

# ESTIMULACIÓN DE ALGUNAS ENZIMAS RELACIONADAS CON LA DEFENSA EN PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa*, L.) OBTENIDAS DE SEMILLAS TRATADAS CON QUITOSANA

Aida T. Rodríguez<sup>✉</sup>, M. A. Rodríguez, A. Falcón, F. Guridi y Elizabeth Cristo

**ABSTRACT.** The application of elicitors is one of the most ecological and economic methods for pest and disease control. The chitosan is an elicitor that stimulates defensive mechanisms in plants, which confer disease resistance. This work presents the first results obtained in Cuba by using chitinous elicitors in rice Crop, particularly the chitosan obtained in the Department of the crop Physiology and Biochemistry from the National Institute of Agricultural Sciences (INCA). During the investigation, the effect of this compound applied to seed was *in vivo* determined, to stimulate some defensive enzymes, such as PAL, glucanase, chitinase and chitosanase in rice plants (cv. J-104). The highest increment of enzymatic activity was recorded in treated plants compared to the control. The best dose used was 1000 mg.L<sup>-1</sup>.

**RESUMEN.** La aplicación de elicitores es uno de los métodos más ecológicos y económicos para el control de plagas y enfermedades. La quitosana es un elicitor que tiene la capacidad de estimular mecanismos defensivos en las plantas, las cuales van a conferir resistencia a enfermedades. En el trabajo se presentan los primeros resultados logrados en Cuba en el empleo de elicitores quitinosos en el cultivo del arroz, en particular de la quitosana obtenida en el Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Durante la investigación se determinó *in vivo* el efecto de este compuesto aplicado a la semilla, en la estimulación de algunas enzimas defensivas como la PAL, glucanasa, quitinasa y quitosanasa en plantas de arroz (variedad J-104). Se observó el mayor incremento de la actividad de estas enzimas en las plantas tratadas con respecto al control. La mejor dosis utilizada fue 1000 mg.L<sup>-1</sup>.

**Key words:** chitosan, seed, glucans, *Oryza sativa*, defense mechanisms

**Palabras clave:** quitosana, semilla, glucanos, *Oryza sativa*, mecanismos de defensa

## INTRODUCCIÓN

Los elicitores son moléculas de origen biótico, capaces de estimular mecanismos defensivos en las plantas, que pueden ser aplicados de forma preventiva o directa a las plantas (1).

Estas sustancias desencadenan en las plantas una serie de mecanismos defensivos, que provocan una resistencia sistémica ante el ataque de los patógenos. Dentro de estos mecanismos se incluyen 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. También se inducen otras enzimas defensivas entre las que se encuentran:  $\beta$ -1,3 glucanasas, quitinasas, quitosanases, entre otras (2).

Entre los elicitores se encuentran los oligómeros de glucano, ácido galacturónico y quitosana (3). En cuanto a la quitosana se le ha prestado especial interés en los últimos años por su doble efecto: inhibir el crecimiento micelial de algunos hongos fitopatógenos y activar mecanismos defensivos en las plantas, lo cual brinda la posibilidad de utilizar estos principios activos en el control de enfermedades en cultivos de interés económico (1).

Este elicitor y sus derivados han demostrado que con la aplicación preventiva de estos a las plantas, se logra además de la estimulación en algunas de las enzimas defensivas, una disminución de los síntomas de la enfermedad (4, 5).

En este sentido, se ha demostrado que la quitosana aplicada a plántulas de tabaco y posteriormente infectadas con *Phytophthora parasitica* se logra una inducción de la actividad de las enzimas PAL y glucanasa, además de observarse protección (4). También en hojas de maní se aplicó quitosana, se infectó con *Puccinia arachidis*, observándose una estimulación en la actividad quitinasa y glucanasa y una disminución de las lesiones (1).

En cuanto al cultivo del arroz (*Oryza sativa*, L.) se puede plantear, que es el alimento básico de más del 65 % de la población mundial. En Cuba constituye el 60 %

Ms.C. Aida T. Rodríguez, Investigador; Ms.C. M. A. Ramírez y Elizabeth Cristo, Investigadores Agregados de la Estación Experimental de Arroz "Los Palacios"; Ms.C. A. B. Falcón, Investigador Agregado del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP. 32 700; Dr.C. F. Guridi, Profesor Auxiliar del Departamento de Química, Universidad Agraria de La Habana.

