

## Detección y cuantificación de quitinasa en hojas de banano (*Musa spp.*) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*

Cynthia Sánchez-García,\* Mileidy Cruz-Martín, Yelenys Alvarado-Capó, Luis Rojas, Michel Leiva-Mora, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. \*e-mail: cyn@ibp.co.cu

### RESUMEN

Aún es muy limitado el conocimiento del papel de enzima quitinasa en la interacción *Musa spp.*-*Mycosphaerella fijiensis*. Por ello, su estudio resulta de gran interés, principalmente, en los programas de mejoramiento genético. El objetivo de este trabajo fue detectar y cuantificar quitinasas en hojas de plantas de *Musa spp.* ('Grande naine' y 'Calcutta 4') inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo. La detección de la actividad enzimática en muestras de hojas de plantas de ambos genotipos, a diferentes tiempos después de la inoculación, se realizó en geles de agarosa con glicolquitina como sustrato y se reveló empleando Calcoflour brightener. Se observó que en las plantas de 'Calcutta 4' hubo un incremento en la actividad quitinasa en las plantas inoculadas respecto a las sin inocular, en todos los tiempos evaluados. En las plantas de 'Grande naine' inoculadas esta diferencia respecto al control solo se observó a las dos horas y a los tres días después de la inoculación. En cada tiempo, los mayores valores de concentración de la enzima, correspondieron a las muestras del genotipo resistente. Se demostró que la acumulación de esta enzima estuvo relacionada con la respuesta de la planta ante la inoculación del patógeno.

Palabras clave: enzimas hidrolíticas, proteínas PR, respuesta defensiva vegetal, Sigatoka negra.

## Detection and quantification of chitinase in banana (*Musa spp.*) leaves inoculated with *Mycosphaerella fijiensis*

### ABSTRACT

The knowledge of the role of chitinase enzyme in *Musa spp.*-*Mycosphaerella fijiensis* interaction is still very limited. Therefore, their study is of great interest, mainly in breeding programs. The aim of this study was to detect and quantify chitinase enzyme in leaves of 'Grande naine' and 'Calcutta 4' inoculated with *M. fijiensis* in greenhouse conditions. This enzyme accumulation was detected in leaves of both genotypes and at different times after inoculation using agarose gel with glycol chitin as a substrate and it was revealed by using Calcoflour brightener. It was noted that in 'Calcutta 4' plants there was an increase in chitinase activity in inoculated compared to non-inoculated plants at all times studied. In 'Grande naine' inoculated plants this difference was only observed at 2 h and at 3 days after inoculation respect to non-inoculated plants. At each time, the highest values of enzyme concentration corresponded to samples of the resistant genotype. It was shown that the accumulation of this enzyme was related to plant response to pathogen inoculation and was higher in inoculated plants of resistant genotype.

Keywords: Black Sigatoka, hydrolytic enzymes, plant defence response, PR proteins.

### INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra se controla fundamentalmente mediante la aplicación frecuente de varios fungicidas químicos, lo que ocasiona problemas desde el punto de vista medio ambiental y para las personas que trabaja o habitan cerca de plantaciones de bananos tratadas. De igual forma, esta práctica es insostenible para pequeños productores quienes no pueden costear el uso de estos químicos, lo cual además, produce una falta

de control del impacto y la dispersión del patógeno (Marín *et al.*, 2003).

Sobre la interacción *Musa*-*M. fijiensis* se han desarrollado investigaciones que han aportado nuevos conocimientos al estudio y entendimiento de este patosistema (Balint-Kurti *et al.*, 2001; Gómez Lim *et al.*, 2002; Alvarado-Capó *et al.*, 2003; Portal, 2008) A pesar de ello, aún se consideran insuficientes los resultados en la obtención de plantas *Musa spp.* resistentes a la enfermedad. En este sentido,

las investigaciones encaminadas a lograr este objetivo cobran cada vez una mayor relevancia.

