

# **QUITOSACÁRIDOS EN LA NODULACIÓN Y EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE SOYA (*GLYCINE MAX* [L.] MERRILL) INOCULADA CON *BRADYRHIZOBIUM ELKANII*.**

**Daimy Costales Menéndez, María C. Nápoles García y Alejandro B. Falcón Rodríguez.**

*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba, email: [daimy@inca.edu.cu](mailto:daimy@inca.edu.cu)*

## **Introducción**

La soya es un cultivo que se destaca dentro de la producción agrícola mundial por la calidad de sus granos en proteínas, aminoácidos y aceite. Este cultivo acumula nitrógeno (N) para su normal crecimiento, con requerimientos que oscilan entre 60 y 80 kg de N por tonelada de grano (Scheiner *et al.*, 1999; González, 2000). Para cubrir tal demanda, además de la absorción de dicho nutriente desde el suelo, las leguminosas han desarrollado el mecanismo de la fijación biológica del nitrógeno (FBN), a partir de la asociación con rizobios. De esta forma, el uso de microorganismos rizosféricos en la preparación de inoculantes para soya ha alcanzado gran importancia porque mantiene altas productividades con un menor impacto ambiental (Sánchez *et al.*, 2005).

La simbiosis *Bradyrhizobium*-soya se establece y transcurre como resultado de un específico intercambio de señales entre ambos simbiontes. Las raíces de la planta exudan isoflavonoides que activan la cascada de expresión génica en la bacteria que resulta en la síntesis y excreción de los factores de nodulación o lipo-quitinoligosacáridos, conocidos como LCOs por sus siglas en inglés (lipochitooligosaccharides) (Spaink, 2000).

Estas moléculas, formadas por esqueletos de oligoquitininas unidas a diversos compuestos y sustituyentes (Souleimanov *et al.*, 2002; Riely *et al.*, 2006), interactúan con receptores en las raíces de la planta causando varias respuestas fisiológicas como la deformación de los pelos radicales, la división de las células corticales de la raíz y otros cambios morfológicos que conllevan a la formación del nódulo donde se establecerá la bacteria como microsimbionte (Gage, 2004).

Algunos trabajos han informado que la parte de oligoquitina de los LCOs es la responsable de inducir las deformaciones de los pelos radicales y las divisiones de las células corticales de la raíz (Gage, 2004). Otros autores demostraron adelantos en la germinación, incrementos de los contenidos de fotosintatos y en la longitud y masa radical, así como el crecimiento temprano de varias especies de plantas con diferentes formas de aplicación de estas moléculas (Smith *et al.*, 2002; Pritiviraj *et al.*, 2003). Es posible pensar entonces, que quizás otros derivados de quitina pudieran influir en el proceso simbiótico de plantas de soya.

Las quitosanas son un grupo de heteropolisacáridos que comprenden copolímeros formados por residuos de D-glucosamina y N-acetil glucosamina, unidos por enlaces  $\beta$  1-4. Son el principal derivado del polímero natural conocido como quitina, que es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. La heterogeneidad de las quitosanas depende de que difieren en características físico-químicas como son la masa molecular, la viscosidad, el grado de acetilación, etc. (Prashanth y Tharanathan, 2007). Algunas de las características mencionadas le confieren a estos compuestos potencialidades biológicas para su aplicación en la agricultura. Entre los efectos biológicos que resultan deseables en el contexto agrícola, se encuentran la inhibición del crecimiento y desarrollo de microorganismos que incluyen hongos, oomycetes y bacterias (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Palma-Guerrero *et al.*, 2008; Raafat *et al.*, 2008), así

como la inducción de respuestas defensivas y de protección contra patógenos en plantas, incluyendo las infecciones virales (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Aziz *et al.*, 2006; Prapagdee *et al.*, 2007). Es conocida, además, la acción de estos compuestos como promotores del crecimiento y desarrollo de varias especies, en algunos casos relacionados a una actividad antitranspirante y mejoradora del rendimiento en algunos cultivos (Utsumomiya *et al.*, 1998; Bitelli *et al.*, 2001; Iriti *et al.*, 2009; El Hadrami *et al.*, 2010). En varios de los efectos biológicos mencionados se ha demostrado diferencias y modulación de las respuestas en las variables evaluadas, cuando se aplican quitosanas con diferentes características físico-químicas (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Aziz *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Falcón *et al.*, 2009).

Trabajos previos demostraron que, la inclusión de compuestos de quitosana en medios de crecimiento *in vitro* de plántulas de soya, benefician el proceso de nodulación de esta especie por su simbionte *Bradyrhizobium elkanii* (Costales *et al.*, 2005; 2007). Sin embargo, no se conoce cómo las diferencias físico-químicas de los quitosacáridos pueden influir en la respuesta simbiótica de esta interacción, ni su influencia en el crecimiento de las plantas. Por tanto, este trabajo tiene como objetivo: evaluar el efecto de compuestos de quitosana en la nodulación y en algunos indicadores del crecimiento *in vitro* de plántulas de soya.

### Materiales y Métodos

En las experimentaciones, se empleó un polímero de quitosana y una mezcla de oligoquitosanas, obtenidas por el Grupo de Productos Bioactivos del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. El polímero fue obtenido por desacetilación básica (NaOH) de quitina de langosta (*Panulinus argus*), calidad farmacéutica, a escala de banco (Falcón, 2005). Las características físico-químicas fueron: porcentaje del grado de acetilación (12%), masa molar ( $1,35 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>) y grado de polimerización (813).

