

# INDUCCIÓN DE $\beta$ -1,3-GLUCANASAS Y QUITINASAS EN PLÁNTULAS DE TOMATE POR HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y SISTEMINA

Blanca M. de la Noval<sup>✉</sup>, E. Pérez, V. Olalde, J. P. Délano y N. Martínez

**ABSTRACT.** During early colonization stages of *L. esculentum* by *Glomus clarum* and systemin addition, pathogenesis-related proteins ( $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases) were determined. Assays were developed in a growth chamber. The basal expression of these enzymes was observed in *L. esculentum*. In relation to  $\beta$ -1,3-glucanase expression, a variety effect in tomato was found on activity level, in this case var. "Amalia" was better than "Fire River". A transitory increase of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in roots of var. "Fire River" was induced by systemin at 2-day-post-germination and the increase was rapidly attenuated. A second peak of the activity induction of this enzyme was observed and could be possibly related to fungal intensity on root (Visual Density percentage). Even though an increased activity on foliar tissue was not observed, when studying the combination of systemin and mycorrhizal arbuscular fungi, a synergical effect was found, promoting a chitinolytic activity in colonization of tomato var. "Fire River", but this promotion was not observed when systemin was used. A new synergical effect between systemin and *G. clarum* was observed in the mentioned combination. The possible induction of systemin response is indicated for the results which could contribute to the systemic effect observed against pathogens.

**Key words:** *Glomus clarum*, *Lycopersicon esculentum*, Beta-glucanase, chitinase, vesicular arbuscular mycorrhizae

**RESUMEN.** En el presente trabajo se determinó la expresión de proteínas relacionadas a patogenicidad ( $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas), en las etapas tempranas de colonización de raíces de *L. esculentum* inducidas por *Glomus clarum* y sistemina (44.06 nM, 30 mL maceta<sup>-1</sup>), para lo cual se llevaron a cabo ensayos a nivel de cámara de crecimiento. Se encontró que en *L. esculentum* se produce la expresión basal de las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas. En cuanto a la expresión de las  $\beta$ -1,3-glucanasas, se encontró un efecto varietal en tomate sobre el nivel de actividad, donde la var. "Amalia" supera a "Río Fuego" en la intensidad de la respuesta. En la var. "Río Fuego" la sistemina indujo un incremento transitorio de la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíz, a los dos días posteriores a la germinación, el que fue rápidamente atenuado. En esta variedad se observa, además, un segundo pico de inducción de la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas, el cual posiblemente se debió al incremento de la intensidad del hongo en la raíz, que coincide con el porcentaje de DV observado. En el tejido foliar, a pesar de que no se observa incremento de la actividad, cuando se estudió la combinación sistemina-hongo MA, se encontró un efecto sinérgico. En la var. "Río Fuego", la colonización con *G. clarum* en las raíces del tomate promovió un incremento de la actividad quitinolítica, la cual no se observó con la aplicación de la sistemina. Nuevamente se encontró un efecto sinérgico entre la sistemina y *G. clarum*. Estos resultados nos indican la posible inducción de una respuesta sistémica, que podría contribuir al efecto protector sistémico observado contra patógenos.

**Palabras clave:** *Glomus clarum*, *Lycopersicon esculentum*, Beta-glucanasa, quitinasa, micorrizas arbusculares vesiculares

## INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares (MA) constituyen la relación simbiótica más extendida sobre la tierra; esta se forma entre hongos del suelo del orden Endogonales y el 95 % de las plantas terrestres con las que han coevolucionando desde sus orígenes. En esta relación,

se produce transporte de nutrimentos, beneficiando a ambos simbioses, donde la planta le transfiere fotosintatos al hongo a costa de la adquisición de compuestos minerales del suelo, a través del micelio fúngico (1, 2, 3).

Se ha planteado que en el establecimiento de las micorrizas se producen interacciones, donde deben participar señales que se intercambien entre la planta y el hongo (4). Se ha encontrado que en plantas micorrizadas se produce una respuesta transitoria, similar a la producida por patógenos, como la acumulación de proteínas relacionadas a patogenicidad, las que son atenuadas a medida que avanza la colonización (4, 5, 6).

Ms.C. Blanca de Noval y E. Pérez, Investigadores Agregados del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700; Dres. V. Olalde y J. P. Délano, Profesores Titulares y N. Martínez, Especialista, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, México

✉ bdelanov@inca.edu.cu

Por otra parte, en la última década ha sido identificada en Solanaceae la participación de un polipéptido de 18 aminoácidos involucrado en mecanismos de defensa, el cual induce una respuesta sistémica, que se genera como respuesta al ataque por herbívoros y daño mecánico (7). Este polipéptido se aisló a partir de hojas de plantas de tomate gracias a su capacidad de inducir la acumulación de inhibidores de proteasas; sin embargo, actualmente se conoce que la actividad inductora se extiende a la expresión de por lo menos 19 proteínas, entre las que se inducen endo- y exo-proteasas, proteínas que participan en las vías de transducción de señales y otras proteínas de las cuales se desconoce aún su función en la defensa de las plantas (7, 8).

El siguiente experimento se desarrolló con el objetivo de determinar la influencia de las MA y el polipéptido sistemina sobre la inducción de PRs ( $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa) en plántulas de tomate en condiciones controladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención del material vegetal.** Como modelo de estudio se emplearon dos variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), la var. "Amalia", obtenida por el Departamento de Mejoramiento Genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba (9) y la variedad mexicana "Río Fuego", de la Compañía Bonanza Seeds, EUA.