Por otra parte, todavía son escasas las evidencias experimentales sobre la respuesta defensiva de la planta, en dicha interacción. En la última década se han realizado varios estudios genómicos (Vilarinhos *et al.*, 2003; Šafá *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2005; Portal, 2008) y se ha comprobado la existencia de numerosos genes relacionados con la defensa de la planta. Sin embargo, este conocimiento es aun insuficiente. Por esto, es necesario el estudio de la respuesta de la planta a otros niveles moleculares.

En tal sentido, se conoce que un mecanismo importante como parte de la respuesta defensiva lo constituye la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, del inglés: *Pathogenesis related proteins*). Estas proteínas son producidas durante el desarrollo normal de las plantas o como parte de la defensa inducida por patógenos fúngicos (Ferreira *et al.*, 2007).

Las familias PR más importantes que se inducen en respuesta a la interacción con patógenos fúngicos son la PR-2 ( $\beta$ -1,3-endoglucanasas) y las PR-3, -4, -8, y -11 que involucran varios tipos de quitinasas (Colditz *et al.*, 2004).

Generalmente, las enzimas hidrolíticas pueden ejercer una función dual, en la respuesta de defensa de la planta, al tener tanto una acción antimicrobiana directa sobre el patógeno o acelerar la resistencia a la infección mediante el inducción de respuesta hipersensible (Tuzun y Somanchi, 2006). La mayoría de los estudios sobre la enzima quitinasa están centrados en su sobreexpresión en plantas transgénicas con el fin de aumentar los niveles de resistencia tras la colonización fúngica (Broekaert *et al.* 2000; Grover y Gowthaman, 2003; Casado-Vela *et al.*, 2006). No obstante, en el patosistema *Musa sp.*-*M. fijiensis* este estudio ha sido muy limitado y existen pocas evidencias del papel de la enzima quitinasa como parte de la respuesta defensiva de la planta ante el patógeno.

Por estas razones el objetivo de este trabajo consistió en detectar y cuantificar quitinasas

en hojas de plantas de *Musa spp.* ('Grande naine' y 'Calcutta 4') inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se emplearon plantas de 'Calcutta 4' (*Musa AA*) (genotipo resistente) provenientes del Banco de Germoplasma del INIBAP (del inglés: *International Network for the Improvement of Banana and Plantain*) (ITC 0249) y plantas de 'Grande naine' (*Musa AAA*) (genotipo susceptible) provenientes del INIVIT (Instituto Nacional de Viandas Tropicales. Cuba).

Las plantas fueron propagadas mediante cultivo de tejidos (Orellana 1994) y aclimatizadas durante tres meses en casa de cultivo.

Se utilizaron plantas con aproximadamente 20 cm de altura y con más de tres hojas activas y se ubicaron en una casa de cultivo con luz solar, riego tres veces al día y una intensidad luminosa de aproximadamente  $3841 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en el período agosto-octubre.

### *Procesamiento estadístico*

El procesamiento estadístico de los datos de las variables estudiadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 18 para Windows.

### *Inoculación artificial y evaluación de los síntomas*

La preparación de la suspensión micelial de *M. fijiensis*, el proceso de inoculación artificial y la evaluación del desarrollo y evolución de los síntomas se llevó a cabo según lo descrito por Alvarado-Capó *et al.* (2003). Se empleó el aislado CCIBP-Mf83 de la Colección de Cultivos Microbianos del IBP.

### *Preparación del substrato y ensayo de actividad enzimática*

Para la toma de las muestras, se colectaron las primeras tres hojas de cinco plantas inoculadas y cinco plantas controles (sin

inocular), a las 2 horas, 3 y 6 días posteriores a la inoculación con *M. fijiensis* (tiempo 1, 2 y 3 respectivamente) y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Se emplearon tres réplicas por cada muestra, en ambos genotipos.

