

ESTIMULACIÓN DE ALGUNAS ENZIMAS EN PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa*, L.) TRATADAS CON UN HIDROLIZADO DE QUITOSANA

Aida T. Rodríguez✉, M. A. Ramírez, A. Falcón, E. Utria y Silvia Bautista

ABSTRACT. The stimulation of defense mechanisms in plants through using of bioactive products is one of the most ecological and dynamic ways to defend them from pathogen attack. Among elicitors promoting this induction is hydrolysis of chitosan, which was obtained in the Department of Crop Physiology and Biochemistry from the National Institute of Agricultural Sciences (INCA). This work determined the effect of a hydrolysis of chitosan applied to seed on the stimulation of some enzymes related with pathogenesis, such as PAL, glucanase, chitinase and chitosanase in rice plants (var. J-104). It was observed that with the application of this compound, there was an induction of the activity of different enzymes. The highest values of the activity of enzymes PAL and β -1,3 glucanases were observed at the concentration of 500 mg.L⁻¹ whereas in chitinase and chitosanase at the concentration of 100 mg.L⁻¹. It was demonstrated that at lower concentrations than 1 000 mg.L⁻¹ a higher stimulation of the activity of evaluated enzymes is obtained.

Key words: rice, enzymatic hydrolysis, Beta glucanase, Phenylalanine ammonia lyase, chitinase

RESUMEN. La estimulación de mecanismos de defensa en plantas, mediante la utilización de productos bioactivos, es una de las vías más ecológicas y dinámicas que les permiten defenderse del ataque de patógenos. Entre los elicitores capaces de provocar esta inducción se encuentra el hidrolizado de quitosana, el cual se obtuvo en el Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). En este trabajo se determinó el efecto de un hidrolizado de quitosana aplicado a la semilla, en la estimulación de algunas enzimas relacionadas con la patogénesis, tales como PAL, glucanasa, quitinasa y quitosanasa en plantas de arroz (var. J-104). Se observó que con la aplicación de este compuesto hubo una inducción de la actividad de las diferentes enzimas. Los valores mayores de actividad de las enzimas PAL y β -1,3 glucanasa se registraron a la concentración de 500 mg.L⁻¹ y en las enzimas quitinasa y quitosanasa a la concentración de 100 mg.L⁻¹. Se demostró que con concentraciones menores de 1 000 mg.L⁻¹, se logra mayor estimulación de la actividad de las enzimas evaluadas.

Palabras clave: arroz, hidrólisis enzimática, Beta glucanasa, amonio fenilalanina liasa, quitinasa

INTRODUCCIÓN

Las plantas al ser atacadas por microorganismos son capaces de activar los mecanismos defensivos; dentro de estos mecanismos se incluye el incremento en la activación de enzimas, tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual es clave en la síntesis de metabolitos defensivos importantes, donde se destacan las fitoalexinas, que constituyen compuestos altamente tóxicos al patógeno. También se inducen otras enzimas defensivas, entre las que se encuentran: β -1,3 glucanasas, quitinasas, quitosanasas, entre otras (1).

Ms.C. Aida T. Rodríguez, Investigadora y Ms.C. M. A. Ramírez, Investigador Agregado de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios"; Ms.C. A. Falcón, Investigador Agregado del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, Gaveta Postal 1, La Habana, CP 32 700; E. Utria, Profesor Asistente, Centro Universitario de Guantánamo (CUG), carretera a Santiago de Cuba km 2½, Guantánamo; Silvia Bautista, Profesor Titular del Instituto Politécnico Nacional del Centro de Productos Bióticos en México, carretera Yautepec-Jojutta, km 8½, San Isidro, Yautepec, Morelos, México.

✉ atania@inca.edu.cu

Sin embargo, existen compuestos capaces de estimular estos mecanismos defensivos en las plantas, los cuales pueden ser aplicados de forma preventiva o curativa, llamados elicitores (2). Entre los elicitores se encuentran la quitina, la quitosana, sus derivados y otros. En cuanto a la quitosana y sus hidrolizados, se ha prestado especial interés por su doble efecto (3, 4, 5, 6): inhibir el crecimiento micelial de algunos hongos fitopatógenos y activar mecanismos defensivos en las plantas (7), lo cual brinda la posibilidad de utilizar estos principios activos en el control de enfermedades en cultivos de interés económico (2).