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante el protocolo presentado por Becárd y Piché (10) para la esterilización de esporas, con las siguientes modificaciones: hipoclorito de sodio al 10 % por 10 min, Tween 20 (0.05 %) más Cloramina T (2 %) en relación 1:1 por 10 min, lavar de tres a cinco veces con agua destilada estéril, Cloramina T (2 %) por 5 min, tres veces, estreptomycin (1 %) y gentamicina (0.5 %) en relación 1:1 por 30 min. Finalmente se realizan de tres a cinco lavados con agua destilada estéril. Después de este procesamiento las semillas quedaron listas para su siembra. Se sembraron 30 plantas por maceta, donde cada maceta constituyó una observación.

Como inóculo micorrízico arbuscular (MA) se seleccionó la especie *Glomus clarum* Nicolson & Schenck, conformado por raicillas infectadas y esporas, el cual fue producido y certificado por el Grupo de Micorrizas del INCA (25 esporas/gramo de suelo fresco y 92 % de infección micorrízica). La inoculación se realizó sobre el sustrato (termolita), antes de la siembra, a razón de 5 g/maceta. Se emplearon macetas de 250 g de capacidad.

Las macetas se mantuvieron en bandejas embebidas en solución nutritiva con concentración de 22 ppm de P, con la siguiente composición ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{KNO}_3$ , 0.404;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.038;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.944;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.0986;  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.0017;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.0003;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0003;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.0031;  $\text{NaCl}$ , 0.0059;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.0009;

$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 0.0245; ácido cítrico, 0.0245 y luego diluida en proporción 2:1 con agua destilada, para obtener una concentración final de 14.6 ppm de P.

La sistemina fue aplicada posterior a la emergencia de las plántulas, a razón de 30 mL/maceta<sup>-1</sup> a una concentración de 44.06 nM. Para ello se suspendió el suministro de la solución nutritiva, previamente a la aplicación, el cual no se le restableció hasta un día después, con el fin de asegurar que se hubiera absorbido toda la solución.

Las plántulas fueron mantenidas en cámara de crecimiento, en condiciones controladas, con fotoperíodo de 8h de oscuridad a 16°C y 16h de luz a 28°C y una intensidad de 200-300 mE.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>.

El experimento se desarrolló mediante un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas conformadas por 60 plántulas cada una, realizándose dos repeticiones en cada tiempo. Los tratamientos quedaron conformados del modo siguiente: Control sin inocular (CM-), Control micorrizado (CM+), Sistemina sin inocular (SM-) y Sistemina micorrizada (SM+).

Se empleó un diseño completamente aleatorizado y los datos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis correspondiente y las medias comparadas mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS).

**Muestreo y evaluación.** Los muestreos se efectuaron a diferentes días posteriores a la inducción. El material vegetal fue separado por órganos para ser conservado en formas diferentes según su destino; muestras de hojas y raíces fueron maceradas en nitrógeno líquido y liofilizadas para las determinaciones enzimáticas. Por otra parte, muestras de raíces fueron secadas a 70°C para la determinación del establecimiento de la simbiosis micorrízica. **Diseño y análisis estadístico.** Se empleó un diseño completamente aleatorizado con tres observaciones. Los datos obtenidos fueron procesados por análisis de varianza de clasificación simple, comparándose las medias por el *Test* de Duncan.

**Determinación del establecimiento de la simbiosis micorrízica.** Las raicillas secas a 70°C fueron teñidas mediante el método descrito por Phillips y Hayman y evaluadas por el método de los interceptos "Grin line intersect" desarrollado por Giovanetti y Mosse, mediante el cual se determinó el porcentaje de colonización micorrízica. El porcentaje de Densidad Visual (% DV) o intensidad de la colonización y el cálculo del peso del endófito se realizó según metodología descrita por Herrera (11).

### Determinación de las actividades enzimáticas

**Preparación de los extractos.** Para la obtención de los extractos se pesaron 10 mg de raíz liofilizada y 15 mg de hoja, en tubos Eppendorf de 1.5 mL a los que se le añadieron 500  $\mu\text{L}$  de regulador de acetato de sodio, 50 mM pH 5.5. Las muestras se homogenizaron en vortex y posteriormente se centrifugaron a 12 000 g por 30 min a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante.

Para determinar la influencia del método de precipitación sobre la actividad enzimática, se procesaron muestras de los controles no micorrizados (M-) de la var. "Amalia" a diferentes tiempos de muestreo, para lo cual se compararon los métodos siguientes: i) precipitación salina con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , del que se añadieron 0.63 g por 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante. Después de disolver bien la sal se incubó de 4-16 h a  $4^\circ\text{C}$  y luego se centrifugó a 12 000 g por 30 min a temperatura ambiente; ii) precipitación con acetona, la cual se añadió a razón de dos volúmenes por un volumen de extracto. La mezcla se homogenizó y se incubó una noche a  $-20^\circ\text{C}$ , para finalmente centrifugarla a 12 000 g por 1 h en cuarto frío. Los precipitados se resuspendieron en 100-200  $\mu\text{L}$  de regulador de acetato de sodio, 50  $\mu\text{M}$  pH 5.5, constituyendo los extractos proteicos. A los extractos se les determinó la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, como se describe posteriormente en este acápite, como método de monitoreo.

