

## INDUCCIÓN DE DOS ENZIMAS PECTOLÍTICAS EN EL MODELO *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* - CLAVEL

## INDUCTION OF TWO PECTOLITIC ENZYMES DURING THE MODEL *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* - CARNATION

Liliana Gómez García\* y Sixta Tulia Martínez\*\*

Recibido: 14/03/05 – Aceptado: 27/06/05

### RESUMEN

Se estudió por ensayos *in vitro* la posible participación de las enzimas endopoligalacturonasa (PG) (EC.3.2.1.15) y pectato liasa (PL) (EC.4.2.2.2), consideradas factores de virulencia en el proceso de infección del clavel por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOD).

Los resultados muestran la inducción de la expresión de la enzima PG en presencia de los inductores artificiales, ácido poligalacturónico (APG) y pectina, y un nivel de expresión muy bajo en cultivos con pared celular (PC) de clavel de variedades resistente y susceptible. La enzima PL no presentó expresión en presencia de inductores artificiales (APG y pectina), mientras que en cultivos inducidos con pared celular de raíz presentó un alto nivel de expresión.

**Palabras clave:** poligalacturonasa, pectato liasa, enzimas pécticas, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

### ABSTRACT

The Polygalacturonase (PG; EC 3.2.1.15) and the Pectate lyase (PL; EC 4.2.2.2) are considered as factor of virulence. These enzymes were studied during the infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOD) on Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) using culture medium *in vitro*.

The results show the induction of the expression of the PG enzyme when the artificial inductors polygalacturonic acid (APG) and pectin are present. The level of expression was very low in culture with cellular wall (PC) of carnations of the resistant and susceptible varieties. The PL enzyme did not show expression in the presence of artificial inductors (APG and pectin) but in induced culture with root and cellular wall showed a high level of expression.

**Key words:** Polygalacturonase, pectate lyase, pectin enzymes, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

\* Correo electrónico: liliquim@hotmail.com

\*\* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.  
Correo electrónico: stmartinezp@unal.edu.co

## INTRODUCCIÓN

Las flores son un renglón muy importante en la economía colombiana ya que ocupan el segundo lugar dentro de las exportaciones no tradicionales. Una de las más importantes es el clavel, muy apetecido por su variedad de color.

La estabilidad de este producto se ve afectada por diversas enfermedades siendo una de las más importantes el marchitamiento vascular, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Esta enfermedad en el clavel infectado causa alteraciones en las funciones normales, inhibe el crecimiento y puede causar la muerte a la planta (1). El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* llegó a Colombia en el año de 1975 a través de una importación de esquejes de clavel contaminados y se propagó por casi todo el territorio nacional (1).

Todos los patógenos interactúan con la pared celular de las plantas, ésta constituye la barrera física entre el patógeno y el contenido interno de las células de las plantas; además, por su gran contenido de glucosa y polisacáridos, sirve como fuente nutricional para microorganismos y animales (2, 3, 4). Las primeras enzimas producidas por algunos hongos y bacterias para atacar y romper los polímeros estructurales de la pared y la lámina media de las células de la planta hospedera son las enzimas pécticas (1, 4). Entre éstas se encuentran la PG y la PL, enzimas de acción extracelular que degradan la pared celular del hospedero (5, 6). Estas dos enzimas se han propuesto como cruciales en la penetración y colonización de tejidos de la planta por algunos patógenos (4).

Se han realizado diversos estudios *in vivo* e *in vitro* con bacterias y hongos patógenos que afirman la participación de la PG en los procesos de infección a sus hospederos. Algunos organismos con los cuales se ha estudiado la enzima PG son *Rhizopus stolonifer* (7), *Erwinia carotovora* (8) y *Botrytis cinerea* (9). La participación de la enzima PL en procesos de infección se ha estudiado en *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Aspergillus* (10), *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici* (11), *Erwinia carotovora* (8, 12), entre otros.

