

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE QUITINASAS EN  
PLANTAS DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* INOCULADAS CON ACTINOMICETOS  
NATIVOS COLOMBIANOS.**



**LORENA ALEXANDRA ROJAS BURGOS  
JOSÉ FERNANDO VARGAS FARELLO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de**

**MICROBIOLOGO INDUSTRIAL; MICROBIOLOGO AGRÍCOLA Y  
VETERINARIO**

**DIRECTORA: MARCELA FRANCO CORREA Ph.D  
CO-DIRECTORA: MARIA XIMENA RODRÍGUEZ BOCANEGRA Ph.D**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERAS DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL; AGRÍCOLA Y  
VETERINARIA  
BOGOTÁ  
NOVIEMBRE DE 2009**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946  
“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus  
alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada  
contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan  
ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el  
anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE QUITINASAS EN  
PLANTAS DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* INOCULADAS CON ACTINOMICETOS  
NATIVOS COLOMBIANOS.**

**LORENA ALEXANDRA ROJAS BURGOS  
JOSÉ FERNANDO VARGAS FARELLO**

**APROBADO**

---

**Marcela Franco Correa Ph.D  
Directora**

---

**María Ximena Rodríguez Bocanegra Ph.D  
Co-Directora**

---

**Balkys Quevedo M.sc  
Profesor Asociado  
Jurado**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE QUITINASAS EN  
PLANTAS DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* INOCULADAS CON ACTINOMICETOS  
NATIVOS COLOMBIANOS.**

**LORENA ALEXANDRA ROJAS BURGOS  
JOSÉ FERNANDO VARGAS FARELLO**

**APROBADO**

---

**INGRID SCHULER**  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias

---

**JANETH ARIAS**  
Directora de Carrera  
Facultad de Ciencias

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. MARCO TEÓRICO .....	9
2.1. Rizosfera .....	9
2.2. Los actinomicetos .....	9
2.3. Las quitinasas.....	10
2.4. El frijol .....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	13
4. OBJETIVOS .....	15
4.1    Objetivo general.....	15
4.2    Objetivos Específicos .....	15
5. METODOLOGÍA.....	16
5.1. Reconstitución de las Cepas.....	16
5.2. Montaje de Materas.....	16
5.3. Preparación de los tratamientos .....	16
5.4. Preparación de extractos vegetales .....	17
5.5. Extracción enzimática.....	17
5.6 Ensayos preliminares para determinación de condiciones óptimas de la Actividad Enzimática.....	18
5.7. Actividad Enzimática de Quitinasas .....	18
5.7.1. Determinación de proteínas.....	19
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
6.1 Reconstitución de las Cepas de actinomicetos.....	20

6.2 Pruebas de Pureza de los cultivos .....	20
6.3 Preparación de los tratamientos .....	20
6.4 Preparación de Extractos Enzimáticos.....	22
6.5 Ensayos preliminares para determinación de condiciones óptimas de la Actividad Enzimática.....	22
7. CONCLUSIONES.....	32
8. RECOMENDACIONES .....	33
9. BIBLIOGRAFIA.....	34
10. ANEXOS.....	39

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de azúcares reductores en función de absorbancia de los extractos vegetales a 37° C con Tampón Acetato pH 5.0 y Tampón Fosfato pH 6.0.....	23
Figura 2. Actividad enzimática quitinolítica en función del tiempo.....	20
Figura 3. Actividad Quitinolítica y Quitinolítica Específica en el Tratamiento Testigo con H2O .....	25
Figura 4. Actividad quitinolítica y quitinolítica específica tratamiento NPK.....	21
Figura 5. Actividad quitinolítica y quitinolítica específica en hojas, tratamiento H2O, NPK, MCR9, MCR24 y MCR 26.....	24
Figura 6. Actividad Quitinolítica - Actividad Quitinolítica Específica en Tallos Para Tratamiento H2O,NPK, MCR9, MCR24 y MCR26 .....	27
Figura 7. Actividad Quitinolítica - Actividad Quitinolítica Específica en Raíz Para Tratamiento H2O,NPK, MCR9, MCR24 y MCR26 .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 8. Actividad Quitinolítica y Quitinolítica Específica tratamiento MCR26.....	28
Figura 9. Actividad Quitinolítica por tratamiento en cada uno de los tejidos y estadios de desarrollo .....	30
Figura 10. Actividad Quitinolítica Específica por tratamiento en cada uno de los tejidos y estadios de desarrollo .....	30

## 1. INTRODUCCIÓN

El suelo tiene características fisicoquímicas que varían y se ve modificado constantemente por la interacción con los microorganismos que allí habitan. La interacción de los actinomicetos en la capa de suelo conocida como rizosfera, ejercen una marcada influencia en el crecimiento vegetal, por lo cual algunos de ellos son considerados promotores de crecimiento vegetal PGPR (Acrónimo del inglés: “Plant growth promoting rhizobacteria”). Las PGPR tienen diferentes acciones determinantes sobre las plantas como la producción de reguladores de crecimiento vegetal, solubilización de nutrientes minerales y presencia de mecanismos indirectos que actúan como inductores en los procesos de defensa en la planta, dentro de lo cual se encuentra la producción de quitinasas.

Por consiguiente se considera de vital importancia el estudio de tres cepas de actinomicetos nativos provenientes del Altiplano Cundiboyacense pertenecientes al cepario de bacterias del grupo de investigación: Unidad de investigaciones agropecuarias (UNIDIA), caracterizadas previamente por Franco-Correa (2008) como PGPR, y evaluar si son capaces de promover el crecimiento de plantas de *Phaseolus vulgaris* e inducir respuestas de defensa de la planta para determinar una resistencia frente a patógenos por la producción de enzimas líticas como las quitinasas.



## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Rizosfera**

La rizosfera ha sido definida como la porción de suelo inmediatamente adyacente a las raíces de las plantas, con una elevada actividad microbiana (Morgan *et al.*, 2005; Bayliss *et al.*, 2001; Stacey & Ken, 2006b) en donde los actinomicetos ocupan el 10-30% de la flora total en la rizosfera como los habitantes más abundantes con una densidad de  $10^6$  a  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup> de suelo (Franco-Correa, 2008; Sylvia, 1998). Los actinomicetos son microorganismos procariotas con un micelio morfológicamente semejante al de los hongos. Desarrollan filamentos delgados y ramificados, que al fragmentarse pueden ser evidenciados microscópicamente de forma cocoide o bacilar con o sin formación de septos. Las esporas le proporcionan a las colonias de los actinomicetos, un aspecto pulverulento al ser observadas macroscópicamente en medios específicos (Sylvia, 1998). Su pared celular se encuentra constituida por peptidoglicano, pero puede presentar una composición variada dependiendo del grupo taxonómico al cual pertenezca (Prescott, 2002). Estos microorganismos presentan un crecimiento óptimo a pH entre 6.5-9 próximo a la neutralidad. Al evaluar la rapidez de su crecimiento, se ha observado que el periodo de incubación ideal es de una a dos semanas. La gran mayoría de los actinomicetos son mesófilos con temperaturas de crecimiento que oscilan entre 25°C y 30°C, los otros corresponden a especies termofílicas capaces de crecer a temperaturas por encima de 55°C (Sylvia, 1998).

### **2.2. Los actinomicetos**

Los actinomicetos son reconocidos por la producción de antibióticos, razón por la cual han mostrado actividad antagonista hacia patógenos potenciales de la planta mediante relaciones amensalistas y la producción de enzimas líticas como las quitinasas causando un efecto inhibitorio sobre algunos microorganismos (Walker *et al.*, 2003; Atlas & Bartha, 2002), tienen la habilidad para utilizar e hidrolizar la quitina como fuente de carbono (Abdel-Fattah & Mohamedin, 2000) y de utilizar paralelamente como fuente de nitrógeno aquel que se encuentra dentro de su molécula (Schrempf, 2001). Los actinomicetos son productores de terpenoides como es el caso de la geosmina, la cual le confiere el olor característico a suelo húmedo (Will & Russel, 1992; Franson, 1992).

Teniendo en cuenta los estudios realizados por Bello & Gómez (2009), se ha evidenciado actividad PGPR por parte de las cepas de actinomicetos de este estudio (MCR9, MCR24, MCR26). Las PGPR, como su nombre lo indica son bacterias que viven en la rizosfera estimulando el crecimiento vegetal y la germinación de semillas (Sylvia, 1998; Compant *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1985). Actualmente este grupo de bacterias, son usadas en diversos campos como la agricultura, la horticultura, la restauración ambiental y la reforestación. Poseen mecanismos directos e indirectos para promover el crecimiento vegetal; se conocen como mecanismos directos aquellos que inciden y benefician a la planta, y como mecanismos indirectos aquellos que promueven el crecimiento de la misma pero la relación no es directamente con ella (Lucy *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2004). Dentro de los mecanismos indirectos se encuentra la síntesis de enzimas líticas que reducen la colonización de semillas y raíces por patógenos (Quitinasas y  $\beta$ ,1-3 Glucanasas) y competencia por nutrientes y espacio en las raíces de la planta con los microorganismos fitopatógenos (Alvarez-Solis & Anzueto-Martínez, 2004; Belimov, 2001).

