

Comportamiento de enzimas relacionadas con la defensa en dos cultivares de frijol común parasitados por *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood



Behavior of defense-related enzymes in two common bean <http://opn.to/a/32ozZ> cultivars parasitized by *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood

Yailen Arias-Vargas ^{1*}, Ivonne González-Marquetti ¹, Susana Gorrita-Ramírez ¹, Ileana Miranda-Cabrera ², Dainé Hernández-Ochandía ², Belkis Peteira Delgado-Oramas ¹

¹Grupo de Fitopatología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Grupo de Plagas Agrícolas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del estudio fue establecer el comportamiento de cuatro enzimas relacionadas con la defensa en los cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) BAT-306 y Triunfo-70 parasitados por *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. Se determinaron las actividades de los sistemas enzimáticos Peroxidasa (PO), Fenilalanina amonio liasa (PAL), Quitinasa y Glucanasa, así como las isoenzimas PO. Las semillas de ambos cultivares se sembraron en una mezcla de suelo y abono orgánico en proporción 3:1 y se inocularon con 2000 juveniles de segundo estadio (J₂) a los siete días de germinadas. Para todos los análisis se tomaron muestras a los 1; 3; 5 y 7 días después de la inoculación y los resultados se compararon a través de un Análisis de Varianza y la prueba de Rangos Múltiples de Duncan, usando el programa InfoStat. Todos los sistemas estudiados mostraron inducción en ambos cultivares. En 'Triunfo-70', cultivar resistente al nematodo, se indujeron aumentos considerables en los niveles de actividad de todos los sistemas enzimáticos y, en algunos, estos incrementos fueron más sostenidos en el tiempo, de mayor magnitud o se produjeron más tempranamente que en el cultivar BAT-306 (susceptible al nematodo).

Palabras clave: Fenilalanina amonio liasa, Glucanasa, Peroxidasa, *Phaseolus vulgaris*, Quitinasa.

ABSTRACT: The objective of the study was to establish the behavior of four defense-related enzymes in the common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) BAT-306 and Triunfo-70 parasitized by *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. The activity of the enzymatic systems peroxidase (PO), phenylalanine ammonia lyase (PAL), chitinase, and glucanase, as well as the PO isoenzymes were determined. The seeds of both cultivars were sown in a mixture of soil and organic matter in a 3:1 ratio and inoculated with 2000 juveniles (J₂) 7 days after germination. For all the analyzes, samples were taken at 1, 3, 5, and 7 days after the inoculation, and the results were compared by an analysis of variance and Duncan's multiple range test, using the InfoStat program. All the systems studied showed induction in both cultivars. In the cultivar Triunfo-70, resistant to the nematode, considerable increases in the activity levels of all the enzymatic systems were induced, and in some of them, these activity increases were more sustained in time, of greater magnitude, or occurred earlier than in the susceptible cultivar BAT-306.

Key words: Chitinase, Glucanase, *Phaseolus vulgaris*, Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase.

*Autor para correspondencia: Yailen Arias-Vargas. E-mail: yailenav@censa.edu.cu

Recibido: 06/07/2018

Aceptado: 09/08/2018

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se cultiva en diversas partes del mundo, pues posee importancia socioeconómica, al constituir un alimento básico vinculado a la seguridad alimentaria de numerosas poblaciones, ser fuente de trabajo y rubro de exportación; se considera una fuente principal de proteínas en la dieta humana en aquellos países donde el consumo de proteína animal es limitado (1,2,3).

En Cuba, el frijol común representa un componente básico de la dieta diaria y se consume, fundamentalmente, en forma de potaje, arroz con grí y moros y cristianos. Este grano goza de gran preferencia con relación a otros alimentos similares, por constituir una rica fuente de hierro y proteínas (4). En el año 2015, se destinaron 30 485 ha para el cultivo del frijol que han contribuido al incremento de su producción en los últimos cinco años. Sin embargo, *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood influye de forma negativa en los rendimientos de este cultivo (5).

Los nematodos agalleros (*Meloidogyne* spp.) representan factores limitantes de la producción de frijol común a nivel mundial (6) y en Cuba, aunque no se realizaron estudios de daños y pérdidas en condiciones de producción, se sabe que el nematodo agallero *M. incognita* afecta de forma considerable al cultivar 'Cuba Cueto 25-9' de amplia extensión en el país (7).