La mezcla de oligómeros de quitosana se obtuvo por hidrólisis enzimática del polímero anterior y posterior precipitación de los oligosacáridos de interés. Mediante cromatografía acoplada a espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) se determinó su grado de polimerización (GP entre 5 y 9) y de acetilación (totalmente desacetilada) (Cabrera y van Cutsem, 2005).

#### Efecto de compuestos de quitosana en la viabilidad de *Bradyrhizobium elkanii*.

A partir de una solución madre a 10 g.L<sup>-1</sup> de un polímero de quitosana y una mezcla de oligoquitosanas, disuelta al 1% en ácido acético y ajustada a pH 5,6, se tomaron alícuotas hasta obtener concentraciones correspondientes a 0; 1; 10; 50; 100; 500 y 1000 mg.L<sup>-1</sup> de lo quitosacáridos que fueron adicionadas al medio de cultivo agarizado, Manitol-extracto de levadura (YEM, por sus siglas en inglés) (Vincent, 1970). Posteriormente, los erlenmeyers conteniendo el medio YEM más los quitosacáridos, se esterilizó en autoclave a 120°C, 152KPa, por 20 min., vertiéndose luego 20 mL de medio en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Se utilizaron 5 placas por tratamiento, las que fueron inoculadas por diseminación con 100 µL de cultivo a una concentración de  $1,22 \times 10^9$  células viables.mL<sup>-1</sup> (obtenido con la cepa ICA 8001 de *Bradyrhizobium elkanii* (Nápoles *et al.*, 2006), cultivada en medio YEM líquido durante 65 horas a 30°C y 140 rpm). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 10 días. Se determinó entonces, mediante conteo de colonias típicas, el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de medio (UFC.mL<sup>-1</sup>) en cada placa, a los 7 y 10 días de inoculadas. El porcentaje de actividad inhibitoria (AI) fue calculado según la fórmula: AI (%)= [(C-T)/C] x 100, donde C es el número de colonias crecidas en el control y T, las colonias correspondientes a los tratamientos con los compuestos de quitosana.

### **Efecto de compuestos de quitosana en la nodulación y en algunos indicadores del crecimiento de plántulas de soya inoculadas con *B. elkanii*.**

Las semillas certificadas de soya, variedad INCAsoy-27 (Ponce *et al.*, 2006), fueron desinfectadas previamente con etanol (70%) e hipoclorito de sodio (25%) durante 5 min. y enjuagadas 6 veces con agua destilada estéril antes de ser colocadas en placas de Petri conteniendo medio Agar-agua (0.75%), para su germinación a 30°C durante 3 días en la oscuridad. Las semillas pregerminadas fueron colocadas en tubos de ensayo con 40 mL de medio vegetal (Norris y Date, 1976) semisólido y las distintas concentraciones de los quitosacáridos, a razón de una semilla por tubo. Se inocularon 7 días después con 1mL de cultivo de la cepa ICA 8001 a una concentración de 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> en medio líquido YEM. Las plantas crecieron en cámara de crecimiento, en condiciones controladas de luz artificial/oscuridad de 16/8 horas, a 25°C y 70% de humedad relativa, durante 30 días.

Las concentraciones del polímero de quitosana empleadas en las evaluaciones de nodulación fueron: 0, 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 mg.L<sup>-1</sup> mientras que con la mezcla de oligoquitosanas se emplearon las siguientes concentraciones: 0, 1, 10, 100 y 500 mg.L<sup>-1</sup>. A los 30 días de inoculadas las plántulas se seleccionaron al azar 10 plantas por tratamiento y se les realizaron las evaluaciones de: número de nódulos totales, porcentaje de efectividad nodular (%), según la coloración interna de los nódulos, y masa seca (g) del total de nódulos por planta.

Para evaluar el efecto de los compuestos de quitosana en las variables de crecimiento, éstos fueron adicionados al medio de cultivo vegetal a concentraciones de: 0, 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 mg.L<sup>-1</sup>. La plantas fueron seleccionadas de forma aleatoria (10 plantas por tratamiento), en 4 momentos del período vegetativo (7, 15, 21 y 30 días después de inoculadas) para evaluar algunos indicadores de crecimiento como el número de hojas (trifoliadas), la altura (cm) y la longitud radical (cm) por planta.

### **Efecto del polímero de quitosana en la activación de indicadores defensivos en raíces de plántulas de soya inoculadas con *B. elkanii*.**

Se seleccionaron de forma aleatoria seis plántulas de soya crecidas en medio vegetal semisólido con la adición de las concentraciones 0, 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 mg.L<sup>-1</sup> del polímero de quitosana, según lo descrito anteriormente. A partir de extractos de raíces de plántulas de soya, crecidas a los 7 y 21 días después de inoculadas, se determinó la concentración de proteínas solubles y tres actividades enzimáticas en cada momento evaluado, conformándose 2 muestras por tratamiento con 4 y 3 repeticiones por muestra, respectivamente.

La actividad enzimática *Fenilalanina-amonioliasa* (PAL), fue desarrollada mediante la metodología de Vander *et al.* (1998). El ensayo se incubó por 2 horas. Se cuantificó la formación de ácido trans-cinámico por acción de las enzimas PAL presentes en el extracto (0.1 mL), usando L-Fenilalanina Sigma, (0.1 mol.L<sup>-1</sup>, pH=8,8) como sustrato. La actividad enzimática fue expresada como actividad específica (mg ácido trans-cinámico.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>), para lo cual se determinó previamente la pendiente de una curva de ácido trans-cinámico a 290 nm.

