



**FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES Y EXACTAS**

***Actividad elicitora en plantas de una
endopoligalacturonasa de levadura
encapsulada en liposomas.***

**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología**

(Mención Biotecnología Industrial)

Autor: Lic. José Alberto De la Fé Isaac

Tutores: Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz

Dr. C. Yaquelin Puchades Izaguirre



**Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
Universidad de Oriente
Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar
“Oriente – Sur”**

Actividad elicitora en plantas de una endopoligalacturonasa de levadura encapsulada en liposomas.

**Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en
Biotecnología**

(Mención Biotecnología Industrial)

Autor: Lic. José Alberto De la Fé Isaac

Tutores: Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz
Dr. C. Yaquelin Puchades Izaguirre

Santiago de Cuba

2020

“Es importante celebrar el éxito, pero es más importante aprender bien de los fracasos.”

Bill Gates

Dedicatoria/Agradecimientos

Dedicatoria

A mi madre por la buena crianza que me dio y por haberme conducido por los caminos del conocimiento, y a mi padre por enseñarme los resultados del trabajo duro y constante.

Agradecimientos

A mi madre, por su amor y apoyo incondicional en todo momento;

A mis tutores Yaquelin y Manuel, quienes me guiaron en todo este largo camino recorrido, aportando sus conocimientos y su valioso tiempo;

A todo el colectivo de trabajadores de la ETICA, en especial a Mónica, Rene, Maritza, Yeline, Elba, Imilsis, Edilberto y Vivian, siempre pendiente a mis necesidades y siempre dispuestos a ayudar;

A María, por sus colaboraciones con los reactivos necesarios y por su oportuna revisión del documento;

A Daniel, que siempre estaba por ahí para intercambiar ideas;

Al resto de mi familia, siempre preocupados por mí;

A mis amigos, los nuevos y los de antes, ellos que, aunque estando lejos, están ahí cuando hace falta;

A mis profesores del CEBI y de la Maestría en Biotecnología en sentido general, gracias por sus enseñanzas;

En fin, a todos los que contribuyeron de una forma u otra, con la realización de este trabajo,

GRACIAS

Leyenda

Leyenda

Leyenda

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AE	actividad enzimática
AGO	proteínas Argonautas
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosín trifosfato (trifosfato de adenosina)
BP-UO	Bioproducto - UO (Universidad de Oriente)
BP-VC	Bioproducto - VC (Villa Clara)
bZIP	cremallera básica de leucina (RBP que funciona como factor de transcripción)
CEBI	Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
CP	proteasa central 20S
CTAB	bromuro de cetil trimetil amonio
DEPC	pirocarbonato de dietilo
dsRNA	ARN bicatenario
EE	Eficiencia de encapsulación
endoPG	endopoligalacturonasa
EP	proteínas efectoras
ETI	inmunidad desencadenada por efectores
ETICA	Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
genes R	genes de resistencia
hpi	horas post inoculación
HR	respuesta hipersensible
INICA	Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar
LMV	<i>Lettuce Mosaic Virus (Virus del Mosaico de la Lechuga)</i>
MAPK	proteínas quinasas activadas por mitógenos
NBS-LRR	sitios de unión a nucleótidos - repeticiones ricas en leucina
NBT	nitroazul de tetrazolio
OGAs	oligogalacturónidos
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PG	poligalacturonasas
PTGS	silenciamiento génico postranscripcional
PTI	inmunidad desencadenada por PAMP

Leyenda

RBD	dominio de unión al ARN
RBP	proteínas de unión a ARN
RISC	complejo silenciador inducido por ARN
ROS	especies reactivas de oxígeno
RP	partículas reguladoras
RRM	motivo de reconocimiento de ARN
SA	ácido salicílico
SAP	proteínas asociadas al estrés
SCMV	<i>Sugarcane Mosaic Virus (Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar)</i>
TF	factores de transcripción
TMV	<i>Tobacco Mosaic Virus (Virus del Mosaico del Tabaco)</i>
TYMV	<i>Turnip Yellow Mosaic Virus (Virus del Mosaico Amarillo del Nabo)</i>
UPS	sistema ubiquitina-proteasoma
WRKY	es una RBP que funciona como factor de transcripción
ZFP	proteínas de dedos de zinc

Índice

Índice

Índice

Introducción	1
I. Revisión Bibliográfica	3
1.1 Enzima endopoligalacturonasa (endoPG)	3
1.1.1 Función biológica de las enzimas endoPG	3
1.1.2 Aplicaciones de las enzimas endoPG	4
1.2 Oligogalacturonidos	4
1.2.1 OGAs y defensa de las plantas	5
1.2.2 Interacción planta - patógeno	5
1.3 Inmovilización de enzimas	6
1.3.1 Métodos de inmovilización por Retención Física	7
1.3.1.1 Encapsulación en liposomas	7
1.4 Caña de Azúcar (<i>Saccharum spp.</i>)	8
1.5 Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar	9
II. Materiales y Métodos	10
2.1 Obtención de la enzima endoPG	10
2.2 Purificación de la enzima endoPG	10
2.2.1 Diálisis	10
2.2.2 Cromatografía de Intercambio Iónico	10
2.2.3 Precipitación con etanol	10
2.3 Determinación de la actividad enzimática poligalacturonasa	11
2.4 Determinaciones espectrofotométricas	11
2.5 Encapsulación en liposomas de la enzima endoPG	11
2.6 Caracterización del preparado liposomal	11
2.7 Evaluación del preparado liposomal como elicitador de respuestas de defensa en caña de azúcar	12
2.7.1 Determinación de la severidad de infección por <i>SCMV</i>	13
2.7.2 Detección histoquímica de radicales superóxido	13
2.7.3 Expresión de genes de resistencia en <i>Saccharum spp.</i>	14
III. Resultados y Discusión	15
3.1 Obtención y purificación de la enzima endoPG	15
3.2 Preparación y caracterización de los liposomas	16
3.3 Preparado liposomal como elicitador de defensas en caña de azúcar	17
3.3.1 Efectividad de los bioproductos contra la infección por <i>SCMV</i>	17

Índice

3.3.2 Detección histoquímica de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	17
3.3.3 Expresión de genes de resistencia en <i>Saccharum</i> spp.....	18
Conclusiones	28
Recomendaciones	29
Referencias Bibliográficas	31

Resumen

Resumen

Esta investigación se realizó con el objetivo de desarrollar un bioproducto capaz de activar respuestas defensivas en caña de azúcar frente al *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV), mediante la encapsulación de la enzima endopoligalacturonasa, de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, en liposomas de fosfatidilcolina. La enzima, purificada por cromatografía de intercambio iónico, presentó una actividad enzimática de 34.5 U/mL. Los liposomas obtenidos por el método de inyección de etanol presentaron forma esférica, tamaño promedio de $3.3 \pm 2 \mu\text{m}$, y una eficiencia de encapsulación, determinada por cromatografía de exclusión molecular, del 28.3 %. Los cultivares SP70-1284 susceptible al SCMV y C323-68 resistente, fueron tratados con el preparado liposomal y con un bioproducto adicional a base de compuestos fenólicos. Se empleó un diseño completo al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Se evaluó la severidad de la infección, la acumulación de radicales superóxido y la expresión de 10 genes relacionados con la defensa. El cultivar resistente no presentó síntomas de infección durante el desarrollo del experimento, mientras que en el susceptible la aplicación de ambos bioproductos disminuyó la severidad de la infección entre el 38.9 y 44.4 % con respecto al control. Se observó la presencia de radicales superóxido en las primeras horas de interacción caña de azúcar - SCMV. A los 28 días post inoculación se apreció una expresión diferenciada de tres genes relacionados con la defensa antiviral. Se demostró la capacidad de ambos bioproductos para inducir respuestas defensivas en caña de azúcar frente al SCMV.

Palabras clave: caña de azúcar, endoPG, inductor, inmovilización enzimática, SCMV.

Abstract

Abstract

Abstract

This research was carried out with the objective to develop a bioproduct capable of activating defensive responses in sugarcane against the *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV), by encapsulating the endopolygalacturonase enzyme, of the *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 yeast, in phosphatidylcholine liposomes. The enzyme, purified by ion exchange chromatography, showed an enzymatic activity of 34.5 U/mL. The liposomes obtained by the ethanol injection method had a spherical shape, average size of $3.3 \pm 2 \mu\text{m}$, and an encapsulation efficiency, determined by molecular exclusion chromatography, of 28.3 %. SP70-1284 cultivar susceptible to SCMV and resistant C323-68 were treated with the liposomal preparation and with an additional bioproduct based on phenolic compounds. A randomized complete design with four treatments and three repetitions was used. The severity of the infection, the accumulation of superoxide radicals and the expression of 10 defense-related genes were evaluated. The resistant cultivar did not show symptoms of infection during the development of the experiment, while in the susceptible the application of both bioproducts decreased the severity of the infection between 44.4 and 38.9 % with respect to the control. The presence of superoxide radicals was observed in the first hours of sugarcane - SCMV interaction. At 28 days' post inoculation, a differentiated expression of three genes related to antiviral defense was observed. The ability of both bioproducts to induce defensive responses in sugarcane against SCMV was demonstrated.

Keywords: sugarcane, endoPG, inductor, enzymatic immobilization, SCMV.

Introducción

Introducción

Uno de los principales problemas que enfrenta la agricultura en la actualidad es el ataque de organismos fitopatógenos. Según estimaciones de la FAO anualmente entre el 20 y el 40 % de la producción mundial de alimentos se pierde por las plagas, lo cual cuesta a la economía alrededor de \$ 220 mil millones (FAO, 2019a).

El desarrollo de nuevas estrategias de protección vegetal frente a las enfermedades causadas por patógenos es un objetivo prioritario para el mantenimiento de la competitividad del sector productivo agrícola. Los avances en el conocimiento de los mecanismos de resistencia frente a agentes nocivos permiten desarrollar nuevas tecnologías más eficaces y respetuosas con el medio ambiente, que contribuyen a impulsar una agricultura sostenible. Entre estas se encuentra la aplicación de moléculas específicas para activar las respuestas defensa de las plantas (Enríquez y col., 2010).

La pared vegetal, primera barrera a la que se enfrentan las plagas, constituye una de las mayores fuentes de moléculas señales de defensa. Estas son liberadas por la acción hidrolíticas de enzimas sintetizadas por el patógeno para debilitar las células, y son reconocidas por receptores de la propia planta, lo cual desencadena los procesos de resistencia.

Los oligómeros de pectina u oligosacáridos (OGAs), derivados de la degradación de la pared celular vegetal, con grado de polimerización entre nueve y 16, presentan actividad biológica en plantas (Rodríguez y col., 2008). Por esta razón se han utilizado para elaborar bioproductos como es el caso de *FytoSave*[®] (LIDA Plant Research, 2019), *Pectimorf*[®] (Suarez y col., 2008) y *PectinHydrol* (Mederos, 2018).

Los OGAs producidos *in situ* por la acción de la enzima endopoligalacturonasa (endoPG) pueden simular el ataque de un patógeno. Esto permite el desencadenamiento de las defensas de las plantas, además de activar su resistencia natural y la inmunización contra futuras infecciones. Su utilización no destruye al parásito, simplemente estimula el “sistema inmune” de las plantas.

La encapsulación de la enzima endoPG en una matriz de liberación controlada puede incrementar la actividad y el tiempo de acción de la misma dentro de las plantas. Investigaciones realizadas por el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente han demostrado la factibilidad técnica de co-producir dicha enzima y etanol a escala industrial mediante una cepa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* (Serrat y col., 2004a).

La encapsulación de ingredientes activos de fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas y micronutrientes en matrices de liberación controlada, mejora la eficacia de los productos químicos, al reducir su volatilización, toxicidad y la contaminación ambiental. Esta es una de las opciones más prometedoras y viables para abordar los desafíos actuales en el área de la sostenibilidad agrícola y la seguridad alimentaria frente al cambio climático (Kashyap y col., 2015).

Los liposomas de fosfatidilcolina parecen ser un medio adecuado para la inmovilización enzimática. Estos pueden ser preparados de distintos tamaños, incluso pueden estar en

Introducción

la escala de los nanómetros, lo que los hace ideales para que entren por los estomas de las hojas durante su aplicación por vía foliar en los cultivos.

La mayor parte de la dieta de los seres humanos proviene de las gramíneas, tanto en forma directa (granos de cereales y sus derivados) como indirecta (carne, leche y huevos que provienen del ganado y las aves de corral que se alimentan de pastos o granos). En términos de la producción global, los cuatro cultivos más importantes son gramíneas: caña de azúcar, trigo, arroz y maíz (FAO, 2019b).

En Cuba, la caña de azúcar tiene un papel muy importante dentro de la economía. Sobre esta planta se han desarrollado múltiples estudios que incluyen condiciones y formas de manejo del suelo para su cultivo (González y col., 2014; Vázquez y col., 2016; Rodríguez y col., 2020), selección de nuevos cultivares adaptados a las condiciones edafoclimáticas del territorio nacional (Rodríguez y col., 2015; Abiche y col., 2015; Rodríguez y col., 2018), así como la interacción con los principales patógenos que la atacan (La O y col., 2008; Puchades y col., 2016; Perera y col., 2020).

Dentro de las interacciones con agentes nocivos, el sistema caña de azúcar - *Sugarcane Mosaic Virus* está bien estudiado y se ha perfeccionado el procedimiento evaluativo de la enfermedad (Puchades, 2017), razón por la cual se utilizó este patosistema como modelo para comprobar la eficiencia de la enzima endoPG, en la inducción de respuestas defensivas ante este virus.

Problema científico:

Se desconocen los efectos de la aplicación de la enzima endoPG de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 sobre la activación de respuestas defensivas en plantas.

Hipótesis:

La aplicación de un bioproducto basado en la enzima endoPG de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 encapsulada en liposomas logra activar respuestas defensivas en cultivares de caña de azúcar inoculados con *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV).

Objetivo general:

Comprobar el efecto protector de un bioproducto basado en la encapsulación de la enzima endoPG en liposomas de fosfatidilcolina sobre cultivares de caña de azúcar inoculados con SCMV.

Objetivos específicos:

1. Purificar la enzima endopoligalacturonasa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011.
2. Obtener un preparado liposomal de la enzima endoPG caracterizado mediante microscopía óptica y cromatografía de exclusión molecular.
3. Evaluar la efectividad del preparado liposomal como elicitador en cultivares de caña de azúcar inoculadas con SCMV.

Revisión Bibliográfica

I. Revisión Bibliográfica

1.1 Enzima endopoligalacturonasa (endoPG)

Las endoPG (EC 3.2.1.15) se clasifican como enzimas pécticas o pectinasas por participar en la degradación natural de la pectina. Estas enzimas promueven la ruptura de la cadena principal de esta molécula mediante la hidrólisis de los enlaces α -(1,4)-glicosídicos que unen los residuos de ácido D-galacturónico. Su ataque ocurre al azar, con una rápida disminución del peso molecular de la pectina (25-360 kDa) y con una mínima liberación de extremos reductores (Serrat, 2003).

Las endoPG se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en plantas, mohos, levaduras y bacterias, donde desempeñan las más diversas funciones biológicas relacionadas con el crecimiento, desarrollo, nutrición, reproducción y fitopatogenicidad, entre otras (Wubben, 1999). En levaduras la actividad pectinolítica es una cualidad relativamente rara y está restringida a unas pocas especies de los géneros de *Kluyveromyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Sacharomyces*, entre otras (Serrat, 2003; Strauss, 2001). La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao, del café, de uvas, higos y están asociadas al deterioro de algunos alimentos y frutas en conservas (Blanco, 1999) y se caracterizan por producir exclusivamente endoPG extracelular (Serrat y col., 2004b).

Hasta el presente, la totalidad de las pectinasas que se comercializan se producen a partir de hongos, pero su producción por levaduras constituye una opción atractiva, pues a pesar de que su productividad se considera baja (Blanco, 1999), presentan mayor velocidad de crecimiento y estructura unicelular, cualidades que le confieren importantes ventajas respecto a los hongos para el cultivo sumergido a gran escala. Otra excelencia de las levaduras es que sólo producen endopoligalacturonasas, a diferencia de los hongos, los cuales originan una compleja mezcla de enzimas pécticas, otras carbohidrasas, además otras actividades enzimáticas indeseables, como la pectina esterasa que libera metanol y la arabinofuranosidasa, que promueve la formación de sedimentos y opalescencia. Por todas estas razones, cada día son más reclamados preparados puros de endoPG (Rodríguez y col., 2008).

1.1.1 Función biológica de las enzimas endoPG

Estudios realizados en hongos fitopatógenos permitieron describir los genes de poligalacturonasas (PG) y sus funciones biológicas en un gran número de ellos. En la mayoría de los casos, los análisis genéticos revelan la existencia de verdaderas familias de estos genes.