Considerando la variabilidad de los componentes principales del suelo, la presencia de los actinomicetos de forma abundante contribuye a la degradación de compuestos como la quitina, considerada uno de los recursos más abundantes en la naturaleza después de la celulosa, constituida por una cadena polimérica de N-acetilglucosamina (Gyo Lee *et al.*, 2008; Abdel-Fattah & Mohamedin, 2000; Cohen-Kupiec & Chet, 1998), asociada frecuentemente a compuestos inorgánicos y proteínas.

### **2.3. Las quitinasas**

La quitina puede ser hidrolizada por enzimas catalíticas denominadas quitinasas, sintetizada por bacterias, hongos y plantas (Abdel-Fattah & Mohamedin, 2000), sin embargo algunas bacterias gram positivas como los actinomicetos y específicamente pertenecientes al género *Streptomyces*, tienen la habilidad para hidrolizar la quitina (Schrempf, 2001; Cohen-Kupiec & Chet, 1998). A pesar de contribuir en el biocontrol de patógenos y de favorecer la degradación de hábitats con cantidades significativas de quitina, su sistema no ha sido muy estudiado.

Las quitinasas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas, bacterias, hongos y virus, así como en plantas vasculares o tracheophytes y en especies de actinomicetos (Punja y Zhang, 1993) como *Streptomyces griseus* (Ohno *et al.*, 1996).

La presencia de quitinasas en plantas, está asociada a la ejecución de mecanismos de defensa contra microorganismos constituidos por quitina como los patógenos fúngicos o como estimulación para la formación de asociaciones micorrízicas con hongos simbióticos. Paralelamente, las quitinasas son expresadas como respuesta a estímulos ambientales como presión osmótica o incluso a procesos inducidos por el etileno como la maduración de frutos (Collinge *et al.*, 1993).

La degradación de la quitina tiene como fin convertir el polímero de N-acetilglucosamina en acetato, NH<sub>3</sub> y fructosa 6-fosfato, sin embargo esto puede variar según la fisiología, el tipo y el propósito del organismo que la está sintetizando. Cuando se habla de quitinasas bacterianas, se sabe que son activas en un amplio rango de temperatura y pH, dependen del tipo de microorganismo del cual sean aisladas y del punto isoeléctrico de la misma (Bhattacharya *et al.*, 2007).

La producción de quitinasas puede verse influenciada por inductores como la N-acetilglucosamina, la quitina coloidal, otros quitoligosacáridos y paredes celulares fúngicas, así como por la presencia de azúcares reductores como la galactosa (Bhattacharya *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2009).

## **2.4. El frijol**

*Phaseolus vulgaris* L., como planta modelo de este estudio, es una leguminosa con un sistema radicular formado por la radícula del embrión la cual se convierte en raíz primaria y raíces secundarias que se desarrollan especialmente en la parte superior. Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes. Esta especie presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radicular. El tallo está formado por una sucesión de nudos y entrenudos, tiene una fuerte dominancia apical y su proceso de desarrollo genera nudos.

En el tallo se encuentran presentes, otros órganos como las hojas, las ramas, las vainas, los racimos y las flores. Las hojas del frijol pueden clasificarse en simples y compuestas; sin embargo son las hojas compuestas, aquellas trifoliadas, típicas del frijol, con tres folíolos, un peciolo y un raquis (Debouck & Hidalgo, 1985). El ciclo biológico de la planta de frijol se divide en dos fases sucesivas: la fase vegetativa y la fase reproductiva. La fase vegetativa se inicia cuando se le brinda a la semilla las condiciones para iniciar la germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales e incluye cinco etapas. La fase reproductiva comprende el momento de la aparición de los botones florales hasta la madurez de cosecha, igualmente incluye 5 etapas (Debouck & Hidalgo, 1985). Dentro de estas fases para efectos de este estudio, se destacan 4 etapas: dos correspondientes a la fase vegetativa (V2 y V4) y dos a la fase reproductiva (R6 y R8) (Debouck & Hidalgo, 1985). La Etapa V2 (Hojas primarias) comienza desde que las hojas primarias están desplegadas en posición horizontal en el segundo nudo del tallo, se observan unifoliadas y opuestas hasta que la primera hoja trifoliada comienza su crecimiento. La Etapa V4 (Tercera hoja trifoliada) comienza cuando la tercera hoja trifoliada se encuentra desplegada, posteriormente se despliegan la cuarta y quinta hoja trifoliada. Para la Etapa R6 (Floración) la planta presenta la primera flor abierta, la cual comienza en último nudo del tallo o de las ramas y continúa en forma descendente en los nudos inferiores; finalmente en la Etapa R8 (Llenado de las vainas) comienza el crecimiento de las semillas, las vainas presentan abultamientos que corresponden a las semillas en crecimiento (Debouck & Hidalgo, 1985).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Pocos estudios se han realizado con respecto a alternativas biológicas que ayuden al sostenimiento del suelo, por lo que es necesario indagar sobre posibles alternativas que favorezcan la potencialidad de este recurso imprescindible (Schaudner *et al.*, 1992).

Dentro de las alternativas biológicas vinculadas al sostenimiento del suelo se hace útil el uso de microorganismos autóctonos, que estimulen el desarrollo de actividades de solubilización, mejoramiento de estructuras, fertilidad, enraizamiento y aumento en la disponibilidad de los nutrientes propios del suelo necesarios para el desarrollo de las plantas (Schaudner *et al* 1992).

Dentro de las comunidades microbianas existentes en el suelo se encuentran las rizobacterias, las cuales son consideradas un subconjunto de microorganismos capaces de colonizar la interface suelo – raíz, adaptándose y persistiendo en la rizosfera de la planta favoreciendo su crecimiento y desarrollo, estas facultades se encuentran agrupadas en un conjunto de microorganismos conocidos como PGPR (Jetiyanona & Kloepper, 2002).

Teniendo en cuenta los estudios sobre poblaciones microbianas existentes en el suelo, hay evidencia que dentro de los grupos con mayor incidencia se encuentran los actinomicetos, que se caracterizan por producir sustancias antibióticas además de metabolitos secundarios de gran interés como las enzimas extracelulares (Cardona, 2004). Se han encontrado pocos estudios sobre la relación de los actinomicetos con la promoción de crecimiento vegetal, razón por la cual se pretende evaluar la actividad enzimática de quitinasas como mecanismo de defensa indirecto en plantas, que para efectos del estudio es *Phaseolus vulgaris* (Dann *et al.*, 1996). *Phaseolus vulgaris* como planta modelo, es una leguminosa de rápido crecimiento por medio de la cual es fácil la obtención de cantidades significativas de material vegetal en cortos periodos de tiempo (Jabaji-hare *et al.*, 1999).

En correlación con las enzimas extracelulares, se evaluará la acción de las quitinasas inducidas por cepas de actinomicetos nativos colombianos, capaces de promover la actividad enzimática en plantas de frijol, aportando de esta forma evidencia sobre su habilidad para promover el crecimiento vegetal.

Este trabajo de grado se basa en investigaciones realizadas en el laboratorio UNIDIA, en el cual se han desarrollado proyectos correspondientes a la determinación de actividad quitinolítica, solubilización de fósforo, producción de sideróforos y fijación de Nitrógeno, de diferentes cepas nativas de actinomicetos. Estas características han llevado a evaluar la promoción de crecimiento vegetal por parte de estas bacterias filamentosas.

En el caso del presente estudio las cepas MCR9, MCR24 y MCR26, han demostrado poseer por lo menos uno de los efectos anteriormente mencionados, debido a esto son propicias para lograr los objetivos del presente trabajo (Franco-Correa, 2008; Gómez & Bello, 2009; Farfán & Gutiérrez, 2009; Hernández & Muñoz, 2009).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Detectar la inducción de la actividad enzimática de quitinasas en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris* inoculadas con tres aislamientos de actinomicetos.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la actividad quitinolítica en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con actinomicetos.
- Evaluar la actividad quitinolítica a partir de tejidos de *Phaseolus vulgaris*.
- Evaluar el efecto de las cepas MCR9, MCR24 y MCR26 en los estadios de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Reconstitución de las Cepas**

A partir del banco de cepas del laboratorio UNIDIA se reconstituyeron las cepas MCR9, MCR24 y MCR26 en cajas de Agar avena (Avena en polvo 30 g/L (p/v), Sacarosa 20 g·L<sup>-1</sup> (p/v) y Agar-Agar 15 g·L<sup>-1</sup> (p/v) (Franco-Correa, 1999) y se incubaron a 25°C durante 7 días, con el fin de obtener un banco de trabajo propio para los correspondientes montajes.

### **5.2. Montaje de Materas**

Los montajes fueron realizados a partir de semillas de *Phaseolus vulgaris* (var. Ica cerinza bola roja). Las semillas fueron sometidas a un proceso de limpieza para retirar el antifúngico Vitavax de su superficie con etanol al 80 % por 30 s, hipoclorito de sodio al 5% por 6 min, seguido de 9 lavados con agua estéril.