Fueron determinadas además, las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), según la metodología descrita por Boudart *et al.* (1998). Para la  $\beta$  1-3 Glucanasa, el total de azúcares reductores liberado en el ensayo fue determinado por el método colorimétrico de Somogyi (1952) y los resultados se expresaron como actividad específica (mg de glucosa.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>), para lo cual se determinó previamente la pendiente en una curva de azúcares reductores para un patrón de glucosa a 520 nm. En cuanto a la actividad Quitinasa, fue estimada mediante la liberación de azúcares reductores de quitina coloidal. El ensayo estándar (0,5 ml) contuvo el extracto enzimático (0,03 mL), 0,25 mL de

quitina coloidal en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5.2) y 0,21 mL del mismo buffer. Después de una incubación por cuatro horas a 37°C bajo continua agitación lineal (250 rpm), se adicionaron a la mezcla 0,01 mL de hidróxido de potasio (5N) para detener la reacción. La solución ensayo se centrifugó (12 000 rpm) durante cinco minutos para precipitar el sustrato que no reaccionó y entonces se determinó el contenido de azúcares reductores en el sobrenadante (Somogyi, 1952). La actividad quitinasa se expresó como actividad específica (mg de N-acetyl glucosamina. min<sup>-1</sup>. mg proteína<sup>-1</sup>), para lo cual se determinó previamente la pendiente en una curva de azúcares reductores para un patrón de N-acetyl glucosamina a 520 nm.

### Diseño experimental y análisis estadístico.

En los experimentos se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado. Todos los ensayos se realizaron dos veces y se promediaron los datos de ambas repeticiones, que fueron sometidos, previos a la verificación de las premisas del ANOVA, a un análisis de varianza de Clasificación Simple. Las medias resultantes se compararon con la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD para  $p \leq 0.05$  en el programa Statgraphics Plus, versión 5.1 (Statistical Graphics Corporation, 2001).

## Resultados y Discusión

### Efecto de compuestos de quitosana en la viabilidad de *Bradyrhizobium elkanii*.

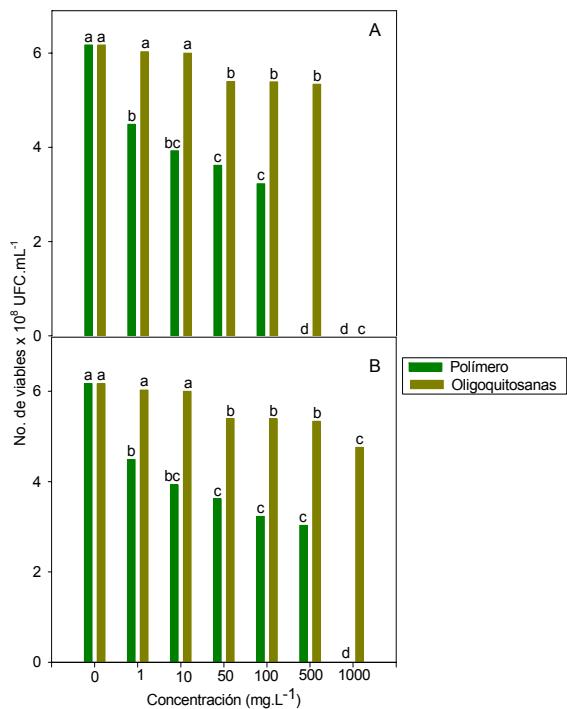
Un número importante de estudios demuestran que los quitosacáridos ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento, desarrollo y la reproducción de una gran variedad de microorganismos que incluyen, hongos, oomycetes y bacterias (Bautista *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008; Raafat *et al.*, 2008). En bacterias, se han informado efectos inhibitorios causados por compuestos de quitosana tanto en Gram positivas como en Gram negativas (Raafat *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009). Sin embargo, un análisis de la literatura arrojó que no existe información acerca del efecto de quitosacáridos en bacterias del grupo de los rizobios.

La presencia del polímero de quitosana y de la mezcla de oligoquitosanas en el medio de cultivo de *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001 afectó su viabilidad, efecto que fue superior para las concentraciones de 500 mg.L<sup>-1</sup> y 1000 mg.L<sup>-1</sup> del polímero y de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de la mezcla en la primera evaluación, correspondiente a los 7 días, con una actividad inhibitoria del 100% (Figura 1A). A los diez días de inoculadas las placas (Figura 1B), la concentración 500 mg.L<sup>-1</sup> del polímero de quitosana permitió el crecimiento de algunas colonias pequeñas, reduciendo su actividad inhibitoria del 100% al 50,9%, mientras que la concentración mayor (1000 mg.L<sup>-1</sup>) mantuvo un efecto inhibitorio total. Este efecto de permitir un crecimiento después de los 7 días, también se observó para la mezcla de oligoquitosanas a la concentración mayor, que mostró un crecimiento de colonias de menor tamaño y diferente estadísticamente del resto de los tratamientos, con un 22,85% de actividad bacteriostática.

