

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS IMPLICADAS EN LA VIRULENCIA DE CEPAS DE *Pectobacterium carotovorum* SUBSP. *carotovorum* Y *Dickeya chrysanthemi* AISLADAS DE PAPA

Yuliet Franco Cardoza y Marusia Stefanova Nalimova

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 N°. 514 e/ 5a B y 5a F, Playa, Ciudad de la Habana. Cuba. CP 11600

Dirección de contacto: yfranco@inisav.cu.

ABSTRACT

Determination of enzymatic activities implicated in the virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya chrysanthemi* isolated from potato

Key words: *Solanum tuberosum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi*, extracellular enzymes, virulence.

The plant pathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya chrysanthemi* can cause severe economic damage to potato and other plant crops. Progression of the disease requires the action of extracellular enzymes produced by these bacteria that degrade the cell walls of host plants. The activities of pectate lyase, polygalacturonase, cellulase and protease from four strains of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and four strains of *D. chrysanthemi* were determined *in vitro*. The highest maceration ability on potato tubers of Spunta cultivar were found for Q35, Ms11, B13 of the latter species, E505, E1003 and Alq41 of *carotovorum* while E1105 and Art41 belonging to the first and the second species respectively were less virulent. For *D. chrysanthemi* the elevated virulence was related with a high pectate lyase and cellulase activities ranging from 2.4 to 4.6 U and 0.24 to 0.3 U, respectively. In the case of subspecies *carotovorum* the high level of virulence was associated with a high polygalacturonase activity between 1.1 and 1.7

RESUMEN

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi*, enzimas extracelulares, virulencia.

Las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* pueden causar daños severos en papa y varios cultivos. El desarrollo de la enfermedad se debe a la acción de enzimas extracelulares producidas por estas especies, que degradan la pared celular de las plantas hospedantes. En este trabajo se analizó la actividad de las enzimas pectato liasa, poligalacturonasa, celulasa y proteasa en condiciones *in vitro* para cuatro cepas de *P. c.* subsp. *carotovorum* y cuatro de *D. chrysanthemi*. Q35, Ms11, B13 de esta última especie y E505, E1003, Alq41 de la otra presentan un comportamiento muy virulento en tubérculos de papa de la variedad Spunta mientras que E1105 y Art41 de *D. chrysanthemi* y *P. c.* subsp. *carotovorum* respectivamente, muestran menor virulencia. Para la especie *D. chrysanthemi* la mayor virulencia fue vinculada con una elevada actividad pectato liasa y celulasa con valores entre 2,4 y 4,6 U para la primera y de 0,24 a 0,3 U para la segunda; mientras que para la subespecie *P. c.* subsp. *carotovorum* se relacionó con una alta actividad poligalacturonasa, entre 1,1 y 1,7 U. La mayor actividad proteasa, con halos de hidrólisis de la gelatina superiores a 18 mm, correspondió a Ms11 y Q35 de *D. chrysanthemi*.

U. The highest protease activity with gelatine hydrolysis halos above 18 mm, corresponded to Ms11 and Q35. For the rest of the strains, the values were similar, except for E1105 where this enzymatic activity was not detected.

Para el resto de las cepas, los valores fueron similares, con la excepción de E1105, de esta misma especie, en la que no fue detectada esta actividad enzimática

INTRODUCCIÓN

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (= *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Jones 1901) y *Dickeya chrysanthemi* (= *Erwinia chrysanthemi* Burkholder, McFadden & Dimock 1953) tienen una distribución mundial y se consideran las bacterias patógenas de mayor importancia en el cultivo de la papa desde el punto de vista comercial. Estas especies causan pudriciones blandas en los tubérculos y pie negro en los tallos de papa, y ocasionan como consecuencia grandes pérdidas que han sido estimadas entre 50 y 100 millones de dólares anuales a nivel mundial (Benelli *et al.*, 2004; ; Duarte *et al.*, 2004, Burr *et al.*, 2006). El desarrollo de la enfermedad se debe a la acción de enzimas extracelulares producidas por estas bacterias como pectato liasa, poligalacturonasa, celulasa y proteasa, que degradan los componentes de la pared celular de las plantas, lo cual conlleva a la maceración de los tejidos y la liberación de nutrientes para el crecimiento bacteriano (Py *et al.*, 1998; Toth *et al.*, 2003). La actividad de estas enzimas, principalmente de las pectato liasas, ha sido correlacionada con la patogenicidad y la virulencia de estas bacterias fitopatógenas (Matsumoto *et al.*, 2003).