En *Aspergillus flavus*, los genes de PG se inducen en medios que contienen pectina, pero no en presencia de glucosa. La endoPG en *Fusarium oxysporum* está también regulada a nivel transcripcional. Es inducida por tejido vascular de tomate y pectina cítrica, y se expresa también en tejidos vivos infectados. Los transcritos se detectaron también durante la patogénesis en *Colletotrichum lindemuthiamun*, además, se observó que la activación transcripcional ocurre rápidamente cuando el hongo entra al estado parasítico. Estos hallazgos apoyan la tesis de que las endoPG participan en la penetración del hospedero por la degradación de la capa de pectina (Lang, 2000).

En el caso de bacterias fitopatógenas como *Erwinia carotovora*, también se estudió intensamente el papel de los genes PG en la patogénesis. A estas enzimas se les atribuyen numerosas funciones en plantas. Se considera que están asociadas a los procesos de abscisión de órganos, maduración de los granos de polen, crecimiento del tubo polínico, así como a la maduración y deterioro de frutos. Se plantea que también están involucradas en los procesos de crecimiento y en los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos (Rodríguez y col., 2008).

1.1.2 Aplicaciones de las enzimas endoPG

Muchas de las aplicaciones industriales de las pectinasas están basadas en la actividad hidrolítica que ejerce la endoPG sobre la pectina. Su utilización se encuentra muy extendida en los procesos de extracción, clarificación y concentración de zumos de frutas, lo cual logra incrementar el rendimiento al reducir la viscosidad de los concentrados y solubilizar las estructuras pécticas. El tratamiento enzimático en el macerado de las hortalizas para la producción de purés, logra hidrolizar protopectinas de productos frescos, tales como zanahoria, patata y tomate. Actualmente se prefiere el macerado enzimático al mecánico, ya que permite la separación de las células enteras intactas, con lo cual se preservan las vitaminas de la acción del oxígeno y los compuestos responsables del aroma y el color (Lang, 2000).

Las enzimas endoPG también son utilizadas en la producción de oligogalacturónidos, fragmentos de pectina con cierto grado de polimerización que inducen la respuesta defensiva en plantas frente a patógenos, estimulan el crecimiento celular y la maduración de frutos, entre otras aplicaciones (Suarez y col., 2008; Hahn y col., 1981).

1.2 Oligogalacturónidos

Se denominan comúnmente oligogalacturónidos (OGAs), oligopectatos o pectooligosacáridos a los oligómeros lineales de ácido D-galacturónico unidos por enlaces glucosídicos α (1-4). El número de restos de D-galacturonatos que contiene el oligosacárido permite definir su grado de polimerización. La estructura de estos oligosacáridos se encuentra representada en la Figura 1.

Los OGAs son producidos por depolimerización parcial de la pectina mediante hidrólisis ácida, métodos enzimáticos e hidrotermales. Alternativamente estos pueden ser preparados a partir de residuales agroindustriales ricos en pectina tales como los residuales cítricos (Yang y col., 2019).

La hidrólisis ácida no es una vía que se emplee frecuentemente en su preparación, puesto que los medios ácidos fuertes pueden conllevar a la ruptura de los enlaces glucosídicos y por consiguiente a una degradación no deseada del polisacárido.

La hidrólisis enzimática es el método de obtención más utilizado, puesto que los oligogalacturónidos obtenidos no son expuestos a las condiciones drásticas de la hidrólisis ácida, que puede alterar su estructura (Coté y col., 1994). Existen diferentes reportes en la literatura referidos al método de obtención de los oligogalacturónidos mediante hidrólisis enzimática donde se aprecia un gran empleo de las pectinasas (Gullón y col., 2013), con las cuales se obtienen oligogalacturónidos con un grado de polimerización muy variable.

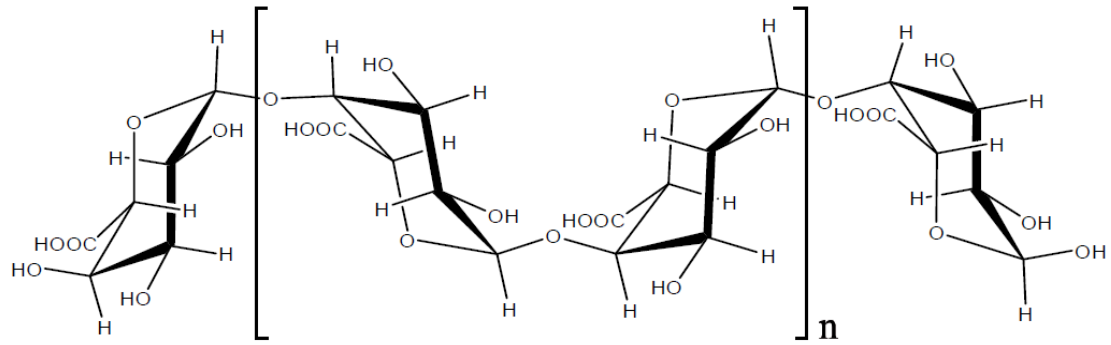


Figura 1: Estructura de los oligogalacturónidos

1.2.1 OGAs y defensa de las plantas

Los OGAs son considerados fitohormonas, específicamente oligosacarinas¹. La primera evidencia de que los fragmentos de pectina inducen respuestas defensivas en las plantas se proporcionó hace más de 30 años en ensayos de la acumulación de fitoalexina en los cotiledones de la soya (Hahn y col., 1981).

Estos fragmentos, llamados elicitores endógenos, fueron luego identificados como oligómeros de residuos del ácido α (1-4) – poligalacturónico. Pocos años después se reportó que los OGAs antagonizan la actividad de las auxinas durante el alargamiento de tallo de guisante, lo cual indicaba un posible papel de estos oligosacáridos como los reguladores de crecimiento y desarrollo (Branca y col., 1988).

1.2.2 Interacción planta - patógeno

Los patógenos atacan a las plantas porque evolutivamente han adquirido la capacidad de vivir de las sustancias producidas por estas y algunos dependen de las mismas para subsistir, para lo cual deben ser capaces de construir un camino hacia las células que los nutren, a modo de avanzar dentro y a través de los tejidos de la planta. Con este fin los organismos patógenos han desarrollado diversas armas químicas, entre las que se encuentran las enzimas, las cuales desintegran los componentes estructurales de las células del hospedante, degradan sustancias inertes a sustancias nutritivas en las células y afectan al protoplasto lo que interfiere con sus sistemas funcionales. La penetración dentro del tejido se caracteriza por la ruptura de las paredes celulares mediante la degradación enzimática de la cutícula, compuestos pécticos, celulosa, hemicelulosa y lignina (Agrios, 2005).

Particularmente, los hongos fitopatógenos producen glucanasas (galacturonasas y xilanasas) que fragmentan a los polisacáridos de la pared celular para iniciar el proceso de infección de los tejidos vegetales. Los oligosacáridos generados por estas enzimas representan una fuente de carbono para los hongos, pero a su vez actúan en los tejidos afectados mediante la estimulación de reacciones de protección. Por consiguiente, en las plantas se sintetizan proteínas inhibitoras de glucanasas fúngicas² para retardar la degradación de su pared celular, lo que a su vez incrementa el tiempo de vida de los oligosacáridos biológicamente activos (oligosacarinas).

Una de las respuestas defensivas de las plantas que se observaron después de la adición de esta sustancia fueron las denominadas comúnmente explosiones oxidativas. Estas ocurren por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como H_2O_2 y O_2^- (Hou y col., 2019), las que pueden atacar los organismos patogénicos directamente, y pueden detener indirectamente la subsiguiente invasión por dichos organismos, al causar una rápida polimerización de componentes fenólicos de la pared celular.

¹ Son oligosacáridos, formados por cadenas cortas de azúcares.

² Después del proceso de infección de los hongos, las plantas liberan β -1,3-endoglucanasas y quitinasas que fragmentan la pared celular fúngica y originan oligosacáridos, que también activan reacciones de protección en la célula vegetal. En los hongos se sintetizan proteínas inhibitoras de glucanasas para prevenir la degradación de su propia pared celular (Agrios, 2005).

El reforzamiento de las paredes celulares es otro de los mecanismos de defensa de la planta. Ocurre cuando entran en contacto con los patógenos y modifican o acumulan diversas sustancias relacionadas con la defensa con el fin de evitar la invasión. Estos compuestos son calosa, hemicelulosa, glicoproteínas como la extensina que es rica en el aminoácido prolina, compuestos fenólicos de variada complejidad que incluyen la lignina y suberina, y elementos minerales como el calcio (Pavlopoulou y col., 2019). Otro mecanismo es la producción de sustancias antimicrobianas en las células atacadas, tales como fitoalexinas y compuestos fenólicos (Hou y col., 2019).

Las oligosacarinas producidas por la degradación de las paredes celulares tanto de la planta como del patógeno son consideradas elicitores, es decir, compuestos capaces de inducir las defensas de la planta (Mishra y col., 2012).

La respuesta hipersensible (HR) es la defensa más radical de las plantas. Empieza cuando ciertas moléculas producidas por los patógenos actúan como elicitores (las oligosacarinas), los cuales son reconocidos por moléculas de las células de las plantas (receptores) y desencadenan una serie de reacciones bioquímicas, nuevas o alteradas, en las células infectadas y las que la rodean. La membrana plasmática, se despolariza, hay salida de K^+ y entrada de Ca^{2+} , se activan las fosfolipasas y las proteínas de la membrana sufren fosforilación. Las reacciones involucran una mayor oxidación de carbohidratos, incremento de movimiento de iones, especialmente H^+ y K^+ a través de las membranas, disrupción de membranas celulares y pérdida del compartimiento celular.

Las paredes celulares y las células mismas acumulan compuestos fenólicos, sintetizan sustancias antimicrobianas como fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis³. El sector invadido de la hoja se vuelve acuoso al principio, después necrótico y muere. Una HR efectiva no siempre es visible debido a que involucra solamente unas cuantas células de la planta (Agrios, 2005). En cuanto a la respuesta defensiva, las células vecinas a las dañadas se lignifican para evitar la penetración del patógeno, por lo que la planta adquiere resistencia sistémica.

1.3 Inmovilización de enzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos, frecuentemente en condiciones muy suaves, disolución acuosa neutra, en condiciones normales de temperatura y presión, y con una muy alta especificidad (Rojas, 2002). A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte, al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y, por tanto, no se pueden reutilizar (Arroyo, 1998). Gracias a la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, con lo que se ha podido lograr que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable (Arroyo, 1998).

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su

³ Son enzimas hidrolíticas que atacan la pared celular del patógeno. Estas PRP pueden ser glucanasas, quitinasas o hidrolasas.

actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringe, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas por su unión a un soporte (Arroyo, 1998). En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: Retención Física (atrapamiento e inclusión en membranas) y Unión Química (unión a soportes y reticulado).

1.3.1 Métodos de inmovilización por Retención Física

Los métodos de inmovilización por Retención Física se pueden clasificar en dos grandes grupos: Atrapamiento e Inclusión en Membrana.

El método de Inclusión en Membrana está basado en encerrar enzimas en membranas semipermeables y se caracteriza por la rapidez y facilidad para su preparación (Rojas, 2002). El método difiere del método de enlace covalente y de entrecruzamiento en que la enzima no se enlaza a la matriz o membrana. Este método se clasifica a su vez en inmovilización en Reactores de Membrana y en Microencapsulación (Arroyo, 1998).

El método de inmovilización por microencapsulación implica encerrar las enzimas con membranas semipermeables de polímeros. Las microcápsulas formadas generalmente tienen un diámetro de 1-100 μm (Rojas, 2002). Estas microcápsulas se han utilizado en diferentes campos como en medicina, alimentos, cosméticos, colorantes, etc. Para la microencapsulación de enzimas, las condiciones deben controlarse minuciosamente, en comparación con otras sustancias químicas.

El proceso de microencapsulación de enzimas puede clasificarse en cuatro categorías, estas son: Método de Polimerización Interfacial, Método del Líquido Secante, Método de Separación de Fase y Método de Membrana Líquida (liposomas) (Arroyo, 1998).

1.3.1.1 Encapsulación en liposomas

Los fosfolípidos naturales se obtienen de la soya y en una solución acuosa forman la estructura esférica conocida como liposoma. Durante este proceso las colas lipofílicas de los fosfolípidos entran en contacto entre ellas para formar una membrana de doble capa que es hidrofílica en sus partes exteriores y lipofílica en su interior. Por lo tanto, el interior y el exterior de un liposoma es hidrosoluble y el interior de la membrana del liposoma es liposoluble. Por definición, los liposomas contienen un núcleo de solución acuosa (Figura 2).

Actualmente, se utilizan como transportadores de diversas sustancias entre el exterior y el interior de la célula. Algunas de estas sustancias son medicamentos o cosméticos, e incluso se utilizan en biotecnología, en algunos casos de terapia genética, para introducir genes de un organismo en otro diferente.

Para la clasificación de los liposomas en función de sus características fisicoquímicas, se tiene en cuenta su tamaño y el número de bicapas o lamelas que conforman la pared del liposoma (Ruano, 2013). En el caso de ser una sola bicapa la que separa el interior del disolvente externo, según se observa en la Figura 3, las estructuras se clasifican en función de su tamaño como vesículas unilamelares pequeñas cuyo tamaño puede ser desde 40 hasta 100 nm, grandes cuyo tamaño puede ser hasta de 500 nm o gigantes

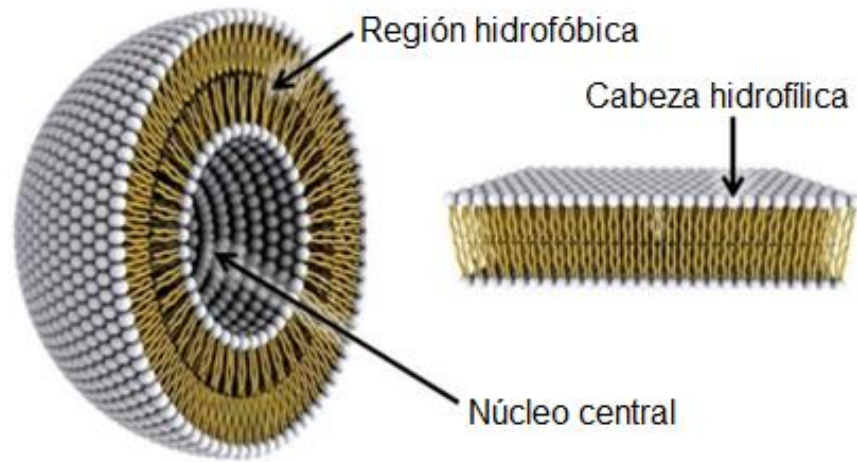


Figura 2: Estructura de los liposomas (Bitounis y col., 2012)

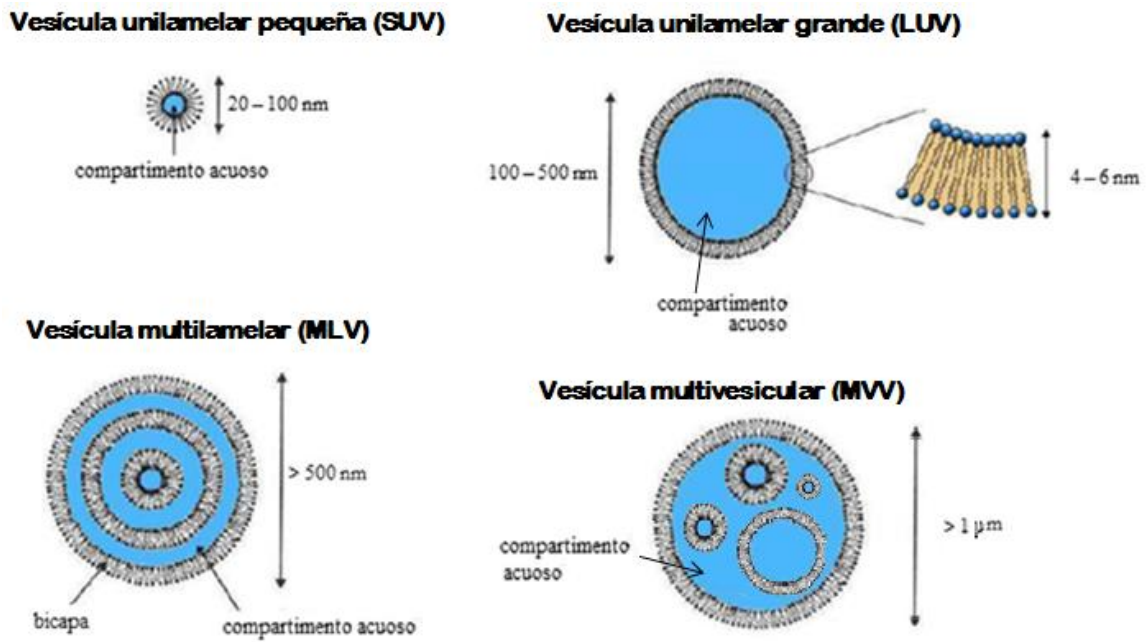


Figura 3: Diferentes tipos de vesículas liposomales [Adaptación de Ruano (2013)]

con un tamaño mayor a 1 μm . Se ha encontrado que varias vesículas unilamelares forman parte de una vesícula mayor, a este tipo se denomina vesícula multivesicular con tamaño mayor a 1 μm . En el caso de que las bicapas sean concéntricas se denomina vesícula multilamelar, con tamaño mayor a 500 nm.