Para el montaje de las materas fue utilizado suelo negro tamizado sin abono, esterilizado en autoclave a 121°C, 15 Psi por 20 min (Gómez & Bello, 2009). Cada matera se llenó con 1 Kg de suelo estéril, a la cual se le colocaron 2 semillas previamente desinfectadas. Este procedimiento se llevó a cabo para cada uno de los tratamientos (cepas MCR 9, MCR 24, MCR 26, testigo con agua y control con fertilizante).

### **5.3. Preparación de los tratamientos**

Se realizó desprendimiento de conidios de las cepas MCR9, MCR24, empleando solución salina al 0,85% (Gómez y Bello, 2009). A partir de este se realizaron diluciones seriadas para hacer recuento de conidios en cámara de Neubauer. La concentración del inóculo fue de 10<sup>6</sup> cel·g·suelo<sup>-1</sup>, la misma metodología se llevó a cabo para el tratamiento testigo con agua y control con fertilizante, sin inoculación de las cepas en estudio.

Los muestreos de cada uno de los tratamientos se realizaron por fases de crecimiento y tiempo. Se evaluaron dos estadios de la fase vegetal (V2 Hojas Primarias y V4 Tercera Hoja Trifoliada) y dos de la fase reproductiva (R6 Floración y R8 Llenado de las vainas) (Debouck & Hidalgo, 1985).



#### **5.4. Preparación de extractos vegetales**

Los extractos vegetales fueron obtenidos a partir de tejidos de hojas, tallos y raíces de *Phaseolus vulgaris* correspondientes a cada uno de los estadios de desarrollo de la planta en estudio. Los tejidos de hojas, tallos y raíces fueron debidamente separados y lavados con agua de grifo hasta retirar cualquier residuo de suelo.

El material foliar recolectado se pesó en una balanza analítica hasta completar 4g del mismo para ser macerado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino del mismo (Boller *et al.*, 1983). Posteriormente el material macerado fue transferido en tubos Falcon de 50 mL y conservado a -20°C hasta su posterior utilización en los ensayos enzimáticos (Abeles & Forrence., 1970).

#### **5.5. Extracción enzimática**

Los extractos vegetales de tejidos de hojas, tallos y raíces, fueron suspendidos en tampón acetato de sodio (0.1M) pH 5.0 (1:2). Luego de una hora de agitación en hielo, los extractos fueron centrifugados a 3500 x g durante 20 min, posteriormente una segunda centrifugación fue realizada a 15000 x g durante 20 min y una tercera en tubos eppendorf a 13000 x g durante 15 min; estos procesos fueron llevados a cabo a 4°C. Posteriormente, 3 mL de sobrenadante fueron precipitados (1:2) con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a un 80% de saturación en hielo, para remover los azúcares reductores de los extractos vegetales. Las proteínas precipitadas fueron recolectadas por centrifugación a 20000 x g durante 25 min, el pellet resultante fue resuspendido en 500 µl de tampón acetato de sodio pH 5.0 (Boller *et al.*, 1983). Posteriormente, la proteína suspendida, fue desalinizada a través de una columna de Sephadex G25 por protocolo gravitacional; para esto la columna se equilibró con 20 mL de tampón de activación (0.1 M) pH 5.0 y la muestra fue completada con el mismo buffer para un volumen final de 2.5 mL, a continuación fueron agregados 4 mL de tampón de activación y se procedió a la respectiva colecta de la muestra (Rodríguez, 2001).

## **5.6 Ensayos preliminares para determinación de condiciones óptimas de la Actividad Enzimática**

Para la determinación de las condiciones óptimas de actividad enzimática, fue diseñado un factorial con el fin de establecer la temperatura, el pH, el tampón de extracción y la relación de enzima:sustrato (E:S) adecuados para la detección de la actividad enzimática.

Se realizaron diferentes ensayos evaluando relación enzima.sustrato 1:2 y 1:4, empleando tampón fosfato de potasio 100 mM y tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.0. Bajo estas condiciones, los extractos fueron sometidos durante una hora en baños termostatados a 25°C y 37°C, la temperatura fue controlada mediante termómetros de mercurio. Culminado el tiempo de reacción, fue adicionado 200 µl del reactivo Somogyi I y 50 µl del reactivo Somogyi II. Los tubos se incubaron en baño termostatado a 95 °C por 30 min; una vez enfriados los tubos, fueron adicionados 250 µl de reactivo de Nelson y 750 µl de agua destilada (Rodríguez, 2001). La reacción fue leída 24 horas después del montaje de la reacción a 595 nm.

## **5.7. Actividad Enzimática de Quitinasas**

Las quitinasas se evaluaron por la liberación de azúcares reductores mediante la reacción de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1951). Para evaluar la actividad enzimática, se utilizó una solución de 5 mg·ml<sup>-1</sup> de quitina coloidal en 0.1M de tampón acetato de sodio a pH 5.0. Posteriormente 50 µl del extracto enzimático fueron transferidos a un tubo eppendorf de 2 mL con 200 µl de sustrato, se homogenizó y se sometió a incubación a 37 °C durante 1h. Después del proceso de incubación, la reacción se detuvo con 200 µl del reactivo Somogyi I y 50 µl del reactivo Somogyi II. Los tubos se incubaron en baño termostatado a 95 °C por 30 min hasta el desarrollo de la reacción.. Una vez enfriados los tubos, fueron adicionados 250 µl de reactivo de Nelson y 750 µl de agua destilada (Rodríguez, 2001). Por último, los tubos se incubaron abiertos y en oscuridad a temperatura ambiente, durante una noche, de tal forma que el CO<sub>2</sub> producido por la reacción con el reactivo de Nelson, fuera liberado. Para medir la actividad de la reacción, se transfirió el volumen de reacción obtenido a celdas y se leyó la absorbancia a 595 nm. Para obtener las unidades de monosacáridos liberadas en la reacción, los valores de absorbancia obtenidos fueron remplazados en la

ecuación de la recta de la curva patrón de N-acetil glucosamina (Rodríguez, 2001). La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que genera la liberación de 1  $\mu\text{mol}$  de NAG en un minuto (Gomes *et al.*, 2000).

#### **5.7.1. Determinación de proteínas.**

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford (1976) y su cuantificación se obtuvo a partir de los extractos vegetales. Paralelamente se obtuvo una curva de calibración con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina (BSA) para transformar las absorbancias en concentraciones de microgramo ( $\mu\text{g}$ ) de proteína por microlitro ( $\mu\text{l}$ ), obteniendo de esta forma la concentración de proteína (Rodríguez, 2001).

#### **5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se realizó un análisis de varianza para la diferencia de medias (ANOVA). Adicionalmente se realizó un análisis Post Hoc (agrupaciones Duncan).

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Reconstitución de las Cepas de actinomicetos**



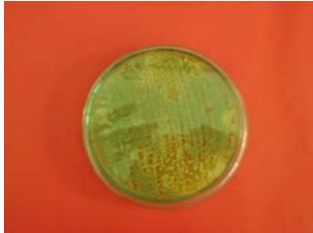

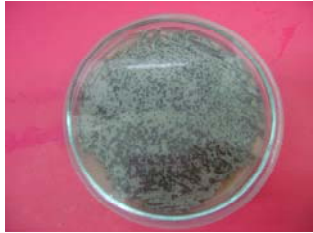
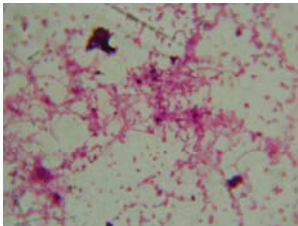
Para la realización del estudio se seleccionaron tres aislamientos de actinomicetos del banco de cepas del grupo UNIDIA de la Pontificia Universidad Javeriana. Los viales con las cepas de actinomicetos conservadas en glicerol, se reconstituyeron en agar avena para reducir el estrés metabólico de los microorganismos, además de garantizar la estabilidad y recuperación total de los procesos moleculares (Hernández & Muñoz, 2009; Sánchez y Corrales, 2005). Posteriormente se procedió a realizar una descripción y comparación microscópica y macroscópica (Tabla 1) de cada una de las cepas descritas anteriormente (Hernández & Muñoz, 2009; Farfán & Gutiérrez, 2009; Duque & Quintana, 2008). Una vez finalizado el periodo de reconstitución, cada una de las cepas fue sembrada masivamente en agar avena.

### **6.2 Pruebas de Pureza de los cultivos**

El seguimiento de la pureza de las cepas de actinomicetos se realizó durante todo el periodo de experimentación con tinción de Gram. Las pruebas de pureza realizadas confirmaron morfologías características de los actinomicetos, por lo cual se descartó la presencia de cualquier otro microorganismo interferente en los resultados del presente estudio; así como la presencia de olor a suelo húmedo, característico de estas bacterias filamentosas como respuesta a la producción del terpenoide geosmina (Sylvia, 2005).

### **6.3 Preparación de los tratamientos**

Franco-Correa (1999) confirmó que la concentración mínima de inóculo es de  $10^6$  cel·g suelo<sup>-1</sup>, para lo cual se realizó un raspado de las cepas MCR9, MCR24 y MCR26, obteniendo de esta forma el inóculo de cada tratamiento para su posterior inoculación en las materas.