La vía más importante de transmisión de la enfermedad es a través de los tubérculos contaminados donde estas especies pectolíticas están presentes de forma latente en la superficie o en las lenticelas (Scott *et al.*, 1996). Las condiciones ambientales de humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno ejercen una gran influencia tanto en la aparición de la enfermedad como en la extensión del daño causado. La temperatura es un factor principal y su nivel puede determinar cuál organismo predomina en una lesión aunque estén presentes en igual

número (Pérombelom, 2002; Smadja *et al.*, 2004). El exceso de agua también es esencial pues permite que las células bacterianas se muevan más fácilmente a través del tejido de la planta. Además conlleva a una disminución en la disponibilidad de oxígeno, lo cual crea un ambiente anaeróbico dentro de la planta y limita sus defensas dependientes de oxígeno (Toth *et al.*, 2003).

Durante las campañas de papa 2002-2003; 2003-2004 y 2004-2005 se produjeron notables afectaciones en papa importada para semilla y en condiciones de campo en la provincia Habana, Cuba. De diferentes muestras de plantas y tubérculos se aislaron cepas bacterianas que fueron identificadas como *P. c.* subsp. *carotovorum* y *D. chrysanthemi*. Estudios de caracterización de estas cepas realizados por Franco (2008) mostraron que aunque todas eran patógenas existían diferencias en su virulencia pues algunas fueron capaces de ocasionar mermas superiores a 14 % en el peso de los tubérculos mientras otras sólo provocaron reducciones entre 4 y 8 %. El objetivo de este trabajo fue analizar, en condiciones *in vitro*, las actividades pectato liasa, poligalacturonasa, celulasa y proteasa implicadas en el proceso patológico para cepas seleccionadas, algunas que presentaron un comportamiento muy virulento y otras que resultaron poco virulentas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se emplearon cuatro cepas de *P. c.* subsp. *carotovorum* y cuatro de *D. chrysanthemi* aisladas de papa y seleccionadas por su comportamiento en el test de maceración de tubérculos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas de *P. c. subsp. carotovorum* y *D. chrysanthemi* empleadas en el estudio.**Table 1. *P. c. subsp. carotovorum* and *D. chrysanthemi* strains evaluated in the study.**

Cepas	Procedencia	Parte afectada	Virulencia
<i>P. c. subsp. carotovorum</i>			
Art41	Alquizar	Tallo	Muy Virulento
E1003	Artemisa	Tallo	Poco virulento
E505	Holanda	Tubérculo	Muy Virulento
	Batabanó	Hoja	Muy Virulento
<i>D. chrysanthemi</i>			
Q35	Quivicán	Tallo	Muy Virulento
B13	Batabanó	Tallo	Muy Virulento
Ms11	Melena del Sur	Tubérculo	Muy Virulento
E1105	Quivicán	Hoja	Poco virulento

Determinación y cuantificación de enzimas extracelulares

Condiciones de cultivo y obtención de los sobrenadantes

El cultivo de las bacterias se llevó a cabo en frascos Erlenmeyer de 250 mL que contenían 45 mL de medio líquido descrito por Smadja *et al.*, (2004) y 0,4% de ácido poligalacturónico (PGA) obtenido en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) a partir de cáscara de lima persa mediante un procedimiento patentado por Cabrera *et al.*, (2003). Los cultivos se mantuvieron en agitación a 100 r·min⁻¹ en zaranda recíprocante (Karl Kolb, Germany) y una temperatura de 28 ° C durante 24 horas. La estimación del crecimiento se realizó mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 600 nm en espectrofotómetro GENESYS 10 UV. Para cada cepa se realizaron dos cultivos independientes.

Para la obtención de los sobrenadantes, las muestras fueron colectadas de cada cultivo a las 24 horas por centrifugación a 12000 r·min⁻¹ durante 10 min (rotor Eppendorf, F45-30-11). Los sobrenadantes se filtraron a través de filtro Millipore de 0,22 μ m (Millipore Cop., Bedford, Mass.) y se congelaron a -20 ° C hasta su uso (Smadja *et al.*, 2004).

Cuantificación de actividad pectato liasa

La actividad pectato liasa se determinó monitoreando la formación de productos 4,5 insaturados en espectrofotómetro a 235 nm con el empleo de ácido poligalacturónico al 1% como sustrato (Laurent *et al.*, 2000). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad

de enzima que produjo un incremento de una unidad de absorbancia a 235 nm por minuto por mililitro. La actividad específica fue expresada como unidad de actividad por unidad de DO a 600 nm.

Cuantificación de actividades poligalacturonasa y endoglucanasa.