Cabe señalar que aunque fue significativo el efecto de los quitosacáridos en la viabilidad de la cepa ICA 8001, la afectación tuvo una significación biológica poco trascendente porque el número de unidades formadoras de colonias por mililitro se mantuvo en el mismo orden ( $10^8$ ) con las concentraciones mayores probadas.

Los resultados de este trabajo demostraron que en la medida en que aumentó la concentración se incrementó la inhibición de la rizobacteria, existiendo acción bactericida sólo para la concentración de 1000 mg.L<sup>-1</sup> del polímero y acción bacteriostática, para el resto de las concentraciones probadas de ambos quitosacáridos. La diferencia en las características físico-químicas (grados de polymerización y acetilación) de ambos compuestos de quitosana utilizados, ejerció una influencia en la actividad inhibitoria que

ellos causan en la viabilidad de esta especie de *Bradyrhizobium*, siendo la mezcla de oligoquitosanas la que menor acción inhibitoria ejerció en la viabilidad del microorganismo.



**Figura 1.** Efecto de compuestos de quitosana adicionados al medio de cultivo en la viabilidad de *B. elkanii* ICA 8001 a los 7 (A) y 10 días (B) de inoculadas las placas Petri. Letras iguales no difieren estadísticamente para  $p \leq 0.05$ , según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD. Polímero de quitosana: ES  $\bar{x}$  (A)= 0,23\* y ES  $\bar{x}$  (B)= 0,22\*. Mezcla de oligoquitosanas: ES  $\bar{x}$  (A)= 0,14\*, ES  $\bar{x}$  (B)= 0,12\*.

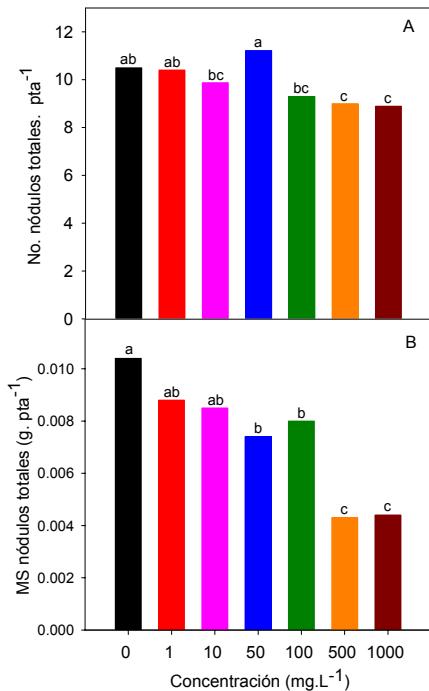
El modo de acción de las quitosanas en las bacterias no ha sido totalmente dilucidado. Usualmente se atribuye su acción inhibitoria al carácter policationico de la quitosana a  $\text{pH} \leq 6$ , que conlleva a que el grupo amino de la glucosamina esté cargado positivamente ( $\text{NH}_3^+$ ) e interaccione con los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas (Fernández *et al.*, 2003), provocando disrupción celular que incluso causa la salida del material intracelular (Liu *et al.*, 2004). Se infiere entonces, a partir de los mecanismos propuestos, que la actividad antimicrobiana de la quitosana dependerá en gran medida de aquellos factores que ayuden a acentuar las cargas positivas en la cadena del biopolímero (Lárez, 2008).

#### Efecto de compuestos de quitosana en la nodulación y en algunos indicadores del crecimiento de plántulas de soya inoculadas con *B. elkanii*.

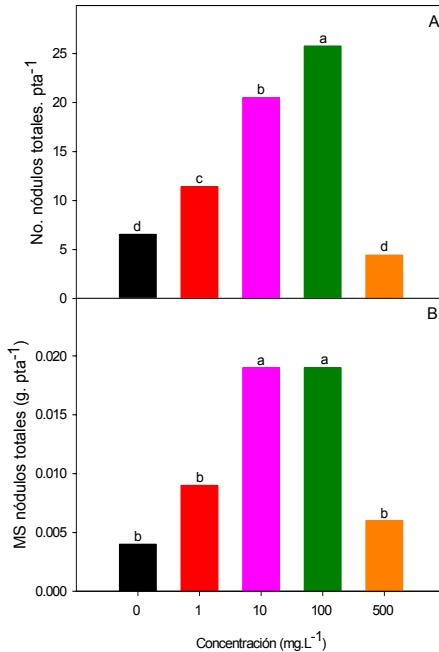
En este trabajo se evaluó el efecto de quitosacáridos de diferentes características físico-químicas en la nodulación *in vitro* de plántulas de soya inoculadas con *B. elkanii*. La respuesta encontrada en las variables de nodulación evaluadas dependió del tipo de compuesto y de las concentraciones utilizadas del mismo (Figura 2 y 3).

Los resultados de este trabajo demuestran que las características físico-químicas de los compuestos de quitosana empleados, influyen en el efecto que estos compuestos pueden ejercer en la simbiosis de la soya con su microsimbionte. El contacto permanente de las raíces con el polímero de quitosana a concentraciones por encima de  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  afectó los indicadores de la nodulación, mientras que las restantes no los modificaron (Figura 2). Sin

embargo, con la mezcla de oligoquitosanas a concentraciones de hasta  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  se obtuvo una inducción de los indicadores de nodulación evaluados (Figura 3).