	Descripción Macroscópica	Descripción Microscópica
<b>Cepa MCR 9</b>	<p>Colonia seca pulverulenta, color anverso gris plateada, reverso café oscuro, colonia pequeña.</p>  <p>Colonias Sobre agar Avena</p>	<p>Cadena larga de conidios, micelio no fragmentado, tortuoso y en espiral.</p>  <p>Duque &amp; Quintana (2008)</p>
<b>Cepa MCR 24</b>	<p>Colonia seca, pulverulenta anverso gris, sin pigmento difusible en el medio.</p>  <p>Colonias Sobre agar Avena</p>	<p>Filamentos ramificados con presencia de pocos Conidios simples.</p>  <p>Duque &amp; Quintana (2008)</p>
<b>Cepa MCR 26</b>	<p>Colonia pequeña, seca pulverulenta, anverso de color gris a morado, reverso gris Oscuro</p>  <p>Colonias Sobre agar Avena</p>	<p>Filamentos largos y fragmentados, micelio tortuoso, cadena de conidios Cortas sin espiral.</p> 

**Tabla 1:** Características macroscópicas y microscópicas de las cepas MCR9, MCR24 y MCR26

#### **6.4 Preparación de Extractos Enzimáticos**

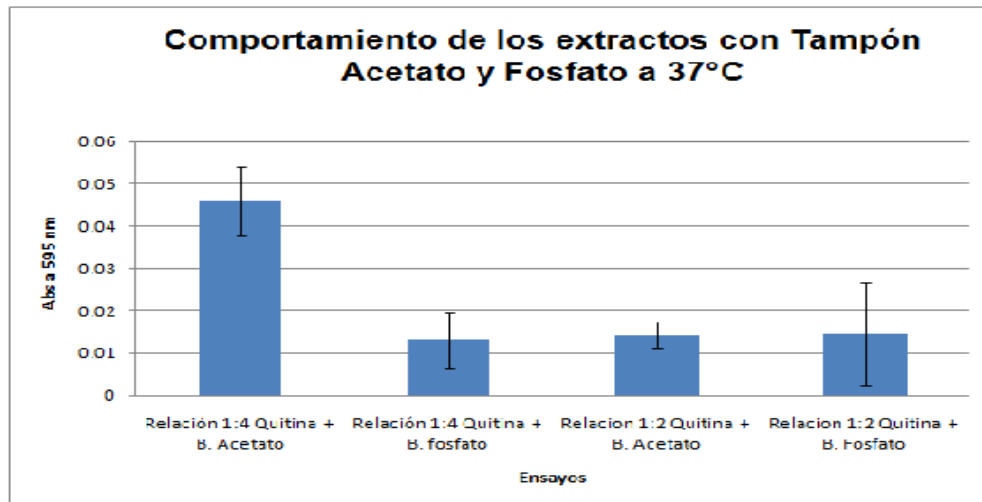
Según Mohammadi & Karr (2002), para la preparación de los extractos vegetales y su posterior actividad enzimática, es necesario la recuperación de 5 a 10 g (peso fresco) de material vegetal. Para efectos de este estudio, se evaluó la actividad enzimática de los extractos vegetales con cantidades inferiores a las sugeridas por los autores previamente mencionados, debido a la limitación de espacio en el montaje de las plántulas. En este sentido, se planteó un ensayo donde se estableció la diferencia entre la utilización de 2 g de tejido vegetal de hojas, tallos y raíces frente a 5 g de cada uno de éstos. Los resultados, demostraron que no presentó una diferencia significativa en los valores de la actividad enzimática y en la concentración de proteínas; por lo cual, se determinó que la utilización de 4 g para cada uno de los tejidos era representativo para llevar a cabo los objetivos del presente estudio (Fernández *et al.*, 2003).

#### **6.5 Ensayos preliminares para determinación de condiciones óptimas de la Actividad Enzimática**

A partir de ensayos preliminares para la determinación de la actividad quitinolítica, se diseñó un factorial con el fin de establecer las condiciones óptimas de temperatura, el pH adecuado para el tampón de extracción y la relación de enzima:sustrato (E:S), necesarios para una detección eficiente de la actividad enzimática en extractos vegetales.

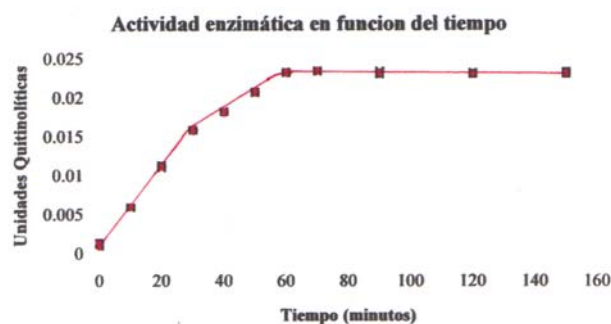
Se estableció la relación 1:4 (enzima:sustrato) como la adecuada en la evaluación de la cantidad de sustrato necesario para obtener la mayor actividad quitinolítica del extracto enzimático, con un tiempo de reacción de una hora y una temperatura de 37°C, tal y como lo demostraron los ensayos de estandarización realizados por Hernández & Muñoz (2009) y Farfán & Gutiérrez (2009). Bhattacharya y colaboradores (2007), demostraron que las quitinasas en especies de *Streptomyces* presentan actividad enzimática en amplios rangos de temperatura y pH, siendo estos dependientes del lugar de aislamiento. Para el caso de los procesos de extracción enzimática, fue evaluado el pH adecuado a través de ensayos con tampón acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) y tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 6.0). La figura 1 muestra que manteniendo una relación 1:4 a 37°C, es evidente una mayor actividad comparada con la observada al utilizar tampón fosfato pH 6.0. Así mismo, estudios en actividad enzimática quitinolítica han demostrado una prevalencia en la utilización de

tampón acetato respecto a tampón fosfato para los procesos de extracción (Rajkumar *et al.*, 2008; Rodríguez, 2001; Inoube *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 1998; Iseli *et al.*, 1996; Dann *et al.*, 1996).



**Figura 1.** Concentración de azúcares reductores en función de absorbancia de los extractos vegetales a 37° C con Tampón Acetato pH 5.0 y Tampón Fosfato pH 6.0

Adicionalmente, según estudios realizados por Hernández & Muñoz (2009), se determinó que el tiempo óptimo de reacción para extractos crudos es de 1 hora como puede observarse en la figura 2, en la cual se evidencia que la mayor liberación de azúcares reductores está presente a los 60 min de la reacción enzimática. Esto concuerda con lo reportado por Singh *et al.* (1998), El-Sayed *et al.* (1999) y El-Tarabilly *et al.* (2000), quienes recomiendan un periodo de una hora para la detección de la actividad enzimática quitinolítica, confirmando que el tiempo de reacción escogido es el adecuado.



**Figura 2.** Actividad enzimática quitinolítica en función del tiempo (Hernández & Muñoz, 2009).

## 6.6. Actividad enzimática de Quitinasas

Desde la década pasada, el estudio de enzimas líticas como las quitinasas, ha incursionado con importantes funciones en la activación de mecanismos de defensa indirectos en plantas. Teniendo en cuenta los estudios previos realizados por Farfán & Gutiérrez (2009) y Franco-Correa (2008), las cepas *Streptomyces* MCR9 sp., *Thermobifida* MCR24 sp. y *Streptomyces* MCR26 sp. mediante ensayos de la actividad enzimática semicuantitativa, mostraron una actividad quitinolítica; lo cual coincide con lo reportado por Agrios (1988), Blaak (1993) y Gupta y colaboradores (1995), quienes demostraron que cepas del género *Streptomyces* como *Streptomyces viridificans*, *Streptomyces olivaceoviridis* y *Streptomyces scabies*, incursionan en los procesos de degradación de la quitina.

Al determinar que las cepas MCR9, MCR24 y MCR26 eran productoras de quitinasas, se evaluó de manera cuantitativa la inducción de estas enzimas como mecanismo de defensa en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). La actividad enzimática se evaluó colorimétricamente siguiendo el protocolo de Boller y Maunch (1988) usando quitina coloidal como sustrato, detectando la concentración de azúcares reductores por el método de Somogyi–Nelson (Somogyi, 1951) y la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

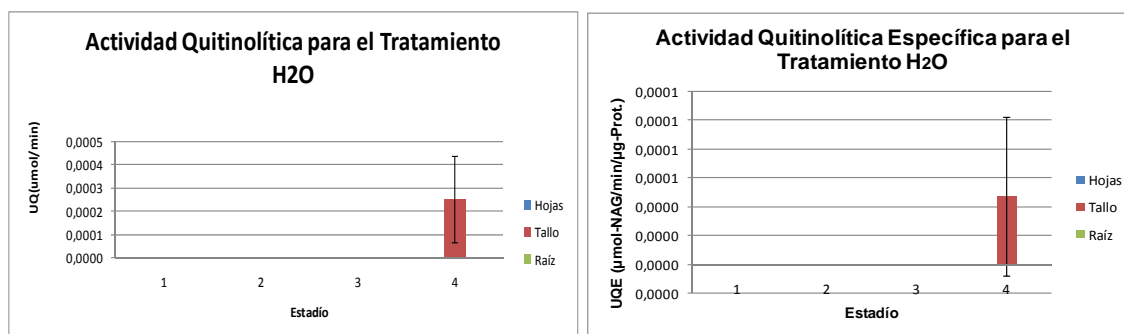
Comparando la respuesta inductora de la actividad quitinolítica en *Phaseolus vulgaris*, se encontró una relación directa post-inoculación en la inducción de quitinasas por la cepa MCR 26, cuyos resultados se analizaron por ANOVA y agrupación de Duncan, donde se observó una diferencia entre los resultados de la actividad quitinolítica (UQ) y actividad quitinolítica específica (UQE).