Ambas actividades en los sobrenadantes de cultivo se midieron valorando la formación de azúcares reductores mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Para la actividad hidrolasa se empleó como sustrato una solución de ácido poligalacturónico (0,5%) preparada en buffer citrato 0,05 M pH 4 y en el caso de la actividad endoglucanasa el sustrato fue una solución de carboximetilcelulosa al 0,5 % preparada en el mismo buffer. Se leyó absorbancia a 540 nm.

La cantidad de azúcares reductores liberados por la actividad enzimática se valoró frente a una recta patrón de ácido D-galacturónico (Sigma). La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ mol de azúcar reductor por minuto por mililitro de sobrenadante bajo las condiciones de ensayo utilizadas. La actividad específica fue expresada como unidades de actividad enzimática por DO a 600 nm.

Detección y determinación semicuantitativa de actividad proteasa en placas

La detección y estimación de la actividad proteasa se llevó a cabo en placas Petri de 100 mm de diámetro con 15 mL de medio que contenía gelatina al 3 % y caldo nutriente al 0,4 %, pH 7,4.

El medio se suplementó con 0,8 % de agarosa y 0,2 % de azida sódica (Chatterjee *et al.*, 1995b). Luego de solidificado se abrieron 5 pocillos de 5 mm de diámetro donde se colocaron 30 μ L de las muestras e igual cantidad de agua destilada estéril como control negativo. Se incubó a 28 ° C durante 36 horas y posteriormente se midieron los halos de hidrólisis del sustrato.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica para Windows versión 6.0. Para cada enzima se efectuó un ANOVA de clasificación simple y las medias se compararon a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan. Los gráficos se realizaron en Excel de Windows XP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de actividades enzimáticas

Las cepas Ms11, Q35 y B13 de *D. chrysanthemi* tuvieron una alta actividad pectato liasa (2,4 - 4,6 U), celulasa (0,24 - 0,3 U), mientras que para las poligalacturonas los valores de actividad fueron bajos con valores entre 0,36 y 0,65 U (Figuras 1 A y B). En E505, E1003 y Alq41 de *P. c. subsp. carotovorum* sucedió lo contrario pues la actividad poligalacturonasa fue elevada con valores de 1,1 a 1,7 U y las de pectato liasas y celulasas resultaron bajas con valores de 0,22 a 0,81 U y de 0,01 a 0,06 U respectivamente. Sin embargo, cabe señalar que los niveles de pectato liasas de E505 y E1003 resultaron los más altos con respecto a las otras cepas de su especie. Art41 de *P. c. subsp. carotovorum* y E1105 de *D. chrysanthemi* tuvieron baja actividad de las tres enzimas al comparar entre todas las cepas empleadas en el experimento.

En el caso de las proteasas, a excepción de Ms11 y Q35 que mostraron las mayores actividades con halos superiores a 18 mm y E1105 en la que no se detectó esta enzima, el resto de las cepas presentó valores bastante

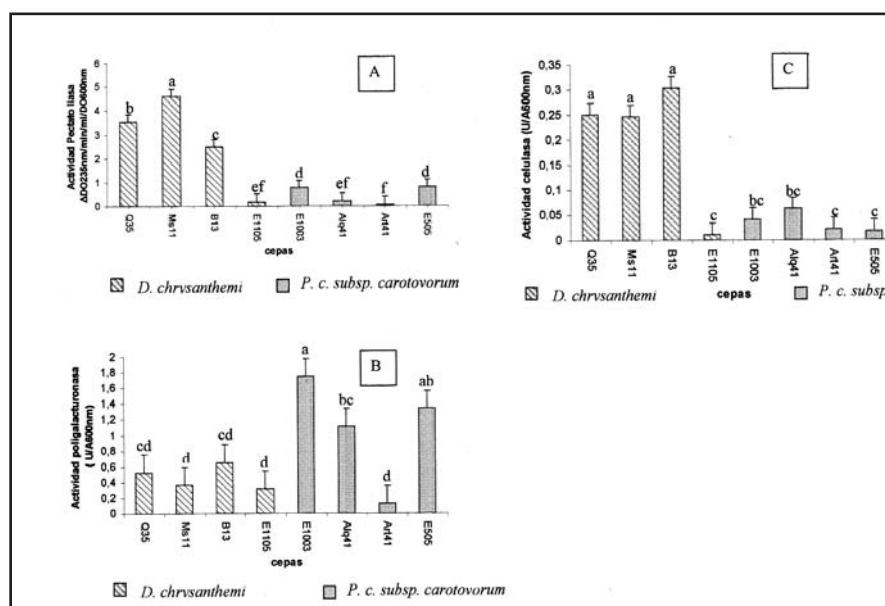


Figura 1. Actividad pectato liasa (A), poligalacturonasa (B) y celulasa (C) de cepas de *D. chrysanthemi* y de *P. c. subsp. carotovorum*. Cultivo 24 h a 28 ° C, 100 r.min⁻¹, medio de sales minerales (Smadja *et al.*, 2004) suplementado con PGA. n=3, p<0,05.

Figure 1. Pectate lyase (A), polygalacturonase (B) and cellulase activity of *D. chrysanthemi* and *P. c. subsp. carotovorum* strains. Grown for 24 h at 28 ° C, 100 r.min⁻¹, in a salt mineral medium (Smadja *et al.*, 2004) supplemented with PGA. n=3, p<0.05.

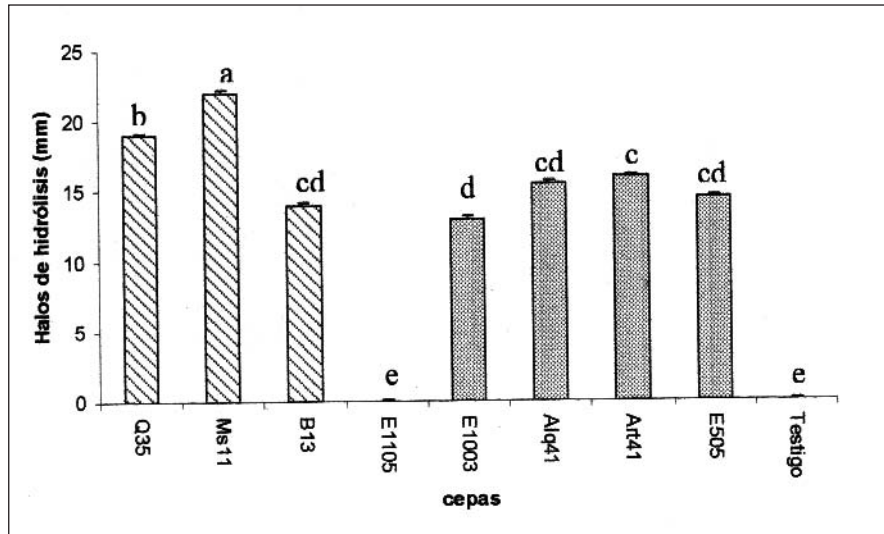


Figura. 2. Halos de hidrólisis de la gelatina debido a la actividad proteasa de cepas de *D. chrysanthemi* y *P. c. subsp. carotovorum*. Las condiciones para la detección fueron descritas anteriormente por Chatterjee *et al.*, (1995).

Figure. 2. Gelatine hydrolysis halos due to protease activity of *D. chrysanthemi* y *P. c. subsp. carotovorum* strains. Conditions for detection were those described by Chatterjee *et al.*, (1995).

similares (Fig. 2). Varios autores entre los que podemos citar a Stromberg *et al.*, (1994) plantean que aunque las proteasas no maceran tejidos, contribuyen a la virulencia al aumentar la acción de las pectinasas, ya sea infligiendo estrés en las células de la planta previo al daño por la actividad pectolítica o proveyendo a la bacteria de fuentes de nitrógeno utilizables a través de la degradación de sustancias poliméricas.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos previamente por Franco, (2008) en la prueba de maceración de tubérculos de papa, donde las cepas Q35, Ms11 y B13 tuvieron altos valores de reducción del peso de los mismos, mientras que E1105 y Art41 presentaron valores mucho menores. E505, E1003, Alq41 a pesar de tener un comportamiento similar al de Ms11 y B13 en ese ensayo de virulencia, tuvieron menor actividad de pectato liasas y celulasas. Esto pudiera ser compensado con la elevada actividad poligalacturonasa que presentaron estas cepas, ya que algunos autores han planteado que existe una acción sinérgica entre las exoenzimas para atacar a la planta (Barras *et al.*, 1994).

Otros investigadores también han relacionado la actividad enzimática y la virulencia de cepas de estos géneros. Recientemente, Phokum *et al.*, (2007), determinaron que cepas de *D. chrysanthemi* y *P. c. subsp. carotovorum* aisladas de zanahoria fueron más agresivas que las obtenidas de otras 9 especies de vegetales pues produjeron la mayor cantidad de estas enzimas y presentaron la mayor área de maceración en plantas de col china inoculadas artificialmente.

La pudrición blanda bacteriana de la papa es una enfermedad conocida en Cuba y se presenta casi todos los años tanto en los campos como durante el almacenamiento. También se detecta en tubérculos-semilla en los cuales estas especies pueden estar presentes de forma latente. Ambos patógenos presentan una amplia distribución geográfica y no constituyen objeto de cuarentena. Debido a ello, no se realizan análisis para su detección en frontera y no puede evitarse su entrada al país. Sin embargo al producirse graves afectaciones como ocurrió en provincia Habana durante las campañas de los años 2002-2005, se realizan las investigaciones pertinentes para esclarecer las causas y los patógenos

involucrados. Franco, (2008) demostró que tales pudriciones se debieron fundamentalmente a la presencia de aislamientos virulentos y altamente virulentos de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi*. En el presente trabajo, se comprobó que cepas con este comportamiento presentan una producción elevada de pectinasas y en el caso de la última especie también de celulasas. Estos resultados constituyen aportes al conocimiento de estas especies en el país y evidencian la necesidad de cumplir estrictamente con las medidas de manejo establecidas para el cultivo así como de realizar un mayor número de estudios dirigidos a la búsqueda de agentes de control biológico capaces de prevenir o controlar la enfermedad.

CONCLUSIONES

Para la especie *D. chrysanthemi*, la mayor virulencia de las cepas en estudio fue vinculada con una elevada actividad pectato liasa y celulasa mientras que para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, con una alta actividad poligalacturonasa,

BIBLIOGRAFÍA

- BARRAS, F.; VAN GIJSEGEM, F.; CHATTERJEE, A.K. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of the soft rot *Erwinia*. Ann. Rev. Phytopathol. 32: 201-234.
- BENELLI, A.; DENARDIN, N.; FORCELINI, C.; DUARTE, V. 2004. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. Fitopatol. Bras. 29 : 155-159.
- BURR, T.; BARNARD, M.; CORBETT, M.; PEMBERTON, C.; SIMPSON, N.; SALMOND, G. 2006. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora* the VirR repressor. Molecular Microbiology 59 : 113-125.
- CABRERA, J.; IGLESIAS, R.; GUTIÉRREZ, A.; HORMAZA, J.; GONZÁLEZ, S.; DIOSDADO, E.; GÓMEZ, R. 2003. Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécicos estimuladora del enraizamiento vegetal. Patente Cubana Nº 22859/2003.
- CHATTERJEE, A. Y.; CUI, Y.; LIU, Y.; DUMENYO, C.; CHATTERJEE, A. K. 1995. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1959-1967.
- DUARTE, V.; DE BOER, S.; WARD, L.; DE OLIVEIRA, A. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. Journal of Applied Microbiology 96: 535-545.
- FRANCO, Y. 2008. Caracterización de aislamientos de *Erwinia* spp. causantes de pudrición blanda en papa (*Solanum tuberosum* L). Tesis en opción al título académico de Maestro en Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 71 p.
- LAURENT, P.; BUCHON, L.; GUESPIN-MICHEL, J.; ORANGE, N. 2000. Production of pectate lyases and cellulases by the bacterium *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1538-1543
- MATSUMOTO, H.; JITAREERAT, P.; BABA, Y.; TSUYUMU, S. 2003. Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Plant-Microbe Interact 16: 226-237.
- MILLER, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31: 426-428.
- PÉROMBELON, M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathol. 51: 1-12.
- PHOKUM, C.; JITAREERAT, P.; PHOTCHANACHAI, S.; CHEEVADHANARAK, S. 2007. Detection and classification of soft rot erwinia of vegetables in thailand by dna polymerase chain reaction. ISHS Acta Horticulturae 712. <http://www.actahort.org/> (Consultado en octubre, 2007)
- PY, B.; BARRAS, F.; HARRIS, S.; ROBSON, N.; SALMOND, G. 1998. Extracellular enzymes and their role in *Erwinia* virulence. Meth. Microbiol. 27: 157-168.
- SCOTT, R.; CHARD, J.; HOCART, M.; LENNARD, J.; GRAHAM, D. 1996. Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. Potato Res. 39: 333-344.

- SMADJA, B.; LATOUR, X.; TRIGUI, S.; BURINI, J.; CHEVALIER, S.; ORANGE, N. 2004. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). Can. J. Microbiol. 50:19-27
- STROMBERG, V.K.; LACY, G.H.; KYÖSTIÖ, S. 1994. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: protease in soft rot. Phytopathology 84:1109.
- TOTH, I.; BELL, K.; HOLEVA, M.; BIRCH, P. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology 4 : 17-30.