**Determinación de la concentración de proteína.** Para la determinación de la concentración de proteínas se empleó el Ensayo de Proteína de Bio-Rad (Bio-rad Laboratories) basado en el método de Bradford. Este método utiliza el principio de "dye-binding" para cuantificar proteínas, mediante una solución ácida de Azul de Coomassie® Brillante G-250. De los dos métodos recomendados por el fabricante para el ensayo, se seleccionó el protocolo para placas de microtítulo, con la siguiente modificación: se preparó una dilución 1:4 con agua desionizada del reactivo de tinción concentrado, al momento de utilizarla, conservándose a temperatura ambiente. Para la curva estándar se prepararon cinco diluciones de BSA, con las concentraciones de 0.05-0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para la determinación se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y de los estándares por duplicado, a los que se les adicionaron 400  $\mu\text{L}$  del reactivo de tinción diluido y la mezcla, para luego homogenizarlos en vortex. La incubación se realizó a temperatura ambiente por 5 min, a partir de los cuales se leyó absorbancia a 595 nm en un período de 5 a 30 min medidos a partir del momento que se aplicó el reactivo de tinción.

**Ensayo de la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa.** Para la cuantificación de la actividad enzimática se empleó el método de microplaca descrito por Zheng y Wozniak (12), para el cual se emplearon placas de polipropileno autoclavables Nunc®96 (Catalog No. 506112-07; PGC Scientific, Gaithersburg, MD, USA). Los ensayos se realizaron con las siguientes modificaciones: de los extractos proteicos se tomaron 10  $\mu\text{L}$  por cuatuplicado, de los cuales dos se emplearon para el ensayo de la actividad y dos como controles. Para el desarrollo de la actividad se añadieron 20  $\mu\text{L}$  del sustrato (laminarina 0.4 % w:v) a los pocillos de ensayo. Posteriormente la microplaca se tapó, se cubrió con papel aluminio y se agitó ligeramente en vortex. La incubación se realizó a  $37^\circ\text{C}$ , durante 20 min, deteniéndose la reacción mediante la colocación de las placas sobre hielo en un cuarto frío, por 20 min. Para el revelado se empleó el reactivo de cobre (solución A) y la

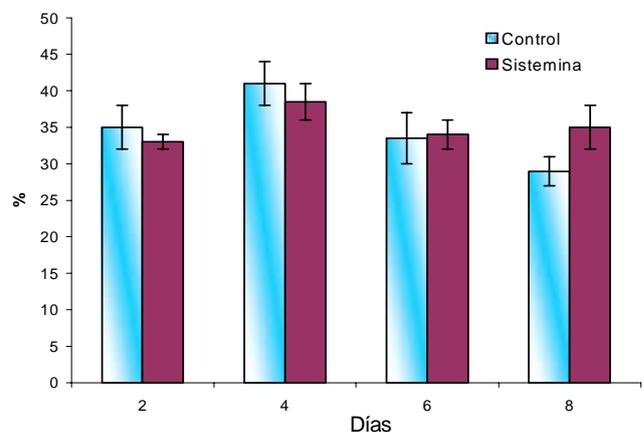
neocuproina (solución B), preparadas según Zheng y Wozniak (12). En los pocillos se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de cada solución. En los que contenían los controles de las muestras se adicionaron, además, los 20  $\mu\text{L}$  del sustrato. La placa envuelta en papel aluminio se introdujo en una bolsa sellada "Ziploc Brand" y se hirvió en baño de agua, precalentado aproximadamente a  $99^\circ\text{C}$ , por 10 min. Finalmente se enfrió sobre hielo en un cuarto frío y se leyó la absorbancia a 450 nm.

La curva estándar de glucosa se preparó con diferentes concentraciones comprendidas entre 2-80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , por duplicado, poniendo 30  $\mu\text{L}$  pocillo<sup>-1</sup>, siguiendo el mismo procedimiento descrito, a partir del paso del revelado de la actividad.

**Ensayo de la actividad de quitinasas.** Se empleó el método descrito por Villagómez-Castro (13), el cual se basa en la acción de las quitinasas sobre el 4-Metilumbeliferil  $\beta$ -D-N,N',N'' triacetilquitotriósido (4-MU(Ch)<sub>3</sub>), a partir del cual se produce la liberación de un residuo fluorescente. Las lecturas se realizaron en un espectrofluorómetro, para lo cual se empleó la longitud de onda de excitación de 350 nm y la de emisión de 440 nm. Para la curva se empleó como estándar la 4-Metilumbeliferona (MU) 10 mM disuelta en metanol, a las concentraciones de 0.1-0.8  $\mu\text{M}$ .

## RESULTADOS

**Determinación de la colonización micorrízica.** Los resultados de colonización micorrízica (porcentaje de colonización) se presentan en la Figura 1, los cuales no mostraron diferencias significativas al ser comparadas por el análisis de varianza correspondiente.



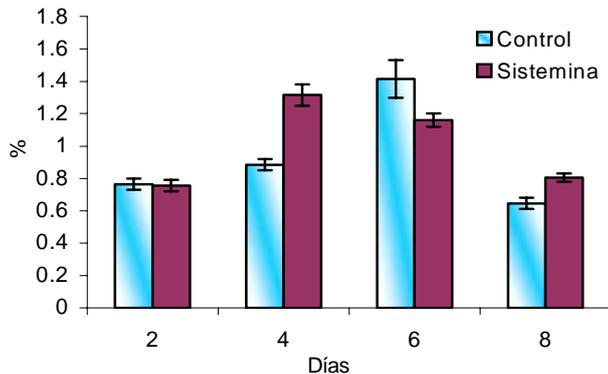
**Figura 1. Porcentaje de colonización MA obtenido en plántulas de tomate var. «Río Fuego»; solo se presentan los tratamientos inoculados**

Es importante resaltar que a los dos días de evaluación ya se detecta la presencia del hongo en raíz, por lo que las respuestas observadas en los tratamientos inoculados es debido a la simbiosis, en sus estadios iniciales. Se observó, además, que la sistemina no tuvo efecto negativo sobre el establecimiento de la simbiosis, al ser comparados con el tratamiento control, lo cual resulta

importante, pues no hubo efecto antagonístico del polipéptido sobre la simbiosis.