Todos los estudios realizados hasta ahora concluyen que estas enzimas son indispensables para el desarrollo de los patógenos (5, 6). Con el estudio *in vitro* de las enzimas PG y PL producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* se contribuye al conocimiento de las enzimas que utiliza el patógeno en el proceso de infección, el cual servirá para proponer alternativas que disminuyan la virulencia del hongo y mejorar la producción del clavel (13).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Origen del material.** El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* se obtuvo a partir de una cepa raza 2, suministrada por la finca MG Consultores, perteneciente al Grupo Chía. Se mantuvo sembrado en medio PDA (25 g papa, 0,2 g dextrosa y 1,5 g agar en 100 ml de agua destilada). A partir de la cepa se preparó un cultivo monoespórico (14) y de allí se realizaron cultivos sucesivos cada 15 días en medio líquido (25% papa, 0,2% glucosa). Una vez sembrado, el hongo se incubó a temperatura ambiente.

Las variedades del clavel estándar utilizadas para la extracción de la pared

celular y la obtención del macerado de raíz fueron la variedad resistente (Lingt Pink Candy) y la variedad susceptible (Rayo di sol), proporcionadas por la finca MG Consultores. Se usaron 150 esquejes de clavel de cada variedad, a partir de éstos se aisló la raíz, se secó a temperatura ambiente y se procedió a obtener la pared celular (15) o la raíz macerada para usarlas como inductores. La inducción artificial se realizó con la sal sódica del ácido poligalacturónico (APG) y la pectina de cáscara de cítricos (Sigma).

**Cultivo *in vitro*.** La inducción de las enzimas PG y PL se llevó a cabo en erlenmeyers que contenían medio líquido con 25% de papa y 0,2% del inductor natural, o 0,1% de inductor artificial dependiendo el ensayo.

Adicionalmente, se preparó un control sin inductor. A los medios de cultivo se les inocularon 500  $\mu$ L de extracto del últi-

mo cultivo en crecimiento, con una densidad aproximada de  $3,2 \times 10^4$  conidias de FOD/mL (según conteo en la cámara de Neubauer).

El medio de cultivo proveniente de los ensayos se filtró a través de una gasa previamente pesada, se dializó contra agua durante 24 horas. Se tomaron datos de pH y crecimiento micelial (13).

### Determinación de la actividad enzimática para la PG y PL

Para determinar la inducción de actividad enzimática de las dos enzimas estudiadas en este trabajo se realizaron diferentes ensayos en presencia de inductores naturales, artificiales y este último con y sin glucosa. El esquema de trabajo se presenta en la Tabla 1.

Cada ensayo se realizó en cultivos *in vitro* por duplicado durante 8 días en los siguientes periodos de tiempo: 12, 36 horas

**Tabla 1.** Ensayos realizados con cultivos *in vitro* para determinar la inducción de las enzimas PG y PL

Ensayos		
Inductores artificiales	APG 0,1%	Con glucosa 0,2%
		Sin glucosa
	Pectina 0,1%	Con glucosa 0,2%
		Sin glucosa
Inductores naturales	Pared celular 0,2%	Var. resistente
		Var. susceptible
	Raíz macerada 0,2%	Var. resistente
		Var. susceptible

y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 días. Los ensayos con inductores naturales se hicieron con dos periodos adicionales de 9 y 10 días.

La actividad de la enzima PG se determinó cuantificando los azúcares reductores liberados por la acción de la enzima sobre el APG como sustrato según método de Somogyi (16). La absorbancia se leyó a 500 nm. La mezcla de reacción contenía 2,5 ml de solución Stock (NaCl 0,6 M, EDTA 7,5 mM, buffer acetato 75 mM, pH 5,4 y 0,3% APG) y 0,5 mL del extracto enzimático. La unidad de actividad de PG se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mol de grupos reductores por minuto bajo condiciones de trabajo (16).