En el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum*) se aplicó un hidrolizado de quitosana a la raíz y después se inoculó con *Phytophthora parasitica*. Posteriormente se observó una estimulación en las enzimas PAL, β -1,3 glucanasa y quitinasa y una disminución de los síntomas de la enfermedad (3).

En cuanto al cultivo del arroz (*Oryza sativa*, L.), en Cuba constituye el 60 % de la dieta de la población; sin embargo, la demanda interna solo se satisface aproximadamente en un 33 %. Una de las causas de los bajos

rendimientos de este cultivo son los daños causados por enfermedades y, en especial, las de origen fungoso, siendo en el estado de plántulas, entre los 25 y 35 días después de germinada la semilla, donde muestran la mayor susceptibilidad a la piriculariosis, enfermedad producida por el hongo *Pyricularia grisea*, Sacc. Este patógeno puede provocar pérdidas que oscilan entre un 10-80 %, dependiendo de las condiciones para que se desarrolle la infección (8, 9).

Una de las vías de transmisión de este patógeno es por semillas, siendo este tratamiento con fungicidas químicos uno de los métodos más usados para el control de la piriculariosis; pero estos son muy costosos y tóxicos al ambiente.

Toda esta situación conduce a la necesidad de utilizar nuevos métodos mucho más económicos y ecológicos, que permitan estimular los mecanismos defensivos en las plantas y que junto a los tradicionales logren un manejo integrado de las enfermedades fungosas.

La quitosana, copolímero lineal formado por unidades de glucosamina, es uno de los elicitores que han demostrado su efecto inductor sobre algunas enzimas relacionadas con la defensa en plantas de arroz, mediante el tratamiento de la semilla, donde se observó que a una concentración de 1 000 mg.L⁻¹, se logra una mayor estimulación en la actividad de todas las enzimas evaluadas (7). Sin embargo, no se conoce si con un hidrolizado de quitosana se lograría un efecto similar con las mismas concentraciones y variedad de arroz.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del trabajo fue determinar la actividad de algunos indicadores de resistencia sistémica inducida: fenilalanina amonio liasa (PAL), β -1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanasa, estimulada por un hidrolizado de quitosana que contiene oligómeros entre 2-7 unidades de glucosamina, en la variedad de arroz J-104.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elicitor utilizado. El hidrolizado de quitosana (HQ) con un grado de polimerización entre 2-7 se obtuvo por una hidrólisis enzimática de la quitosana con Celuclast, un complejo enzimático de *Novozymes* rico en actividad celulolítica (3).

Estimulación de los mecanismos de defensa por el hidrolizado de quitosana. Las semillas de arroz variedad J-104, después de desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3 % durante tres minutos y lavadas con agua destilada estéril, fueron tratadas con disoluciones del hidrolizado de quitosana a las concentraciones de 100, 500 y 1 000 mg.L⁻¹ mediante imbibición por 15 minutos. Posteriormente, fueron secadas a temperatura ambiente y más tarde sembradas en bandejas plásticas con suelo Gley Nodular Ferralítico concrecionario (10), esterilizado previamente durante una hora en autoclave a 121°C, por tres días consecutivos. Se incubaron las bandejas en cuarto de crecimiento con alternancia de luz (16 horas) y oscuridad

(8 horas) a una temperatura de 22-24°C. A los 18, 25, 32 y 39 días de germinadas (ddg) las semillas, se determinaron las diferentes actividades enzimáticas: fenilalanina amonio liasa (PAL), β -1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanasa, y se compararon con un control (tratado con agua).

Extracción de enzimas. El material vegetal utilizado para la extracción fue hojas de arroz, de las cuales se tomaron 2 g y maceraron en mortero con nitrógeno líquido. Se procedió a la extracción con una solución tampón de acetato de sodio 0.1 mol.L⁻¹ a pH 5.2 para la determinación de las actividades: β -1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanasa, y para determinar la actividad PAL se utilizó como solución tampón tetraborato de sodio 0.1 mol.L⁻¹ y ácido bórico 0.1 mol.L⁻¹ a pH 8.8. Para ambas extracciones se usó 1 g de tejido por cada 2 mL de solución tampón.

Determinación de las actividades enzimáticas

Determinación de la actividad PAL. Se tomó 0.9 mL de L-fenilalanina 1 mg.mL⁻¹ (Merck calidad bioquímica), se le adicionó 0.1 mL de extracto enzimático y se incubó a 40°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 0.25 mL de ácido clorhídrico 5 N, se colocaron las muestras en baño helado y se le adicionó 5 mL de agua destilada. Los valores de absorbancia se determinaron a 290 nm. Se definió como una unidad de actividad enzimática equivalente a la producción de 1 mmol de ácido transcinámico producido por minuto por mg de proteínas (11).