Se homogeneizó 1 g de tejido vegetal en nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo preenfriados. Se adicionaron 2 ml de solución tampón de Sodio-fosfato 0.1 M (pH 7.0), que contenía inhibidor de proteasa (*Protease Inhibitor Cocktail for General Use*, Sigma-Aldrich). El homogenizado fue centrifugado a 10 000 g durante 20 min, a 4°C y el sobrenadante (SN) fue usado como extracto enzimático para la determinación de la actividad quitinasa.

Se siguió el protocolo descrito por Velásquez y Hammerschmidt (2004) con pequeñas modificaciones. Se preparó una solución de agarosa al 1% (m/v) en solución de sodio fosfato (0.01 M, pH 5.5), se calentó hasta el punto de ebullición y se dejó enfriar por 12 minutos. Se agregó a 100 ml de la solución de agarosa, 1 ml de una solución de glicolquitina (Sigma) al 1% (m/v) en la solución de tampón sodio fosfato antes mencionada. La suspensión resultante fue homogeneizada y vertida en placas de Petri (15 cm de diámetro). Las placas se dejaron reposar hasta que la agarosa solidificara (20-25 min). Posteriormente, se abrieron pequeños orificios en el gel (3 mm diámetro) a una distancia de 1.5 cm. Los residuos de agarosa fueron removidos con la ayuda de una pipeta Pasteur de 5 ml de volumen. Se agregaron 5 µl de cada muestra (SN) en cada pocillo. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C en baño de agua. Después de la incubación, se agregaron 50 ml de una solución de Tris-HCl (0.5 M, pH 8.9) con 0.01% (m/v) de *Calcoflour brightener 28* (Sigma) y se incubó nuevamente durante 30 minutos en la oscuridad para parar la reacción enzimática y teñir el gel. Se lavó el gel dos veces con agua destilada y se dejó en la oscuridad toda la noche para el desarrollo del color. Se emplearon tres réplicas de cada muestra y se realizaron tres réplicas de cada gel.

Se preparó una curva patrón de quitinasa a partir de diluciones de quitinasa comercial

(Sigma) a las concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µM ml<sup>-1</sup> en solución tampón de sodio-fosfato (0.01 M, pH 7.0).

Las placas se fotografiaron en equipo (Bio-Rad Gel Doc 2000, cámara CCD. Bio-Rad.) y las imágenes se procesaron empleando el software (Quantity One) instalado al equipo antes mencionado. Se fijó el brillo (180 unidades) y el contraste (200 unidades). Se calculó el área del halo de actividad enzimática (zona oscura) para cada muestra y se expresó en mm<sup>2</sup>. La concentración de enzima en cada muestra se calculó a partir de la ecuación de la curva patrón de quitinasa.

Se compararon estadísticamente los valores de los dos genotipos analizados, en los diferentes tiempos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, previa comprobación de normalidad y heterogeneidad de varianzas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el ensayo realizado se detectó la presencia de actividad quitinasa en las muestras evaluadas. Se observó que los mayores halos de actividad (zonas oscuras) correspondían a las muestras de 'Calcutta 4' en los diferentes tiempos, respecto a las muestras de 'Grande naine' (Figura 1).

Específicamente, el mayor halo de actividad se detectó al tiempo 1 en la muestra de 'Calcutta 4' inoculado, al compararlo tanto con las muestras controles como con las de 'Grande naine' inoculado. Resultados similares fueron obtenidos por Velásquez y Hammerschmidt (2004), quienes crearon este método de detección de quitinasa y lo probaron en muestras de plantas de *Cucumis sativus* L. con Resistencia Sistémica Adquirida y plantas susceptibles, estos autores observaron que, en todos los casos, hubo un incremento en la actividad quitinasa en las plantas con resistencia respecto a las susceptibles.