Así mismo, los niveles de colonización fueron relevantes (30-40 %), si se tiene en cuenta que estos son valores que se alcanzan en plantas de tomate adultas. En los tratamientos donde no se inoculó con el hongo MA, no se detectó la presencia fúngica en la raíz (datos no mostrados). Esta ausencia era esperada pues se trabajó con un sustrato artificial, libre de posibles propágulos, y, además, las semillas se desinfectaron superficialmente antes de la siembra.

La Figura 2 muestra los resultados del % DV, parámetro que permite la cuantificación de la intensidad de la colonización micorrízica arbuscular. Este método mostró que tampoco existen diferencias estadísticamente significativas, entre las raíces de plantas micorrizadas y las de las plantas a las cuales se les aplicó la sistemina. En forma general, no se observa un efecto importante entre los tratamientos, ya que se obtienen niveles bajos de colonización micorrízica, menores al 1.5 % de ocupación, lo cual es de esperar ya que se encuentran en estadios iniciales del establecimiento de la simbiosis.



**Figura 2. Densidad visual o intensidad de la colonización MA obtenidas en plántulas de tomate var. «Río Fuego»; solo se informan los tratamientos inoculados**

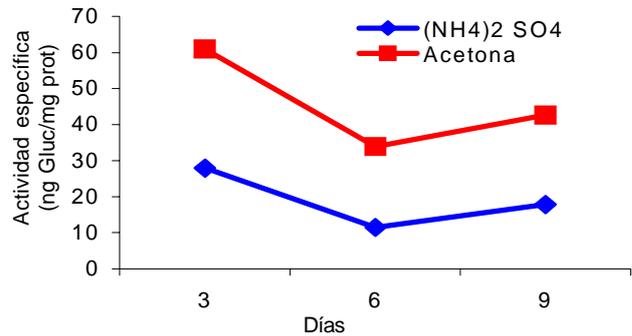
#### Determinación de la actividad enzimática *in vitro*

*Comparación de los métodos de precipitación de proteína.* Con el objetivo de obtener extractos proteicos que conservaran buena actividad enzimática, se procedió a la comparación de dos métodos de precipitación de proteína, tal como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 3. En esta se observó que la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  produjo una disminución del 50 % de la actividad específica, en relación con la obtenida con acetona, lo que indica que este método fue el más adecuado para conservar la actividad de estas enzimas.

De forma adicional se determinó la concentración de azúcares reductores en los extractos obtenidos por ambos métodos de precipitación, los cuales no mostraron diferencias significativas (datos no mostrados).

*Ensayo de la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas.* Al analizar la actividad específica de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en las dos

variedades de tomate, mediante el análisis estadístico como se indica en materiales y métodos, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, para ambas variedades.



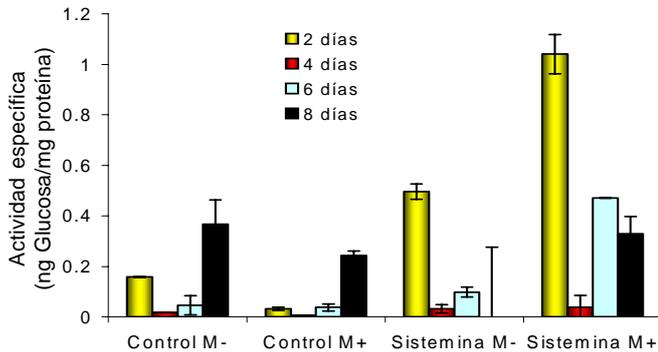
**Figura 3. Comparación de métodos de precipitación de proteínas monitoreadas mediante la actividad de b-1,3-glucanasa en raíces de tomate var. «Amalia», sin colonización micorrízica. Las proteínas fueron precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (♦) y acetona (■), como se indica en Materiales y Métodos**

La Figura 4 muestra la actividad específica de extractos de raíz de la variedad «Río Fuego», en los que se muestra que existe un nivel basal, que se observó en las plantas control (no inoculadas con el HMA, ni sistemina), el que se incrementó súbitamente a partir de los ocho días posteriores a la emergencia, para alcanzar un valor de actividad de  $0.496 \text{ ng de glucosa} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Por su parte, en el tratamiento colonizado con HMA se produjo una ligera depresión de esta actividad, en relación con el control, la que se mantiene aún al octavo día de muestreo, a pesar de que se observó una ligera recuperación ( $0.244 \text{ ng de glucosa} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína).

Por el contrario, la aplicación de la sistemina produjo una inducción rápida y transiente, la que se manifestó como un pico de actividad a los dos días posteriores a la emergencia, de  $1.041 \text{ ng de glucosa} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, la que decayó drásticamente al cuarto día de muestreo. Posteriormente, se observó un incremento, alcanzando un nivel cercano al basal. Esta activación temprana por sistemina fue aún más intensa cuando se combinó con la colonización del HMA. En este tratamiento, se observó un segundo incremento en la actividad, el que se presentó a los seis días y fue ligeramente inferior al observado el segundo día, alcanzando niveles de actividad de  $0.471 \text{ ng de glucosa} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Esta segunda activación pudo ser causada por la colonización del hongo MA en la raíz. Estos resultados indican que la sistemina podría estar potenciando la inducción temprana y local de  $\beta$ -1,3-glucanasas por HMA en la fase de precolonización.