Determinación de la actividad β -1,3 glucanasa. A 0.2 mL de sustrato laminarina 1 mg.mL⁻¹ (Sigma para análisis) (11), se le adicionó 0.1 mL de tampón acetato de sodio 0.1 mol.L⁻¹ a pH 5.2 y 0.1 mL de extracto enzimático; las muestras se incubaron a 40°C durante 30 minutos. Se determinó la actividad enzimática por medición del nivel de producción de azúcares reductores por el método de Schales modificado (1) y se expresó en términos de actividad específica como μ mol de glucosa producido.minuto⁻¹.mg⁻¹ de proteínas.

Determinación de la actividad quitinasa. Para este ensayo se procedió adicionando 2 mL del tampón ácido cítrico 0.1 mol.L⁻¹ e hidrógeno fosfato de sodio 0.1 mol.L⁻¹ pH 5.2 a 1 mL de extracto enzimático y a 1 mL de quitina coloidal 0.5 % (Sigma con fines analíticos). Se incubaron las muestras a 37°C durante 20 minutos con agitación continua. La reacción se detuvo al calentarla a ebullición por cinco minutos. Se determinó el incremento de azúcares reductores según el método de Schales (1) y se leyó la absorbancia a 420 nm. La actividad enzimática se expresó como μ moles de azúcares reductores por minuto por mg de proteínas.

Determinación de la actividad quitosanasa. A 0.5 mL de quitosana al 0.5 % en buffer de acetato de sodio 0.1 M a pH 5.2, se le añadió 0.5 mL de muestra. La mezcla se incubó a 37°C durante 24 horas; posteriormente, para detener la reacción se colocaron las muestras en baño María a 100°C durante cuatro minutos. Se determinó el incremento de azúcares reductores (1) y se leyó la absorbancia a 420 nm. La actividad enzimática se expresó como μ moles de azúcares reductores por minuto por mg de proteínas.

En todos los casos se registraron las actividades específicas de las enzimas; para ello se determinó la concentración de proteínas presente en los extractos (12). *Análisis estadístico.* Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. Las medias se compararon con el empleo de la prueba de rangos múltiples de Duncan para un 5 % de significación, así como se determinaron los errores estándar para cada momento evaluativo. El experimento se repitió tres veces con resultados coincidentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la actividad de la enzima PAL, en plántulas de arroz provenientes de semillas tratadas con hidrolizado de quitosana, se muestran en la Figura 1. Esta es una de las enzimas que se activa en el metabolismo secundario y a partir de ella se desencadena rápidamente una serie de mecanismos, como la vía de los fenilpropanoides que da lugar a la síntesis de fitoalexinas, ligninas, ácido benzoico, ácido salicílico, este último considerado como una importante señal en la amplificación de las respuestas defensivas sistémicas (13, 14).

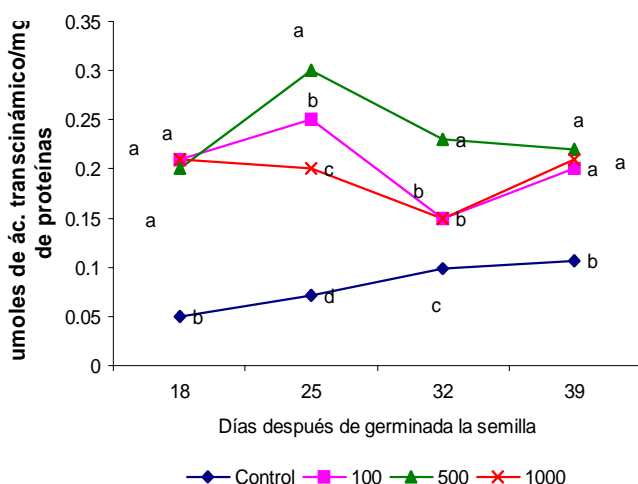


Figura 1. Dinámica de la actividad de la enzima PAL en plántulas de arroz provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de hidrolizado de quitosana

Como se puede observar, los mayores niveles de actividad PAL se encontraron en las plantas tratadas con el hidrolizado de quitosana, mostrando diferencias significativas respecto al tratamiento control. Este comportamiento se mantuvo desde la primera evaluación, realizada a los 18 días después de germinada la semilla de arroz y hasta los 39 días, tiempo en que se realiza la última evaluación. Se debe destacar que 500 mg.L⁻¹ fue la dosis que logró la mayor estimulación en todas las evaluaciones.