**Figura 2.** Efecto de la adición del polímero de quitosana en el medio de cultivo vegetal en el número (A) y la masa seca (B) formados en plántulas de soya a los 30 días de inoculadas. Letras iguales no difieren estadísticamente para  $p \leq 0.05$  según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD.  $\bar{\text{ES X}} (A)= 0.96^*$ ,  $\bar{\text{ES X}} (B)= 0.001^*$ .



**Figura 3.** Efecto de la adición de la mezcla de oligoquitosanas en el medio de cultivo vegetal en el número (A) y la masa seca (B) de los nódulos totales de plántulas de soya a los 30 días de inoculadas. Letras iguales no difieren estadísticamente para  $p \leq 0.05$ , según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD.  $\bar{\text{ES X}} (A)= 0.70^*$ ,  $\bar{\text{ES X}} (B)= 0.01^*$ .

El efecto negativo encontrado en la nodulación de las plántulas de soya con la aplicación del polímero de quitosana, a las concentraciones mayores, pudiera estar relacionado con la acción inhibitoria que tuvieron dichas concentraciones (500 y  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) en la viabilidad de *Bradyrhizobium elkanii* (Figura 1). Sin embargo, lo antes mencionado podría no ser la única causa que incida en los indicadores de la nodulación evaluados. Esta afectación podría, además, estar relacionada con la capacidad probada de las quitosanas de inducir mecanismos de defensa en la planta, lo cual afectaría directamente la entrada del microsimbionte a las raíces y comprometería el balance energético requerido para otras funciones de crecimiento en la planta.

Contrario a los resultados obtenidos con el polímero de quitosana, la mezcla de oligoquitosanas benefició el incremento del número y la masa seca de los nódulos de plántulas en interacción con el microsimbionte. Este efecto positivo en la nodulación podría explicarse de dos formas. Es conocido que los derivados de quitosana favorecen el crecimiento, la floración y fructificación de diversos cultivos (Utsunomiya *et al.*, 1998; Otha *et al.*, 2004), por lo que como resultado de efectos que favorecen los procesos mencionados, podría beneficiarse la simbiosis *Bradyrhizobium-soya*.

Es también conocido que la estructura de los factores de nodulación (LCOs) producidos por los diferentes rizobios, contiene básicamente un esqueleto compuesto por oligosacáridos de quitina. Estas moléculas son responsables de iniciar el proceso de formación del nódulo ya que inducen las divisiones de las células corticales de las raíces

que conducen a la formación del primordio nodular; respuestas requeridas para controlar la entrada del microsimbionte y la ocurrencia de la nodulación (Gage, 2004; Mulder *et al.*, 2005). La mezcla de oligoquitosanas empleada tiene un rango de polimerización entre 5 y 9 residuos de glucosamina, donde se incluyen fragmentos de similar tamaño al de la estructura de oligoquitina de los LCOs de *Bradyrhizobium*.

Por otra parte, no se ha dilucidado aún el modo de acción de los derivados de quitina y quitosana en su acción biológica en la planta. Algunos autores sugieren que está dado a través de su unión a receptores en la membrana plasmática de la soya y al tamaño preferencial de los oligosacáridos de quitina (grado de polimerización, GP=8) para unirse al receptor que constituye el mismo sitio para reconocer a los LCOs de *B. japonicum*. Esta unión en ambos casos origina cambios en la membrana plasmática de la soya en esa región como la alcalinización del medio externo y la producción de especies reactivas de oxígeno, que inducen respuestas defensivas en plantas (Day *et al.*, 2001).

Tanto los factores de nodulación como los oligómeros de quitina producen alcalinización del apoplasto, lo cual está relacionado con la activación de especies reactivas de oxígeno y se ha demostrado que estos últimos, son más activos en la inducción de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico respecto a los LCOs en los pelos radicales de leguminosas (Muller *et al.*, 2000). La capacidad de los LCOs de eliciar respuesta cárctica depende de su estructura porque aparentemente sus sustituyentes evitan la estimulación de las reacciones defensivas que induce la parte oligosacárida de su esqueleto (Riely *et al.*, 2006). Estos autores sugieren que los cambios de pH y  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico son eventos claves en la transducción y en la discriminación de señales a respuestas simbióticas o reacciones defensivas (Felle *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2000; El Hadrami *et al.*, 2010). Sin embargo, trabajos anteriores refieren la existencia de un mismo receptor de membrana celular para reconocer a los LCOs y los oligómeros de quitina, sugiriéndose que a partir de un mismo sitio receptor se transducen señales de inducción de respuestas defensivas y de simbiosis (Minami *et al.*, 1996).

Es evidente que el tema no está totalmente esclarecido y que el estudio de respuestas en la simbiosis, activadas por compuestos de quitina y quitosana constituye un tema actual de investigación teórica y práctica.

Hasta el momento se conoce poco acerca del efecto de las oligosacarinas en la nodulación en leguminosas. Resultaría válida la utilización de derivados de quitina como aditivos de inoculantes, teniendo en cuenta las características físico-químicas, la concentración y el modo de aplicación de dichos compuestos, para incrementar el proceso de nodulación de la oleaginosa.