El manejo de esta plaga se realiza combinando varias tácticas, entre las que se destaca el uso de cultivares resistentes. Esta alternativa constituye una forma más efectiva, económica y ambientalmente segura (8). Sin embargo, en muchas ocasiones no se cuenta con estos cultivares o con suficiente información sobre su comportamiento frente a nematodos formadores de agallas (5).

El uso de marcadores enzimáticos permite conocer aspectos relacionados con la resistencia de las plantas y el efecto de ciertos patógenos sobre el metabolismo de las mismas, a nivel bioquímico (9). Entre los sistemas enzimáticos que más se emplean con este fin se encuentran las Peroxidasas (PO), Fenilalanina amonio liasas (PAL), Quitinasas y β -1,3-Glucanasas (10,11).

En la actualidad, se conoce que los cultivares 'BAT-306' y 'Triunfo-70', utilizados con frecuencia en Cuba, se comportan como susceptible y resistente, respectivamente, frente a *Meloidogyne incognita* (5). No obstante, no existen informes sobre su comportamiento desde el punto de vista bioquímico. El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento de los cultivares de frijol BAT-306 y Triunfo-70 frente a *Meloidogyne incognita* utilizando marcadores enzimáticos relacionados con la defensa de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en los aisladores biológicos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) ($25\pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa entre el 80 y el 85 % y fotoperiodo natural). Las semillas de ambos cultivares se sembraron en cajuelas que contenían una mezcla de suelo y materia orgánica en proporción 3:1. A los siete días de germinadas (15 cm de longitud y al menos dos hojas verdaderas) se inocularon con 2000 juveniles de segundo estadio (J_2), obtenidos a partir de una población pura de *Meloidogyne incognita*, utilizando el método de Baermann modificado (12) y que permite recuperar solo juveniles activos. Como controles se utilizaron plantas sin inocular.

Se realizaron la determinación de actividad enzimática específica Peroxidasa (PO), Fenilalanina amonio liasa (PAL), Quitinasa y Glucanasa, así como la detección de isoenzimas PO según métodos descritos por Peteira *et al.* (13). Para todos los análisis se tomaron muestras foliares a los 1; 3; 5; y 7 días después de la inoculación y se realizaron tres réplicas y tres repeticiones para cada tratamiento (planta sin inocular y planta inoculada con el nematodo para cada cultivar). Los datos se compararon a través de un Análisis de Varianza y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$) usando el programa InfoStat versión 2017 (14).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los sistemas enzimáticos analizados, los tratamientos inoculados mostraron niveles superiores de actividad en comparación con sus controles, lo que evidencia la inducción de estas

enzimas cuando la planta se encuentra en presencia del nematodo.

El cultivar 'BAT-306' alcanzó los mayores valores de actividad PO; sin embargo, 'Triunfo-70' mostró niveles elevados de actividad de forma más prolongada en el tiempo. En la actividad PAL se destacó el cultivar 'Triunfo-70', pues alcanzó, de forma más rápida, el mayor valor de actividad enzimática detectado durante la dinámica, mientras que 'BAT-306' solo mostró un ligero aumento de la actividad en el tiempo. Los dos cultivares tuvieron comportamientos similares en cuanto a la enzima Quitinasa, alcanzaron los mayores niveles de actividad a los tres días. No obstante, 'Triunfo-70' aumentó en dos veces su actividad y 'BAT-306' solo lo hizo una vez. En la actividad Glucanasa, a diferencia del resto de las actividades enzimáticas analizadas, los valores máximos de actividad para ambos cultivares aparecen al quinto día posterior a la inoculación. En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de actividad en los cultivares para este momento; no obstante,

'Triunfo-70' fue el primero en alcanzar niveles elevados de actividad enzimática (tercer día).

Desde los momentos iniciales, en 'Triunfo-70' se indujeron aumentos considerables en los niveles de actividad de todos los sistemas enzimáticos y, en algunos, estos incrementos estuvieron más sostenidos en el tiempo o se produjeron más tempranamente que en el cultivar 'BAT-306'. (Figura 1)

El tiempo requerido para activar los mecanismos de defensa es importante para la supresión de la invasión por los patógenos y explica, en parte, el hecho de que las plantas se comporten como resistentes o susceptibles frente a los mismos. La inducción temprana de actividad enzimática y altos niveles de expresión de las enzimas influyen positivamente en la disminución de la severidad de la infección provocada por los patógenos (15,16,17).