La actividad de la enzima PL se determinó espectrofotométricamente a 232 nm, por la medición del incremento de absorbancia de los compuestos 4,5 insaturados formados como productos de reacción, según el método de Collmer (15), modificado por Konno (13, 16). La unidad de la actividad enzimática de PL se definió como la cantidad de enzima que forma 1  $\mu$ mol de compuesto 4,5-insaturado en un min según condiciones de trabajo (16).

Para determinar la actividad de PL en los ensayos con material vegetativo se utilizaron los parámetros reportados por Collmer (15) modificado por Konno (13, 16), los cuales fueron 0,5% de APG como sustrato, buffer de pH 8,5 y un tiempo de reacción de una hora.

#### **Determinación de las condiciones óptimas de reacción para PG y PL**

Los parámetros óptimos de actividad de las enzimas estudiadas se determinaron

con extractos correspondientes al día en el que se produjo mayor inducción.

**pH óptimo.** La PG estudiada en diferentes patógenos tiene un pH óptimo de actividad en la región ácida (7, 9, 10). El rango de pH seleccionado para este trabajo fue entre 3,5 y 6,8. Los buffer utilizados fueron biftalato de Na-K-HCl pH 3,5; acetato de sodio-ácido acético pH 4,0 a 5,5 y malato de sodio -NaOH pH 6,2 y 6,8. Las condiciones del ensayo fueron: 0,3% de APG como sustrato, tiempo de reacción de 2 horas y 37 °C de temperatura.

La enzima PL encontrada en diferentes hongos y bacterias actúa en condiciones básicas (10, 17). Por tanto, se utilizaron valores de pH entre 6,0 y 9,6, usando buffer fosfato para pH 6,0 y 6,6; buffer TRIS-HCl para pH 7,2 a 9,0 y buffer carbonato para pH 9,2 y 9,6. Las condiciones del ensayo fueron 0,2% de APG, el tiempo de reacción de 1 hora y 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub> (13, 16, 17).

**Tiempo óptimo de reacción.** Entre los tiempos reportados para la acción de la PG sobre el sustrato se encuentran 1 hora (11) y de 1 a 3 horas (4), lo que llevó a escoger tiempos de reacción entre 30 min hasta 3 horas con intervalos de 30 min. La determinación fue realizada con 0,3% de APG y el buffer con el pH óptimo encontrado.

Los tiempos de reacción para la actividad de PL fueron de 30 min a 3 horas con intervalos de 30 min. Las condiciones del ensayo fueron 0,2% de APG, 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub> y el pH óptimo encontrado.

**Concentración óptima de sustrato.** Para PG se ensayaron concentraciones de APG entre 0,1 y 0,5% (16, 18). Se utili-

zaron las condiciones óptimas obtenidas en los dos parámetros anteriores.

Para PL se usaron concentraciones de APG de 0,1 a 0,5% (16, 18). La concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue de 0,5 mM, pH y tiempo de reacción óptimos encontrados.

**Concentración óptima de iones calcio.** La enzima PL requiere para su actividad la presencia de un cofactor, el ión divalente  $\text{Ca}^{+2}$  (10); en cultivos de *Erwinia caratovora* ha presentado una concentración óptima de  $10^{-4}$  M de  $\text{Ca}^{+2}$  (12). Se ensayaron concentraciones entre el rango de  $10^{-3}$  M a  $10^{-5}$  M. Se utilizaron los parámetros óptimos encontrados para pH, tiempo de reacción y concentración de sustrato.