En cada tiempo, los mayores valores de concentración de la enzima, correspondieron a las muestras del genotipo resistente y el mayor valor se observó a las dos horas después de la inoculación del patógeno (tiempo 1) (Figura 2).

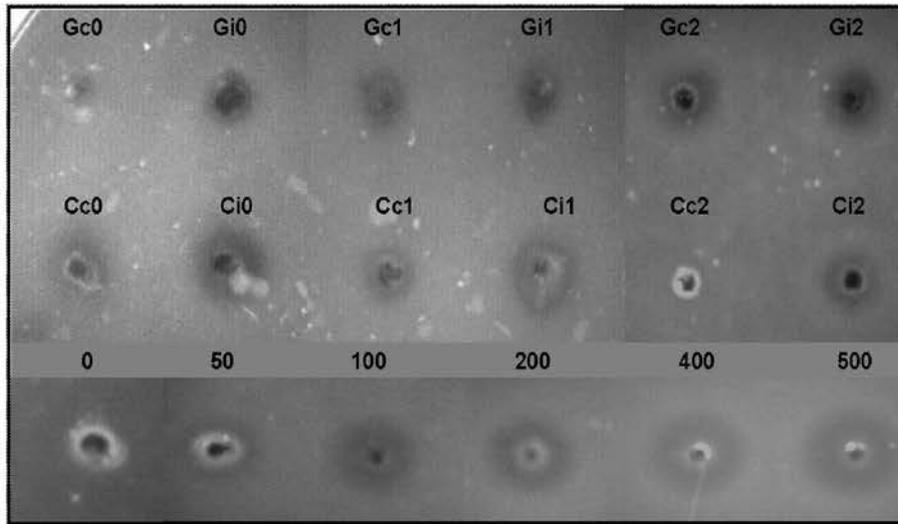


Figura 1. Detección de la actividad quitinasa en gel de agarosa de muestras de hojas de *Musa* spp. ('Grande naine' y 'Calcutta 4') inoculadas con *Mycospaherella fijiensis*. Gc: 'Grande naine' control, Gi: 'Grande naine' inoculado, Cc: 'Calcutta 4' control, Ci: 'Calcutta 4' inoculado. Tiempos: 2 horas (1), 3 (2) y 6 (3) días posteriores a la inoculación. Curva patrón de quitinasa: 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 (mU/ml).

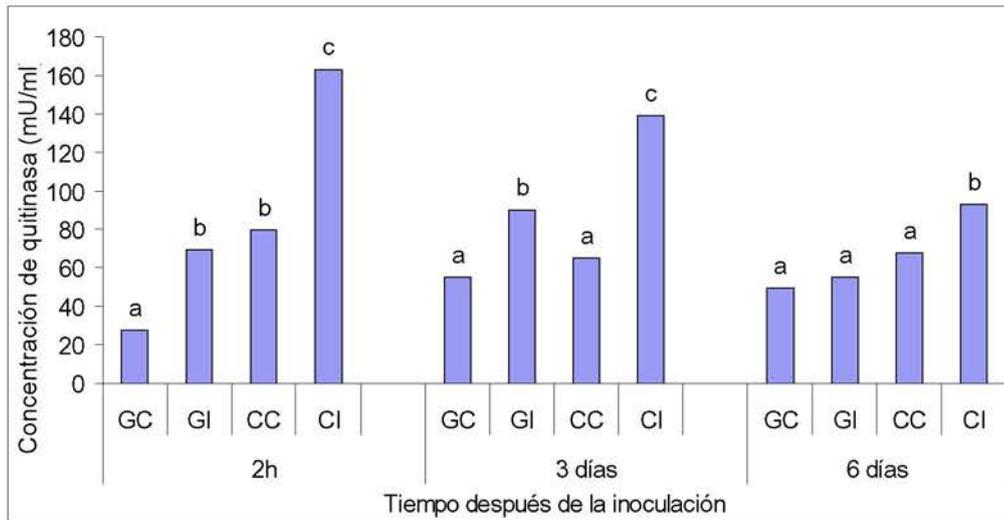


Figura 2. Concentración de quitinasa en gel de agarosa de muestras de hojas de *Musa* spp. ('Grande naine' y 'Calcutta 4') inoculadas con *Mycospaherella fijiensis* a diferentes tiempos después de la inoculación. GC: 'Grande naine' control, GI: 'Grande naine' inoculado, CC: 'Calcutta 4' control, CI: 'Calcutta 4' inoculado. Valores medios con letras desiguales en cada tiempo difieren por la prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0.05$ .