La forma de aplicación en este trabajo fue la inclusión de los quitosacáridos en el medio de cultivo de las plántulas *in vitro*. Se observó que, en dependencia de las concentraciones de los quitosacáridos incluidos en el medio de cultivo de crecimiento de las plántulas, estos ejercieron un efecto significativo en algunas de las variables de crecimiento analizadas (Figuras 4; Figura 5). Resultados de otros autores, con la inclusión de compuestos poliméricos de quitosana en el medio de cultivo *in vitro*, demostraron un efecto en el crecimiento dependiente de las concentraciones utilizadas (Ait Barka *et al.*, 2004; Asghari *et al.*, 2009). Los mayores incrementos de altura en plantas de uva, inducidos por el polímero, a la concentración de 1,75% (v/v), causó un porcentaje de incremento respecto al control de 50%, además de mejorar la biomasa del tallo y las raíces y reducir el desarrollo infeccioso del patógeno *Botrytis cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2004). Asghari *et al.*, (2009), con la adición de concentraciones desde 5 hasta 1000 mg.L<sup>-1</sup> del polímero, sólo encontraron diferencias en la masa fresca de minutubérculos de papa, destacándose 500 mg.L<sup>-1</sup> del compuesto, a diferencia de las restantes concentraciones que no modificaron esta variable.

En este trabajo, las concentraciones mayores ( $500$  y  $1000\text{ mg.L}^{-1}$ ) de los compuestos de quitosana afectaron de forma negativa algunas de las variables analizadas del crecimiento de plántulas de soya, fundamentalmente, la longitud radical. Es posible pensar entonces, que el contacto permanente de las raíces de las plántulas en el medio de cultivo con dichas dosis de quitosana desencadenen respuestas en la planta que afecten su crecimiento. Esto no descarta que otras formas de aplicación como la imbibición temporal de semillas ó de raíces en similares concentraciones, reduzca el efecto negativo encontrado como resultado del tiempo de exposición a éstos compuestos.

Otro aspecto a destacar es que el polímero de quitosana, aceleró el crecimiento de las plántulas de soya con las concentraciones de  $50$  y  $100\text{ mg.L}^{-1}$  en los dos primeros momentos evaluados ( $7$  y  $15$  ddi). Se evidenció para dichos momentos de crecimiento que el polímero causó los mayores porcentajes de incremento en altura respecto al control (Figura 4B), lo cual sugiere, que este compuesto adelanta el crecimiento de las plantas en dependencia del tiempo de contacto con las raíces. El estudio de este resultado puede profundizarse en el futuro.

Con anterioridad, varios trabajos han informado que la quitosana promueve el crecimiento vegetativo e induce la germinación y la floración de varias especies de plantas (Tsugita *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2002; Uddin *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2008; El Hadrami *et al.*, 2010). De acuerdo a los estudios realizados por estos autores, la respuesta en los diferentes indicadores depende de las concentraciones empleadas, el tipo de quitosacárido empleado (diferencias en sus propiedades físico-químicas) y la forma de aplicación de estos compuestos a la planta, que incluyen el tiempo de contacto con el compuesto y el órgano que percibe la aplicación (Ohta *et al.*, 2004; Kowalski *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008; El Hadrami *et al.*, 2010). Aparentemente, esto podría ocurrir por una acción antitranspirante (Bitelli *et al.*, 2001), elicitora (Mal-Tawaha *et al.*, 2005), mejoradora de la actividad fotosintética (Khan *et al.*, 2003) y/o por absorción de la quitosana a través de las raíces y su posterior uso por la planta (Otha *et al.*, 2004).

Haciendo una valoración de los indicadores del crecimiento evaluados en este trabajo, con la adición del polímero de quitosana y la mezcla de oligoquitosanas en el medio de cultivo vegetal, debe considerarse necesario determinar otros parámetros como la masa fresca y seca en plantas completas, ya que éstos podrían completar con mayor precisión el efecto de los quitosacáridos en el crecimiento de la soya.

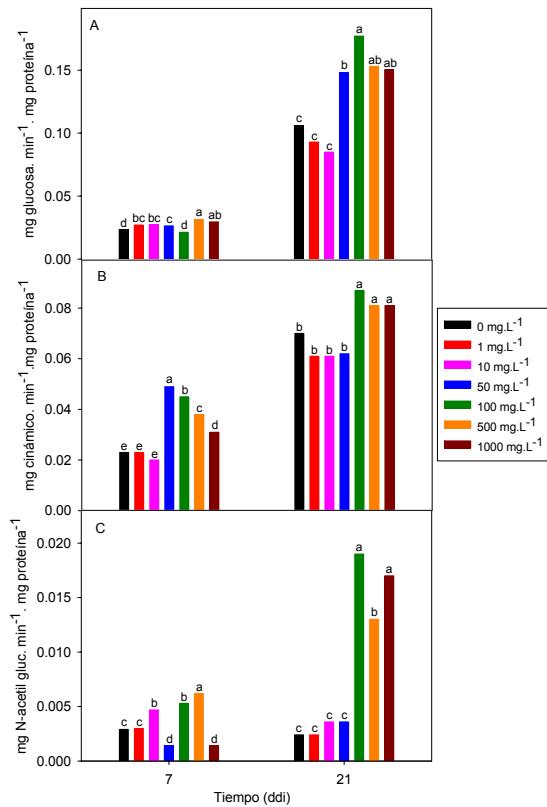
Los resultados obtenidos con ambos compuestos de quitosana en la nodulación y en los indicadores de crecimiento evaluados indican que la presencia de los quitosacáridos en el medio de cultivo de la soya, inciden en ambos procesos a concentraciones superiores a  $100\text{ mg.L}^{-1}$ . Está demostrado que la inducción de respuestas defensivas en plantas contra patógenos inhibe el proceso simbiótico en las leguminosas (Mithöfer, 2002). Por esta razón, se determinó la posible inducción de indicadores de resistencia basal en raíces de las plántulas de soya tratadas con el polímero de quitosana e inoculadas con *Bradyrhizobium*.