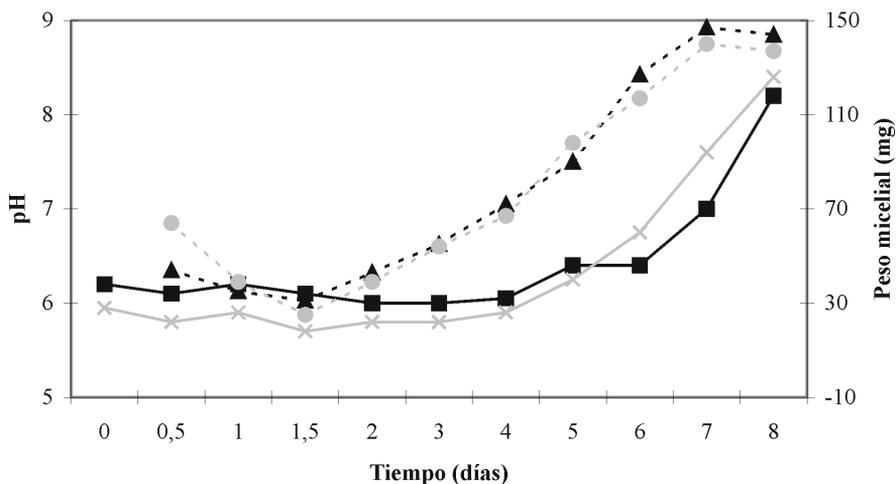
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conocimiento de la participación de enzimas pectolíticas en los procesos de infección de patógenos es importante para

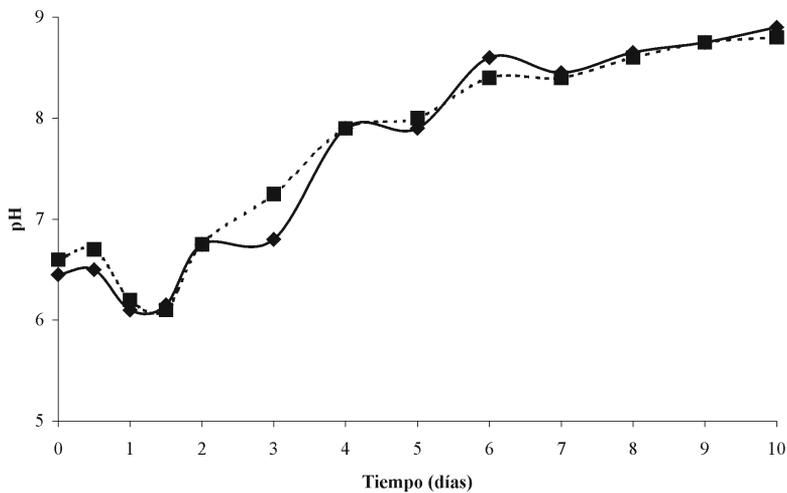
entender los mecanismos de patogenicidad. Entre las enzimas involucradas en estos procesos están la PG y la PL cuya participación en los mecanismos de invasión de diferentes patógenos, se ha comprobado, razón que motiva conocer su papel en el modelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

En los diferentes ensayos realizados se evaluó la evolución del crecimiento micelial del hongo FOD y el pH del cultivo. El crecimiento del hongo aumentó durante el ensayo como se esperaba, estabilizándose en el día séptimo, según se observa en la Gráfica 1.

La tendencia del crecimiento micelial y el pH en todos los ensayos realizados fue similar al presentado en la Gráfica 1. El pH del cultivo inicialmente era ácido y a medida que avanzaba el experimento el medio se basificó hasta llegar al final del ensayo a valores cercanos a pH 8,0 (Gráficas 1 y 2).



**Gráfica 1.** Variación del pH y crecimiento micelial en cultivos usados para la determinación de la actividad de la PG. Inductor APG 0,1%: variación de pH (—■—) y variación de peso seco (mg) (---▲---). Inductor Pectina 0,1%: variación de pH (—×—) y variación de peso seco (mg) (---●---).