Al analizarse la combinación de ambos inductores (HMA y sistemina), se observó un patrón de inducción completamente diferente al encontrado en los restantes tratamientos. En este se produjo una inducción rápida y

transiente, la que se manifestó como un pico de actividad a los dos días que superó en un 131 % a la inducida por la sistemina y en un 477 % a la basal con niveles de 1.041 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína.



**Figura 4. Actividad específica de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de plántulas de tomate var. «Río Fuego»**

Posteriormente, se observó un segundo incremento de la actividad a los seis días de 0.471 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína con una ligera tendencia a decaer a los ocho días con niveles inferiores a los obtenidos al inicio.

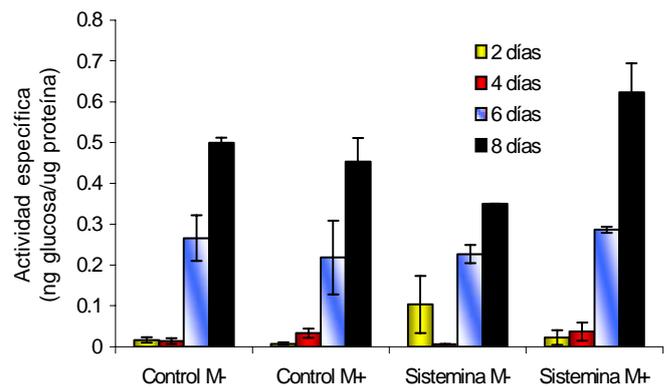
En el tejido foliar se detectó una respuesta similar en las plantas control con colonización micorrizca y sin ella con valores de 0.499 y 0.453 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína, respectivamente (Figura 5). En el caso de las plantas tratadas con sistemina se observó una activación al segundo día, inferior a los niveles alcanzados por el control y por la micorrización, la que decayó drásticamente al cuarto día, manteniendo el mismo patrón encontrado en raíz. Posteriormente se produjo una segunda activación que alcanzó niveles más bajos que los basales. Esta disminución no se observó en las hojas de las plantas micorrizadas tratadas con sistemina, donde por el contrario, se detectó un claro pico de activación, el cual fue mayor a cualquiera de los otros, con actividad de 0.634 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína. Esto podría indicar que la sistemina, además de producir la aparición temprana de una respuesta de defensa local en raíces, podría, cuando se combina con la colonización del HMA, estar potenciando la generación de una respuesta sistémica, de aparición más lenta en hoja.

La Figura 6 muestra los resultados de la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas en la var. «Amalia». Se observó una marcada diferencia en los niveles de actividad, detectados en las raíces de esta variedad, los que fueron al menos 10-21 veces superiores a los informados en la var. «Río Fuego».

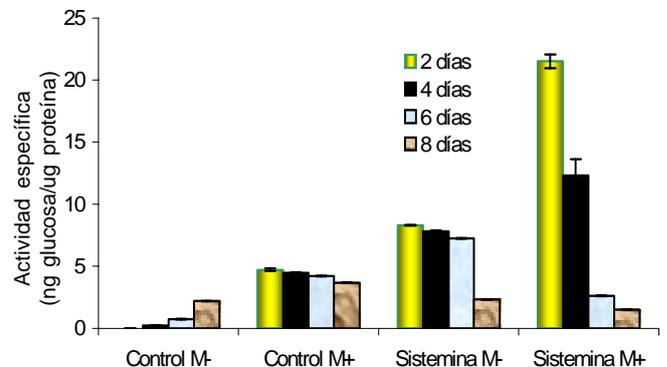
En esta variedad se observó, de igual forma, la expresión de niveles basales, detectables a partir de los seis días, a los cuales alcanzó niveles de actividad específica de 4.617 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína a los ocho días de muestreo.

En el tratamiento colonizado con el HMA se produjo, por el contrario, un rápido incremento de la actividad a los dos días (4.703 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína), el cual

fue mantenido hasta el octavo día, con niveles que siempre fueron superiores a los detectados en el control.



**Figura 5. Actividad específica de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en hojas de plántulas de tomate var. «Río Fuego»**



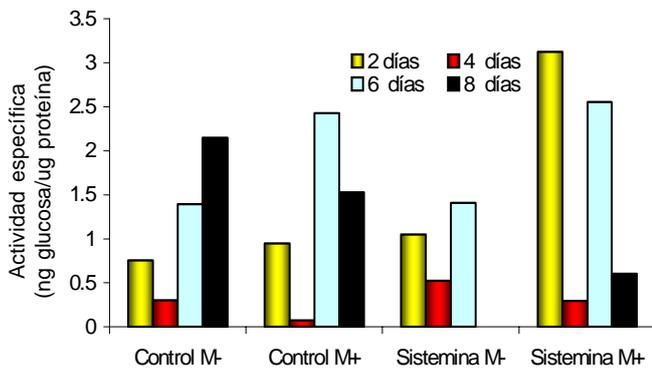
**Figura 6. Actividad específica de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíz de plántulas de tomate var. «Amalia»**

La similitud de las respuestas volvió a presentarse en el tratamiento en el cual se aplicó la sistemina, ya que se observó una rápida inducción de la actividad en estadios tempranos a los dos días (8.305 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína), donde a diferencia de la var. «Río Fuego» los niveles se mantuvieron hasta el sexto día posterior a la aplicación del polipéptido, para luego decaer hasta niveles similares al basal (3.656 ng de glucosa. $\text{mg}^{-1}$  de proteína). El mismo efecto potenciador temprano fue observado en esta variedad cuando la sistemina se combinó con el HMA. En esta ocasión la inducción a los dos días llegó a alcanzar niveles 2.6 superiores a los obtenidos al aplicar la sistemina de forma individual.