Los liposomas pueden transportar las sustancias de interés en dependencia de sus propiedades: las sustancias liposolubles, disueltas en la bicapa lipídica; las sustancias hidrosolubles, disueltas en el núcleo acuoso; y otras sustancias sólidas encapsuladas dentro del liposoma.

Investigaciones realizadas han permitido detectar cuatro formas diferentes de interacción entre los liposomas y las células (Clares, 2003), aunque más de un mecanismo puede ocurrir al mismo tiempo:

1) Los liposomas pueden penetrar en la célula por endocitosis de las células fagocitarias del sistema retículo endotelial. Se desintegran por la acción de las enzimas celulares, con la consecuente liberación del fármaco. Según este mecanismo, los liposomas quedarían englobados en células con gran capacidad fagocitaria. La endocitosis del vector en liposomas puede modificar a la sustancia transportada.

2) Puede producirse una fusión directa de las membranas del liposoma con la membrana plasmática celular, mediante inserción del bistrato lipídico del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea del contenido liposómico dentro del citoplasma; es decir por coalescencia, el fármaco pasa del liposoma al interior celular.

3) Igualmente, cabe la posibilidad de una transferencia de lípidos de la bicapa liposomal a las membranas celulares o subcelulares, sin adsorción previa ni asociación del contenido liposomal.

4) Por adsorción estable de los liposomas a la superficie celular mediante fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles o mediante interacciones inespecíficas con componentes de la superficie celular.

1.4 Caña de Azúcar (*Saccharum spp.*)

La caña de azúcar es el principal cultivo azucarero a nivel mundial, provee aproximadamente el 70 % de la producción total de azúcar (Perera y col., 2020). Se cultiva con fines comerciales en más de 100 países (Marques y col., 2017). El 55.1 % de las áreas cosechadas a nivel global corresponden al Continente Americano, el cual acumuló en 2017 el 71.3 % de la producción mundial de azúcar de caña (FAO, 2019b). Se obtienen, además, unos 50 subproductos, con alto valor comercial (La O, 2007).

Este cultivo ha llamado la atención como una fuente renovable de energía, principalmente por la producción de alcohol. También se puede producir bioetanol de segunda generación con el uso de enzimas degradadoras de la pared celular para la depolimerización de la celulosa presente en el bagazo; el creciente uso de la bioelectricidad también ha sido posible gracias al uso de esta biomasa resultante de la producción industrial de azúcar. Lo anterior explica el por qué la caña de azúcar es la segunda mayor fuente de energía en Brasil (Marques y col., 2017).

La producción de caña de azúcar es usualmente retada por diversos factores bióticos y abióticos. En Cuba existen informadas 59 enfermedades en el cultivo; dentro de estas,

el carbón, la roya parda, la escaldadura foliar y el mosaico son consideradas criterios de selección de nuevos cultivares por su importancia económica y distribución nacional (Puchades, 2017).

1.5 Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar

El Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar, o *Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)*, es el agente causal de la enfermedad conocida como mosaico de la caña de azúcar. A mediados de la década de 1920 una epifitía⁴ de mosaico casi causó el colapso de la producción en Argentina, Brasil, Luisiana (EE.UU.), Puerto Rico y Cuba. Los clones utilizados en la época, conocidos como cañas nobles, eran altamente susceptibles al mosaico y tuvieron que ser reemplazados por cultivares tolerantes o resistentes (Puchades, 2017).

En la Figura 4 se puede observar el síntoma más distintivo de la enfermedad, un patrón de zonas de color verde oscuro alternadas con otras más claras (cloróticas con menor contenido de clorofila). En general las partes cloróticas tienen bordes difusos, aunque en ocasiones pueden ser marcados y llegar a ser áreas amarillas, rojas o necróticas en los casos más severos. Estas son más evidentes en la base de las hojas y pueden estar presentes en la vaina, pero no en el tallo (Comstock y col., 2000).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, *SCMV* es miembro de la familia *Potyviridae*, género *Potyvirus*, subgrupo *SCMV*. Todos los miembros de la familia *Potyviridae*, son partículas filamentosas de longitud variable aproximada entre 650-900 nm, 500-600 nm y 200-300 nm, y con diámetro de 11 a 13 nm. Están constituidas por unas 20 000 unidades de la proteína estructural de la cápsida que recubre a una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena y polaridad positiva (Puchades, 2017).

⁴ Fenómeno consistente en que una enfermedad afecte simultáneamente a un gran número de plantas de la misma especie en la misma región. Cuando se trata de enfermedades que afecten a plantas y a humanos, se emplean, respectivamente, las palabras epifitía y epidemia.

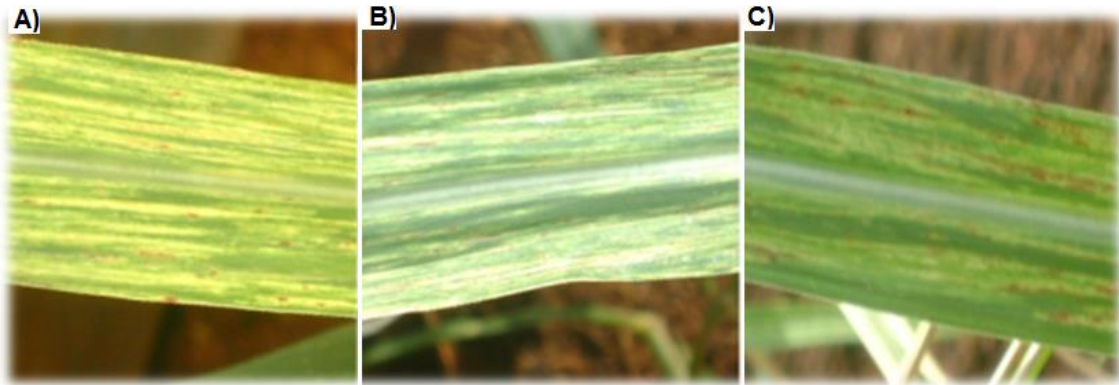


Figura 4: Síntomas de mosaico observados en cultivares de caña de azúcar. A) CP31-294; B) B34104; C) C236-51 (Puchades, 2017)

Materiales y Métodos

II. Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, y en la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) “Oriente - Sur” en Palma Soriano, Santiago de Cuba, en el período comprendido desde marzo a octubre del 2019.

2.1 Obtención de la enzima endoPG

La cepa *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 de la colección de cultivos del CEBI, es el microorganismo utilizado para la producción de la enzima endoPG.

La propagación del microorganismo se efectuó en cultivo agitado a 160 rpm (Mini Zaranda MIZARD. 2001, Retomed, Cuba), 28 °C durante 24 horas en un Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo YPD (extracto de levadura [UNI-Chem, China] – 10 g/L, peptona [UNI-Chem, China] – 20 g/L, glucosa [UNI-Chem, China] – 20 g/L).

Posteriormente, este cultivo se utilizó como inóculo (2 % v/v) del medio de producción YD120 (extracto de levadura [UNI-Chem, China] – 10 g/L, glucosa [UNI-Chem, China] 120 g/L, pH 5, 25 °C). En esta fase el cultivo tuvo lugar en un Erlenmeyer con 1 L del medio de producción, con agitación y con limitaciones de oxígeno, a la temperatura de 25 °C durante 60 horas. Terminada la fermentación, el cultivo se centrifugó (Heal Force, China) a 7 500 rpm durante 5 minutos para separar la biomasa y el sobrenadante se filtró a través de un filtro bacteriológico de 0.22 µm (Millipore). Se tomó una muestra y se guardó en refrigeración para la posterior determinación de actividad enzimática en el medio.

2.2 Purificación de la enzima endoPG

2.2.1 Diálisis

El crudo enzimático fue dializado contra el buffer Tris-HCl 20 mmol/L, pH 6.7 a través una membrana de 12-14 kDa de corte (Spectra/Por® 2 Dialysis Membrane MWCO, EU) durante 24 horas a 15°C aproximadamente.

2.2.2 Cromatografía de Intercambio Iónico

Un total de 150 mL del dializado fueron aplicados a una columna de intercambio iónico Q-Sepharosa Fast Flow (Pharmacia, Suecia) previamente equilibrada al mismo pH y fuerza iónica del dializado con el buffer Tris-HCl 20 mmol/L, pH 6.7. Una vez lavada la columna con el mismo buffer se eluyó con gradiente continuo de 0-300 mmol/L de NaCl en el mismo buffer a un flujo de 3.6 mL/h. Se colectaron fracciones de 1 mL, se agruparon aquellas pertenecientes a un mismo pico y se conservaron para la posterior determinación de la actividad enzimática y proteínas totales.

2.2.3 Precipitación con etanol

Se tomaron 50 µL de crudo enzimático de poligalacturonasa, y se clarificó mediante precipitación con 950 µL de etanol helado. Se homogenizó e incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó (Labnet Spectrofuge 24D) durante 10 minutos a 7 000 rpm y se desechó el sobrenadante. La enzima se resuspendió en buffer acetato de sodio 50 mmol/L, pH 5 hasta 1 mL.

2.3 Determinación de la actividad enzimática poligalacturonasa

Se siguió el procedimiento descrito por Serrat y col. (2002). Para ello, se utilizó como sustrato ácido poligalacturónico (SIGMA) 5 g/L en buffer acetato de sodio, 50 mmol/L, pH 5. La actividad enzimática se estimó del incremento en el poder reductor del sustrato a 37 °C en 10 min, el cual se evaluó mediante el método de Somogyi-Nelson. La mezcla de reacción estuvo conformada por 0.4 mL de sustrato y 0.1 mL de una dilución apropiada de la enzima en buffer acetato de sodio 50 mmol/L, pH 5. Una unidad de actividad endoPG se definió como la cantidad de enzima que produce un incremento de 1 μ mol de extremos reductores (expresados como ácido galacturónico) en un minuto bajo estas condiciones.

2.4 Determinaciones espectrofotométricas

- *Determinación de azúcares reductores*

Los azúcares reductores se determinaron según el método de Somogyi-Nelson (1952). Fue utilizado ácido galacturónico (SIGMA) como patrón, en el rango de 20 – 100 μ g/mL.

- *Determinación de proteínas solubles*

La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método de Lowry y col. (1951). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 650 nm y se utilizó como patrón seroalbúmina bovina (BDH, Inglaterra) en el rango de 20 – 500 μ g/mL.

2.5 Encapsulación en liposomas de la enzima endoPG

Los liposomas se prepararon según el método de inyección de etanol propuesto por Batzri y col. (1973) con modificaciones. Se pesaron 462 mg de lecitina de soya (Grupo VivePlus, 2019), que equivalen a 92.4 mg de fosfatidilcolina, y se diluyeron en 3 mL de etanol. Se separó la parte soluble en etanol (fracción rica en fosfatidilcolina) de la insoluble por centrifugación. La fracción alcohólica se añadió con una jeringuilla a razón de 1.5 mL/min en 60 mL de una solución de la enzima en buffer acetato de sodio 50 mmol/L bajo agitación magnética (500 rpm). La suspensión de liposomas se mantuvo bajo agitación magnética por 15 min a temperatura ambiente, y se almacenaron a 4°C.

2.6 Caracterización del preparado liposomal

- *Concentración de liposomas*

Diferentes diluciones de los liposomas se contaron en una cámara de Neubauer (BRAND, Alemania, 0.1 mm, 0.0025 mm²) con la ayuda de un microscopio óptico (Motic BA210, China) en el aumento 40X.

- *Determinación del diámetro de los liposomas*

El tamaño de los liposomas se estimó con la ayuda del programa informático ImageJ 1.43u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), y con fotografías de los mismos en los aumentos 10X y 40X. Se utilizó como referencia un portaobjetos graduado con una microrregla de 1 mm de longitud con divisiones de 0.01 mm. El diámetro medio y la desviación estándar se calcularon a través el programa Microsoft Excel. Para una mejor observación de los liposomas, estos fueron teñidos con el colorante para lípidos Sudán III.

- Determinación de la eficiencia de encapsulación

Las vesículas liposomales se separaron de la enzima no encapsulada por cromatografía de exclusión molecular. A una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia, Suecia) de 14.5 x 1 cm, previamente equilibrada con buffer acetato de sodio 50 mmol/L + NaCl 150 mmol/L, pH 5, se le aplicaron 0.5 mL de la suspensión de liposomas y se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 9.6 mL/h. Se colectaron fracciones de 0.5 mL hasta alcanzar la elución de los liposomas. Las fracciones posteriores se unificaron y se determinó su actividad enzimática. Esta correspondió a la actividad enzimática no encapsulada. La actividad enzimática de la solución de enzima a encapsular representó la actividad enzimática total. La eficiencia de encapsulación fue determinada según:

$$(1) EE = \frac{AE\ total - AE\ ext}{AE\ total} * 100$$

Donde:

EE = Eficiencia de encapsulación

AE total = actividad endoPG total

AE ext = actividad endoPG no encapsulada

2.7 Evaluación del preparado liposomal como elicitador de respuestas de defensa en caña de azúcar

La plantación e inoculación de los cultivares de caña de azúcar SP70-1284 susceptible al *SCMV* y C323-68 resistente se realizó en el invernadero de la ETICA "Oriente-Sur". Se utilizaron propágulos de una yema, tomados de semilla sana de seis meses de edad, los que se plantaron a una distancia de 5 cm entre sí en canteros con 1.0 m de ancho por 4.0 m de largo y altura de 0.25 m.

Se evaluó la utilización del preparado liposomal como inductor de defensas en caña de azúcar frente a la infección por *SCMV*, para lo cual se tomaron 2.5 mL del preparado liposomal obtenido y se llevó a un volumen final de 100 mL con buffer acetato de sodio 50 mmol/L, pH 5, al que se denominó a partir de ese momento como Bioproducto - UO (BP-UO). Se utilizó además un bioproducto a base de compuestos fenólicos obtenidos por la ETICA Villa Clara, que se utilizó con anterioridad para inducir respuestas defensivas en plantas (Arencibia y col., 2008), referido en lo adelante como Bioproducto - VC (BP-VC). Se asperjó el área foliar con 50 mL de los productos, con ayuda de frasco atomizador hasta punto de goteo.

Se realizaron tres aplicaciones de los productos: a las 72 h y 1 h antes de la inoculación con *SCMV*, y 72 h después de la misma. Se utilizaron cuatro tratamientos: 1) BP-UO + Inoculación *SCMV*; 2) BP-VC + Inoculación *SCMV*; 3) Inoculación *SCMV* (control de infección); 4) Sin inocular (control sano). Se utilizó un diseño completo al azar con tres repeticiones y 20 plantas por réplica.

El inóculo se preparó a partir de jugo de hojas sintomáticas del cultivar B34104 (infectado con *SCMV*) mezclado con un polvo abrasivo (tierra de infusorios). La inoculación con el patógeno (*SCMV*) se realizó según las Normas y Procedimientos del Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar en Cuba utilizado por

Materiales y Métodos

Puchades y col. (2016) mediante frotación de las hojas +3 con motas de algodón embebidas en la preparación viral.

Se realizaron muestreos que consistieron en fracciones del tercio medio de cinco hojas +3, a las 2 y 4 h post inoculación para los estudios histológicos y a los 28 días para la extracción de los ácidos nucleicos totales. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

2.7.1 Determinación de la severidad de infección por *SCMV*

A los 28 días posteriores a la inoculación se utilizó una escala de 3 categorías: 0 = sin síntomas, 1 = síntomas leves, 2 = síntomas severos (reducción del crecimiento), para determinar el porcentaje de severidad, calculado mediante la ecuación de Townsend – Heuberger (Townsend y col., 1943):

$$(2) S = \frac{\sum_{i=0}^n (n \cdot v)}{i \cdot N} * 100$$

donde:

S= Severidad del ataque expresada como porcentaje

v= Valor de la categoría

i= Valor de la categoría más alta

n= No de plantas (partes de plantas) en cada categoría

N= No Total de plantas (partes de plantas) investigadas

Los datos originales se comprobaron de acuerdo a su normalidad y homogeneidad de varianza, mediante prueba de Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors. Se utilizó la fórmula $y = \log(x+1)$ para transformar los porcentajes de severidad. Para la comparación de las medias entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

2.7.2 Detección histoquímica de radicales superóxido

Se utilizó la tinción histoquímica con nitroazul de tetrazolio (NBT, del inglés, Nitro Blue Tetrazolium), según Wohlgemuth y col. (2002) con modificaciones. Para analizar la producción *in situ* de radicales superóxidos, las muestras foliares se sumergieron en un buffer fosfato de potasio 50 mmol/L, pH 8 que contenía 0.1 % de NBT y azida sódica 10 mmol/L. Para asegurar la infiltración del NBT, se hicieron 2 golpes de vacío de 1 min cada uno. Seguidamente las muestras se incubaron en oscuridad durante 2 horas; y luego sumergidas en hipoclorito de sodio 5 % hasta eliminar completamente la clorofila.