✉ atania@inca.edu.cu

de la dieta de los cubanos y la demanda interna sólo se satisface aproximadamente el 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 (6), siendo en el estado de plántulas, entre los 25 y 35 días después de germinada la semilla, donde la planta muestra la mayor susceptibilidad. Las pérdidas oscilan entre un 10-30 %, pero su capacidad destructiva en condiciones favorables llega a ser hasta un 80 % (6, 7).

Resulta importante destacar, que una de las vías de transmisión de este patógeno es por semillas contaminadas, siendo el tratamiento a la semilla con fungicidas químicos uno de los métodos más usado para el control de la piriculariosis, pero los mismos son muy costosos y tóxicos al ambiente.

Toda esta situación conduce a la necesidad de utilizar nuevos métodos, muchos más económicos y ecológicos, que se unan a los tradicionales para el control integrado de las enfermedades fungosas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo del trabajo es determinar la dinámica de algunos indicadores de resistencia sistémica inducida: fenilalanina amonio liasa,  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanasa estimulada por la quitosana en una variedad de arroz (J-104).

## MATERIALES Y METODOS

*Elicitor utilizado.* La quitosana con grado de acetilación 36.5 % (Q-63), obtenida en el Laboratorio de Oligosacarinas del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), por desacetilación alcalina de quitina de langosta, calidad farmacéutica (8).

*Estimulación de los mecanismos de defensa por la 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 de quitosana a las concentraciones 100, 500 y 1000 mg.L<sup>-1</sup> mediante imbibición durante 15 minutos. Posteriormente, fueron secadas a temperatura ambiente y más tarde sembradas en bandejas plásticas con suelo Gley Nodular Ferralítico concrecionario (9), 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 y a los 18, 25, 32 y 39 días de germinadas las semillas se determinaron las diferentes actividades enzimáticas: fenilalanina amonio liasa (PAL),  $\beta$  1,3 glucanasa, quitinasa, quitosanasa, que 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<sup>-1</sup> a pH 5,2 para la determina-

ción de las actividades:  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanasa y para determinar la actividad PAL se utilizó como solución tampón tetraborato de sodio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> y ácido bórico 0.1 mol.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> (Merck calidad bioquímica) se le adicionó 0,1 mL de extracto enzimático, 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 (10).

*Determinación de la actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa.* A 0.2 mL de sustrato laminarina 1 mg.mL<sup>-1</sup> (Sigma para análisis) (11) se le adicionó 0,1 mL de tampón acetato de sodio 0.1 mol.L<sup>-1</sup> 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 (12) y se expresó en términos de actividad específica como  $\mu$ mol de glucosa producido minutos<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteínas.

*Determinación de la actividad quitinasa.* Para este ensayo se procedió adicionando 2 mL de tampón de ácido cítrico 0,1 mol. L<sup>-1</sup> e hidrógeno fosfato de sodio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 5,2 a 1 mL de extracto enzimático y a un 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 5 minutos. Se determinó el incremento de azúcares reductores (2) se leyó la absorbancia a 420 nm. La actividad enzimática se expresó como  $\mu$ moles de azúcares reductores por minuto por mg de proteínas.

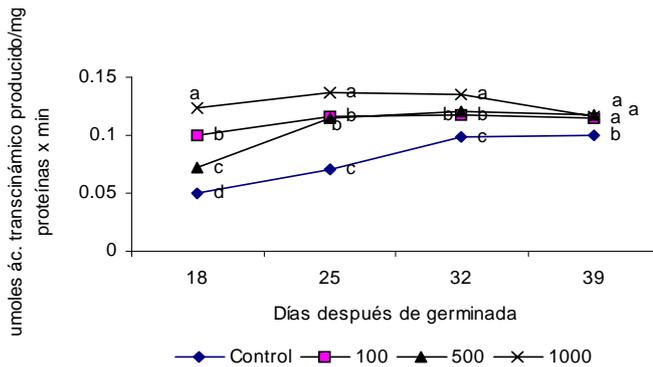
*Determinación de la actividad quitosanasa.* A 0.5 mL de quitosana al 0.5 % en buffer de acetato de sodio 0,1 M a pH 5.2, se le añadió 0.5 mL de muestra. La mezcla se incubó a 37°C durante 24 horas, posteriormente para detener la reacción se colocaron las muestras en baño María a 100°C durante cuatro minutos (2). Se leyó la absorbancia a 420 nm. La actividad enzimática se expresó como  $\mu$ 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 (13).