Como se observa los niveles de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en *L. esculentum* están fuertemente influidas por la variedad, lo que se refleja, tanto en los niveles como en los patrones encontrados, ya sean basales o inducidos por los HMA y la sistemina.

#### Ensayo de la actividad de quitinasas

Los resultados de la actividad específica de las quitinasas detectadas en la var. «Río Fuego» se muestran en la Figura 7, en los cuales se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados.



**Figura 7. Actividad específica de las quitinasas en raíces de plántulas de tomate var. «Río Fuego»**

Un análisis de los tratamientos en conjunto señala que se presentó una tendencia similar en actividad quitinolítica a la observada en el patrón de actividad de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de la variedad "Río Fuego". En ambos casos se produjo un incremento inicial de la actividad, el cual disminuyó a los cuatro días, para luego volver a incrementarse a partir de los seis días, donde se alcanzaron diferentes intensidades según el tratamiento en cuestión.

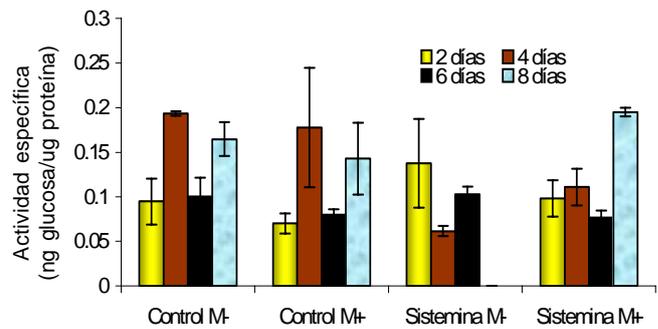
Resultó interesante observar una expresión basal de esta enzima en el control sin inocular (M-), el que varió durante los diferentes momentos de muestreo, donde se observó una rápida elevación de la actividad en estadios tempranos del desarrollo vegetal (dos días), alcanzando niveles de  $0.757 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de actividad. Posteriormente se observó una disminución a los cuatro días, para luego producirse un segundo incremento a los seis y ocho días, con niveles de  $1.397$  y  $2.145 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de actividad quitinolítica, respectivamente. De acuerdo con la tendencia observada, es posible que este incremento en actividad continúe más allá del octavo día, que fue nuestra última medición.

Por otra parte, se encontró que la colonización micorrízica (M+) provocó un ligero incremento de la actividad a los dos días ( $0.954 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) que luego decaió bruscamente en el cuarto día ( $0.076 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Sin embargo, a los seis días se produjo una rápida inducción de esta actividad que alcanzó un máximo de  $2.426 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , para luego decaer a niveles inferiores al basal. Por el contrario, el tratamiento con la sistemina no elevó los niveles de actividad por encima del control no micorrizado con la posible excepción de un ligero aumento observado a los dos días ( $1.059 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Sin embargo, a los ocho días produjo una depresión de la actividad, la cual no pudo ser detectada.

Nuevamente se observó un efecto sinérgico entre el hongo MA y la sistemina, manifestado por la potenciación de la respuesta temprana obtenida por la micorrización. Esta activación superó los niveles basales a los dos y seis días, a los cuales se detectó un segundo pico de inducción, con niveles de actividad de  $3.124$  y  $2.554 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , respectivamente. Este segundo

pico, al parecer, no fue estimulado por la sistemina ya que fue similar en intensidad al obtenido por el tratamiento micorrizado.

En el tejido foliar se obtuvieron valores de actividad mucho más bajos que en raíz, hasta 16.8 veces (Figura 8). Al igual que en raíz existe un nivel basal de expresión de las quitinasas en hoja. Sin embargo, el patrón de expresión durante el crecimiento varía, donde se detectó la actividad en etapas tempranas (dos días) que muestra un máximo a los cuatro y ocho días ( $0.193$  y  $0.165 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , respectivamente).



**Figura 8. Actividad específica de las quitinasas en hojas de plántulas de tomate var. «Río Fuego»**

El tratamiento colonizado con el HMA mostró similar tendencia pero con niveles inferiores al basal, obtenido por el control, con actividades que van desde  $0.070$  hasta  $0.178 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , según la edad de la planta. La sistemina, por su parte, produjo depresión en la expresión de esta enzima, excepto a los dos días, a los que se observa un ligero incremento de  $1.328 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de actividad. A diferencia de lo ocurrido con las  $\beta$ -1,3-glucanasas, en esta ocasión no se detectó la inducción sistémica de quitinasas en tejido aéreo como resultado de la interacción sistemina-hongo MA, alcanzando a los ocho días de cultivo valores similares al basal ( $0.195 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

## DISCUSIÓN

Es reconocido que la asociación simbiótica denominada micorriza promueve el crecimiento de las plantas, principalmente por elevar la adquisición de nutrimentos, la producción de sustancias promotoras del crecimiento y el mejoramiento de las condiciones de suelo; modificar las propiedades bioquímicas y fisiológicas de la planta e incrementar la defensa contra patógenos (11).

Como se mostró en las Figuras 6 y 8, la respuesta de las  $\beta$ -1,3-glucanasas dependió de la variedad del tomate, diferencia que se observó tanto en los niveles basales como en los inducidos por la acción del HMA y la sistemina, siendo importante la presencia de la sistemina por el efecto potenciador observado.