Uno de los métodos para detectar la actividad enzimática entre los tratamientos evaluados (MCR9, MCR24, MCR 26, control con fertilizante y testigo con agua), fue evidenciar si hay o no diferencia estadísticamente significativa dependiendo del estadio y el tejido evaluado, ya sean hojas, tallo o raíces.

El tratamiento agua, mostró que existe diferencia estadísticamente significativa, con un  $\alpha$  0,05 (sig 0,0000 y F 41,966) entre los cuatro estadios, siendo este último el que presentó

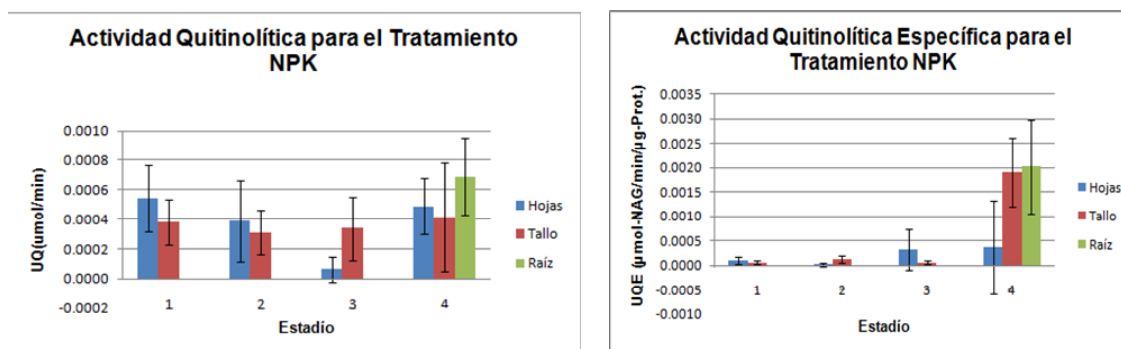


una mayor actividad quitinolítica (0,0004589 Umol/min) y actividad quitinolítica específica (0,00004522  $\mu\text{mol-NAG/min/ug-prot}$ ). Adicionalmente se encontró que entre los tres tejidos evaluados, el que demostró una mayor inducción enzimática tanto a nivel específico como no específico fueron los tallos en los dos casos, respectivamente (Figura 3).



**Figura 3.** Actividad Quitinolítica y Quitinolítica Específica en el Tratamiento Testigo con H<sub>2</sub>O

Por otro lado, el tratamiento con fertilizante químico, demostró al igual que el tratamiento H<sub>2</sub>O, poseer una diferencia estadísticamente significativa con un  $\alpha$  0,05 (sig.0,000 y F 7,247) en cuanto a la actividad enzimática promovida por el fertilizante. En la agrupación de Duncan, se observó un solapamiento de tres muestras, pertenecientes al cuarto y primer estadio. A partir de esto, en la evaluación enzimática a nivel de tejidos, se evidenció actividad por parte de las raíces durante el cuarto estadio; por otro lado en las muestras solapadas se observó que tanto en el primer estadio (0.00054  $\mu\text{mol/min}$ ) como en el cuarto, hubo actividad en las hojas presentándose mayor actividad quitinolítica (0.00069  $\mu\text{mol-NAG/min/ug-prot}$ ), en este último (Figura4), lo cual puede estar influenciado por la inoculación del suelo con el fertilizante químico, el cual al tener componentes esenciales para el desarrollo vegetal hace que sea más eficiente la producción de metabolitos vinculados con la actividad enzimática (Frageria *et al.*, 2002).



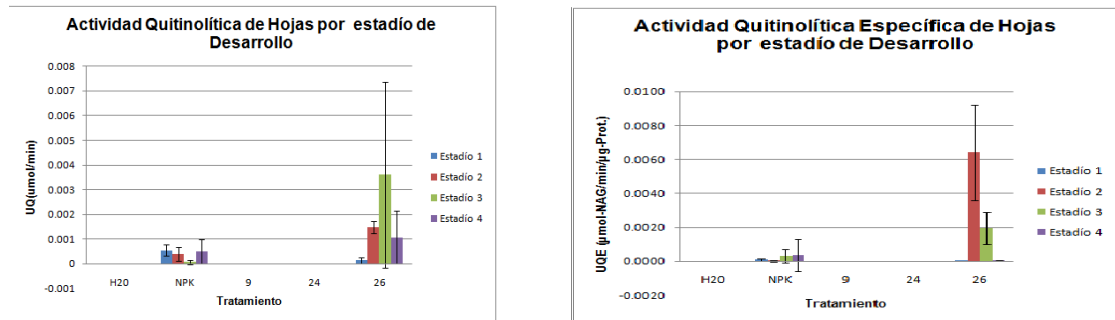
**Figura 4.** Actividad Quitinolítica y Quitinolítica Específica Tratamiento NPK

Con respecto a la actividad enzimática específica, se observa el mismo comportamiento, ya que se evidencia una mejor actividad enzimática en las raíces del cuarto estadio. La agrupación de Duncan permite observar la incidencia del fertilizante en la actividad enzimática específica lo cual coincide con lo observado en la Figura 4; esto indica que los fertilizantes químicos inducen la actividad enzimática y le proporcionan a las plantas mejores condiciones nutricionales y metabólicas, reforzando de esta forma los mecanismos de defensa (Frageria *et al.*, 2002).

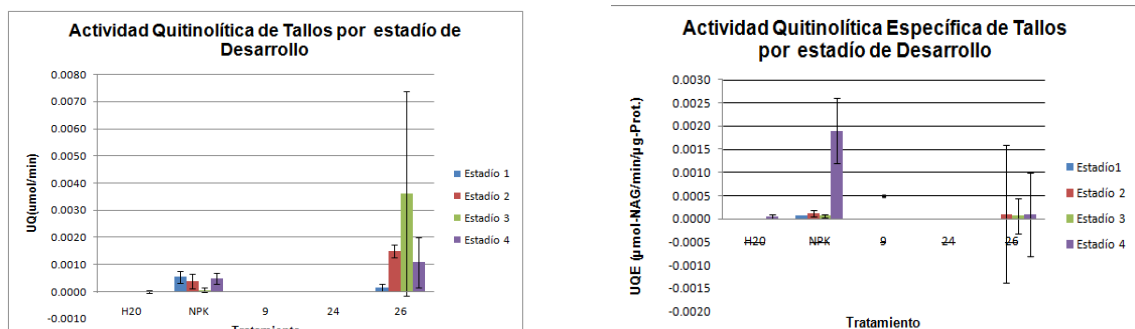
Análogamente, los tratamientos MCR9 y MCR24 no demostraron inducción de actividad enzimática. Sin embargo, según los estudios de Bello & Gómez (2009) y Franco-correa (2008), se estableció que la concentración de inóculo ( $10^6$  cel·g suelo<sup>-1</sup>) utilizada para este estudio, es la adecuada en el establecimiento de los actinomicetos en la rizosfera de leguminosas, por lo cual la concentración de inóculo no está relacionada con la ausencia de inducción enzimática por parte de las cepas MCR9 y MCR24.

Estadísticamente, se evidencia actividad quitinolítica en el tratamiento MCR26, a partir del segundo estadio, hasta la última fase de desarrollo y actividad quitinolítica específica en tallo y raíz; mostrando de manera clara la resistencia sistémica inducida en la planta. Este proceso, se observa por las agrupaciones de Duncan, las cuales muestran valores de actividad quitinolítica máxima en el estadio 3 con valores de 0,0036 (μmol/min) para hojas (Figura 5), 0,0018 (μmol/min) en tallos durante el estadio 4 (Figura 6) y 0,0014 (μmol/min) en raíces durante el estadio 3 (Figura 7); así como actividad quitinolítica específica en el estadio 2 para hojas con valores de 0,006416 (μmol-NAG/min/ug-prot), 0,001898 (μmol-NAG/min/ug-prot) en el estadio 4 para tallos y 0,008828 (μmol-NAG/min/ug-prot) en el estadio 1 en raíces, respectivamente. Estos resultados responden a

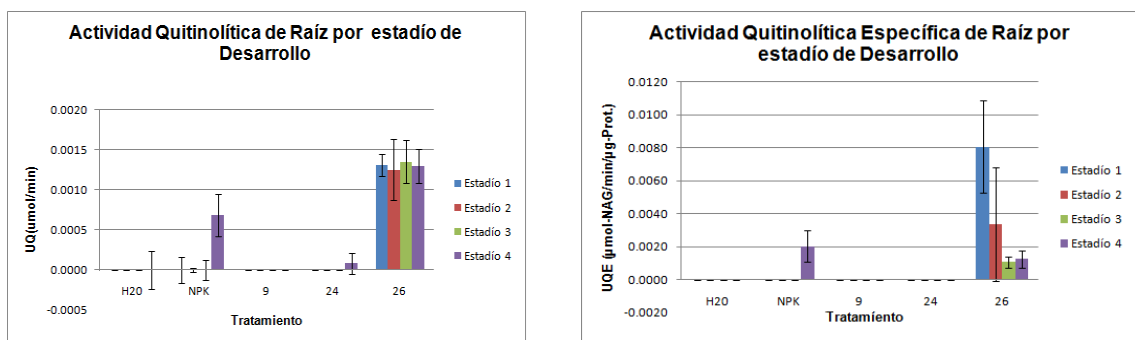
lo publicado por Schumann & D'arcy (2006), quienes mencionan que mediante la inducción de los mecanismos de defensa, es posible incrementar la síntesis de nutrientes esenciales, encontrándolos en todos los estadios de crecimiento de la planta, lo cual está directamente relacionado con la actividad enzimática.