*Análisis estadístico.* Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y con tres repeticiones por tratamientos. 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 dos veces con resultados coincidentes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La enzima PAL es una de las primeras 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, siendo este último considerado una importante señal en la amplificación de las respuestas defensivas sistémicas (14, 15). Los resultados de la actividad de la enzima PAL en plántulas de arroz provenientes de semillas tratadas con quitosana se muestran en la Figura 1.



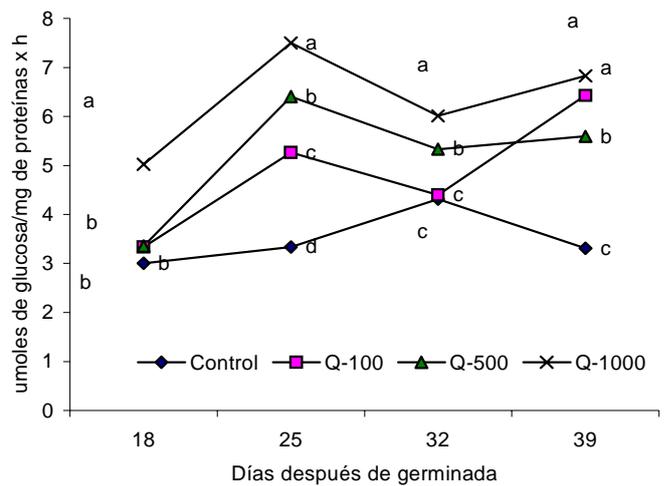
**Figura 1. Actividad de la enzima PAL en plántulas de arroz provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de quitosana**

Como se puede observar, se apreciaron mayores niveles de actividad PAL en las plantas suplementadas con las diferentes dosis de elicitores que en el control, con diferencia significativa entre los tratamientos aplicados. 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 los mayores valores de actividad PAL se alcanzaron aproximadamente entre 0,12 y 0,14  $\mu\text{moles de ácido transcinámico producido.mg}^{-1}$  de proteínas. $\text{minuto}^{-1}$  con la dosis de 1000  $\text{mg.L}^{-1}$  para todas las evaluaciones, mientras que a las concentraciones de 100 y 500  $\text{mg.L}^{-1}$  fueron significativamente inferiores, aunque mejores que el tratamiento control. Los resultados sugieren que la tendencia al mayor incremento de la actividad PAL ocurre entre los 25 y 32 días, después de germinada la semilla.

El hecho de que a la mayor concentración de quitosana se encontró la mayor actividad PAL pudiera explicarse teniendo en cuenta que a 1000  $\text{mg.L}^{-1}$  la solución es más viscosa, por lo que debe adherirse mejor a la semilla y su liberación debe ser más lenta que el resto de las concentraciones cuya viscosidad es menor. Esto trae como consecuencia que las sustancias activas se mantengan más tiempo en contacto con las semillas y plántulas de arroz (16).

En cuanto a los resultados de la actividad de la enzima  $\beta$ -1,3 glucanasa se muestran en la Figura 2.



**Figura 2. Actividad de la enzima  $\beta$  1,3 glucanasa en plántulas de arroz provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de quitosana**

Como se puede apreciar la estimulación provocada por los elicitores en la actividad de la enzima  $\beta$ -1,3 glucanasa fue significativamente superior que la encontrada en los tratamientos controles para la mayor parte de las evaluaciones realizadas.