En cuanto a las evaluaciones efectuadas a los 18 y 39 ddd, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con las diferentes dosis del elicitador. Sin embargo, a los 25 ddd, las plantas tratadas con 500 mg.L⁻¹

de hidrolizado exhibieron los mayores valores de actividad PAL, significativamente superiores a las tratadas con 100 mg.L⁻¹ y 1 000 mg.L⁻¹.

Otros también plantean (3) que este compuesto tiene la capacidad de estimular la actividad de la enzima PAL a la concentración de 500 mg.L⁻¹.

Los resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que los hidrolizados están compuestos por moléculas de menor tamaño, que son fácilmente absorbidos por las semillas e interactúan mejor con los receptores en la membrana plasmática. Este hecho pudiera justificar que inicialmente todas las concentraciones del hidrolizado estimularon de igual forma la actividad PAL. Sin embargo, al transcurrir el tiempo cambió esta situación, pues la concentración de 500 mg.L⁻¹ al parecer resultó más adecuada en la estimulación enzimática, con lo cual se pudiera especular que una concentración más baja como 100 mg.L⁻¹ no contiene una cantidad suficiente de principio activo.

La enzima β 1,3 glucanasa fue también evaluada y los resultados se muestran en la Figura 2.

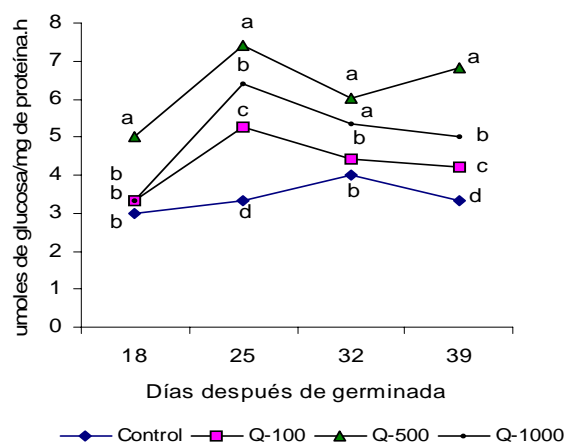


Figura 2. Dinámica de actividad de la enzima β 1,3 glucanasa en plántulas de arroz provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de quitosana

Se puede apreciar en la Figura 2, que las diferentes dosis del elicitador provocaron una estimulación de la actividad de la enzima β-1,3 glucanasa en las evaluaciones realizadas, siendo la dosis de 500 mg.L⁻¹ la que logró la mayor activación de la enzima, mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos y en todas las evaluaciones, alcanzando la mayor estimulación a los 25 ddd. Debe destacarse que todas las plantas, a las cuales se les aplicó el elicitador, tuvieron sus mayores valores de actividad a los 25 ddd.

Por otra parte, se ha observado que la glucanasa es capaz de lograr una elevada actividad con el mismo elicitador, pero en otro cultivo, corroborándose así su efecto inductor (3).

Con respecto a esta enzima, se ha publicado también que se expresa en forma constitutiva a niveles relativamente bajos en semillas germinadas, hojas, panículas y tallos de arroz (15). Los resultados de la actividad quitinasa se muestran en la Figura 3.

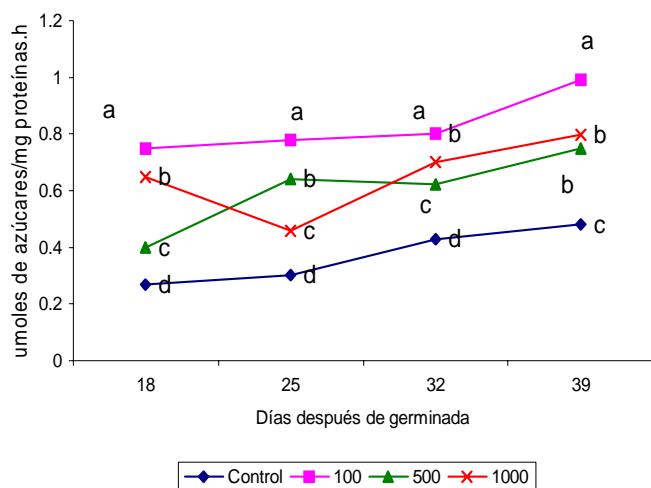


Figura 3. Dinámica de la actividad quitinasa en plántulas de arroz obtenidas de semillas tratadas con un hidrolizado de quitosana