Los resultados del presente estudio pudieran ser la causa por la cual el cultivar 'Triunfo-70' se comporta como pobre hospedante frente a *Meloidogyne incognita* (5). Las enzimas analizadas están involucradas en diferentes

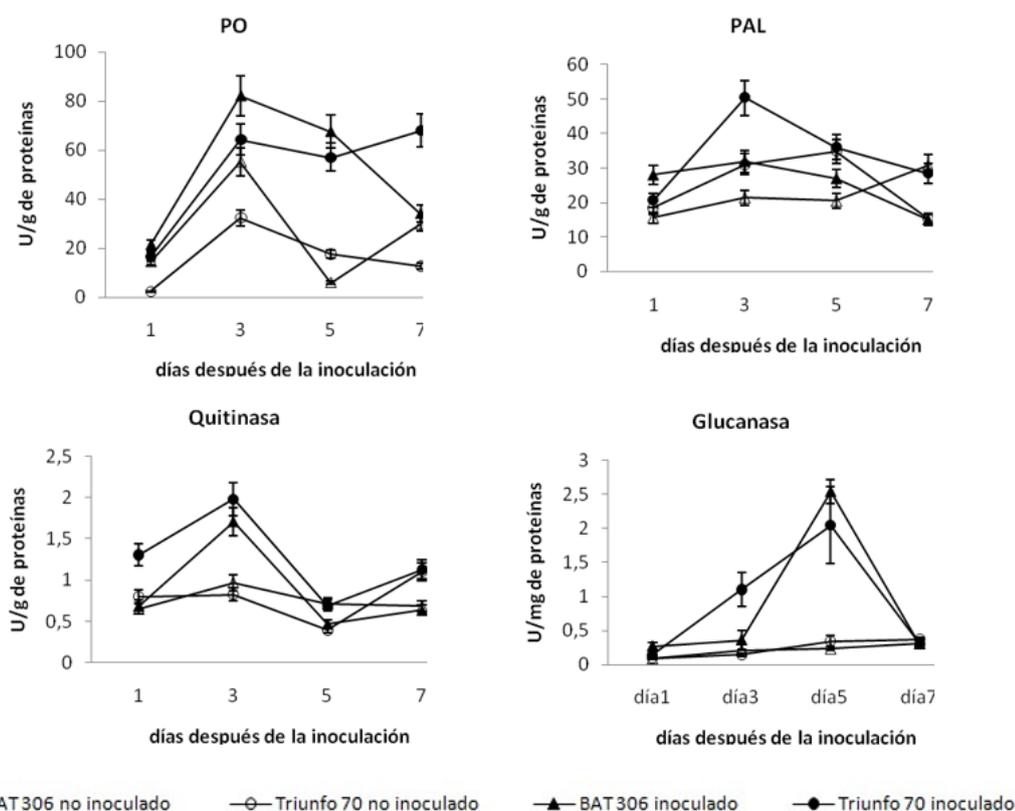


FIGURA 1. Efecto de *Meloidogyne incognita* en los mecanismos de defensa en los genotipos de frijol estudiados. Los genotipos se compararon entre ellos y con sus respectivos controles. / *Effect of Meloidogyne incognita on the defense mechanisms in the bean genotypes studied. The genotypes were compared among them and with their respective controls.*

respuestas de defensa. Entre estas respuestas se encuentran: el reforzamiento de las paredes celulares mediante la formación de lignina y suberina, el efecto antinutritivo de las plantas (como resultado de la generación de sustancias citotóxicas para los patógenos), la inhibición de las enzimas hidrolíticas que estos emplean para la infección y el establecimiento y la desintegración de las células hospedantes. También participan en otros procesos como la síntesis de fenilpropanoides, compuestos que son necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, y de compuestos relacionados con la defensa de las mismas, como son los compuestos fenólicos (10,18).

Durante el análisis de las isoenzimas PO se detectaron cinco isoformas en total, de las cuales tres fueron comunes para todos los tratamientos. Las mismas mostraron menor intensidad en los controles, lo que se corresponde con los niveles de actividad enzimática detectada. En los tratamientos que expresaron las cinco isoformas, se observó el mismo patrón de bandas, aunque existieron diferencias en la intensidad. Se destacó el cultivar 'BAT-306' con bandas más intensas, muy similar a los resultados obtenidos para la

determinación de actividad enzimática en solución. (Figura 2)

Se informaron con anterioridad resultados variables relacionados con el número de isoenzimas PO en frijol y detectaron 3; 4 o 5 isoformas. Esto ha estado en correspondencia con la parte de la planta analizada y con el tipo de estrés al que se sometieron las mismas. En todos los casos existieron diferencias entre los tratamientos y sus controles, ya sea en cuanto a la intensidad de las bandas o al número de isoformas detectadas (19,20,21).