#### **Efecto del polímero de quitosana en la activación de indicadores defensivos en raíces de plántulas de soya inoculadas con *B. elkanii*.**

Las actividades enzimáticas  $\beta$  1-3 glucanasa, fenilalanina-amoniolasa (PAL) y quitinasa evaluadas en este trabajo, son consideradas indicadores de resistencia contra patógenos (van Loon *et al.*, 2006). Igualmente, estas enzimas han sido evaluadas con anterioridad por diversos autores en plantas tratadas con quitosacáridos (Ben-Shalom *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007; Falcón *et al.*, 2009).

Este trabajo estudia, la inducción de las respuestas defensivas antes mencionadas en raíces de plántulas de soya, que fueron cultivadas en medio de cultivo en presencia de quitosana. La enzima PAL fue inducida con las concentraciones mayores ( $100$ ,  $500$  y

$1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) del polímero de quitosana, hasta dos veces el valor del control (Figura 6B). Similares resultados fueron obtenidos recientemente por Falcón *et al.* (2009) en la inducción de actividad PAL en raíces de plantas de tabaco previamente tratadas con  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  de quitosana.



**Figura 6.** Efecto de la adición del polímero de quitosana al medio de cultivo vegetal en las actividades enzimáticas  $\beta$ -1-3 glucanasa (A), fenilalanina-amoniolasa (B) y quitinasa (C) en raíces a los 7 y 21 días después de inoculadas las plántulas (ddi) de soya. Letras iguales no difieren estadísticamente para  $p \leq 0.05$  según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD. 7ddi: A (ES  $\bar{x} = 0,0005^*$ ), B (ES  $\bar{x} = 0,0007^*$ ) y C (ES  $\bar{x} = 0,0002^*$ ). 21ddi: A (ES  $\bar{x} = 0,005^*$ ), B (ES  $\bar{x} = 0,003^*$ ) y C (ES  $\bar{x} = 0,0007^*$ ).

Entre las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), las enzimas quitininas y  $\beta$ -1-3 glucananas han sido las más estudiadas y referidas en respuesta a patógenos y elicidores bióticos (van Loon *et al.*, 2006). En esta tesis se demostró la elevación de los niveles de actividad de ambas enzimas en las raíces de soya, de hasta dos veces en el caso de la  $\beta$ -1-3 glucanasa y entre tres y cuatro veces en el caso de las quitininas, en plantas que crecieron en medio de cultivo con concentraciones desde 100 a  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  a los 21 ddi (Figura 6A y C). En otros trabajos con la aplicación de quitosana en hojas de uva y soya, se obtuvieron incrementos de actividad quitinasa de hasta 4 veces el valor del control en dependencia de la concentración de quitosana empleada (Aziz *et al.*, 2006; Prapagdee *et al.*, 2007). De forma similar, las mismas concentraciones que causaron los incrementos en relación al control en este estudio, fueron informadas con anterioridad como inductoras de actividad quitinasa en hojas de plantas de soya de 17 días, cuyas semillas fueron previamente tratadas por imbibición con quitosana (Falcón *et al.*, 2004). Los incrementos de actividad defensiva encontrados en este trabajo están en los niveles informados por otros autores para aplicaciones de plantas con quitosanas.

En el trabajo se escogieron dos momentos importantes del proceso simbiótico para la determinación de actividades defensivas: 7 ddi, cuando la planta está en plena formación de nódulos, luego de la colonización de los pelos radicales por la bacteria y su conversión a bacteroide y los 21 ddi, cuando los nódulos están formados y los bacteroides activos dentro de él ejerciendo una intensa actividad de fijación del nitrógeno.

Los valores absolutos de las actividades enzimáticas fueron mayores a los 21 ddi respecto a los 7 ddi (Figura 6). Es conocido que los niveles basales de actividad enzimática defensiva pueden variar con la edad fisiológica de la especie. Ha sido informado que varias enzimas, como las PR, están sujetas a incrementos en sus niveles de actividad con el desarrollo de las plantas (Cullimore *et al.*, 2001; van Loon *et al.*, 2006). Es posible también, que los mayores niveles enzimáticos a los 21 ddi se deban a una respuesta defensiva de la planta a elicidores específicos de la pared celular de aquellas bacterias inoculadas que no se establecieron como microsimbionte. Se ha demostrado que las leguminosas pueden autoregular la magnitud de la simbiosis mediante la inducción de respuestas defensivas que limiten la entrada del microsimbionte y causan, entonces, la formación de nódulos menos desarrollados o disfuncionales (Mithöfer, 2002).

En los dos momentos en que se evaluaron los indicadores defensivos con la adición del polímero, de forma general, las tres concentraciones mayores (100, 500 y 1000 mg.L<sup>-1</sup>) causaron incrementos significativos de los niveles enzimáticos con relación al control no tratado (Figura 6). Se conoce que la activación de respuestas defensivas como las determinadas en este trabajo, por estos y otros elicidores, preceden y participan en la resistencia inducida de la planta contra el ataque de patógenos (Ben-Shalom *et al.*, 2003; van Loon *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007; Falcón, 2009). En consecuencia, los incrementos enzimáticos encontrados demuestran una inducción defensiva activada por el polímero de quitosana en raíces de soya que podría contribuir a elevar un estado de resistencia en la planta contra posibles infecciones patogénicas.