Las plantas tratadas con las diferentes dosis del elicitor mostraron una mayor actividad quitinasa que las correspondientes a las plantas controles, durante todo el período evaluado. La dosis de 100 mg.L⁻¹ fue la que provocó una mayor estimulación en todas las evaluaciones realizadas. Se debe plantear, además, que a los 39 ddg en todos los casos se lograron los mayores valores de la actividad enzimática.

El hidrolizado de quitosana empleado está compuesto por algunos oligosacáridos con grado de polimerización entre 2 y 7 unidades, lo que le permite con una menor concentración una estimulación significativa de la actividad de la enzima. Este hecho permite mantener como criterio que el tamaño molecular es una característica importante para la interacción de estos compuestos con la planta. En este sentido, se ha demostrado (16) que existen receptores de membranas específicos para los oligosacáridos quitinosos en plantas de arroz.

También se trataron semillas de arroz (17) con quitosana e hidrolizados de quitosana durante pocos segundos y se observó que había inducción de la actividad quitinasa a los ocho días después germinada la semilla, lo cual reafirma los resultados obtenidos.

En la Figura 4 se muestran los resultados de la actividad quitosanasa en plántulas de arroz, obtenidas de semillas tratadas con hidrolizado de quitosana.

Como se puede apreciar, las plantas provenientes de semillas tratadas con hidrolizado de quitosana, lograron con la dosis de 100 mg.L⁻¹ la mayor estimulación enzimática, aunque en las dos últimas evaluaciones no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de 100 y 500 mg.L⁻¹. Este resultado sugiere que una concentración de hidrolizado por encima de 500 mg.L⁻¹ no es adecuada para la estimulación de la quitosanasa. Se debe señalar que el mayor valor de actividad enzimática se logra a los 25 ddg. Con otro inductor como la quitosana en el mismo cultivo y variedad, se observó que la concentración de 1 000 mg.L⁻¹ es la que logra la mayor estimulación de esta enzima a los 39 ddg (7).

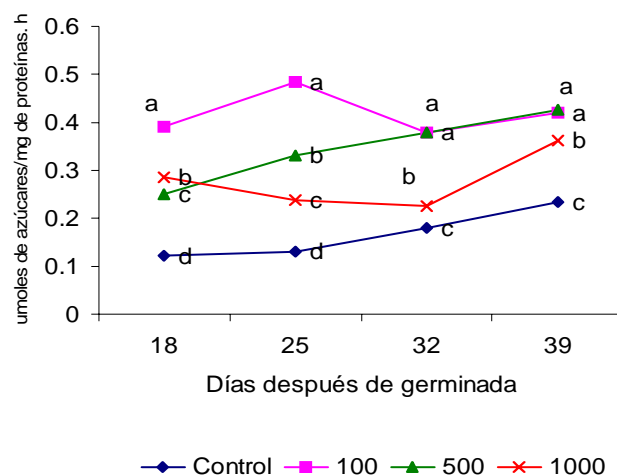


Figura 4. Dinámica de la actividad quitosanasa en plántulas de arroz obtenidas de semillas tratadas con hidrolizado de quitosana

En resumen, se ratifica la actividad estimuladora de estos compuestos sobre la enzima quitosanasa, lo cual está relacionada con la resistencia a los patógenos (18).

De forma general, se puede plantear que las plantas obtenidas de semillas tratadas con hidrolizado de quitosana a la dosis de 500 mg.L⁻¹ tuvieron la mayor estimulación de las enzimas PAL y β -1.3 glucanasa y a la dosis de 100 mg.L⁻¹ las enzimas quitinasa y quitosanasa. Sin embargo, en otro trabajo donde se utilizó la quitosana, con las mismas concentraciones y variedad de arroz, fue la concentración de 1 000 mg.L⁻¹ la que logró la mayor estimulación en las mismas enzimas (PAL, glucanasa, quitinasa y quitosanasa) y evaluaciones realizadas (7).