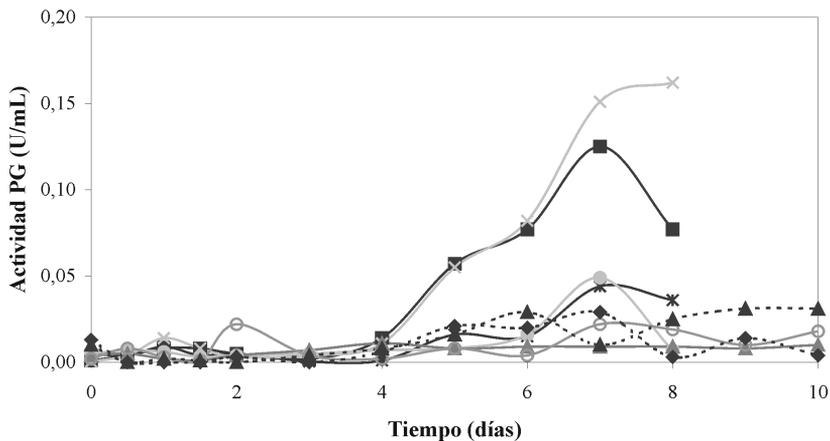


Gráfica 2. Evolución del pH en cultivos inducidos con pared celular usados para la determinación de la actividad de la PL, variedad resistente 0,2% (—◆—) y la variedad susceptible 0,2% (---■---).

### Determinación de la inducción de la actividad enzimática de la enzima PG

La inducción de la enzima PG se determinó en tres ensayos diferentes (Tabla 1) a los tiempos anotados en materiales y métodos.

La actividad presentada por la enzima PG en cultivos inducidos con pared celular de las variedades resistente y susceptible fue muy baja y se mantuvo así durante el ensayo (10 días) (Gráfica 3), con el fin de verificar estos resultados se repitió el ensayo en presencia de macerado de raíz, inductor semejante al encontrado por el



Gráfica 3. Actividad enzimática de poligalacturonasa en presencia de inductores artificiales y naturales. APG con glucosa (—◆—) y sin glucosa (—■—), Pectina con glucosa (—●—) y sin glucosa (—x—), Pared celular de raíz de clavel variedad resistente (—▲—) y variedad susceptible (—○—) y raíz macerada de clavel variedad resistente (---◆---) y variedad susceptible (---▲---).

patógeno cuando ataca a la planta y tampoco se presentó inducción lo que corrobora el resultado obtenido en presencia de pared celular. Este comportamiento es diferente al presentado con APG y pectina (Gráfica 3), en presencia de los cuales se notó inducción al séptimo día.

Nuestro resultado está de acuerdo con el obtenido por Guevara (2) quien reporta una mayor actividad para PG secretada por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. radices lycopersici* alrededor del séptimo día en cultivos inducidos con pectina.

Cuando al cultivo se le añadió glucosa se disminuyó la expresión de la enzima, proceso denominado regulación por catabolito, fenómeno que se presenta también en otras enzimas hidrolíticas secretadas por patógenos (19).

Los tiempos de inducción para la enzima PG varían en diferentes microorganismos. En *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (11) con ensayos realizados *in vitro*, la enzima PG se induce en presencia de pared celular y pectina a las 24 horas; en *Aspergillus nidulans* (4) la actividad aparece al primer día y presenta un máximo al segundo día, en presencia de APG como inductor.

Di Pietro y Roncero (19) reportan activación de la PG en presencia de APG con ensayos realizados *in vivo* a los 14 días posinoculación, una expresión tardía que hace pensar en la no participación de esta enzima en el proceso de penetración pero sí en el proceso de invasión, lo cual estaría también de acuerdo en la no inducción de PG en los ensayos realizados en presencia de pared celular y sí en los realizados utilizando como inductor APG.

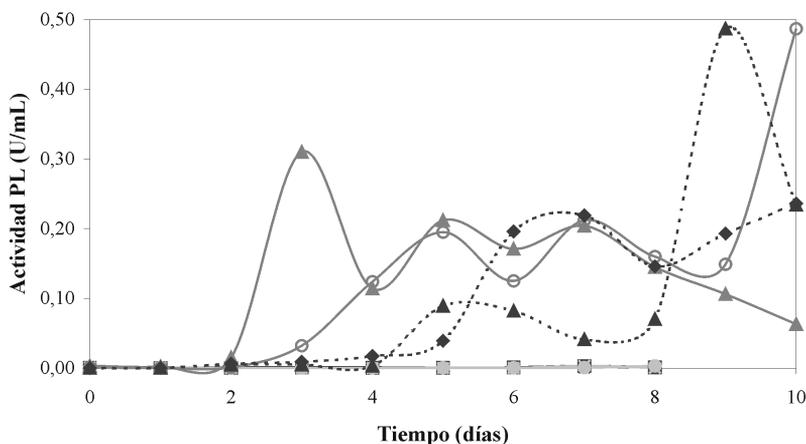
El pH del medio de cultivo al cual se expresa la mayor actividad de la PG (pH 8,0) no coincide con el valor de pH óptimo presentado por la enzima (pH 5,0), lo cual podría sugerir que la enzima se secreta al medio para luego actuar dentro de la planta donde tendría un pH adecuado para su acción.