La acumulación de superóxido se estimó por observación en el estereoscopio de los depósitos negro - azulados de formazán (compuesto resultante de la interacción entre la solución NBT y los radicales superóxidos) en los tejidos foliares. Se utilizó una escala de tres niveles: Alto = acumulación de gran cantidad de manchas en el tejido foliar, Medio = acumulación de manchas dispersas y/o formación de líneas, Bajo = acumulación de pocas manchas o ninguna. Se realizaron cortes transversales para observar las acumulaciones intra-tisulares de radicales en el microscopio óptico.

2.7.3 Expresión de genes de resistencia en *Saccharum* spp.

Se utilizaron 10 pares de cebadores para genes de resistencia (genes R) diseñados por el INICA (Tabla 1), basados en el análisis de 243 secuencias previamente informadas sobre la interacción caña de azúcar - *Sporisorium scitamineum* (Heinze y col., 2001; Que y col., 2001; Thokoane y col., 2001; La O y col., 2008).

- **Extracción de ácidos nucleicos totales**

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó por el método de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) modificado por Racedo y col. (2015). Se pesaron 0.2 g de la muestra colectada. Esta se maceró en mortero con nitrógeno líquido y en campana de extracción de gases, se añadieron 0.5 mL de solución de extracción (0.1 mol/L Tris-HCl pH 8; 1.4 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA, 0.1 % β -mercaptoetanol, 2 % CTAB), previamente calentada a 60 °C.

Las muestras se homogeneizaron y se incubaron 30 min a 60 °C. Posteriormente, se agregaron 0.375 mL de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Las muestras se centrifugaron 10 min a 4 °C y 8 000 rpm. Se transfirieron 0,7 mL de sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionaron 0.5 mL de isopropanol frío.

La mezcla se agitó por inversión y se incubó a -20 °C durante 1 h. Luego, se centrifugó 10 min a 4 °C y 10 000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0.2 mL de etanol 70 %. Se repitieron los pasos de centrifugación y lavado. Después de una centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C, el precipitado se secó durante 5 min en liofilizadora y se resuspendió en 25 μ L de agua con pirocarbonato de dietilo (DEPC) 0.01 %.

- **Amplificación de genes R**

El ADNc se sintetizó con la enzima reverso-transcriptasa M-MLV (Promega), según las especificaciones del proveedor y el empleo de un oligo-dT como cebador.

La mezcla de PCR se realizó con 2 μ L ADNc, 25 pmol de cada cebador, 2.5 μ L de solución amortiguadora para PCR 1X (HeberBiotec), 2.5 μ L MgCl₂ (HeberBiotec), 0.5 μ L dNTPs 10 μ mol/L (HeberBiotec), 0.4 unidades de ADN-polimerasa (HeberBiotec) y agua tratada con DEPC, hasta un volumen final de 25 μ L. Las reacciones se realizaron con el siguiente programa: un ciclo de 94 °C (3 min); 30 ciclos de 94 °C (30 s) / 52, 54, 56 °C (30 s) / 72 °C (1 min); un ciclo de 72 °C (10 min); y un ciclo final a 4 °C durante 10 min. Los resultados de la amplificación (5 μ L) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con Bromuro de etidio (Scharlau, España) 0.5 μ g/mL.

- **Análisis de expresión diferencial de genes R**

Para cada combinación de cultivar -gen - tratamiento, los datos se puntuaron como "1" para "presencia" y "0" para "ausencia". Con el empleo del software NTSYSpc v2.1 se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico basado en la matriz de covarianza genética estimada, mediante el método de la media aritmética de grupos pareados desbalanceados (UPGMA) y coeficiente de disimilitud como medida de la diferencia entre grupos. Se tuvo en cuenta no fusionar conjuntos demasiado lejanos, como criterio de parada del agrupamiento.

Tabla 1: Secuencia de cebadores, temperatura de alineamiento (Tm) y tamaño esperado del producto de amplificación.

Nombre	Descripción	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Talla (pb)
Cu-79	Hidrolasa	GCGAAGGCGTGCGACAAG GCCAATGGACCACCAGTTGC	52	308
Sa2-30	Resistencia a estrés	CATTGGTGGTTGCATTGGC GCCAGGAGAAGGATTGAGTGAC	52	511
Sa2-2	Regulación negativa	GAATTGATCTGCAGGAATGTGG GCGATAGAAGATGCCAACATTC	54	330
Sa2 -18	Proteína de unión a Zinc con dominio A20 y AN1	CTCGGATAAACATGACTGCCAG CGACCGAAACCACCATGAATAAC	54	338
Sa1-17	Endopeptidasa, superfamilia nucleótido N-terminal	CCTTCAATGTGCTCGGTGGG GCGAACACATCCTTAAGTAGATCG	54	236
Cu-37	Factor de elongación	CCACTGTAAGATTCCCGGAGATG CACGATTAACATGTGGAACATCAC	54	287
Cu-33	Promotor de crecimiento independiente de auxina	GGTCCATTGGTCCCCTTGATC CGAGTTGTTGCTTGTATCTCAGG	54	202
Cu-38	Proteína de transporte	GGGTAGCACACGCGAGAGG GCTTTCGGAGAGACTGGCTGG	54	358
Cu-29	Proteína de unión a ácido nucleico	GCAACAACCTATGGCGCAAAC CGTGAGGATGGGATGCAGAG	54	286
Sa2-31	Endoglucanasa, glicosil hidrolasa familia 9	GGAAGGCCAACATGGTTCAG CACTGCACTGCTGCTGTCC	56	311

Resultados y Discusión

III. Resultados y Discusión

3.1 Obtención y purificación de la enzima endoPG

La fermentación producida por la levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 se detuvo a las 60 horas. La precipitación con etanol disminuyó el fondo de azúcares reductores presentes en el caldo de cultivo. La actividad enzimática (AE) del filtrado fue de 14.9 U/mL.

Cuando el dializado fue aplicado a la columna, una pequeña parte de la actividad enzimática de la muestra no fue retenida en la matriz. No se encontró actividad enzimática endoPG en la fracción posterior al lavado de la columna. Con el gradiente de 0-300 mmol/L de NaCl, la concentración de proteínas totales eluye en cuatro picos, de modo similar ocurre con la AE (Figura 5), lo cual indica la existencia de varias isoenzimas con actividad endoPG.

Las fracciones con mayor actividad enzimática (fracciones 9 - 17) fueron agrupadas para formar un concentrado enzimático. La Tabla 2 muestra un resumen del proceso de purificación de la endoPG de *K. marxianus*.

El concentrado enzimático se ajustó una AE de 1.24 U/mL. Esta solución diluida de endoPG fue la utilizada para la obtención del preparado liposomal.

Se han informado valores de AE para esta cepa de 18 U/mL (Serrat y col., 2002), 17 U/mL (Serrat y col., 2004a), 15.4 ± 1.6 U/mL (González, 2005), 10.7 U/mL (Valverde, 2005), 11 U/mL (Vallejo y col., 2012) y 15.1 U/mL (De la Fé, 2016).

Este es el primer informe sobre varias isoenzimas producidas por la cepa *K. marxianus* CCEBI 2011. Esta cualidad, aunque no es frecuente, sí se observó anteriormente (Barnby y col., 1990). Estos autores separaron y caracterizaron cuatro formas de endoPG aisladas del sobrenadante de la cepa *K. marxianus* NCYC 587, para lo cual utilizaron una mezcla de técnicas cromatográficas: intercambio iónico (CM-Sephadex) - exclusión molecular (Sephadex G-75) - afinidad (concanavalin-A-Sepharose).

Serrat y col. (2002) lograron la purificación de esta enzima con el intercambiador catiónico SP-Sepharose Fast Flow, con el cual se obtuvo toda la AE endoPG en un solo pico. Retener toda la endoPG garantizará que al ser encapsulada en los liposomas, las distintas isoenzimas ejerzan su función dentro de las plantas.

Serrat y col. (2014) utilizaron otro protocolo para realizar la purificación de esta enzima, que siguió las primeras etapas del trabajo anteriormente citado: concentración del caldo de cultivo libre de células por ultrafiltración y posterior diálisis, pero eliminó el paso de cromatografía. Con este procedimiento lograron un recobrado del 73 %. El grado de purificación alcanzado por estos autores es adecuado para los propósitos de obtener un bioproducto, ya que al estar destinado para aplicar en las plantas la enzima endoPG no necesita de un alto nivel de pureza.

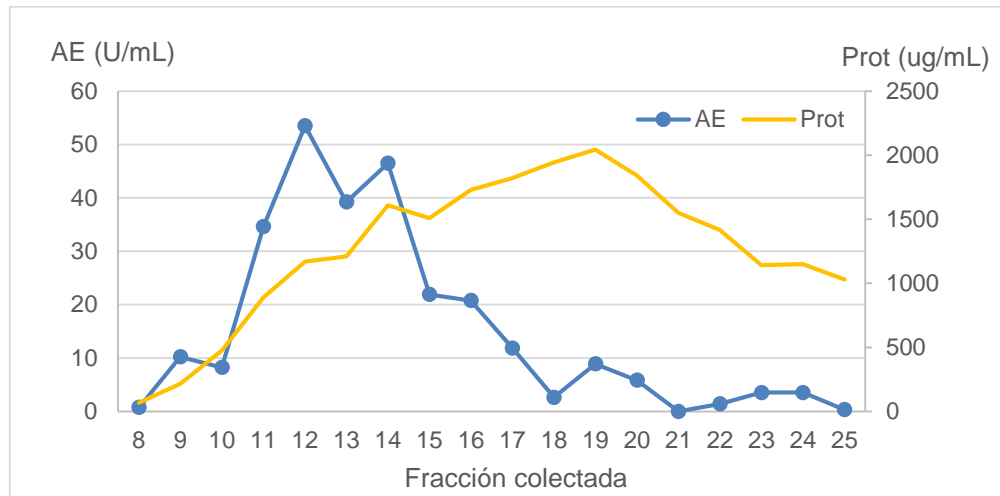


Figura 5: Elución de la endoPG en la columna Q-Sepharosa Fast Flow

Tabla 2: Resumen de la purificación de la endoPG desde el sobrenadante de *K. marxianus*

Paso de la Purificación	Sobrenadante	Cromatografía de Intercambio Iónico
Volumen (mL)	150	9
Proteína Total (µg/mL)	2499.3	1372.7
Actividad Enzimática (U/mL)	14.9	34.5
Actividad Total (U)	2235	310.7
Actividad Específica (U/mg)	6	25.1
Purificación (-veces)	1	4.2
Recuperado (%)	100	14

3.2 Preparación y caracterización de los liposomas

Una formación espontánea de liposomas ocurrió tan pronto la solución alcohólica entró en contacto con la fase acuosa. Los liposomas presentaron forma esférica (Figura 6), con una gran dispersión de tamaños. La concentración de vesículas formadas fue 3.82×10^5 liposomas/ μL .

En la Tabla 3 se muestra el diámetro de los liposomas determinado a los 15 y 90 días. Se observó que la tendencia de las vesículas liposomales es aumentar de tamaño en el tiempo.

La enzima endoPG no encapsulada fue separada de los liposomas por cromatografía de exclusión molecular. Los liposomas comenzaron a salir de la columna en la fracción 8, y dejan de apreciarse en la fracción 10. Se tomó la fracción 11 (la cual no presentaba turbidez y no se encontró AE endoPG en la misma), y a partir de ese momento, los siguientes 10 mL eluidos se tomaron como una única fracción (fracción 12), en la cual se encuentra la enzima no encapsulada. El volumen total eluido fue de 15.5 mL.

La actividad enzimática de la solución de enzima a encapsular (actividad enzimática total) fue de 1.24 U/mL, mientras que la actividad enzimática no encapsulada fue de 0.9 U/mL, lo cual representó una eficiencia de encapsulación del 28.3 %.

La pérdida del tamaño original de los liposomas fue debido a que la membrana de los liposomas obtenidos estaba conformada por fosfatidilcolina, por lo que las vesículas resultantes no tienen carga. La agregación de liposomas neutros es producida por las interacciones de Van der Waals. El tamaño de las vesículas influye en la estabilidad de los sistemas y se considera que a mayor tamaño son más estables. Los fenómenos de agregación y/o fusión provocan la pérdida de su tamaño original, y la composición lipídica es fundamental para lograr estructuras más estables. Se trata de un fenómeno natural e inevitable para membranas sin carga, y el camino para vencerla es la introducción de carga en la mezcla de lípidos. La repulsión electrostática es suficiente para estabilizar liposomas *in vitro* (New, 1990).

La adición de al menos un fosfolípido con carga es necesaria para lograr mantener el tamaño original de las vesículas. En muchas preparaciones se añaden fosfolípidos cargados negativamente en forma de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (New, 1990).

A través del programa ImageJ 1.43u se determinó que la longitud de los estomas de caña de azúcar es de $36.3 \pm 3 \mu\text{m}$. Dichos resultados indican que los liposomas obtenidos tienen un tamaño adecuado para introducirse en las plantas a través de estos.

Se han informado valores muy variables para la eficiencia de encapsulación por el método de inyección de etanol, por lo general son mayores para compuestos encapsulados en la bicapa lipídica que en el interior acuoso. Miao y col. (2015) obtuvieron un 82 % de EE de rapamicina en la bicapa, y Castan y col. (2012) alcanzaron valores entre un 45 - 60 % de EE de vainillina también en la parte apolar de los liposomas. Por otra parte, Wagner y col. (2006) lograron una EE del 25 - 30 % durante la encapsulación de una enzima recombinante en el interior de los liposomas. Sin embargo, Pérez (2017) obtuvo valores entre 10 - 60 % EE para encapsular proteína

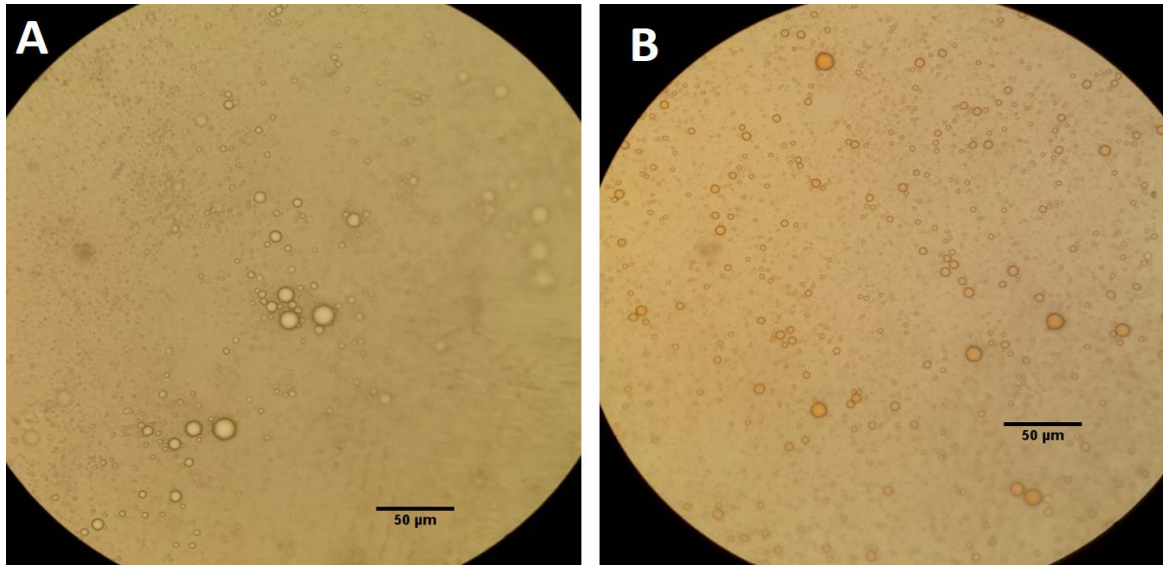


Figura 6: Vista de los liposomas al microscopio óptico. A: suspensión de liposomas. B: suspensión de liposomas teñidos con Sudán III

Tabla 3: Diámetro de los liposomas

Tiempo del preparado (días)	No. de liposomas medidos	Mínimo (μm)	Máximo (μm)	Promedio \pm SD ¹ (μm)
15	2536	1.0	31.2	3.3 \pm 2
90	593	1.6	32.1	5.9 \pm 4

¹ desviación estándar

hidrolizada de leche, mientras que la utilización de otro método de preparación liposomal, el método de evaporación de fase reversa, solo logró una eficiencia del 2 - 27 %.