**Figura 5.** Actividad Quitinolítica - Actividad Quitinolítica Específica en Hojas Para Tratamiento H2O, NPK, MCR9, MCR24 y MCR26

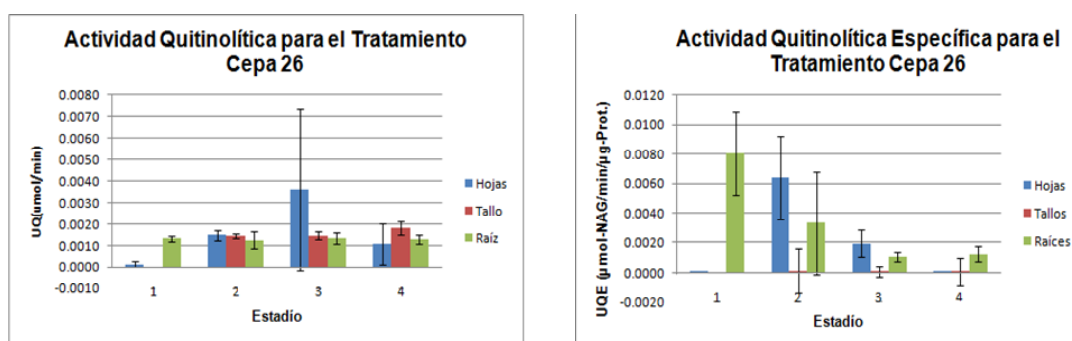


**Figura 6.** Actividad Quitinolítica - Actividad Quitinolítica Específica en Tallos Para Tratamiento H2O, NPK, MCR9 MCR24 y MCR26



**Figura 7.** Actividad Quitinolítica - Actividad Quitinolítica Específica en Raíz Para Tratamiento H2O, NPK, MCR9, MCR24 y MCR26

Análogamente, en el primer estadio se evidenció un aumento en la inducción de la actividad enzimática específica en las raíces (Figura 8), lo cual coincide con lo reportado por Xue *et al.*, (1998), quien menciona que la inducción de la actividad enzimática es evidente en tejidos de raíz de *Phaseolus vulgaris*, inoculadas con especies de *Rhizoctonia*, debido al establecimiento del microorganismo en la raíz, siempre y cuando la inoculación sea a nivel de suelo. Esto puede ser explicado en estudios realizados por Lee *et al.* (1986) quienes afirman que debido a la producción de sustancias quimioatrayentes como las lecitinas y flavonoides por parte de las raíces, es evidente un mayor establecimiento microbiano en raíces, lo cual puede influir en el desarrollo vegetal. Adicionalmente, Höflich *et al.* (1994) mencionan que al inocular microorganismos en el suelo, hay mayor absorción de nutrientes debido a que el suelo es un sustrato que a nivel de componentes es muy complejo.



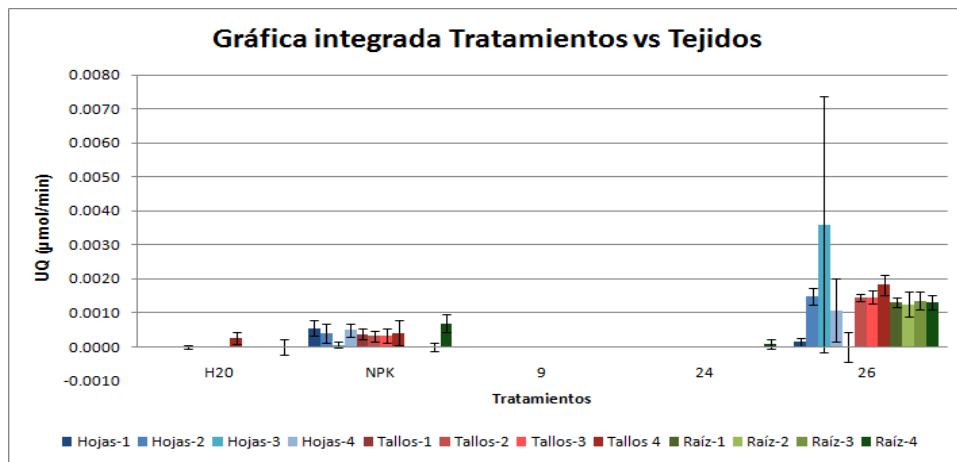
**Figura 8.** Actividad Quitinolítica y Quitinolítica Específica tratamiento MCR26

Sin embargo, publicaciones sobre producción de enzimas líticas como mecanismo de defensa indirecto en plantas están relacionadas con patógenos como *Fusarium oxysporum* (Clavijo *et al.*, 1995), *Rhizoctonia solani* (Anuratha *et al.*, 1996), así como en bacterias Gram negativas del género *Pseudomonas* (Lingua *et al.*, 2008; Devendra *et al.*, 2000) pero muy pocos reportes en bacterias filamentosas Gram positivas, como los actinomicetos quienes se han descrito como agentes de biocontrol al producir enzimas biodegradativas como las quitinasas en procesos de micoparasitismo (Tokala *et al.*, 2002), así como uno de

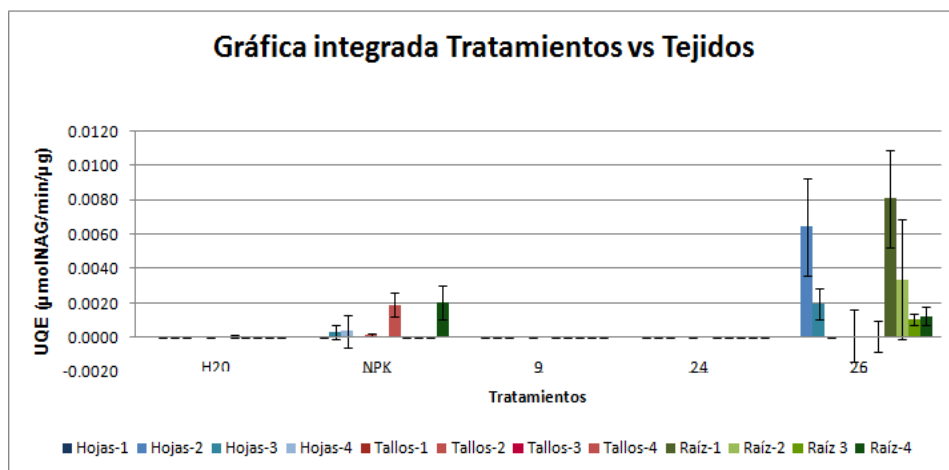
los microorganismos más importantes a nivel de rizosfera (El-Tarabily *et al.*, 2006 y Sylvia, 2005).

La evaluación por estadios de desarrollo, muestra actividades enzimáticas relevantes en la actividad quitinolítica y la actividad quitinolítica específica de la cepa MCR26 (Figura 8) en donde se evidencian diferencias estadísticamente significativas con un  $\alpha$  0,05 (Sig.0.000) en cada uno de los estadios de *Phaseolus vulgaris*, donde la cepa MCR26 fue la única que mostró inducción de actividad enzimática quitinolítica mientras que las cepas MCR9 y MCR24 no presentaron evidencia de la misma, con excepción del estadio 4, en el que la cepa MCR24 mostró una actividad quitinolítica (0,000083 umol/min) y actividad quitinolítica específica de (0,0056 umol-NAG/min/ug-prot) en tejidos de raíz. Este factor pudo haberse presentado como un efecto tardío en la respuesta inducida por parte del microorganismo con la planta, teniendo en cuenta que la raíz es el primer órgano con el que entra en contacto el microorganismo. Adicionalmente según estudios realizados por Sousa *et al.* (2008) al entrar en contacto, los actinomicetos con las raíces, promueven el crecimiento de las mismas principalmente por la elevada producción de metabolitos primarios y secundarios, dentro de las cuales se encuentran las enzimas líticas de pared fúngica como las quitinasas.