El hidrolizado de quitosana, al estar formado por moléculas de menor tamaño (entre 2 y 7), hace que estos sean más fácilmente absorbidos por las semillas, lo cual le permitiría un mejor acceso de los fragmentos elicitors a sus receptores en la membrana plasmática y lograr así con una menor concentración, una mayor estimulación de las enzimas evaluadas. Esta estimulación pudiera contribuir a la protección de la planta del ataque de patógenos.

REFERENCIAS

- Inui, H.; Yamaguchi, Y.; Yasuhiro, Y. y Hirano, S. Elicitor actions of N-acetylchitoooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1997, vol. 61, no. 6, p. 975-978.
- Sathiyabama, M. y Balasubramanian, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Protection*, 1998, vol. 17, no. 4, p. 307-313.
- Falcón, A.; Ramírez, M. A.; Márquez, R. y Hernández, M. Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 61-66.

4. Badawy, M.; Rabea, E.; Rogge, T.; Stevens, C.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. y Hofte, M. Synthesis and fungicidal activity of new N,O-acyl chitosan derivatives. *Biomacromolecules*, 2003.
5. Rodríguez, A. T.; Ramírez, M. A.; Nápoles, M. C. y Cárdenas, R. Antifungal activity of chitosan and of its hydrolisates on *Pyricularia grisea*, Sacc fungus. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 2, p. 85-88.
6. Parra, Y. y Ramírez, M. A. Efecto de la quitina y sus derivados en el crecimiento *in vitro* del hongo *Rhizoctonia solani*. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 2, p. 73-75.
7. Rodríguez, A. T.; Ramírez, M. A.; Falcón, A.; Guridi, F. y Cristo, E. Estimulación de algunas enzimas relacionadas con la defensa en arroz (*Oryza sativa*, L.) obtenidas de semillas tratadas con quitosana. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 3, p. 111-115.
8. Prado, G. A. /et al./ Hipótesis de exclusión de linajes. Una alternativa para el desarrollo de cultivares de arroz con resistencia durable a *Pyricularia grisea* (Sacc.) en Colombia. En: Encuentro Internacional del Arroz (1:1998 jun. 9-10:La Habana), 1998.
9. Cárdenas, R.; Cristo, E. y Pérez, N. Variedades cubanas de arroz promisorias para la provincia de Pinar del Río tolerantes al tizón de la hoja (*Pyricularia grisea* Sacc.) *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 53-56.
10. Cuba. MINAGRI. Instituto de Suelos. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba, La Habana. AGROINFOR, 1999, 64 p.
11. Paz-Lago, D.; Gutiérrez, A. y Luzardo, L. Relevancia biológica de la enzima β 1,3 glucanasa en la activación de la resistencia sistémica del tabaco inducida por la pared celular fúngica. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 3, p. 25-27.
12. Sun, S. MicroLowry method. En: *Methods in Plant Molecular Biology and Agricultural Biotechnology*. Asian Vegetable Research and Development Center. Council of Agricultural, 1994, p. 9-11.
13. Hammerschmidt, R. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopatol.*, 1999, vol. 37, p. 285-306.
14. Gozzo, F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, p. 4487-4503.
15. Leubner-Metzger, G. Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*, 2003, vol. 13, p. 17-35.
16. Shibuya, N.; Ebis, N.; Yamada, Y.; Kaku, H. e Ito, Y. Localization and binding characteristic of a high-affinity binding site for N-acetylchito-oligosaccharide elicitor in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. *Plant Cell Physiol.*, 1996, vol. 37, p. 894-898.
17. Hirano, S.; Hayashi, M.; Nishida, T. y Yamamoto, T. Chitinase activity of some seeds during their germination process, and its induction by treating with chitosan and derivates. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol. 57, no. 3, p. 2098-2100.
18. Shimono, K.; Shigeru, K.; Tsuchiya, A.; Ito, N.; Ohta, Y.; Tanaka, K.; Nakagawa, T.; Matsuda, H. y Kawamukai, M. Two glutamic acids in chitosanase A from *Matsuebacter chitosanotadidus* 3001 are the catalytically important residues. *J. Biochem.*, 2002, vol. 131, p. 87-96.

Recibido: 19 de julio de 2005

Aceptado: 30 de marzo de 2006

Cursos de Verano

Precio: 320 CUC

*Uso de técnicas biotecnológicas y nucleares
en el mejoramiento genético
para la tolerancia al estrés abiótico*

Coordinador: Dra.C. María C. González Cepero

Fecha: julio

Duración: 40 horas

SOLICITAR INFORMACIÓN

**Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (47) 86-3773
Fax: (53) (47) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu**