Biosynthesis of avenacins and phytosterols in roots of *Avena sativa* cv. Image. *Phytochemistry*, 54(2), 153-164.
128. Trojanowska, M. R., Osbourn, A. E., Daniels, M. J. and Threlfall, D. R. (2001). Investigation of avenacin-deficient mutants of *Avena strigosa*. *Phytochemistry*, 56(2), 121-129.
129. Trojanowska, M. R. and Threlfall, D. R. (1999). Regulation of saponin biosynthesis in primary roots of oat. *Acta Botanica Gallica*, 146(1), 101-104.
130. Wallace, J. (2004). Symposium on 'Plants as animal foods: a case of catch 22?', antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 621-629.
131. Wang, Y., McAllister, T. A., Yanke, L. J. and Cheeke, P. R. (2000). Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 887-896.
132. Watanabe, M., Sumida, N., Yanai, K. and Murakami, T. (2004). A novel saponin hydrolase from *Neocosmospora vasinfecta* var. *vasinfecta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 865-872.
133. Watanabe, M., Sumida, N., Yanai, K. and Murakami, T. (2005). Cloning and characterization of saponin hydrolases from *Aspergillus oryzae* and *Eupenicillium breffieldianum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69(11), 2178-2185.
134. Weltring, K. M., Wessels, J. and Geyer, R. (1997). Metabolism of the potato saponins alpha-chaconine and alpha-solanine by *Gibberella pulicaris*. *Phytochemistry*, 46(6), 1005-1009.
135. Wiermer, M., Feys, B. J. and Parker, J. E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 383-389.

136. Yadava, R. N. (2001). A new biologically active triterpenoid saponin from the leaves of *Lepidagathis hyalina* Nees. *Natural Product Letters*, 15(5), 315-322.

137. Yadava, R. N. and Chakravarti, N. (2009). New antifungal triterpenoid saponin from *Launaea pinnatifida* Cass. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 48(1), 83-87.

138. Yadava, R. N. and Jharbade, J. (2007). A new bioactive triterpenoid saponin from the seeds of *Lactuca scariola* Linn. *Natural Product Research*, 21(6), 500-506.

55

139. Yadava, R. N. and Jharbade, J. (2008). New antibacterial triterpenoid saponin from *Lactuca scariola*. *Fitoterapia*, 79(4), 245-249.

140. Yahara, S., Uda, N. and Nohara, T. (1996). Lycopersosides A-C, three stereoisomeric 23-acetoxyspirosolan-3[beta]-ol [beta]-lycotetraosides from *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*, 42(1), 169-172.

141. Yahara, S., Uda, N., Yoshio, E. and Yae, E. (2004). Steroidal alkaloid glycosides from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Natural Products*, 67(3), 500-502.

142. Yamanaka, T., Vincken, J. P., de Waard, P., Sanders, M., Takada, N. and Gruppen, H. (2008). Isolation, Characterization, and Surfactant Properties of the Major Triterpenoid Glycosides from Unripe Tomato Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11432-11440.

143. Yoshihara, T., Nagaoka, T., Ohra, J. and Sakamura, S. (1988). Lycopersiconol, a Pregnane Derivative from Tomato Stock Roots. *Phytochemistry*, 27(12), 3982-3984.

144. Yoshioka, H., Yamada, N. and Doke, N. (1999). cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiology*, 40, 993-998.

145. Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y. M., An, S., Guo, D. A., Zhou, Y. X., Zeng, L. W. and Cheng, J. (2002). Cluster analysis of yeast genome-wide expression patterns obtained by treating with different antifungal agents. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 29(4), 538-542.

(*) **Autor de correspondencia:**

Luz Nelly Diaz Puentes

Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA,
Carretera Nacional Hoyo de la Puerta a Baruta, Valle de Sartenejas, Caracas,

Estado Miranda, República Bolivariana de Venezuela

e-mail: ndiaz@idea.gob.ve