En general, 'Triunfo-70' mostró los mejores resultados. Teniendo en cuenta la función que estos sistemas enzimáticos cumplen en los mecanismos de defensa de las plantas, se pudiera plantear que este cultivar se encuentra mejor preparado, desde el punto de vista bioquímico, para enfrentar el ataque de *Meloidogyne incognita*. Este resultado corrobora lo obtenido anteriormente por Hernández *et al.* (5) y constituye un elemento a tener en cuenta, tanto para los programas de mejoramiento como para los sistemas de producción del cultivo del frijol en Cuba.

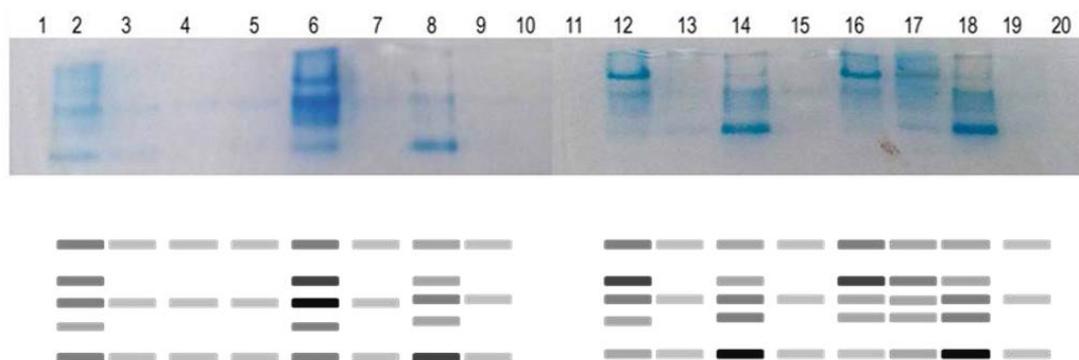


FIGURA 2. Gel de electroforesis y zimograma para las isoenzimas PO en los genotipos de frijol estudiados. Líneas 1, 10, 11 y 20: Agua; 2: BAT-306 inoculada día 1; 3: BAT-306 no inoculada día 1; 4: Triunfo-70 inoculada día 1; 5: Triunfo-70 no inoculada día 1; 6: BAT-306 inoculada día 3; 7: BAT-306 no inoculada día 3; 8: Triunfo-70 inoculada día 3; 9: Triunfo-70 no inoculada día 3; 12: BAT-306 inoculada día 5; 13: BAT-306 no inoculada día 5; 14: Triunfo-70 inoculada día 5; 15: Triunfo-70 no inoculada día 5; 16: BAT-306 inoculada día 7; 17: BAT-306 no inoculada día 7; 18: Triunfo-70 inoculada día 7; 19: Triunfo-70 no inoculada día 7 / *Gel electrophoresis and zymogram for the PO isoenzymes in the bean genotypes studied. Lane 1; 10, 11 and 20: Water; 2: BAT-306 inoculated on day 1; 3: BAT-306 not inoculated on day 1; 4: Triumph-70 inoculated on day 1; 5: Triumph-70 not inoculated on day 1; 6: BAT-306 inoculated on day 3; 7: BAT-306 not inoculated on day 3; 8: Triumph-70 inoculated on day 3; 9: Triumph-70 not inoculated on day 3; 12: BAT-306 inoculated on day 5; 13: BAT-306 not inoculated on day 5; 14: Triumph-70 inoculated on day 5; 15: Triumph-70 not inoculated on day 5; 16: BAT-306 inoculated on day 7; 17: BAT-306 not inoculated on day 7; 18: Triumph-70 inoculated day on7; 19: Triumph-70 not inoculated on day 7.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto “Uso eficiente de genotipos de cultivos de valor estratégico y su respuesta ante especies de *Meloidogyne*”, financiado por el Programa Nacional de Salud Animal y Vegetal del Ministerio de la Agricultura, Cuba