Nuestros resultados corroboran los obtenidos por otros autores (14), quienes encontraron que las  $\beta$ -1,3-glucanasas exhiben una actividad basal en muchos teji-

dos de plantas, a pesar de que también puede ser inducida durante infecciones patogénicas.

Estudiando la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas en raíces de alfalfa colonizadas por *Glomus versiforme*, se ha encontrado que, curiosamente, estas enzimas solo fueron localizadas en células que contenían arbusculos (15), localización que fue confirmada por Lambais y Medhy (6), quienes observaron la acumulación de transcritos de ambas enzimas en las células de frijol colonizadas por *Glomus intraradices*, que contenían arbusculos. Esta localización tan marcada de la actividad de esta enzima podría ser la explicación de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que los muestreos correspondieron a fases tempranas de la colonización, demostrada por los porcentajes de DV, fases en las cuales aún no se han desarrollado estas estructuras (datos no mostrados), lo cual coincide con otros informes (1). Sin embargo, en la var. «Amalia» se encontró que la micorrización indujo respuestas de defensa en etapas tempranas, manifestadas por la acumulación de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas.

En nuestros resultados encontramos la inducción de la actividad quitinasa con la rápida atenuación a los ocho días. Estudiando las respuestas de defensa generadas durante el establecimiento de la simbiosis MA, se ha observado que estas son generalmente de menor nivel que la inducida por las interacciones planta-patógeno. Tratando de explicar este fenómeno, se postula un modelo especulativo de los mecanismos de supresión inducidos por las MA (4), según el cual durante los primeros estadios de la formación de la simbiosis se produce la expresión constitutiva de quitinasas en la planta, las que inducen una respuesta de defensa atenuada. Mientras que en estadios tardíos ocurre la acumulación de quitinasas específicas inducidas exclusivamente por la micorrización, las que inactivan completamente a los elicitores, por lo que eliminan las respuestas defensivas rápidas que dan lugar a la síntesis de proteínas PR.

Varios autores informan la inducción de la actividad quitinasa relacionada con etapas tempranas del establecimiento de la colonización (16, 17, 18). De forma similar, en este trabajo se muestra una inducción de estas durante estadios tempranos, donde, según los datos de la evaluación de la intensidad de la colonización, se está produciendo el contacto y la penetración intraradical. En raíces de *Allium porrum* micorrizadas con *G. vermiforme*, se encontraron incrementos de la actividad de quitinasa, inducida en los primeros estadios de la formación de la MA, la que decreció cuando la simbiosis fue totalmente establecida (17). Similares resultados fueron obtenidos en alfalfa colonizada con *G. intraradices* (18).

Se observó que existe actividad basal de las  $\beta$ -1,3-glucanasas y de las quitinasas en raíz, la cual se incrementó gradualmente del segundo al octavo día. Este comportamiento sugirió que estas enzimas, en especial las quitinasas, podrían estar inducidas en procesos de desarrollo y diferenciación de las raíces en esta etapa tan temprana de desarrollo (19).

Se ha encontrado que la sistemina está involucrada en la expresión de genes de defensa, como respuesta al ataque por herbívoros y daño mecánico, donde su estudio ha sido concentrado en hojas (7), se induce la acumulación de inhibidores de proteinasas y de por lo menos 19 proteínas más, así como de otras proteínas, cuya función en la defensa de las plantas es aún desconocida (8). Sin embargo, no ha sido abordada su actividad biológica en raíz, ni su relación con otras interacciones planta-patógeno o planta-simbionte. En nuestro caso, se encontró que la aplicación de la sistemina indujo un incremento transitorio de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasa en raíz, proteínas que se encuentran más relacionadas con respuestas de defensa contra patógenos que contra insectos.

La aplicación de la sistemina tuvo un efecto negativo retardado sobre estas enzimas, llegando a inhibirlas completamente a los ocho días. El mecanismo mediante el cual la sistemina ejerce este efecto se desconoce, pero podría estar asociado en cierta medida con el antagonismo que en ocasiones se presenta entre las respuestas defensivas generadas contra daño mecánico e insectos masticadores, que dependen de la sistemina y el ácido jasmónico, y las respuestas generadas contra microorganismos patógenos, entre las que se producen quitinasas y glucanasas, muchas de las cuales dependen de ácido salicílico (11).

Como ya se indicó la diferencia de lo observado en las últimas etapas del experimento (seis y ocho días), la sistemina indujo un ligero aumento de la actividad de quitinasas y glucanasas al segundo día, que se amplificó claramente en presencia del HMA, lo que indicó que la sistemina ejerció un efecto potenciador de esta respuesta. Un efecto similar fue informado por algunos autores (20), quienes observaron que el pretratamiento de células en suspensiones de *L. esculentum* variedad «Rio Grand PtoR» incrementó entre 10 y 16 veces la intensidad de la explosión oxidativa, inducida en estas células por la adición de oligosacáridos de origen fúngico. Este efecto no se produjo al emplear el análogo inactivo de la sistemina (A-17), ni cuando se adicionó cicloheximida al medio, lo que indicó que la respuesta es específica para sistemina y que esta requería de la síntesis *de novo* de proteínas (11).

El efecto sinérgico de la sistemina sobre la inducción de respuestas defensivas en las fases de la colonización micorrízica también se presentó en hoja, aunque en forma más retardada. Este efecto se manifestó como una acumulación de  $\beta$ -1,3-glucanasas en el follaje en el octavo día de evaluación. Dicho resultado sugiere que la generación, el transporte y/o detección de una señal, producida por la interacción raíz-HMA, es facilitada por la presencia de la sistemina.