3.3 Preparado liposomal como elicitador de defensas en caña de azúcar

3.3.1 Efectividad de los bioproductos contra la infección por *SCMV*

El Bioproducto - UO (preparado liposomal diluido), fue llevado a una actividad enzimática total de 0.03 U/mL, adecuada para la generación *in situ* de OGAs con capacidad elicitora de las defensas de las plantas.

El cultivar resistente (C323-68) no presentó síntomas de *SCMV* durante el desarrollo del experimento; mientras que el susceptible mostró un comportamiento que varió en función de los tratamientos aplicados (Figura 7).

Las plantas tratadas con la suspensión de liposomas (Tratamiento 1) disminuyeron la severidad de la infección un 44.4 % con respecto al control de infección (Tratamiento 3), mientras que las tratadas con el BP-VC (Tratamiento 2) lo hicieron en un 38.9 %, lo cual sugiere la efectividad de los biopreparados para elevar la respuesta inmune de este cultivar susceptible al *SCMV*.

3.3.2 Detección histoquímica de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

La tinción con NBT permitió la detección de radicales superóxido durante las primeras horas de infección con el patógeno. La acumulación de estas especies se pudo observar con la formación de puntos y líneas de color negro azulados. Su acumulación en las hojas de caña de azúcar estuvo localizada principalmente en las células del haz vascular (Figura 8 C).

Al analizar las hojas de caña de azúcar teñidas con NBT se pueden identificar tres niveles de acumulación de superóxido: alto (Figura 9: I, K, Ñ), medio (Figura 9: D, E, M, L) y bajo (Figura 9: A, B, C, F, G, H, J, N, O). A las 2 horas post inoculación (hpi) se pudo observar que el control sin infección del cultivar resistente (C323-68) tiene un nivel medio de acumulación de $O_2^{\cdot-}$ (D), el cual disminuyó al producirse la infección viral (C), incluso en las plantas tratadas con ambos bioproductos (A, B).

A las 4 hpi en las plantas tratadas con el BP-UO (Figura 9, I) la acumulación de $O_2^{\cdot-}$ alcanza un nivel alto, fue menor en las plantas inoculadas con el *SCMV* (K). El control sano mantuvo un nivel medio (L) y las plantas tratadas con el BP-VC mantuvieron niveles bajos (J).

El control no infectado del cultivar SP70-1284 (susceptible a *SCMV*) presentó un nivel bajo de acumulación basal de $O_2^{\cdot-}$ a las 2 hpi (Figura 9, H), mientras que al inocularse con *SCMV* prácticamente no se observa (G). Las plantas tratadas con el BP-UO mostraron un nivel medio (E), sin embargo, en las tratadas con el BP-VC no hubo una respuesta apreciable (F).

A las 4 hpi el nivel basal de este cultivar se mantuvo similar a lo observado a las 2 hpi (Figura 9, O), pero ocurrió un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en el Tratamiento 3 (Ñ). Las plantas tratadas con la suspensión liposomal mantuvieron un nivel medio de acumulación de ROS (M), pero en las tratadas con el otro bioproducto no se observó variación (N).

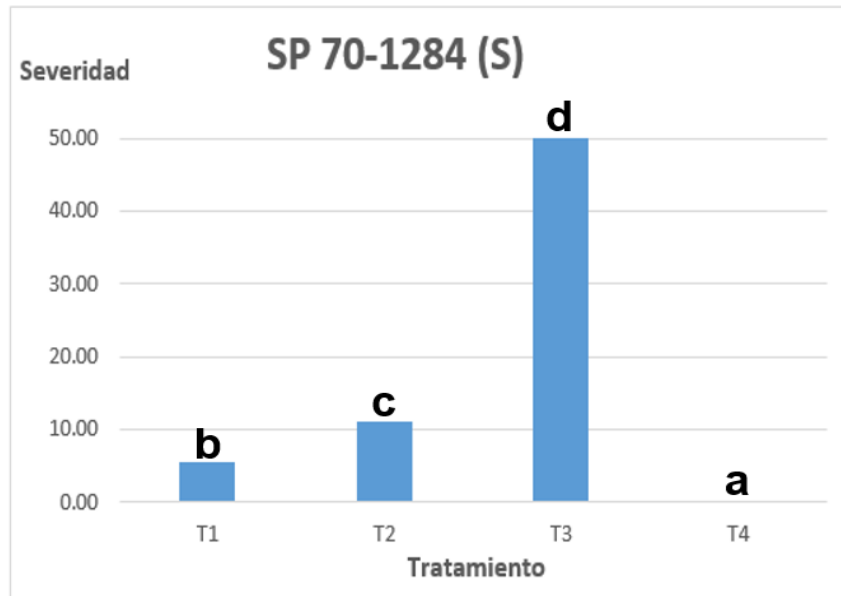


Figura 7: Comportamiento del cultivar SP70-1284 (susceptible a SCMV) a los 28 días después de aplicados los tratamientos: T1: BP-UO+SCMV; T2: BP-VC+SCMV; T3: inoculado con SCMV; T4: control sano.

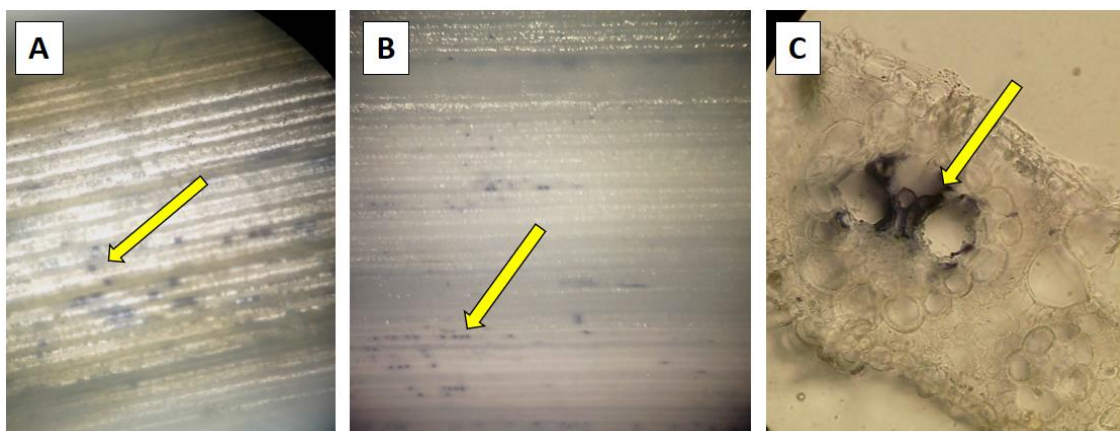


Figura 8: Acumulación de radicales superóxido en hojas de caña de azúcar. A: después de la tinción con NBT; B: después de la tinción con NBT y sin clorofila; C: corte transversal de una hoja teñida con NBT y sin clorofila (aumento 40X)

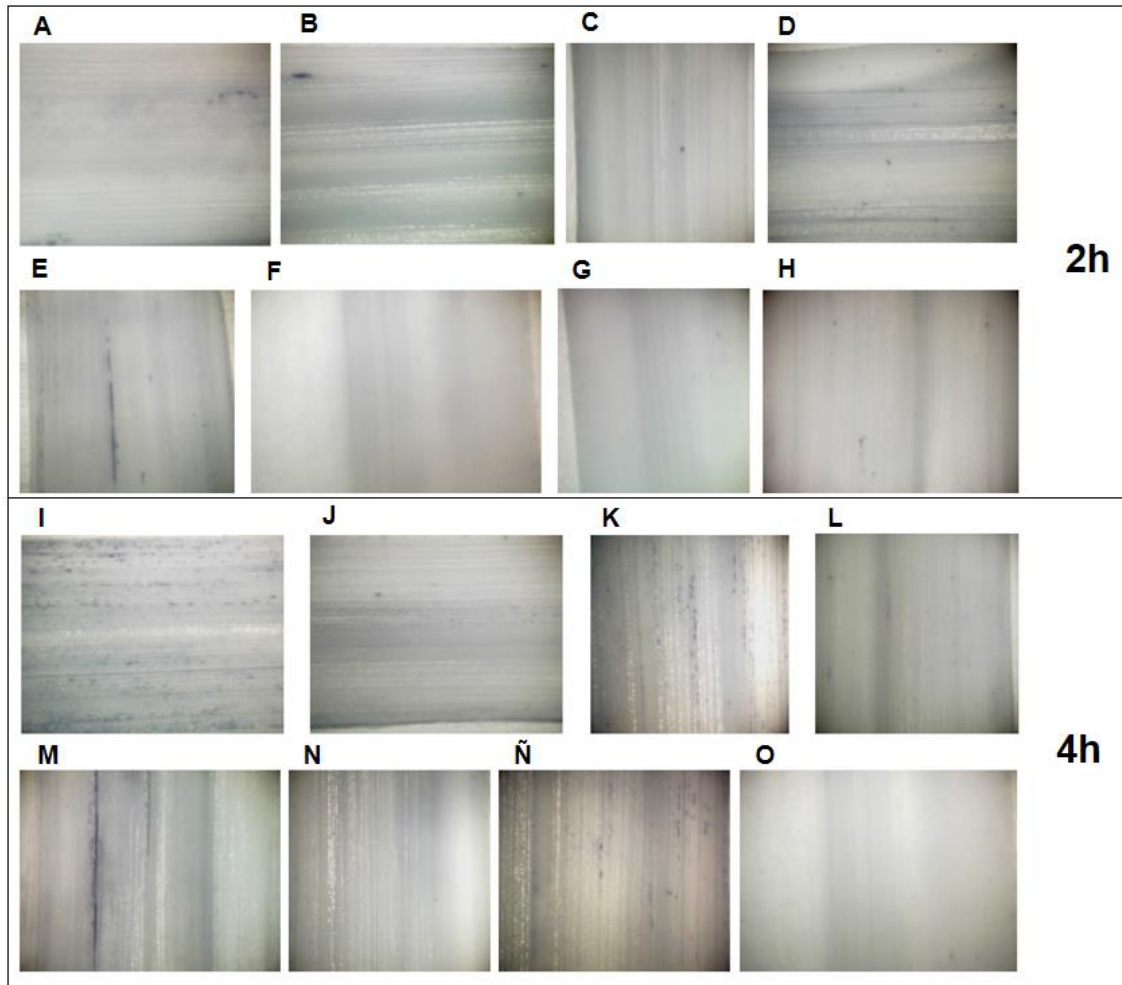


Figura 9: Acumulación de superóxidos mediante tinción con NBT en los cultivares C323-68 (resistente a *SCMV*, A-D, I-L) y SP70-1284 (susceptible a *SCMV*, E-H, M-O) a las 2 y 4 hpi: BP-UO+*SCMV* (A, E, I, M); BP-VC+*SCMV* (B, F, J, N); Inoculado con *SCMV* (C, G, K, Ñ); Control sano (D, H, L, O).

Resultados y Discusión

Los resultados anteriores muestran que ambos cultivares de caña de azúcar acumulan niveles basales de $O_2^{\cdot-}$, aunque con distinta intensidad. En ambos casos la inoculación con el patógeno disminuye estos niveles a las 2 hpi, y muestran un aumento a las 4 hpi. Esto indica que la reducción de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ pudieran ser identificados por las plantas como una señal de ataque, lo cual produciría el incremento en la producción de ROS.

El BP-UO a las 2 hpi en el cultivar resistente muestra el mismo comportamiento que al inocular el virus (disminuye la acumulación de $O_2^{\cdot-}$), pero a las 4 hpi ocurre un incremento notable de la actividad oxidativa. En el cultivar susceptible este bioproducto logra que la acumulación de radicales sea mayor que su nivel basal desde las 2 hpi, y se mantiene a las 4 hpi. El BP-VC no logra en ninguno de los casos una activación de este tipo de mecanismos.

Se puede inferir que la producción de $O_2^{\cdot-}$ está relacionada con la capacidad de la caña de azúcar para protegerse contra la infección por *SCMV*, aunque esta vía por sí sola no es garantía de resistencia a la enfermedad. Esto se puede afirmar ya que, aunque el BP-VC no permitió un aumento de la producción de ROS, el cultivar C323-68 no presentó síntomas de enfermedad, y se observó una disminución de la severidad de infección en el cultivar SP70-1284 tratado con este producto. Como se demostró en el epígrafe anterior el BP-UO tuvo una mayor efectividad en la protección del cultivar susceptible, y la acumulación temprana de $O_2^{\cdot-}$ puede ser una de las causas.

3.3.3 Expresión de genes de resistencia en *Saccharum* spp.

De un total de 10 genes R probados solo tres genes mostraron una expresión diferencial a los 28 días post inoculación en los diferentes tratamientos evaluados, estos fueron: Sa2-18, Sa1-17y Cu-29.

En la figura 10 se muestra el patrón de expresión del gen Sa2-18 a los 28 dpi. En el cultivar resistente este gen es constitutivo (Tratamiento 4), pero en el susceptible no se observa. Al retar ambos cultivares con *SCMV* (Tratamiento 3) su patrón cambió, C323-68 (resistente a *SCMV*) silencia el gen, mientras que SP70-1284 (susceptible a *SCMV*) lo expresa. Se aprecia que ambos productos mantienen la activación del gen en el cultivar resistente. Mientras que en el cultivar susceptible se induce solo con el Tratamiento 1.

La figura 11 muestra el patrón de expresión del gen Sa1-17 a los 28 dpi. En el cultivar resistente este gen es constitutivo (Tratamiento 4), pero en el susceptible no se observa, similar a Sa2-18. Al retar ambos cultivares con *SCMV* (Tratamiento 3) su patrón cambió para el cultivar resistente, en el cual se silencia, mientras que en SP70-1284 (susceptible a *SCMV*) se mantiene la no expresión. La aplicación de BP-UO y BP-VC promueven la expresión del gen en los cultivares susceptible y resistente respectivamente.

En la figura 12 se muestra el patrón de expresión del gen Cu-29 a los 28 dpi. El mismo es constitutivo en los dos cultivares evaluados. Al retar ambos con *SCMV* (Tratamiento 3) su patrón cambió, los cuales dejan de mostrar la banda esperada para este gen. La aplicación de BP-UO mantiene la activación del gen, mientras que BP-VC conserva el silenciamiento inducido por el virus.

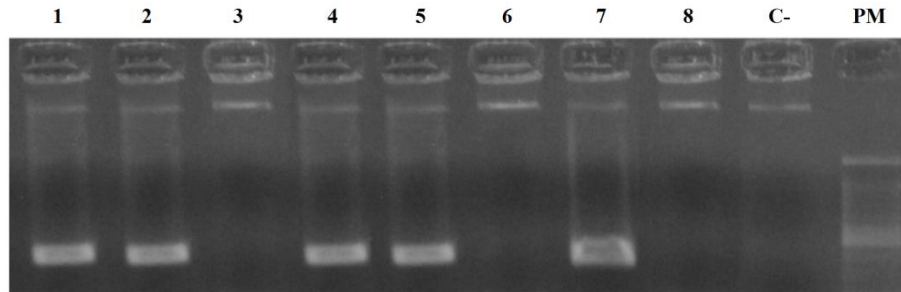


Figura 10: Expresión del gen Sa2-18 en los cultivares C323-68 (resistente a *SCMV*, carriles 1-4) y SP70-1284 (susceptible a *SCMV*, carriles 5-8). PM = patrón de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega); C- = control negativo (mezcla de reacción); BP-UO+*SCMV* (carriles 1 y 5); BP-VC+*SCMV* (carriles 2 y 6); Inoculado con *SCMV* (carriles 3 y 7); Control sano (carriles 4 y 8).

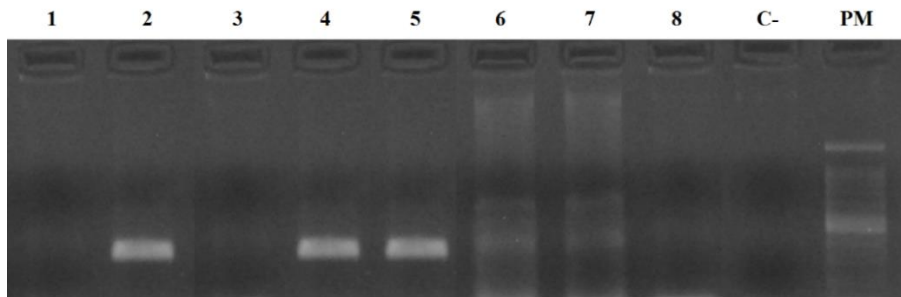


Figura 11: Expresión del gen Sa1-17 en los cultivares C323-68 (resistente a *SCMV*, carriles 1-4) y SP70-1284 (susceptible a *SCMV*, carriles 5-8). PM = patrón de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega); C- = control negativo (mezcla de reacción); BP-UO+*SCMV* (carriles 1 y 5); BP-VC+*SCMV* (carriles 2 y 6); Inoculado con *SCMV* (carriles 3 y 7); Control sano (carriles 4 y 8).