El papel de esta enzima en la respuesta de la plantas ante la inoculación del patógeno ha sido referida por varios autores y se ha demostrado además que el incremento de esta es significativamente mayor en plantas con algún tipo de resistencia al patógeno, respecto a plantas susceptibles (Radjacommare *et al.*, 2004; Viswanathan *et al.*, 2005; Elvira *et al.*, 2008).

Autores como Viswanathan *et al.* (2005) comprobaron el incremento diferencial entre plantas de *Saccharum* sp. con diferentes grados de resistencia a *Colletotrichum falcatum*, el cual fue siempre mayor en las plantas de mayor resistencia al patógeno.

En tal sentido, se conoce que las quitinasas de plantas que hidrolizan quitina, inhiben el

crecimiento fúngico y generan oligosacáridos de quitina que a su vez actúan como elicitores. En adición, una gran cantidad de quitinasas son inducidas ante el ataque por patógenos y algunas isoformas muestran actividad antifúngica *in vitro*. Por estas razones, se cree que esta enzima juega un papel principal en la defensa de la planta hospedera ante el patógeno (Ferreira *et al.*, 2006).

La quitina y el  $\beta$ -1,3-glucano son sintetizados simultáneamente en el extremo de las hifas de los hongos filamentosos (Theis y Stahl, 2004). Al respecto, una gran cantidad de estudios informan acerca de la acción sinérgica que existe entre las enzimas glucanasa y quitinasa, tanto *in vitro* como *in vivo* (Jach *et al.*, 1995; Stintzi *et al.*, 1993; Kasprzewska, 2003; Moore *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha aislado una quitinasa de 30.8 kDa con actividad antifúngica a partir de semillas de *Phaseolus mungo* (Wang *et al.*, 2005).

En el patosistema *Musa-M. fijiensis* el conocimiento sobre el papel de esta enzima en la interacción planta-patógeno es muy limitado, por lo que los resultados de este trabajo aportan nuevos conocimientos en el tema a la vez que validan el uso de esta técnica rápida y sencilla en los estudios enzimáticos en este importante patosistema.

## CONCLUSIONES

Se detectó y cuantificó la enzima quitinasa en hojas de plantas de los genotipos de *Musa* spp. ('Grande naine' y 'Calcutta 4') inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo. Los mayores valores de dicha enzima se observaron en las plantas inoculadas del genotipo resistente.

## REFERENCIAS

Alvarado-Capó, Y, Leiva M, Rodríguez MA, Acosta M, Cruz M, Portal, O, Kosky RG, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance by using mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. En: Jacome, L, Leproive P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (eds). pp 169-175. INIBAP, Montpellier

Arzanlou, M, Groenewald JZ, Fullerton RA, Abeln ECA, Carlier J, Zapater MF, Buddenhagen IW, Viljoen

A, Crous PW (2008) Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs of banana. *Persoonia* 20:19-37

Balint-Kurti, PJ, May GD, Churchill ACL (2001) Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 9-15

Broekaert, WF, Terras FRG, Y Cammue BPA (2000) Induced and performed antimicrobial proteins. En: Slusarenko, AJ, Fraser, RSS, Van Loon, LC (eds). *Mechanisms of resistance to plant diseases*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht

Casado-Vela, J, Sellas S, Martínez RB (2006) Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein. *Proteomics* 6:S196-206