### Determinación de la inducción de la actividad enzimática de la enzima PL

La enzima PL es inducida notoriamente por material vegetativo mientras que con los inductores artificiales, la actividad es casi nula.

La inducción de esta enzima presentó una gran variación en presencia de inductores naturales (Gráfica 4). Debido a la variabilidad en los tiempos de expresión para la enzima PL, esta en indujo a los 3 y 7 días del ensayo en presencia de pared celular y macerado de clavel de variedad resistente respectivamente, mientras que la mayor inducción fue a los 9 días para los ensayos con pared celular y 10 días para los ensayos con macerado de los cultivos inducidos con variedad susceptible. La enzima PL no se indujo en presencia de inductores artificiales. Se observa inducción más temprana en presencia de la variedad resistente. No se presentó un comportamiento semejante entre la pared celular y el macerado de raíz como para el caso de la PG.

La variedad resistente indujo mucho más la producción de la enzima PL, este comportamiento fue algo similar aunque posterior en el tiempo al observado en los ensayos donde se utilizó como inductor raíz macerada de clavel.



**Gráfica 4.** Actividad enzimática de pectato liasa con inductores artificiales y naturales. El APG con glucosa (—▲—) y sin glucosa (—■—), pectina con glucosa (—●—) y sin glucosa (—x—), pared celular de raíz de clavel variedad resistente (—▲—) y variedad susceptible (—○—) y raíz macerada de clavel variedad resistente (---◆---) y variedad susceptible (---▲---). La actividad con los inductores artificiales se superpone sobre el eje de las abscisas.

zima presentó mayor coincidencia entre los valores del pH de mayor expresión en el medio y los valores de pH básicos en los que presentó mayor actividad.

#### Condiciones óptimas de reacción para las enzimas PG y PL

Las condiciones óptimas de trabajo encontradas para cada enzima inducida en el medio de cultivo se reportan en la Tabla 2.

Bajo las condiciones de este trabajo, la enzima PL del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* se expresó en cultivos con inductores naturales, mientras la enzima PG no se expresa notoriamente, lo cual podría indicar que la PL participa en etapas tempranas del proceso de infección del clavel.

Es interesante ver cómo en los cultivos inducidos con variedad resistente esta enzima se expresó primero y en mayor can-

**Tabla 2.** Condiciones óptimas para la determinación de la actividad de las enzimas PG y PL secretadas por *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*

Parámetros óptimos	Enzima PG	Enzima PL	
		Resist.	Suscep.
pH	5,0	8,0	7,6
Tiempo reacción	150 min	150 min	60 min
Conc. sustrato	0,3 %	0,06 %	0,08 %
Conc. Ca <sup>2+</sup>	---	0,5 mM	0,08 mM

tividad que con la variedad susceptible; esto indicaría que la presencia de un hospedero resistente induce al hongo a producir mayor cantidad de la enzima. Sin embargo, se esperaba encontrar una expresión más temprana por lo cual deben existir otras enzimas pécticas que se expresan en tiempos más tempranos y participan en el proceso de infección.

La variabilidad de respuesta del hongo a la secreción de estas dos enzimas hidrolíticas en presencia de inductores artificiales y naturales, lo mismo que en presencia de pared celular de variedades resistentes y susceptibles muestran lo complejo del proceso de interacción hospedero-patógeno. La suma de las investigaciones realizadas alrededor de las enzimas que participan en procesos de patogenicidad contribuirá a descifrar los detalles de los mecanismos de expresión de éstas y, por lo tanto, las formas de regulación.

#### AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Universidad Nacional de Colombia y a Colciencias (proyecto código 1101-05-11440) la financiación del presente proyecto.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guardiola, M. L. (1996). Estudio sobre la interacción Huésped -Parásito del modelo tomate-*Fusarium oxysporum*. Tesis. Maestría en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá.
- Guevara, M. A. (1997). Regulación de síntesis de enzimas pécticas en *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Purificación y caracterización de Pectín y Pectato Liasa. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Compu-tense de Madrid. Madrid.
- Walton, J. D. (1994). Deconstructing the cell wall. Update on Plant-Microbe Interactions. *Plant Physiology*. **104**, 1113-1118.
- Dean, R. A.; Timberlake, W. E. (1989). Production of cell wall-degrading enzymes by *Aspergillus nidulans*: A model system for fungal pathogenesis of plant. *Plant Cell*. March **1**, 265-273.
- D'oviedo, R.; Mattei, B.; Roberti, S.; Bellincampi, D. (2004). Polygalacturanases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant pathogen interactions *Biochemica et Biophysica Acta*. **1696**, 237-244.
- Rogers, L. M.; Kim, Y.; Guo, W.; González, L.; Li, D.; Kolattukudy, P. E. (2000). Requirement for either a host-or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *PNAS*. **97**, 9813-9818.
- Lee, S. Ch.; West, Ch. A. (1981). Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, an elicitor of Casbene Synthetase activity in Castor Bean (*Ricinus Communis* L) seedling. *Plant Physiology*. **67**, 633-639.
- Collmer, A.; Keen, N. (1986). The role of pectic enzymes in plant patho-

- genesis. *Annual Review of Phytopathology*, **24**, 383-409.
9. Wood, W. A. (1988). Pectinesterase and polygalacturonase. *Methods in Enzymology*. **161**, 366-373.
  10. Ayers, W. A.; Papavizas, G. C.; Diem, A. F. (1966). Polygalacturonate trans-eliminase and Polygalacturonate production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopatology*. **56**, 1006-1011.
  11. Jones, T. M.; Anderson, A. J.; Albersheim, P. (1972). Host-Pathogen Interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f.sp. *licopersici*. *Physiological Plant Pathology*. **2**, 153-166.
  12. Tsuyumu, S. (1979). Self-Catabolite Repression of Pectate Lyase in *Erwinia carotovora*. *The Journal of Bacteriology*. **137**, 1035-1036.
  13. Gómez, L. (1999). "Estudio de la participación de la endopoligalacturonasa (3.2.1.15) y la endopectato liasa (4.2.2.2) en la infección del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Tesis de pregrado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá.
  14. Castro, M.; Chaparro, J. (1992). Caracterización de 2 razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* con base en análisis electroforético del ADN. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
  15. Lee, Ch. W. (1998). Estudio del eventual efecto biocontrol de *Rhizobium Leguminosarum* y lectina de raíz de arveja (*Pisum sativum*) sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
  16. Collmer, A.; Ried, J. L.; Mount, M. S. (1988). Assay methods for Pectic Enzymes. *Methods in Enzymology*. **161**, 329-335.
  17. Konno, H. (1988). Endopectate Lyase from *Erwinia aroideae*. *Methods in Enzymology*. **161**, 367-373.
  18. Cervone, F.; Hahn, M. G.; De Lorenzo, G.; Darvill, A.; Albersheim, P. (1989). Host-Pathogen Interactions. XXXIII. A Plant Protein converts a Fungal Pathogenesis Factor into an Elicitor of Plant Defense Responses. *Plant Physiology*. **90**, 542-548.
  19. Di Pietro, A.; Roncero, M. I. (1996). Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: Purification, characterization and production during infection of tomato plants. *Phytopatology*. **86**, 1324-1330.