La obtención de este efecto en dos variedades fortalece la propuesta que sugiere la existencia de un efecto sinérgico entre la sistemina y el HMA en las fases iniciales de la colonización, el que podría estar mediado por señales generadas por el huésped y/o el HMA, las cua-

les podrían actuar como señales, capaces de regular las respuestas de defensa en la planta, previamente al contacto con la superficie radical.

Este fenómeno podría explicar en parte el efecto protector contra patógenos observado frecuentemente en plantas micorrizadas y que se manifiesta como una resistencia sistémica, informada por diversos autores, quienes encontraron que el efecto protector dependió del grado de colonización por el HMA, donde solamente las plantas con  $\geq 50$  % de colonización MA indujeron protección (11).

De forma general se plantea que, al parecer, existe una co-regulación de las actividades  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa en diferentes condiciones de estrés, las que son suprimidas durante algunos estadios del desarrollo de la micorrización (21). Otros autores encontraron que plantas transformadas de tabaco, las cuales expresaban quitinasa y glucanasa, su efecto estaba regulado por la colonización del simbionte micorrízico, así como la expresión de proteínas antifúngicas, denominadas defensinas (3). Diversos autores han estudiado la influencia de las especies de HMA sobre la expresión de diferentes actividades enzimáticas como  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas (22, 23), quienes coinciden en la posibilidad de que exista una regulación de estas enzimas por el hongo en la simbiosis MA. Sin embargo, poco se ha explorado la influencia que pudiera tener el genotipo de la planta sobre dicha regulación.

## REFERENCIAS

- Bago, B.; Azcón-Aguilar, C.; Goulet, A. y Piché, Y. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 1998, vol. 139, p. 375-388.
- Bago, B.; Shachar-Hill, Y. y Pfeffer, P. E. Dissecting carbon pathways in arbuscular mycorrhizas with NMR spectroscopy. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section IV: Carbon metabolism and cost of arbuscular mycorrhizas. APS Press, 2000, p. 111-126.
- Bonfante, P. y Perotto, S. Outside and inside the roots: cell-cell interactions among arbuscular mycorrhizal fungi, bacteria and host plants. In: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section V: Ultrastructural changes during mycorrhizal symbiosis. APS Press, 2000, p. 141-156.
- Salzer, P. y Boller, T. Elicitor induced reactions in mycorrhizae and their suppression. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section I: Signaling mechanisms in mycorrhizal symbiosis. APS Press, 2000, p. 1-10.
- Dumas-Gaudot, E.; Gollotte, A.; Cordier, C.; Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Perason, V. Modulation of host defence systems. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers. 2000, p. 173-200.
- Mohr, U.; Lange, J.; Boller, T.; Wiemken, A. y Vögeli-Lange, R. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.*, 1998, vol. 138, p. 589-598.
- Ryan, C. A. y Pearce, G. Systemin, a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1998, vol. 14, p. 1-17.
- Schaller, A. Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 40, p. 763-769.
- Alvarez, M.; De Armas, G. y Martínez, B. Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate de consumo fresco. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 1, p. 83.
- Bécar, G. y Piché, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: Review and proposed methodology. En: *Methods in Microbiology*. 1992, vol. 24. American Press.
- Noval, B. M. de la. Influencia de la sistemina sobre la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) micorrizadas. [Tesis de Maestría]; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN. Unidad Irapuato. Irapuato, 2000.
- Zheng, Y. y Wozniak, C. A. Adaptation of a  $\beta$ -1,3-glucanase assay to microplate format. *Biotechniques*. 1997, vol. 22, no. 5, p. 922-926.
- Villagómez-Castro, J. C.; Calvo-Méndez, C. y López-Romero, E. Chitinase activity in encysting *Entamoeba* invadens and its inhibition by allosamidin. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, vol. 52, p. 55-62.
- Collinger, D. B.; Kragh, K. M.; Mikkelsen, L. D.; Nielsen, K. K.; Rasmussen, U. y Vad, K. Plant chitinases. *Plant J.*, 1993, vol. 3, p. 31-40.
- Blee, K. A. y Anderson, A. J. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section II: Mycorrhizal fungi and plants defense. APS Press, 2000, p. 27-44.
- Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. Spatial distribution of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases transcripts in bean mycorrhizal roots under low and high phosphate conditions. *New Phytol.*, 1998, vol. 140, p. 33-42.
- Spanu, P.; Boller, T.; Ludwig, A.; Wiemken, A.; Faccio, A. y Bonfante-Fasolo, P. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta*, 1989, vol. 177, p. 447-455.
- Volpin, H.; Elkind, Y.; Okon, Y.; y Kapulnik, Y. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.*, 1994, vol. 104, p. 683-689.
- Bisseling, T. The role of plant peptides in intercellular signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1999, vol. 2, p. 365-368.
- Stennis, M. J.; Chandra, S.; Ryan, C. A. y Low, P. Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 117, p. 1031-1036.
- Lambais, M. R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section II: Mycorrhizal fungi and plants defense. APS Press, 2000, p. 45-60.
- Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase expression. *New Phytol.*, 1996, vol. 134, p. 531-538.
- Pozo, M. J.; Azcón-Aguilar, C.; Dumas-Gaudot, E. y Barea, J. M.  $\beta$ -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sc.*, 1999, vol. 141, p. 149-157.

Recibido: 19 de julio de 2002

Aceptado: 17 de abril de 2003