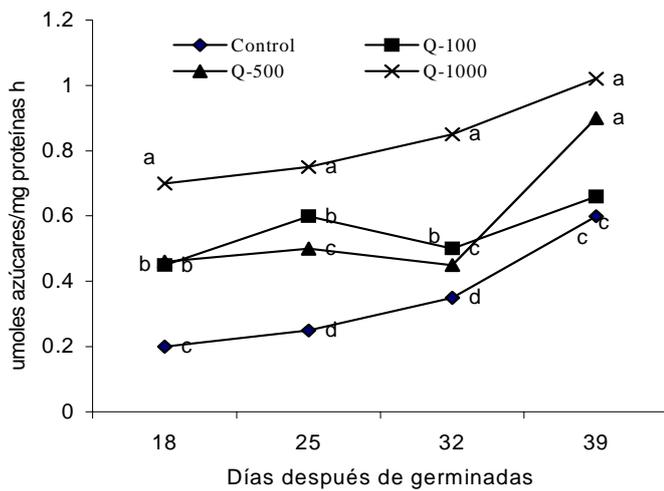
La dosis 1000  $\text{mg.L}^{-1}$  y en menor medida la de 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de quitosana fueron las que provocaron la mayor estimulación enzimática, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Se debe destacar que a los 25 días después de germinada la semilla se alcanzó la mayor estimulación de la actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa para la concentración 1000  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Algunos autores (1), en trabajos relacionados con la actividad de esta enzima ante la aplicación de quitosana, han observado un incremento de la actividad de la misma en el tiempo. Por ejemplo, en hojas de maní encontraron un incremento de la actividad enzimática a partir del segundo día después de la aplicación del elicitador y el máximo de inducción se mostró a los 10 días después del tratamiento. Sin embargo, en otras investigaciones realizadas (4) se observó que a las 24 horas después del tratamiento a plántulas de tabaco a través de la raíz, provocó un aumento de la actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa cuatro veces mayor respecto al control.

En la Figura 3 se pueden apreciar los resultados de actividad quitinasa, otra de las enzimas analizadas, en las plántulas de arroz obtenidas de semillas tratadas con quitosana.

Como se puede observar las plantas tratadas con las diferentes dosis del elicitador mostraron una mayor actividad quitinasa que las correspondientes a las plantas controles en la mayoría de las evaluaciones realizadas.

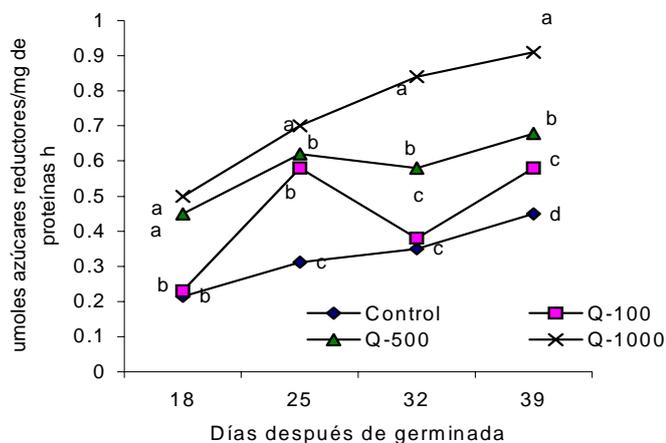
Cuando se aplica la quitosana, se evidencia que la mayor estimulación de la actividad de la enzima se produce con la dosis de 1000  $\text{mg.L}^{-1}$  para todas las evaluaciones y 500  $\text{mg.L}^{-1}$  en la última evaluación, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Se debe señalar que los mayores valores de actividad enzimática se encontraron a los 39 días después de germinada la semilla de arroz para todos los tratamientos.



**Figura 3. Actividad quitinasa en plántulas de arroz obtenidas de semillas tratadas con quitosana**

Estos resultados concuerdan con lo planteado por otros investigadores (15), quienes al tratar semilla de soya con quitosana a las dosis de 250, 500 y 1000 mg.L<sup>-1</sup> observaron que a los 17 días después de germinadas las semillas hubo una estimulación de la actividad quitinasa y que a medida que aumentaba la concentración se incrementaba la actividad, siendo 1000 mg.L<sup>-1</sup> la mejor concentración utilizada. Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo, con el mismo elicitor y la misma concentración, por lo que nos sugiere la capacidad que presenta la quitosana obtenida en el Laboratorio de Oligosacarinas de estimular los mecanismos defensivos en cultivos como la soya y el arroz.

En otros trabajos (16) donde se trataron semillas de arroz con quitosana y uno de sus oligómeros durante pocos segundos y se observó también que había inducción de la actividad quitinasa a los 8 días después germinada la semilla, lo cual reafirma los resultados obtenidos. Los resultados de actividad quitosanas se muestran en la Figura 4.