Las agrupaciones de Duncan en el estadio 1 tanto para la actividad quitinolítica como para la actividad específica, exponen que la muestra 513 (cepa MCR26, primer estadio, raíces) presenta valores de UQ 0,0014 (umol/min) y UQE 0,0088 (umol-NAG/min/ug-prot) respectivamente, lo cual permite inferir que la raíz al ser el primer punto de contacto entre el suelo inoculado con el microorganismo y la planta, presentó actividad enzimática desde el primer estadio de desarrollo. Por otro lado, cabe resaltar que la actividad inducida por la cepa MCR26 (Figura 9 y 10) es mayor a la actividad evidenciada con el tratamiento control NPK muestra 211 (Fertilizante, primer estadio, hojas) y 213 (fertilizante, primer estadio raíces).



**Figura 9.** Actividad Quitinolítica por tratamiento en cada uno de los tejidos y estadios de desarrollo



**Figura 10.** Actividad Quitinolítica Específica por tratamiento en cada uno de los tejidos y estadios de desarrollo

En consecuencia, se estableció que a nivel de la actividad quitinolítica y actividad quitinolítica específica, a partir del segundo estadio de desarrollo hay actividad enzimática relevante, lo cual se evidencia claramente en los resultados arrojados por la cepa MCR26. Por otro lado, demuestra que las plantas de *Phaseolus vulgaris* producen enzimas líticas de pared, debido a la activación de mecanismos de defensa inducida, expresada en términos del presente estudio como quitinasas (Schröder *et al.*, 1996). Paralelamente, según los

resultados obtenidos, es claro el aumento de la inducción enzimática por el sistema radicular como primer contacto planta-microorganismo; seguida por el transporte de las mismas a través de su sistema vascular hasta las hojas, proporcionando de esta forma, una correlación directa entre el tiempo de evolución de las plantas hasta llegar al último estadio de desarrollo, con la concentración de quitinasas en tejidos foliares (Dann *et al.*, 1996).

Por otro lado, a pesar de la evidencia de las barras de error donde se llega a superar los valores de la media aritmética, la cepa MCR26 mostró inducción de actividad quitinolítica y actividad quitinolítica específica, a diferencia de las otras dos cepas evaluadas. Análogamente, es preciso mencionar que la técnica de precipitación con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y la desalinización de las muestras por columna de sephadex G25, aumentan el error experimental, debido a la manipulación constante de las muestras, lo cual es claramente evidenciado en los valores de la desviación estándar.

## 7. CONCLUSIONES

1. La cepa MCR26 induce la actividad enzimática quitinolítica en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris*, demostrando que puede ser considerada como un agente inductor de la defensa sistémica.
2. Las cepas MCR9 y MCR24 no presentaron inducción de actividad enzimática en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris*.
3. La actividad quitinolítica y actividad quitinolítica específica, registraron valores máximos de actividad enzimática en tejidos de Hojas y Raíces con énfasis en el tercer y cuarto estadio de desarrollo, indicando una inducción sistémica de esta actividad implicada en defensa.
4. Por medio de la inoculación directa en suelo, es posible la inducción sistémica de enzimas quitinolíticas en leguminosas como el frijol.



## 8. RECOMENDACIONES

- Continuar los trabajos de estandarización que se llevan a cabo en el laboratorio UNIDIA, relacionados con la concentración de proteínas, evaluando diferentes métodos de precipitación como el ácido tricloroacético, la ultrafiltración y la liofilización, a demás de otras técnicas de detección de azúcares reductores con presencia del grupo amino, como la cuantificación de amino azúcares reportada por Morgan-Elson (1934).
- Para concluir el proceso de extracción enzimática, se recomienda realizar una diálisis tras el proceso de precipitación con sulfato de amonio, con la finalidad de eliminar los restos de esta sal, para de esta manera evitar los interferentes al momento de la cuantificación.
- Como factor complementario, realizar la purificación de las quitinasas por medio de técnicas cromatográficas así como la ejecución de seguimientos de pureza con electroforesis.
- Emplear otros modelos de planta de interés agrícola como maíz (*Zea mays*) y algodón.
- Realizar enfrentamientos de las plantas inoculadas con los actinomicetos en estudio, frente a hongos fitopatógenos que afectan los cultivos de leguminosas como el frijol, con el fin de verificar si efectivamente hay inducción de defensa.
- Realizar aislamientos a partir de cultivos de interés económico para el país (Soya, maíz, algodón y trigo), en busca de cepas autóctonas de actinomicetos que permitan encontrar efectos benéficos frente al control de plagas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

**Abdel-Fattah G.M. & Mohamedin A.H. (2000).** Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brawn scales. *Biology Fertility Soils*. 32:401–409.

**Agrios J. N. (2005)** Plant pathology. *Fifth edition Elsevier academic press*. United States. Págs 213-217, 231-233.

**Alvarez-Solis J.& Anzuelo-Martínez M. (2004)** Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México. *Ensayo en Agrociencia*, 38:13-22.

**Anuratha C., Zen C. & Cole K. (1996)** Induction of chitinases and  $\beta$ , 1-3 Glucanases in *Rhizoctonia solani* infected rice plants isolation of an infection related chitinase cDNA clon *Physiology plantarum* 97:39-46

**Atlas R. & Bartha R. (2002)** Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Madrid, España.677 Págs.

**Bhattacharya D., Nagpure A. & Gupta R. (2007).** Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27:21–28.

**Bayliss, K. L.; Kuo, J.; Sivasithamparam, K.; Barbetti, M. J. & Lagudah, E. S (2001).** Infection of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) by *Kabatiella caulivora*. *Phytopathology*. 149: 669-671.

**Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K.J. & Stepanok V.V. (2001)** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:642-52.

**Bello C. & Gómez R. (2009)** Evaluación de mecanismos directos relacionados con la promoción de crecimiento vegetal por parte de actinomicetos nativos colombianos y su interacción con *Glomus sp.*. *Trabajo de grado*. Directora: Marcela Franco Correa. 180 Págs.

**Blaak H., Schnellmann J., Walter S., Henrissat B. & Schrempf H. (1993)**

Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *European Journal of Biochemistry*, 214: 659-669

**Bollet T., Maunch F (1988)** Antifungal hidrolases in pea. *Plant physiology* 88:936-942

**Cardona G. (2004).** Evaluación de la diversidad de actinomicetos en suelos bajo tres coberturas en el sur del Trapecio Amazónico colombiano. *Tesis de maestría*. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Colombia. Director: Manuel Ruiz García. 162 págs.

**Clavijo A., Cotes A (1995)** Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* sp en tomate mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología*.

**Cohen-Kupiec R. & Chet I. (1998)** The molecular biology of chitin digestion. *Environmental Biotechnology*, 9: 270-277.

**Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U. & Vad K. (1993)** Plant Chitinases. *Plant Journal*, 3: 31-40

**Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C. & Barka E.A. (2005)** Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:4951-4959.

**Dann E.K., Meuwly P., Métraux J.P. & Deverall B.J. (1996)** The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Physiology Mol plant Pathology*, 49: 307-319.

**Debouck D. & Hidalgo R. (1985)** Morfología de la planta de frijol común; en Marcelino López, Fernando Fernández y Aart van Sochoonhoven (comp), *Frijol: investigación y producción*. PNUD/CIAT. Cali, Colombia. Pág. 7-78.

**Devendra K.C. & Bhavdisha N.J. (2009)** Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 164: 493-513

**Duque, C.; Quintana, M. (2008)** Determinación Preliminar de la Actividad Promotora de Crecimiento Vegetal de Actinomycetes Aislados de Suelo. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Director. Marcela Franco Correa. Co director. María Ximena Rodríguez. pp. 126.

**El-Sayed S., Ezzat S., Ghaly M., Mansour M. & El-Bohey M. (1999)** Purification and characterization of two chitinases from *Streptomyces albobovineus* S-22. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16:87-89.

**El-Tarabily K.A., Soliman M.H., Nassar A.H., Al-Hassani H.A., Sivasithamparam K., McKenna F. & Hardy G.E.St. J.(2000)** Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* 49: 573-583.

**El-Tarabily K.A. & Sivasithamparam K. (2006)** Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology & Biochemistry* 38 : 1505–1520

**Farfan D. & Gutierrez C. (2009)** Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos. *Trabajo de grado*. Directora: Dra María Ximena Rodríguez. Codirectora: Dra Marcela Franco Correa 137 Págs.

**Franco-Correa, M (1999).** Aislamiento, caracterización y evaluación de actinomycetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos. Tesis de maestría en Microbiología, Director: Dr. Hernando Valencia. *Departamento de Química, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.* 86 págs.

**Franco-Correa, M. (2008).** Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas. *Tesis de Doctorado. Universidad de Granada.* Director: José Miguel Barea, Facultad de ciencias. 266 Págs.

**Franson M.A. (1992)** Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Escrito por American Water Works Association, American Public Health Association, Water Pollution Control Federation, Publicado por Ediciones Díaz de Santos.1816 págs.

**Gupta R., Saxena R., Chaturvedi P (1994)** Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: Its potential in fungal cell wall lysis. *Journal of applied bacteriology* 78:378-383

**Han, Y., Li Z., Miao X. & Zhang F. (2009)** Characterization of Antifungal Chitinase from Marine *Streptomyces* sp. DA11 Associated with South China Sea Sponge *Craniella Australiensis*. *Marine Biotechnology* 11: 132-140.