REFERENCIAS

1. Santini L, Monhoz CF, Ferreira MB Jr, Mendes MB, Massayuki MI, Carneiro MLV. Host transcriptional profiling at early and later stage of the compatible interaction between *Phaseolus vulgaris* and *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*. 2016; 106(3):282-294.
2. Sharf R, Hisamuddin Abbasi, Akhtar A. Management of root-knot disease in *Phaseolus vulgaris* using potassium fertilizer and biocontrol agents. *J Plant Pathol Microb*. 2014; 5: 242. doi:10.4172/2157-7471.1000242.
3. FAOSTAT 2017. Disponible en: Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> . Fecha de consulta: 6 de julio de 2018.
4. Sabina LR (editor). La cadena de valor del frijol común en Cuba. 1ra edición, La Habana, Cuba. 2016. ISBN: 978-959-296-045-9
5. Hernández DO, Rodríguez MGH, Miranda IC, Hernández HG, Holgado R. Reacción de los genotipos BAT-306 y Triunfo-70 de *Phaseolus vulgaris* L. a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Rev. Protección Veg*. 2016; 31(3): 224-227.
6. Sikora RA, Greco N, Flávo JVS. Nematode Parasites of Food Legumes. En *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Pp. 259-318. 2nd Edition (editores M. Luc, R.A. Sikora, J. Bridge) CAB International. 2005
7. Hernández D, Rodríguez MG, Miranda I, Moreno E, Castro I, Peteira B, et al. Reproducción y efecto nocivo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en *Phaseolus vulgaris* L. ?Cuba-Cueto-25-9'. *Rev. Protección Veg*. 2018; 33(2):1-6.
8. Bozbuga R, Yildiz HD, Akhoundnejad Y, Imren M, Toktay H, Bortecine EK. Identification of common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes having resistance against root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Legume Research*. 2015; 38 (5):669-674.
9. Azofeifa-Delgado A. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 2006; 17(2):221-242.
10. Flores-Torres LM, Flores-Olivas A, Ochoa-Fuentes YM, López-Arroyo JI, Olalde-Portugal V, Benavides-Mendoza A, et al. Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2017; 35: 314-325.
11. Oliveira J, Barreto A, Vasconcelos I, Eloy Y, Gondim D, Fernández C, et al. Role of antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and PR-proteins in the compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Plant Physiol Pathol*. 2014; 2:3.
12. Pitcher R, Flegg J. An improved final separation sieve for the extraction of plant-parasitic nematodes from soil debris. *Nematologica*. 1968; 14:123-127.
13. Peteira B, Dueñas F, Arias Y, Martínez Y, Pino O. Caracterización de materiales promisorios de tomate obtenidos en el programa de mejoramiento para la resistencia al TYLCV. *Fitopatología*. 2008; 43(3): 105-119.
14. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
15. Moghbeli E, Nemati SH, Aroiee H, Olfati HA. Evaluation of resistance, enzymatic response, and phenolic compounds in roots of cucumber hybrids to *Fusarium oxysporum* F. SP. *radicis cucumerinum*. *Journal of Horticultural Research*. 2017; 25(1): 117-124.

16. Liu Hong-xia, Xin Zhi-yong, Zhang Zeng-Yan. Changes in activities of antioxidant-related enzymes in leaves of resistant and susceptible wheat inoculated with *Rhizoctonia cerealis*. Agricultural Sciences in China. 2011; 10(4): 526-533.
17. Karthikeyan M, Radhika K, Mathiyazhagan S, Bhaskaran R, Samiyappan R, Velazhahan R. Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. Braz. J. Plant Physiol. 2006; 18(3):367-377.
18. Matos MT, Díaz MS, Samaniego LMF, Cortegaza LA, Pérez JRM, Pellón YG, et al. Expression of the peroxidase enzyme in hybrid *Saccharum* sp. plants inoculated with *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson). Pastos y Forrajes. 2017; 40(3): 181-186.
19. Padilha ITD, Troyjack C, Aisenberg GR, Koch F, Jardel VS, Pimentel JR; et al. Effect of temperature on bean seed germination: vigor and isozyme expression. AJAR. 2016; 1(5): 0001-0009.
20. Blois AV, da Silva AA, Suárez CIC, Deuner C, Nogueira VS, Ongaratto T; et al. Isoenzyme Expression in bean seed germination treated with Thiamethoxam with and without drought stress. American Journal of Plant Sciences. 2015; 6: 3157-3163.
21. Nowogórska A y Patykowski J. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection. Acta Physiol Plant. 2015; 37:1725.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.