**Figura 4. Actividad quitosanas en plántulas de arroz obtenidas de semillas tratadas con quitosana**

Los resultados muestran que los elicitors fueron capaces de estimular la actividad de la enzima quitosanas de forma significativamente mayor que los tratamientos controles en la mayoría de las evaluaciones.

Las plantas obtenidas de semillas tratadas con quitosana con la dosis de 1000 mg.L<sup>-1</sup> exhibieron un mayor valor de actividad quitosanas que el resto de los tratamientos alcanzando los valores mayores de actividad enzimática a los 39 días después de germinada la semilla de arroz, con un comportamiento ascendente en todas las evaluaciones. La concentración de 500 mg.L<sup>-1</sup> tuvo un comportamiento más regular que 100 mg.L<sup>-1</sup>.

Estos resultados confirman la capacidad estimuladora de estos compuestos sobre la enzima quitosanas, lo cual está relacionada con la resistencia a los patógenos (17, 18).

De forma general, se puede plantear que las plantas obtenidas de semillas de arroz tratadas con quitosana a la dosis de 1000 mg.L<sup>-1</sup> lograron la mayor estimulación en todas las actividades enzimáticas evaluadas (PAL, β-1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanas) desde los 18 hasta los 39 días después de germinada la semilla. Por lo que se demostró la capacidad que presenta la quitosana de estimular la actividad de algunas enzimas relacionadas con la defensa y que esta estimulación se diferencia en cuanto a la magnitud, rapidez en alcanzar los valores mayores de actividad y la dosis utilizada. Lo cual sugiere, la posibilidad de que este elicitor pueda ser empleado en la protección de plántulas de arroz contra algunos patógenos fúngicos.

## REFERENCIAS

1. 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.
2. Inui, H.; Yamaguchi, 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.
3. Takeshi, Y.; Ito, Y. y Shibuya, N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trends in Glycosc. Glycotech*, 2000, vol. 12, no. 64, p. 113-120.
4. 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.
5. Pospieszny, H. Potential use of chitosan in plant protection. En: Chitin and chitosan. Polish-Russian Monograph. Eds: Struszczyk, H. Pospieszny, H. and Gamzazade, A., 1999, p. 115-130.
6. 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.

7. 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. Libro Resumen. En: Encuentro Internacional del Arroz (1:1998, junio 9-10, La Habana), 1998.
8. Ramírez, M. A.; Cabrera, G.; Gutiérrez, A. y Rodríguez, T. Metodología de obtención de quitosana a partir de quitina de langosta. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 1, p. 81-84.
9. Cuba. MINAGRI. Instituto de Suelos. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba, La Habana : AGROINFOR, 1999, 64 p.
10. Paz-Lago, D. Relevancia fisiológica de la actividad  $\beta$ 1,3 glucanasa en extractos enzimáticos. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 15, no. 2, p.26-29.
11. Paz-Lago, D.; Gutiérrez, A. y Luzardo, L. Relevancia biológica de la enzima  $\beta$ 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. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 1944, no. 153, p. 375-380.
13. Sun, S. MicroLowry method. En: *Methods in Plant Molecular Biology and Agricultural Biotechnology*. Asian Vegetable Research and Development Center, 1994.
14. Hammerschmidt, R. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annu. Rev. Phytopatol.*, 1999, vol. 37, p. 285-306.
15. Díaz, D. Potencialidades biológicas de la quitosana y sus hidrolizados enzimáticos. [Trabajo de Diploma], Universidad de La Habana, 2001.
16. 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 derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol. 57, no. 3, p. 2098-2100.
17. 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.
18. Van Loon, L. C. Occurrence and properties of pathogenesis-related proteins. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. London: CRC Press, 1999, 193 p.

Recibido: 15 de septiembre de 2003

Aceptado: 2 de febrero de 2004

# Cursos de Verano

Precio: 320 USD

## Las Oligosacarinas reguladoras de los mecanismos de defensa, del desarrollo y la diferenciación de las plantas

*Coordinador: Dr.C. Ramón Iglesias Curbelo*

*Fecha: 23 al 27 de agosto*

### 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) (64) 6-3773  
Fax: (53) (64) 6-3867  
E.mail: posgrado@inca.edu.cu