Colditz, F, Krajinski F, Niehaus K (2007) Plant Proteomics Upon Fungal Attack. En: Šamaj, J y Thelen, J (eds.). *Plant Proteomics*. Chapter 18. Springer. Paris

Elvira, M, Molina M, Gilardi P, García-Luque I, Serra M (2008) Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L. plants. *Journal of Experimental Botany* 59 (6): 1253-1265

Ferreira, RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 5: 677-700

Ferreira, RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR (2006) Fungal pathogens: The battle for plant infection. *Crit Rev Plant Sci.* 25: 505-524

Gómez Lim, M, Gonzalez J, Ortiz J, Aguilar M, Sandoval J (2002) Generation of transgenic banana (cv. 'Grande naine') containing antifungal genes as a means to confer resistance to Black Sigatoka. En: Acorbat. *Memorias XV Reunión*. Realizada en Cartagena de Indias, Colombia. Octubre 27 a Noviembre 02. Medellín, Colombia

Grover, A, Gowthaman, R (2003) Strategies for development of fungus resistant transgenic plants. *Curr Sci* 84:330-340

Jach, G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal

- disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8: 97-109
- Kasprzewska, A (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cell Mol. Biol. Lett.* 8: 809-824
- Marín, DH, Romero RA, Guzmán M, Sutton TB (2003) Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis.* 87: 208-222
- Moore, K G, Price M S, Boston R S, Weissinger A K, Payne GA (2004) A chitinase from Tex6 maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 94:82-87
- Ortiz, E, Kaemmer D, Zhang H B, Muth J, Rodríguez M, Arias C, James A (2005) Construction and characterization of a plant transformation-competent BIBAC library of the black Sigatoka-resistant banana *Musa acuminata* cv. Tuu Gia (AA). *Theoretical and Applied Genetics* 110 (4): 706-713
- Portal, O (2008) Development of molecular tools to study the interaction between banana and *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of Black Leaf Streak Disease. PhD thesis. Ghent University, Belgium
- Radjacommare, R, Ramanathan A, Kandan A, Harish S, Thambidurai G, Sible GV, Ragupathi N, Samiyappan R (2004) PGPR mediates induction of pathogenesis-related (PR) proteins against the infection of blast pathogen in resistant and susceptible ragi [*Eleusine coracana* (L.) Gaertner] cultivars. *Plant and Soil* 266: 165-176
- Šafář, J, Noa JC, Vrána J, Bartoš J, Alkhirimova O, Sabau X, Šimková H, Lheureux F, Caruana ML, Dole J, Piffanelli P (2004) Creation of a BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musa balbisiana*) genome. *Genome* 47: 1182-1191
- Stintzi, A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Auffmann S, Eoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687-706
- Theis, T, Stahl U (2004) Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 437-455
- Tuzun, S, Somanchi A (2006) The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic resistance. En: Tuzun S, Bent E (eds) *Multigenic and induced systemic resistance in plants*, pp. 112-142. Springer. New York
- Velasquez, L, Hammerschmidt R (2004) Development of a method for the detection and quantification of total chitinase activity by digital analysis. *Journal of Microbiological Methods* 59: 7-14
- Vilarinhos, AD, Piffanelli P, Lagoda P, Thibivilliers S, Sabau X, Carreel F, D'Hont A (2003) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). *Theoretical and Applied Genetics* 106 (6): 1102-1106
- Viswanathan, R., Malathi P, Ramesh Sundar A, Aarthi S, Premkumari S, Padmanaban M (2005) Differential induction of chitinases and thaumatin-like proteins in sugarcane in response to infection by *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease. *Journal of Plant Diseases and Protection* 112 (5): 417-425
- Wang, S, Wu J, Rao P, Ng TB (2005) A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expr. Purif.* 40: 230-236

Recibido: 9-7-2011

Aceptado 9-1-2012