**Hernández A. & Muñoz R. (2009).** Estandarización preliminar de un método para la cuantificación de actividad quitinolítica en un grupo de actinomicetos nativos. *Trabajo de grado*. Directora: Marcela Franco Correa. Págs 121

**Jabaji-Hare S., Chamberland H. & Charest P. (1999)** Cell wall alterations in hypocotyls of bean seedlings protected from *Rhizoctonia* stem canker by a binucleate *Rhizoctonia* isolate. *Mycological Research*. 103, 8 : 1035-1043

**Jetiyanona K. & Kloepper J.W. (2002)** Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, 24:285-291

**Liu L., Kloepper J.W. y Tuzum S. (1995)** Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85:695-698.

**Lingua G., Gamalero E., Fusconi A., Lemanceau P., Berta G. (2008).** Colonization Of plant roots by *Pseudomonas* and a AM fungi: a dynamic phenomenon, affecting plant growth and health. Mycorrhiza, A. Varma (ed) Springer verlag Berlín Heidelberg, pp. 601-626

**Lucy M., Reed E. & Glick B. R. (2004)** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1–25.

**Morgan W.J.A., Bending G. D. & White P. J. (2005)** Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56,417:1729-1739

**Morgan W.T.J. & Elson L.A. (1934)** A Colorimetric Method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Serum Department of the Lister Institute, Elstree, Herts*.

- Ohno T., Armand S., Hata T., Nikaidou N., Henrissat B., Mitsutomi M. & Watanabe T. (1996).** A Modular Family 19 Chitinase Found in the Prokaryotic Organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal Of Bacteriology*, 178: 5065–5070
- Prescott, L.M. (2002).** Microbiology. 5<sup>th</sup> ed. *Editorial McGraw- Hill. Boston, Massachussets, USA*. pp. 524-528.
- Punja Z.K. & Zhang Y. (1993)** Plant chitinases and their roles in resistance to fungal disease. *Journal of Nematology*, 25:526-540
- Rodríguez M.X. (2001)** Towards identifying markers for post-harvest physiological deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de Doctorado. University of Bath, Inglaterra.
- Schrempf H. (2001)** Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 285–289
- Schröder M., Hahlbrock K. & Kambhampati E. (1992)** Temporal and spacial patterns of  $\beta$ , 1-3 Glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans* the plant journal 2:161-172
- Singh P. P., Shin Y.C., Park C.S. & Chung Y.R. (1998)** Biological control of Fusarium Wilt of Cucumber by Chitinolytic Bacteria, *Biological Control* 89: 92-99
- Stacey G. & Keen N.T. (1996b)** Plant-Microbe Interactions Volume 3. *Chapman & Hall. Eds New York*. 35-37.
- Sylvia D.M. (1998)** Principles and Applications of Soil Microbiology. *Prentice-Hall. Eds. Seattle river, NJ United States*. 550 pp.
- Tokala K., Strap C., Jung D., Crawford L., Salove L., Deobald F., Bailey J. & Morra J. (2002).** Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2161-2171
- Walker T., Pal H., Grotewold E. & Vivanco J. (2003)** Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology*, 132: 44–51.
- Wen H., Ying C., Yaw H (1998)** Chitinase activity of sweet potato (*Ipomea patata*). *Botanical bulletin of academia sínica*, 39.

**Wild A. & Russell E.J. (1992)** Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas. *Publicado por Mundi-Prensa Libros*. 1045.

**Xue L., Charest P. & Jabaji-Hare (1998)** Systemic induction of peroxidases  $\beta$ , 1-3 Glucanase, chitinases and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species *Plant Physiology* 86

**Zahir Z.A., Arshad M. & Frankenberger W.T. (2004)** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Advances in Agronomy*, 81:97-198.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1. ANOVA** Evaluación de las Diferencias entre los Tratamientos y los Estadíos Evaluados en un mismo Tejido.

ANALISIS DE VARIANZA UQ		
	valor F	Significancia
HOJA	7,039	0,0000
TALLO	109,987	0,0000
RAIZ	113,066	0,0000

ANALISIS DE VARIANZA UQ E		
	valor F	Significancia
HOJA	11,93	0,0000
TALLO	29,052	0,0000
RAIZ	6,515	0,0000

**Anexo 2. ANOVA** Evaluación de los Diferentes Tratamientos, para un mismo Estadío con Diferentes Tejidos

ANALISIS DE VARIANZA UQ		
	valor F	Significancia
ESTADIO 1	72,43	0,0000
ESTADIO 2	109,431	0,0000
ESTADIO 3	7,633	0,0000
ESTADIO 4	27,883	0,0000

ANALISIS DE VARIANZA UQE		
	valor F	Significancia
ESTADIO 1	33,272	0,0000
ESTADIO 2	9,868	0,0000
ESTADIO 3	5,091	0,0000
ESTADIO 4	27,883	0,0000

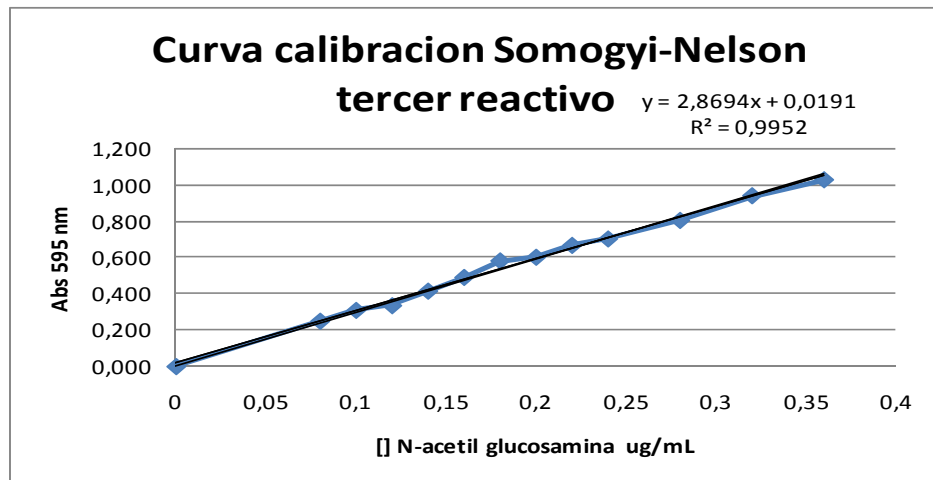
**Anexo 3. ANOVA** Evaluación de las Diferencias entre los Estadios Evaluados y los Tejidos Vegetales en cada Tratamiento.

ANALISIS DE VARIANZA UQ		
	valor F	Significancia
Tto H2O	41,996	0,0000
Tto NPK	7,171	0,0000
Tto MCR26	4,479	0,0000

ANALISIS DE VARIANZA UQE		
	valor F	Significancia
Tto H2O	5,495	0,0000
Tto NPK	18,998	0,0000
Tto MCR26	11,984	0,0000

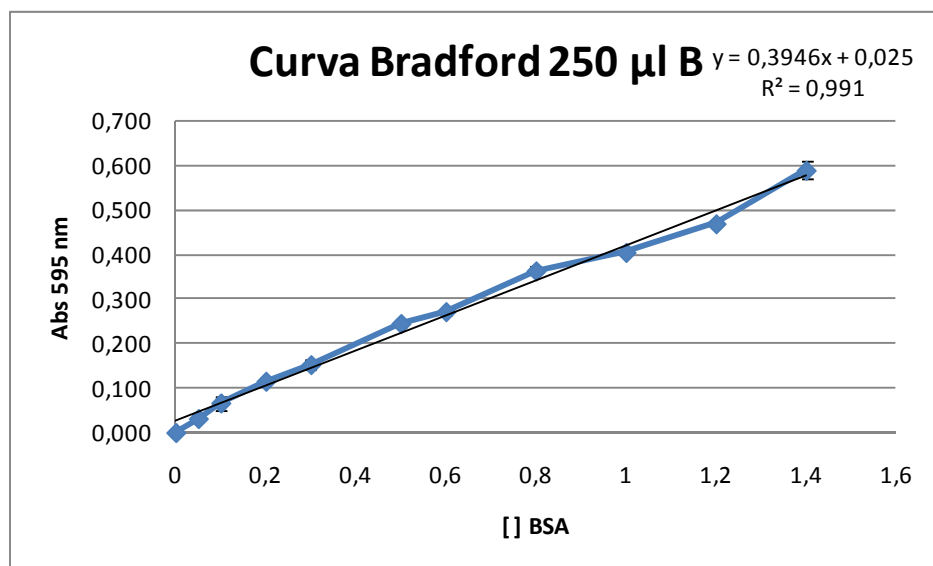
**Anexo 4.** Curva Patrón para la cuantificación de azúcares reductores





**Cuantificación de azúcares reductores por Somogyi–Nelson modificado por Rodríguez (2001).**

#### **Anexo 5:** Curva de calibración Bradford



**Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976), modificado por Rodríguez (2001).**