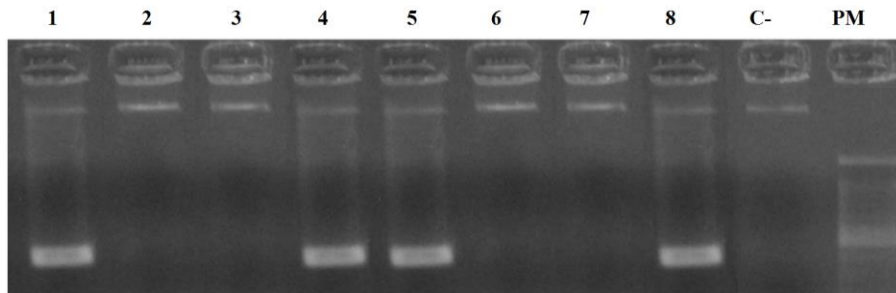


Figura 12: Expresión del gen Cu-29 en los cultivares C323-68 (resistente a *SCMV*, carriles 1-4) y SP70-1284 (susceptible a *SCMV*, carriles 5-8). PM = patrón de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega); C- = control negativo (mezcla de reacción); BP-UO+*SCMV* (carriles 1 y 5); BP-VC+*SCMV* (carriles 2 y 6); Inoculado con *SCMV* (carriles 3 y 7); Control sano (carriles 4 y 8).

Resultados y Discusión

El dendrograma del análisis de conglomerados (Figura 13) reveló la formación de tres grupos bien diferenciados. El grupo I comprende los Tratamientos 1 (BP-UO+SCMV), 2 (BP-VC+SCMV) y 4 (control sano) aplicados al cultivar resistente (C323-68) y el Tratamiento 1 aplicado al susceptible (SP70-1284). El grupo II comprende los Tratamientos 2 y 4 aplicados al cultivar susceptible y el Tratamiento 3 (inoculado con SCMV) aplicado al cultivar resistente. El grupo III está conformado por el cultivar SP70-1284 infectado con SCMV.

El gen Sa2-18 codifica una proteína homóloga a una proteína de dedos de zinc que contiene dominios A20 y AN1. Estas características están ampliamente dispersas en los genomas eucariotas, participan activamente en la unión de secuencias específicas al ADN/ARN y contribuyen al reconocimiento proteína - proteína (Gupta y col., 2012). La familia de proteínas que contiene el dominio de dedos de zinc A20 / AN1 está bien caracterizada en animales y se sabe que juega un papel central en la regulación de la respuesta inmune (Vij y col., 2008).

La presencia del dominio de unión dedos de zinc - ADN en la clase de proteínas sitios de unión a nucleótidos - repeticiones ricas en leucina (NBS-LRR) determina la función reguladora de esta proteína en condiciones de estrés. Estos dominios son básicamente factores de transcripción en origen que hacen que la proteína sea el regulador.

Se ha demostrado que muchas proteínas de defensa de arábido y arroz con dominio de dedos de zinc regulan la muerte celular programada (Gupta y col., 2012). Gupta y col. (2012) mostraron un análisis de secuencias de proteínas de resistencia a enfermedades de plantas en las que se encontraron dominios de dedos de zinc junto con otros dominios previamente descritos como NBS y LRR; ellos describieron que el gen Pi54, que confiere resistencia duradera a la enfermedad del tizón del arroz en *Oryza sativa*, codifica una proteína NBS-LRR junto con un dominio típico de dedos de zinc.

Las proteínas con dominio de dedos de zinc A20 / AN1 probablemente pertenecen a la clase reguladora de proteínas en la cascada de señalización de estrés, ya que carecen de cualquier señal de localización nuclear típica, y ya se ha demostrado que tales proteínas en animales funcionan en el citosol. Los genes que codifican el dominio de dedos de zinc A20 / AN1 de las plantas están asociados con la respuesta de la planta al estrés biótico y abiótico (Vij y col., 2008; Paul y col., 2015; Kang y col., 2016).

Las proteínas asociadas al estrés (SAP) son una clase de proteínas de dedos de zinc (ZFP) compuestas por dos dominios de dedos de zinc, un dominio A20 N-terminal y un dominio AN1 C-terminal. Estos pueden funcionar como factores de transcripción, proteínas de unión a ARN y enzimas de modificación de proteínas para regular el crecimiento, el desarrollo y las respuestas al estrés de un organismo (Kothari y col., 2016).

También se ha demostrado que la clase de proteínas de dedos de zinc A20 / AN1 están involucradas en la señalización de ubiquitina con evidencia directa disponible para la actividad de ubiquitina ligasa del dominio de dedos de zinc A20 (Vij y col., 2008; Chang y col., 2019). OsSAP1 es un gen del arroz asociado al estrés, relacionado con la regulación de la defensa basal contra la infección por patógenos a través de la

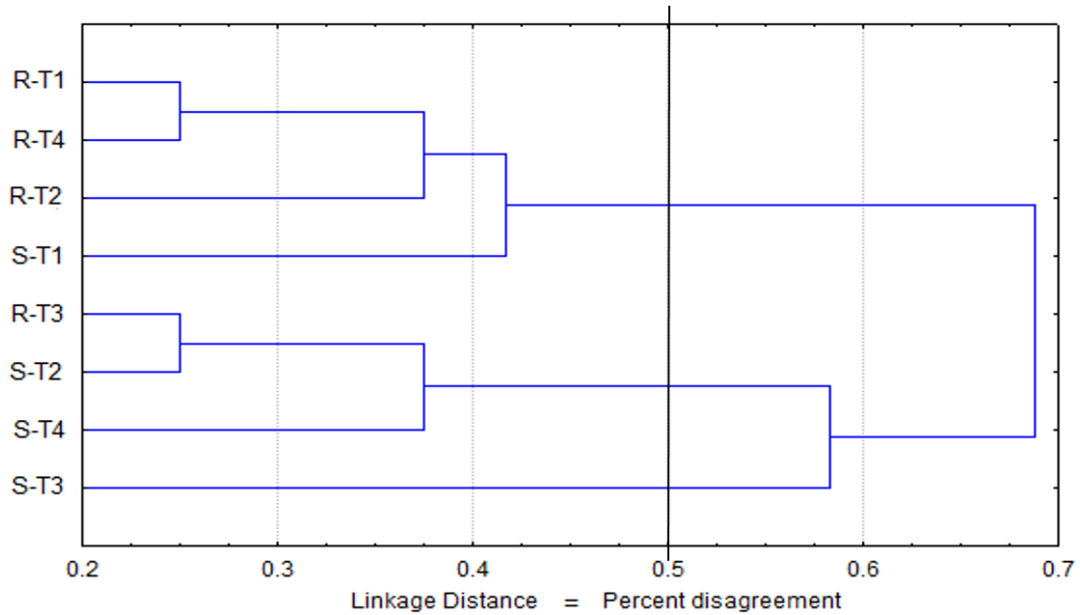


Figura 13: Agrupamiento entre la expresión génica de los cultivares C323-68 (resistente a *SCMV*, “R”) y SP70-1284 (susceptible a *SCMV*, “S”) en respuesta a la aplicación de los tratamientos: T1: BP-UO+*SCMV*; T2: BP-VC+*SCMV*; T3: inoculado con *SCMV*; T4: control sano.

Resultados y Discusión

regulación positiva de genes conocidos que responden a la defensa (Kothari y col., 2016).

Chang y col. (2018) identificaron una proteína de orquídea que contiene dominios de dedos de zinc A20 y AN1, designada como Pha13; esta fue regulada por infección viral, y la orquídea (monocotiledónea) y arabis (dicotiledónea) transgénicas que sobre expresan la Pha13 de orquídea obtuvieron una mayor resistencia a diferentes virus. Sus datos mostraron que el homólogo de Pha13 en arabis, AtSAP5, también está involucrado en la resistencia a los virus. Pha13 y AtSAP5 funcionan en la previamente desconocida vía inmune antiviral mediada por ácido salicílico (SA).

En otros estudios de Chang y col. (2019) sugieren que las proteínas A20 / AN1 pueden servir como un enlace entre SA y la ruta del ARN de interferencia (ARNi) en la etapa temprana de la inmunidad antiviral inducida por SA, y describieron un gen (Pha21) que codifica una proteína de orquídeas (*Phalaenopsis*) que afectan la expresión de genes antivirales PhaRdR1 (homólogo de la ARN polimerasa dependiente de ARN 1 de *Phalaenopsis*) y C9 PhaGRXC9 (Glutaredoxina).

La O y col. (2016) demostraron que el gen Sa2-18 es constitutivo en el cultivar de caña de azúcar C323-68. Mientras que en este trabajo se demuestra su silenciamiento ante la inoculación con *SCMV*. La inmunidad antiviral mediada por proteínas A20 / AN1 se conserva entre las plantas, y puede funcionar sola o de manera cooperativa para inducir la expresión de los genes mediados por SA y los involucrados en la vía del silenciamiento génico (ARNi): AGO1 y DCL4 (Chang y col., 2019).

El gen Sa1-17 codifica una proteína homóloga a una perteneciente al complejo proteasomal de *Zea mays* (maíz) (proteasome subunit beta type 1). Esta superfamilia contiene un dominio catalítico nucleófilo o Ntn hidrolasa. El dominio de pliegue Ntn comprende cuatro capas de hélices alfa y láminas beta en un motivo estructural de emparedado alfa-beta-beta-alfa. Las Ntn hidrolasas tienen secuencias divergentes, pero comparten un mecanismo enzimático común (NCBI, 2019a).

El proteasoma es un aparato destructor de proteínas involucrado en muchas funciones celulares esenciales, como la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular, las vías de transducción de señales, el procesamiento de antígenos para respuestas inmunes apropiadas, señalización de estrés, respuestas inflamatorias y apoptosis. Es un gran complejo de proteínas que consiste en un núcleo proteolítico llamado partícula 20S y factores auxiliares que regulan su actividad de varias maneras. La forma más común es el proteasoma 26S que contiene una partícula de núcleo 20S y dos partículas reguladoras 19S que permiten al proteasoma degradar las proteínas ubiquitinadas mediante un mecanismo dependiente de ATP (NCBI, 2019b).

El núcleo del proteasoma 20S está compuesto por 28 subunidades que están dispuestas en cuatro anillos apilados, lo que da como resultado una estructura en forma de barril. Los dos anillos finales están formados por siete subunidades alfa, y los dos centrales por siete subunidades beta. La cámara catalítica con los sitios activos está en el interior del barril. Es un complejo multicatalítico de proteasas que se caracteriza por su capacidad para escindir péptidos con Arg, Phe, Tyr, Leu y Glu adyacentes al grupo saliente a pH neutro o ligeramente básico. El proteasoma tiene una actividad proteolítica dependiente de ATP (UNIPROT, 2019a).

Resultados y Discusión

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) es uno de los principales sistemas de degradación de proteínas de las células eucariotas que no solo elimina las proteínas mal plegadas y defectuosas, sino que también controla varias vías celulares a través de la eliminación selectiva de proteínas reguladoras de vida corta. La degradación selectiva de proteínas por el UPS procede de la unión de una o más proteínas de ubiquitina al grupo ϵ -amino de un residuo Lys dentro de proteínas diana específicas catalizadas por la acción consecutiva de las enzimas E1, E2 y E3 (Üstün y col., 2016).

Las proteínas ubiquitinadas resultantes son luego reconocidas y degradadas por el proteasoma 26S. Mientras que la proteasa central 20S (CP) es un complejo de proteasa independiente de ATP y ubiquitina de amplio espectro, el subcomplejo de partículas reguladoras (RP) 19S ayuda a reconocer las proteínas diana ubiquitinadas y a abrir el canal de la CP para insertar los sustratos desplegados en la cámara de la CP para su degradación. Durante los últimos años, varios estudios han revelado que el UPS controla varios procesos en casi todos los aspectos de la homeostasis de las plantas (mediante la eliminación de las proteínas modificadas oxidativamente), que comprenden la división celular, el desarrollo de las plantas, respuestas a las hormonas de las plantas, así como al estrés biótico y abiótico (Üstün y col., 2016; Kovács y col., 2017).

En plantas, se informaron secuencias de ADNc de subunidades de proteasoma 20S para *Arabidopsis thaliana* y arroz. Se demostró que están involucradas en la progresión del ciclo celular, en la diferenciación de elementos traqueales, en la senescencia, en las primeras etapas del desarrollo de las plántulas y en la obtención de respuestas de defensa (Suty y col., 2003).

El proteasoma es un componente esencial de la inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y de la resistencia sistémica adquirida, por lo que es diana de múltiples efectores bacterianos. Una forma más directa de subvertir el UPS es lograda por SylA, un péptido pequeño no ribosómico secretado por *Pseudomonas syringae pv syringae*, el cual se une a las subunidades catalíticas del proteasoma 26S para inhibir su actividad y suprimir las reacciones inmunes de las plantas, incluido el cierre estomático y señalización mediada por SA.

Las primeras proteínas efectoras (EP) bacterianas identificadas que se dirigen directamente al proteasoma para la supresión de la defensa son XopJ de *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* y HopZ4 de *Pseudomonas syringae pv lachrymans*. Ambas EP, estrechamente relacionadas, interactúan con el componente proteasomal RPT6, una subunidad del 19S RP, para inhibir la actividad del proteasoma (Üstün y col., 2016).

Suty y col. (2003) clonaron por expresión diferencial tcl7, un ADNc de tabaco con altas homologías de secuencia con genes que codifican subunidades β 1 de proteasoma. Se demostró que el gen correspondiente se activaba mediante elicinas, H_2O_2 y ácido salicílico, que median las reacciones de defensa.

Además de la degradación de las proteínas, los proteasomas vegetales tienen actividad ARNasa que parece ser parte de un mecanismo de defensa contra los potyvirus vegetales como el virus del mosaico del tabaco (*TMV*) y el virus del mosaico de la lechuga (*LMV*). Las subunidades PAA y PAE de la proteasa central 20S pueden hidrolizar ARN de *TMV*. A su vez, el genoma de *LMV* codifica un inhibidor de la

Resultados y Discusión

actividad ARNasa proteasoma - dependiente, lo que representa otro ejemplo más de la "carrera de armamentista" de los patógenos de las plantas (Kurepa y col., 2016). La O y col. (2016) describieron que la expresión de Sa1-17 en el cultivar de caña de azúcar C323-68 fue inducida por la infección con SCMV. El presente trabajo demuestra silenciamiento de este gen ante la inoculación viral y su activación por el bioproducto BP-VC, similar a lo informado por Suty y col. (2003) en tabaco.

El gen Cu-29 codifica una proteína homóloga a una proteína de unión a ácido nucleico. Muchas proteínas eucariotas que se sabe o se supone que se unen al ARN monocatenario contienen una o más copias de un supuesto dominio de unión al ARN (RBD) de aproximadamente 90 aminoácidos (UNIPROT, 2019b).

Los ejemplos de RBD incluyen motivo de reconocimiento de ARN (RRM), dominio Pumilio / FBF, dominio de homología K y dominio de unión a ARN bicatenario (Sung y col. 2013). Los RRM se encuentran en una variedad de proteínas de unión a ARN, incluidas las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, las proteínas implicadas en la regulación del empalme alternativo y los componentes proteicos de las pequeñas ribonucleoproteínas nucleares. El motivo también aparece en algunas proteínas de unión a ADN monocatenarias. La estructura RRM consta de cuatro hebras y dos hélices dispuestas en un sándwich alfa / beta, con una tercera hélice presente durante la unión del ARN en algunos casos (UNIPROT, 2019b).

Las proteínas de unión a ARN (RBP) juegan papeles críticos en la regulación génica postranscripcional al controlar el empalme, la poliadenilación, la estabilidad del ARNm, el tráfico de ARN y la traducción. Además, algunas RBP funcionan como chaperonas de ARN. Se ha conocido que algunas RBP están involucradas en la inmunidad innata de las plantas, aunque pocas RBP han sido caracterizadas en detalle en la defensa de las mismas (Sung y col. 2013).

Los factores de transcripción (TF) en las células vegetales interactúan con secuencias de ADN específicas en los promotores de genes diana para activar o inhibir la transcripción y expresión de genes diana, y regulan así la expresión de estos genes. Esta modulación provoca la adaptación a los efectos y daños de diversos tipos de estrés. Como una de las familias de TF más grandes de plantas específicas, se ha demostrado que WRKY está ampliamente implicado en las respuestas al estrés biótico y abiótico. Los WRKY TF también son una parte vital de la red de vías de señalización de las plantas, ya que regulan procesos fisiológicos y bioquímicos (Wang y col. 2018). Los factores de transcripción WRKY (WRKYs) son una gran familia de reguladores transcripcionales, que se definen por el dominio WRKY (el motivo WRKYGQK al final del extremo N-terminal y un motivo similar al dedo de zinc en el extremo C-terminal) (Bai y col., 2018).