Los tratamientos del polímero de quitosana que causaron incrementos de actividad defensiva por encima del control coinciden con los tratamientos que afectaron la formación y la masa seca de los nódulos en las plantas. Esta afectación podría ocurrir de dos formas. Por un lado, el aumento de la resistencia basal como resultado de la elicitation con el polímero puede causar tanto la reducción de entrada de patógenos como de microorganismos simbiontes a través del rechazo por las defensas del vegetal. Esto puede ocasionar tanto el ataque directo de las defensas del vegetal sobre la pared celular de la bacteria, como también impedir la ocurrencia de las señales específicas del microorganismo que llevan a la simbiosis. Por ejemplo, se ha informado que las quitinasas en varias especies de leguminosas son capaces de hidrolizar los factores de nodulación excretados por las bacterias, lo que reduciría el reconocimiento de estas señales por la planta (Staehlin *et al.*, 1994; Mithöfer, 2002).

En condiciones normales la planta realiza el reconocimiento del microorganismo simbionte a través de percibir componentes estructurales específicos de la bacteria (polisacáridos). Estos componentes constituyen señales de especificidad simbiótica para las células de los pelos radicales, lo cual hace que la planta module o suprima la respuesta defensiva para permitir la infección de la bacteria (Mithöfer, 2002; Fraysee *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2007). La inducción previa de respuestas defensivas en la planta puede afectar la supresión de su respuesta defensiva contra el simbionte.

Otra forma de explicar la afectación de la simbiosis por la quitosana puede ser a través del desvío de precursores y energía hacia la inducción de resistencia, lo que afectaría la distribución de recursos hacia el proceso simbiótico. Es conocido que muchos compuestos que actúan como elicidores pueden causar afectaciones de procesos normales de la planta como el crecimiento, desarrollo y los propios rendimientos (van Hulten *et al.*, 2006; Heil y Walters, 2009). Se han realizado experimentaciones para

cuantificar posibles pérdidas en rendimiento cuando se aplican quitosanas (Iriti *et al.*, 2010), sin embargo, estos autores no encontraron efectos perjudiciales en los rendimientos de frijol para las condiciones experimentales que utilizaron.

La adición de los quitosacáridos en el medio microbiano y vegetal, influyó tanto en la viabilidad de la cepa ICA 8001 de *B. elkanii* como en el proceso simbiótico *Bradyrhizobium*-soya y de crecimiento de las plántulas, en dependencia del tipo de compuesto empleado y sus concentraciones. Con ambos compuestos de quitosana, las concentraciones por encima de 100 mg.L<sup>-1</sup> incidieron en las variables de los tres procesos mencionados, sin embargo, el polímero causó afectaciones más severas en todos los casos por lo que las diferencias físico-químicas existentes entre ellos jugaron un papel importante en los efectos biológicos evaluados.

Los efectos encontrados con la adición de ambos quitosacáridos en esta interacción, podrían ser diferentes si se utilizan otras formas de aplicación de estos compuestos u otras condiciones de cultivo. En esta experimentación los quitosacáridos están incluidos en el medio de crecimiento de las plantas, lo que provoca una interacción permanente de las raíces de la planta con los compuestos y de estos, además, con el inóculo bacteriano, esto podría no ser siempre conveniente o beneficioso para ambos simbiontes. Resulta importante evaluar otras formas de aplicación de los quitosacáridos, menos permanentes como son la imbibición o recubrimiento del frijol de soya, la aspersión foliar o la aplicación al sustrato de las plantas para mejorar la respuesta encontrada en los indicadores evaluados de los procesos antes mencionados o reducir los efectos negativos con la presencia de las concentraciones mayores de los quitosacáridos.

Tomando en cuenta lo que se dijo anteriormente, es posible incrementar la efectividad de la nodulación y el desarrollo de la soya mediante la aplicación de estos quitosacáridos, asumiendo que son compuestos activos, con potencialidades biológicas, y que se obtienen a partir de desechos de la industria pesquera con un bajo costo. Utilizando concentraciones adecuadas de estos compuestos, pudieran evaluarse incorporados a los biofertilizantes ó aplicarse combinado con el inóculo en el momento de la siembra del cultivo.

Es necesario además, realizar ensayos en condiciones *in vivo* con la aplicación de estos compuestos de quitosana para estudiar el comportamiento productivo de variedades de soya, en localidades que difieren en las características físico-químicas de los suelos y en su adaptabilidad a diferentes estreses bióticos y abióticos. La extensión y profundización del estudio de la soya con el uso de los quitosacáridos de diferentes características físico-químicas, en combinación con la biofertilización, repercutirá favorablemente en la elección del compuesto, sus modos y dosis de aplicación en el crecimiento, la fijación del nitrógeno y los rendimientos del cultivo.

## Referencias bibliográficas

- Cabrera, J.C., van Cutsem, P. Preparation of chitooligo-saccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochem. Eng. J.*, 25: 165–172, 2005.
- Gage, D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 68: 280-300, 2004.
- Raafat, D.; von Bargen, K.; Haas, A.; Sahl, H-G. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Appl. Env. Microbiol.*, vol. 74: 3764–3773, 2008.