Las plantas han desarrollado dos capas de respuestas de defensa inducidas, en las que se muestra que los WRKY funcionan como reguladores positivos o negativos. La primera capa, denominada inmunidad desencadenada por PAMP (PTI), se activa mediante el reconocimiento de los PAMP por los receptores de reconocimiento de patrones de la planta. Los patógenos adaptados pueden expresar proteínas efectoras para suprimir la PTI. La segunda capa, denominada inmunidad desencadenada por

Resultados y Discusión

efector (ETI), se activa por el reconocimiento de los efectores patógenos por las proteínas de resistencia (R) de la planta.

Las proteínas R de las plantas generalmente están compuestas por sitios de unión a nucleótidos - repeticiones ricas leucina (NBS-LRR). PTI y ETI inducen respuestas de resistencia adquiridas tanto locales como sistémicas a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de una red de señalización integrada que incluye MAP quinasas y vías de señalización hormonal. El ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno son las hormonas clásicas relacionadas con la inmunidad (Bai y col., 2018).

Los WRKY están involucrados en PTI y ETI en diferentes niveles regulatorios. En primer lugar, los WRKY pueden interactuar directa o indirectamente con PAMP o proteínas efectoras para activar o reprimir tanto PTI como ETI. En cebada (*Hordeum vulgare*), HvWRKY1 y HvWRKY2 fueron activados por flg22 (un MAMP) y actuaron como represores de la PTI contra el hongo del oídio *Blumeria graminis f.sp. hordei*. Los resultados anteriores sugieren que los miembros de esta subfamilia pueden tener una función reguladora negativa conservada en la defensa de las plantas. Sin embargo, la sobreexpresión del miembro de la subfamilia WRKY II-a OsWRKY71 mejoró la resistencia a *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* en el arroz (Bai y col., 2018).

Liu y col. (2014) demostraron que SIDRW1 (WRKY1 relacionado con la defensa de *Solanum lycopersicum*) es un regulador positivo de la respuesta de defensa en tomate contra *Botrytis cinerea* y el estrés oxidativo. Lyons y col. (2013) mostraron que una RBP, conocida como FPA, regula negativamente la resistencia basal al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* en Arabidopsis.

En segundo lugar, los WRKY pueden regularse mediante proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Bai y col., 2018). Las cascadas de MAPK de plantas desempeñan funciones de señalización esenciales en múltiples respuestas de defensa, especialmente en la detección de PAMP o efectores patógenos y en la señalización negativa (Seo y col., 2015). En *Nicotiana benthamiana*, NtWRKY7, NtWRKY8, NtWRKY9 y NtWRKY11, fosforilados por MAPK que responden a los patógenos, pudieron unirse a la caja W en el promotor del gen RBOHB que conduce al estallido de ROS (Bai y col., 2018). En Arabidopsis, AtWRKY33 juega un papel en la resistencia a los hongos necrotrofos patógenos *B. cinerea* y *Alternaria brassicicola*. Un estudio reciente reveló que AtWRKY33 es fosforilada por MPK3 / MPK6 en respuesta a *B. cinerea*, y juega un papel en la biosíntesis de fitoalexina. AtWRKY33 se une no solo al promotor de deficiencia de fitoalexina 3, que cataliza el paso final en la biosíntesis de camalexina, sino también a su propio promotor, lo que indica un posible circuito regulador de retroalimentación positiva (Seo y col., 2015).

En tercer lugar, los WRKY regulan las vías de señalización hormonal. Por ejemplo, la sobreexpresión de AtWRKY18 y AtWRKY70 condujo a la expresión inducida de genes relacionados con la defensa, incluido el PR1 inducido por SA (Bai y col., 2018). Otro estudio reveló que AtWRKY33 se une a los promotores de la 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa 2 (ACS2) / ACS6 en la vía biosintética de etileno y activa la expresión de ACS2 / ACS6 en respuesta a *B. cinerea* (Seo y col., 2015). Además, los WRKY pueden contribuir a la inmunidad de las plantas mediante la modulación de

Resultados y Discusión

pequeños ARN, mediante mecanismos epigenéticos a través de la metilación de histonas, así como mediante la degradación mediada por proteasomas y la señalización retrógrada entre orgánulos (Bai y col., 2018).

Muchos WRKY de tomate funcionan como reguladores positivos de las respuestas de las plantas al estrés biótico. SIWRKY31 y SIWRKY33, homólogos de AtWRKY33, pudieron complementar la comprometida tolerancia a *B. cinerea* del mutante *atwrky33*. Además, la sobreexpresión del alelo de *Solanum pimpinellifolium* SIWRKY33 resultó en resistencia a los oomicetos hemibiotróficos *Phytophthora nicotianae* en tabaco y *Phytophthora infestans* en tomate (Bai y col., 2018).

WRKY TF interactúa con las proteínas R. En la cebada, el locus de resistencia al moho a10 (MLa10), una proteína en espiral (CC) – NBS -LRR que confiere resistencia al oídio, interactúa con *Hordeum vulgare* WRKY1 y WRKY2 (HvWRKY1 y HvWRKY2) en presencia del efector AVRa10. HvWRKY1 y HvWRKY2 reprimen la respuesta de defensa basal contra el hongo virulento del oídio, *B. graminis*. La interacción con MLa10 ocurre después de la inoculación con *B. graminis* que expresa AVRa10, y la defensa se activa. Un estudio reciente también reveló que Pb1 (rice panicle blast 1), una proteína CC-NBS-LRR, interactúa con *Oryza sativa* WRKY45 (OsWRKY45) en el núcleo y media la resistencia al tizón del hongo *Magnaporthe oryzae*. Otro ejemplo, Arabidopsis WRKY52 / RRS1, una proteína Toll / interleukin-1 receptor (TIR)-NBS-LRR contiene un dominio WRKY que confiere resistencia contra el patógeno bacteriano *Ralstonia solanacearum* (Seo y col., 2015).

Carrasco y col. (2003) informaron una proteína de unión al ADN de plantas de tabaco, denominada DBP1, con actividad proteína fosfatasa. Esta se une de manera secuencial - específica a un elemento cis - actuante⁵ de un gen relacionado con la defensa (CEV11, un gen relacionado con la defensa de plantas de tomate) y participa en su regulación transcripcional.

Los bZIP son otros TF que se han descrito en Arabidopsis, arroz, sorgo, soja y recientemente en maíz. En las plantas, participan en procesos importantes como la defensa contra patógenos, la señalización de estrés abiótico, la señalización hormonal y otras funciones (Llorca y col., 2014). El nombre de la familia se deriva del dominio de la región básica / cremallera de leucina (bZIP) presente en todos sus miembros. Este dominio consiste en una hélice α ininterrumpida que comprende una región básica (BR) que es necesaria y suficiente para unir el ADN, seguida de un motivo de cremallera de leucina C-terminal (LZ) responsable de la dimerización (Llorca y col., 2014).

Las plantas han desarrollado inmunidad innata hacia los ARN de los virus de ARN infectantes. La interferencia de ARN, también llamada silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), es un aspecto de la inmunidad innata del hospedador que se dirige al ARN viral. El ARNi tiene un papel importante en la protección de las células contra la infección por el virus de ARN de la planta mediante la unión específica de secuencias de pequeños ARN interferentes (Sung y col., 2013).

⁵ Elemento cis - actuante: secuencia de ADN en la vecindad de la porción estructural de un gen que se requieren para la expresión génica.

Resultados y Discusión

Las RBP de las plantas están involucradas en la respuesta de inmunidad innata de las plantas contra virus ARN. Por lo tanto, las proteínas de unión al ARN del huésped podrían estar involucradas directa o indirectamente en la defensa dirigida al ARN viral contra la infección del virus ARN a nivel transcripcional / traduccional (Sung y col., 2013).

Por ejemplo, la proteína 1 de unión a ARN de *Arabidopsis thaliana* relacionada con la defensa 1 (AtRBP-DR1) contribuye positivamente a la defensa del patógeno hemibiotrófico, y posiblemente regula los genes involucrados en la vía de señalización del ácido salicílico en la región citosólica, a través de la unión directa de los ARN diana. La sobreexpresión de la proteína de unión a ARN rica en glicina 7 (AtGRP7), que contiene un motivo de reconocimiento de ARN, confirió la defensa de la planta contra los patógenos, incluido *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000 (Pst DC3000), la bacteria necrotrofica *Pectobacterium carotovorum*, así como el virus biotrófico *TMV* (Sung y col., 2013).

En las RBP antivirales, la proteína de unión a dsRNA 4 de *Arabidopsis* (DRB4), como la pareja que interactúa como Dicer 4, estuvo involucrada en la defensa antiviral contra la infección por el *virus del mosaico amarillo del nabo* (*TYMV*). DRB4 puede actuar como un represor traduccional de virus ARN de plantas, ya que DRB4 suprime la traducción de ARN viral (Sung y col., 2013).

El silenciamiento de ARN es un mecanismo antiviral importante en diversos organismos eucariotas. El silenciamiento del ARN se induce tras la formación de ARN bicatenario (dsRNA), que se procesa en dsRNA pequeño de 20-30 nucleótidos con extremos escalonados. Las enzimas ribonucleasa tipo III llamadas Dicers median el procesamiento de dsRNA en sRNA (ARN monocatenario) (Zhu y col., 2013). Las plantas de *Arabidopsis* codifican cuatro proteínas similares a Dicer, pero *Arabidopsis* Dicer Like 4 (DCL4) es el Dicer antiviral primario, requerido para la producción de pequeños ARN virales a partir de virus ARN de cadena positiva.

Jakubiec y col. (2012) mostraron que DCL4 y su compañero de DRB4 participan en la respuesta antiviral al *TYMV*, y que ambas proteínas son necesarias para la producción de ARN pequeño derivado de *TYMV*. Sus resultados indicaron que DRB4 tiene un efecto negativo sobre la acumulación de proteínas de la cubierta viral.

Luego se incorpora una cadena de dsRNA en un gran complejo de ribonucleoproteína llamado complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que luego escinde el ARN viral diana. Los complejos RISC están formados por la cadena de sRNA y un miembro de la familia de proteínas Argonautas (AGO), que también se denominan proteínas rebanadoras (slicers) (Zhu y col., 2013).

Las proteínas AGO se unen directamente al ARN, lo que permite a RISC escindir el ARN objetivo para silenciarlo o impedir su traducción. Todas las proteínas AGO tienen un dominio PAZ (responsable del reconocimiento de nucleótidos libres en el extremo 3'), que se une al extremo 3' del sobresaliente de dos nucleótidos creado anteriormente en la ruta de ARNi (Woloshen y col., 2011).

La O y col. (2016) reportaron que al inocular el cultivar de caña de azúcar C323-68 con *SCMV* el gen Cu-29 mostró una supresión o silenciamiento. Estos resultados están en

Resultados y Discusión

correspondencia con lo obtenido en este trabajo y confirman la participación de proteínas RBP en la defensa contra la infección del virus ARN en caña de azúcar.

Los virus, a su vez, han evolucionado para expresar supresores que se dirigen a los componentes silenciadores de ARN del huésped y, por lo tanto, aseguran su replicación. Curiosamente, en muchos casos, estos supresores del silenciamiento también actúan como factores de avirulencia (avr), y su interacción con las proteínas R del huésped conduce a la activación de las respuestas de defensa (Zhu y col., 2013).

Los resultados del agrupamiento indican que la aplicación del BP-UO en el cultivar susceptible produce una activación génica muy similar a la producida al aplicar ambos bioproductos en el cultivar resistente. Esto pudiera explicar el por qué esta preparación mostró una mayor efectividad para la protección ante la infección viral, lo que sugiere que los OGAs producidos por la enzima endoPG contenida en los liposomas desencadenan una vía defensiva que imita a la del cultivar C323-68. Esto se pudo observar también con la acumulación de radicales O_2^- , la cual fue favorecida con la aplicación de este producto.

Por otra parte, la aplicación de BP-VC provoca en el cultivar susceptible una expresión diferencial de genes similar al control sano y al resistente inoculado con SCMV. Además, con su aplicación no se observa una respuesta oxidativa apreciable. Estos resultados sugieren que el bioproducto desencadena otras vías defensivas ante la infección ocasionada por el SCMV, distintas a las que sigue el cultivar resistente C323-68, lo que puede atribuirse a los compuestos fenólicos que contiene el BP-VC.

Se han descrito varias respuestas defensivas elicidadas por OGAs, tales como la acumulación de fitoalexinas, la producción de ROS y la expresión de genes relacionados con defensa (Hou y col., 2019). Las dos últimas se pudieron demostrar en este trabajo. También pueden inducir la acumulación de glucanasas y quitinasas, y la deposición de calosa y lignina en la pared celular (Nafisi y col., 2015). Otras respuestas desencadenadas por OGAs incluyen el incremento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático y la activación de componentes de las vías del ácido salicílico, jasmonato y etileno (Pavlopoulou y col., 2019).

Investigaciones realizadas por Arencibia y col. (2008) confirmaron que la producción fenólica por caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal indujo un vigor notable en las plantas micropropagadas de esta especie, que mostraron un rendimiento más robusto cuando fueron transferidas a condiciones de campo. En estas plantas, la regulación positiva de los genes relacionados con el metabolismo y el desarrollo celular, las defensas de las plantas, los fenilpropanoides, la respuesta al metil jasmonato, el etileno, el estallido oxidativo y la vía de la auxina sugirieron que esos metabolitos fenólicos podrían actuar como moléculas que provocan fenómenos de resistencia sistémica adquirida.

Yang y col. (2010) utilizaron este bioproducto como inductor de resistencia sistémica en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) contra la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*). Los autores demostraron que las plantas lograron una respuesta temprana a la enfermedad, lo cual resultó en la protección contra dicha enfermedad.

Resultados y Discusión

Los OGAs se han utilizado con más de un propósito en la agricultura. Además de elicitar respuestas defensivas se han utilizado como bioestimulantes. En plantas de tomate tratadas con *Pectimorf*® se incrementó el rendimiento del fruto por planta un 40 %, así como la firmeza del fruto en un 27 % con respecto al control (Lara y col., 2018). En leguminosas esta mezcla de OGAs también incrementa el desarrollo foliar y el rendimiento principalmente en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*) y en soya (*Glycine max*) (Lara y col., 2018).

Se puede inferir que los OGAs producidos por la enzima endoPG pueden conferir al preparado liposomal un potencial uso como bioestimulante. Para demostrar lo planteado se hacen necesarios posteriores estudios sobre la utilización de dicho bioproducto, tanto en caña de azúcar como en otros cultivos.

Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones

- Se obtuvo una actividad enzimática de 34.5 U/mL luego de la purificación de la enzima endoPG con el intercambiador iónico Q – Sepharosa Fast Flow.
- Se obtuvieron vesículas de $3.3 \pm 2 \mu\text{m}$ tras la encapsulación de la enzima endoPG con el método de inyección de etanol.
- Se logró una eficiencia de encapsulación del 28.3 %.
- Se activaron respuestas de defensa en caña de azúcar frente a *SCMV* tras la aplicación del preparado liposomal.

Recomendaciones

Recomendaciones

Recomendaciones

- Utilizar una mezcla de al menos un fosfolípido con carga negativa y fosfatidilcolina en la preparación de los liposomas.
- Evaluar las propiedades elicitoras y bioestimulantes del bioproducto obtenido en otros cultivos para evaluar sus propiedades elicitoras y bioestimulantes.

Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

1. Abiche, W., Rill, S.A., Rodríguez, R., et al. Respuesta de nuevos cultivares de caña de azúcar en la región oriental de Cuba. *Ciencia en su PC*. 2015; 4 (4): 37-46.
 2. Agrios, G.N. *Plant Pathology*. Fifth edition. New York, USA: Academic Press. 2005.
 3. Arencibia, A., et al. New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science*. 2008; 175: 487-496.
 4. Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. *Fundamentos, métodos y aplicaciones*. *Ars Pharmaceutica*, 1998; 39 (2): 23-29.
 5. Bai, Y., Sunarti, S., et al. The Role of Tomato WRKY Genes in Plant Responses to Combined Abiotic and Biotic Stresses. *Front. Plant Sci*. 2018; 9 (801). DOI: 10.3389/fpls.2018.00801.
 6. Barnby, F.M., Morpeth, F.F. and Pyle, D.L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterisation of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol*. 1990; 12.
 7. Batzri, S. and Korn, E. "Single bilayer liposomes prepared without sonication", *Biochimica et Biophysica Acta*. 1973; 298: 1015-1019.
 8. Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A. and Ciccolini, J. Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept. *ISRN pharmaceuticals*. 2012; 1-11.
 9. Blanco, P.; Sieiro, C. and Villa, T. G. "Production of Pectic Enzymes in Yeast", *FEMS Microbiol*. 1999; 175: 1-9.
 10. Branca, C., De Lorenzo, G. and Cervone, F. Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiol. Plant*. 1988; 72: 499–504.
 11. Carrasco, J.L., et al. A novel transcription factor involved in plant defense endowed with protein phosphatase activity. *The EMBO Journal*. 2003; 22 (13): 3376-3384.
 12. Castan, L. et al. Encapsulación del 4-Hidroxi- 3-Metoxibenzaldehído en Liposomas Modificados con 1-O-Alquilglicerolos Sintéticos: Estudio de su Reactividad con el Radical DPPH. *Revista Cubana de Química*. 2012; 24 (1): 83-90.
 13. Chang, L., Chang, H. et al. Plant A20/AN1 proteins coordinate different immune responses including ARNi pathway for antiviral immunity. *bioRxiv*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/622696>.
 14. Chang, L., Chang, H-H, et al. Plant A20/AN1 protein serves as the important hub to mediate antiviral immunity. *PLoS Pathog*. 2018; 14 (9): e1007288. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007288>.
 15. Clares, B. "Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilamelares portadores de acetónido de triamcinolona". Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Granada, España, 2003.
 16. Comstock, J.C., Follis, J., Miller, J.D. Evaluation of sugarcane mosaic incidence in Florida. *J. Am. Soc. Sugar Cane Technol*. 2000; 2: 15–21.
 17. Coté, F. and Hahn, M. Oligosaccharins: Structure and signal transduction. *Plant Molecular Biology*. 1994; 26: 33.
-

Referencias Bibliográficas

18. De la Fé, J.A. “Encapsulación en liposomas de la enzima endopoligalacturonasa de *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011”. Tesis de Grado. Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba, 2016.
 19. Enríquez, E.A., et al. Oligosacarinas Derivadas de Pared Celular: Actividad Biológica y Participación en la Respuesta de Defensa de Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2010; 28 (2): 144-155.
 20. FAO a. New standards to curb the global spread of plant pests and diseases [Internet]. [Consultado 13/12/19]. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/icode/>
 21. FAO b. FAOSTAT [Internet]. [Consultado 06/12/19]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
 22. González, D.M. Levaduras pectinolíticas como alternativa biotecnológica para la valorización de los residuales del café. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Naturales. Univ. Oriente, Cuba, 2005.
 23. González, M., Pablos, P., Alarcón, S.A., et al. Dinámica espacio-tiempo del carbono y su relación con variables químicas del suelo en los ecosistemas bosque y caña de azúcar. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*. 2014; 2 (4): 714-727. ISSN: 2007-6940.
 24. Grupo VivePlus. “VIVE+ Lectina de Soja 48 perlas”. [Internet]. [Consultado 13/05/19]. Disponible en: <http://grupoviveplus.com/productos/viveplus/salud-vive/lectina-de-soya-perlas/>
 25. Gullón, B. et al. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*. 2013; 30: 153-161. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.01.006>
 26. Gupta, S.K., Rai, A.K., et al. Comparative Analysis of Zinc Finger Proteins Involved in Plant Disease Resistance. *PLoS ONE*. 2012; 7 (8): e42578. DOI: 10.1371/journal.pone.0042578.
 27. Hahn, M.G., Darvill, A.G. and Albersheim, P. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol*. 1981; 68: 1161–1169.
 28. Heinze, B.S., Thokoane, L.N., Williams, C.N., Barnes, J.M. and Rutherford, R.S. The smut-sugarcane interaction as a model system for the integration of marker discovery and gene isolation. *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association*. 2001; 75: 88-93.
 29. Hou, S. et al., “Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants”, *Frontiers in Plant Science*. 2019; 10: 646. DOI: 10.3389/fpls.2019.00646.
 30. Jakubiec, A., Yang, S. W. and Chua, N. H. Arabidopsis DRB4 protein in antiviral defense against Turnip yellow mosaic virus infection. *The Plant Journal*. 2012; 69: 14–25. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04765.x.
 31. Kang, M., Lee, S. et al. Arabidopsis Stress Associated Protein 9 mediates biotic and abiotic stress responsive ABA signaling via the proteasome pathway. 2016. DOI: 10.1111/pce.12892.
 32. Kashyap, L. et al., “Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture”, *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015; 77: 36-51.
 33. Kothari, K.S., Dansana, K., Giri, J. and Tyagi, A.K. Rice Stress Associated Protein 1 (OsSAP1) Interacts with Aminotransferase (OsAMTR1) and Pathogenesis-Related
-

Referencias Bibliográficas

- 1a Protein (OsSCP) and Regulates Abiotic Stress Responses. *Front. Plant Sci.* 2016; 7 (1057). DOI: 10.3389/fpls.2016.01057.
34. Kovács, J., Poór, P., et al. Proteasome Activity Profiling Uncovers Alteration of Catalytic $\beta 2$ and $\beta 5$ Subunits of the Stress-Induced Proteasome during Salinity Stress in Tomato Roots. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 107. DOI: 10.3389/fpls.2017.00107
35. Kurepa, J. and Smalle, J.A. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie.* 2008; 90: 324-335. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.07.019.
36. La O, M. Contribución a la caracterización molecular de la interacción *Saccharum sp - Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & F. Oberw. Tesis de Doctorado, León, O. y Rodríguez, E. (Tutores). Universidad Agraria de La Habana, La Habana, Cuba, 2007.
37. La O, M., Arencibia, A., Vinagre, F., et al. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum sp* after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports.* 2008; 27: 1103-1111.
38. La O, M., Puchades, Y., et al. Detection of resistance-related genes in sugarcane cultivars inoculated with sugarcane mosaic virus. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists.* 2016; 29: 728-731.
39. Lang, C. and Dörnenburg, H. "Perspectives in the Biological Function and the Technological Application of Polygalacturonases". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000; 53: 366-375.
40. Lara, D., Costales, D. y Falcón, A. Los Oligogalacturónidos en el Crecimiento y Desarrollo de las Plantas. *Cultivos Tropicales.* 2018; 39 (2): 127-134. ISSN digital: 1819-4087.
41. LIDA Plant Research. "Fytosave - fitovacuna vegetal". [Internet]. [Consultado 13/05/19]. Disponible en: http://www.lidaplantresearch.com/p-lista-productos-grid.php?id_seccion=1&id_familia=1
42. Liu, B., Hong, YB., et al. Tomato WRKY transcriptional factor SIDRW1 is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to oxidative stress. *Plant Science.* 2014; 227: 145-156.
43. Llorca, C. M. et al. bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in Plant Science.* 2014; 5 (169). DOI: 10.3389/fpls.2014.00169.
44. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., et al. "Protein measurement with folin-phenol reagent", *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
45. Lyons, R., Akira Iwase, A. et al. The RNA-binding protein FPA regulates flg22-triggered defense responses and transcription factor activity by alternative polyadenylation. *Scientific Reports.* 2013; 3 (2866). DOI: 10.1038/srep02866.
46. Marques, J.P.R., Appezzato, B., Piepenbring, M., et al. Sugarcane smut: shedding light on the development of the whip-shaped sorus. *Annals of Botany.* 2017; 119: 815-827. DOI:10.1093/aob/mcw169.
47. Mederos, C. Efectos de *Brevibacillus borstelensis* B65 y el bioestimulante PectinHydrol en el cultivo de la Zanahoria (*Daucus carota* L.). Tesis de Maestría, Serrat, M. y Ratón, T. (Tutores), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba, 2018.
-

Referencias Bibliográficas

48. Miao, Z. L. et al. Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015; 9: 941-946. DOI: 10.3892/etm.2015.2201.
 49. Mishra, A.K., Sharma, K. and Misra, R.S. Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*. 2012; 7 (2): 95-120, DOI: 10.1080/17429145.2011.597517.
 50. Nafisi, M. et al. "Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens". *Phytochemistry*. 2015; 112: 63-71. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.11.008.
 51. NCBI a. N-terminal nucleophile (Ntn) domain. [Internet]. [Consultado 16/12/19]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_115946.3
 52. NCBI b. Proteasome subunit beta type 4 [*Zea mays*]. [Internet]. [Consultado 16/12/19]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/125657?Sel=geneid:100283981#show=genes>
 53. New, R.R.C. *Liposomes: A Practical Approach*. First edition. New York, USA: IRL Press; 1990.
 54. Paul, A. and Kumar, S. An A20/AN1-zinc-finger domain containing protein gene in tea is differentially expressed during winter dormancy and in response to abiotic stress and plant growth regulators. *Plant Gene*. 2015; 1: 1-7.
 55. Pavlopoulou, A. et al. "In Silico Phylogenetic and Structural Analyses of Plant Endogenous Danger Signaling Molecules upon Stress", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. DOI: 10.1155/2019/8683054.
 56. Perera, M.F., Bertani, R., La O, M., et al. Morphological and molecular characterization of *Puccinia kuehnii*, the causal agent of sugarcane orange rust, in Cuba. *Sci. Agric*. 2020; 77 (2). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0038>.
 57. Pérez, J. "Estudio comparativo de dos métodos de producción de liposomas para el encapsulamiento de proteína hidrolizada de leche como modelo de componente funcional de aplicación cosmética". Tesis de Magister. Universidad ICESI. Facultad de Ciencias Naturales, Cali, Colombia, 2017.
 58. Puchades, Y. Metodología para evaluar resistencia al mosaico de la caña de azúcar en Cuba. Tesis de Doctorado, La O, M. y Rodríguez, E. (Tutores). Universidad Agraria de La Habana, Mayabeque, Cuba, 2017.
 59. Puchades, Y., La O, M., et al. "Genetic and Symptomatic Characterization of Sugarcane mosaic virus (SCMV) in Cuba", *Sugar Tech*. 2016; 18 (2): 184–191. DOI: 10.1007/s12355-015-0375-0
 60. Que, Y., Lin, J., Song, X., Xu, L., and Chen, R. Differential gene expression in sugarcane in response to challenge by fungal pathogen *Ustilago scitaminea* revealed by cDNA-AFL *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011. DOI:10.1155/2011/160934.
 61. Racedo, J., Perera, M.F., et al. Molecular Diagnostic of Both Brown and Orange Sugarcane Rust and Evaluation of Sugarcane Brown Rust Resistance in Tucuman, Argentina, Using Molecular Markers Associated with Bru1 a Broad-Range Resistance Allele. *Sugar Tech*. 2015. DOI: 10.1007/s12355-015-0404-z.
 62. Rodríguez, D., Barbosa, R.N., García, A., et al. Plantación en surcos de base ancha, alternativa tecnológica para reducir el porcentaje de arvenses en caña de azúcar. *Cultivos Tropicales*. 2020; 47 (1): 61-68. ISSN digital: 2072-2015.
-

Referencias Bibliográficas

63. Rodríguez, O. y Serrat M. Poligalacturonasas de levaduras: un producto biotecnológico de grandes potencialidades. *Tecnología Química*. 2008; 28 (1).
 64. Rodríguez, R., Puchades, Y., Abiche, W., et al. Estudio del rendimiento y modelación del período de madurez en nuevos cultivares de caña de azúcar. *Cultivos Tropicales*. 2015; 36 (4): 134-143. ISSN digital: 1819-4087.
 65. Rodríguez, R., Puchades, Y., Abiche, W., et al. Modelo matemático para estimar el valor genético de progenitores y cruces en caña de azúcar. *Cultivos Tropicales*. 2018; 39 (2): 81-88. ISSN digital: 1819-4087.
 66. Rojas, F. "Inmovilización de enzimas en esteres cinámicos de carbohidratos: Nuevos soportes fotoentrecruzables". Tesis de doctorado. Universidad de Murcia, Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, España, 2002.
 67. Ruano, M. "Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas". Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Física I., Madrid, España, 2013.
 68. Seo, E. and D. Choi, Functional studies of transcription factors involved in plant defenses in the genomics era. *Briefings in Functional Genomics*. 2015; 14 (4): 260–267. DOI: 10.1093/bfpg/elv011.
 69. Serrat, M, Bermúdez R. C. y Villa, T.G. Producción de poligalacturonasa en levaduras: ¿Una violación del principio de economía celular?, I Simposium Internacional de Ciencias Biológicas Charles T. Ramsden in memoriam (Memorias), Octubre 11-14 de 2004 b. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
 70. Serrat, M. et al. Covalent Immobilization of a Yeast Endopolygalacturonase in Calcium Alginate. *Revista Cubana de Química*. 2014; 26 (1): 26-31.
 71. Serrat, M., Bermúdez, R. C. and Villa, T. G. Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002; 97: 193-208.
 72. Serrat, M., Bermúdez, R.C. and Villa, T.G. Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*. Potential use of polygalacturonase in foodstuffs. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004 a.; 117: 49-64.
 73. Serrat, M., Producción, purificación y caracterización de la poligalacturonasa de una cepa de levadura aislada de residuales del beneficio húmedo del café. Tesis de Doctorado, Bermúdez R.C. y Villa T.G. (Tutores). Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba, 2003.
 74. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J Biol. Chem*. 1952; 159: 19-23.
 75. Strauss, M.L., Jolly, N., et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol*. 2001; 91: 182-190.
 76. Suarez, L. et al. "Efecto de una mezcla de Oligogalacturónidos en la propagación in Vitro de la Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), var. CMC-40", *Cultivos Tropicales*. 2008; 29 (3): 47-52.
 77. Sung, U.H. and Paek, K. H. Plant RNA binding proteins for control of RNA virus infection. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4 (397). DOI: 10.3389/fphys.2013.00397.
 78. Suty, L. et al. Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of "plant defense proteasomes". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2003; 35: 637-650. DOI:10.1016/S1357-2725(02)00386-2.
-

Referencias Bibliográficas

79. Thokoane, L.N. and Rutherford, R.S. cDNA-AFLP differential display of sugarcane (*Saccharum* spp, hybrids) genes induced by challenge with the fungal pathogen *Ustilago scitaminea* (sugarcane smut). Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association. 2001; 75: 104-107.
 80. Townsend, G.R. and Heuberger, J.W. "Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments", *The Plant Disease Reporter*. 1943; 27: 340-343.
 81. UNIPROT a. Proteasome subunit beta type-1. [Internet]. [Consultado 16/12/19]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/P42742>
 82. UNIPROT b. RNA-binding domain [Internet]. [Consultado 16/12/19]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/B6UER2>
 83. Üstün, S., Sheikh, A., et al. The Proteasome Acts as a Hub for Plant Immunity and Is Targeted by *Pseudomonas* Type III Effectors. *Plant Physiol*. 2016; 172: 1941-1958.
 84. Vallejo, J., M. Serrat, Perez, I. and Sanchez, A. A novel *Kluyveromyces marxianus* strain with an inducible flocculation phenotype. *AMB Express*. 2012; 2: 38. DOI:10.1186/2191-0855-2-38.
 85. Valverde, T. Inmovilización covalente de una endopoligalacturonasa de levadura sobre alginato de calcio. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Naturales, Univ. Oriente, Cuba. 2005.
 86. Vazquez, L., Rodríguez, R., Pablos, P., et al. Efecto de la fertilización con azufre elemental sobre el sistema radical y su relación con los indicadores del rendimiento en caña de azúcar. *Ciencia en su PC*. 2016; 3 (3): 57-70.
 87. Vij, S. and Tyagi, A. K. A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Funct Integr Genomics*. 2008; 8: 301-307. DOI: 10.1007/s10142-008-0078-7.
 88. Wagner, A., Platzgummer, M., et al. 'GMP Production of Liposomes -A New Industrial Approach'. *Journal of Liposome Research*. 2006; 16 (3): 311-319. DOI: 10.1080/08982100600851086.
 89. Wang, L., Liu, F., et al. Expression Characteristics and Functional Analysis of the ScWRKY3 Gene from Sugarcane. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19 (4059). DOI:10.3390/ijms19124059.
 90. Wohlgemuth, H., Mittelstrass, K., et al. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment*. 2002; 25: 717-726.
 91. Woloshen, V., Huang, S., and Li, X. RNA-Binding Proteins in Plant Immunity. *Journal of Pathogens*. 2011; Article ID 278697. DOI: 10.4061/2011/278697.
 92. Wubben, J., Mulder, W., et al. Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999; 65: 1596-1602.
 93. Yang, G., Tan, H., et al. Application of engineered yeast strain fermentation for oligogalacturonides production from pectin-rich waste biomass. *Bioresource Technology*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122645>
 94. Yang, L., Zambrano, Y., et al. Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*. 2010; 46: 558-568. DOI 10.1007/s11627-010-9312-9.
-

Referencias Bibliográficas

95. Zhu, S. et al. Double-Stranded RNA-Binding Protein 4 Is Required for Resistance Signaling against Viral and Bacterial Pathogens. *Cell Reports*. 2013; 4: 1168-1184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celre2013.08.018>.