

Quitinasas en plantas y posible uso como biomarcadores para el diseño de biosensores en la detección de hongos fitopatógenos

Jesús Armando Lucas-Bautista^{1§}
Silvia Bautista-Baños¹
Rosa Isela Ventura-Aguilar²
Mónica Hernández-López¹

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec-Jojutla km 6, calle Ceprobi 8, Yautepec, Morelos, México. CP. 62731. Tel. 735 3942020, ext. 82500. (sbautis@ipn.mx; mohernandezl@ipn.mx). ²CONACYT-CEPROBI-IPN. Carretera Yautepec-Jojutla km 6, calle Ceprobi 8, Yautepec, Morelos, México. CP. 62731. Tel. 735 3942020, ext. 82500. (iselaventura@yahoo.com.mx).

§Autor para correspondencia: lukairo21@gmail.com.

Resumen

La quitina es el biopolímero más importante de la pared celular de los hongos, la cual se degrada por la acción de quitinasas. Las plantas sintetizan estas enzimas para protegerse de factores tanto abióticos como bióticos, incluyendo a los hongos fitopatógenos, los cuales permanecen en estado de latencia hasta encontrar las condiciones adecuadas para manifestarse. Para su identificación, se podrían considerar técnicas basadas en biomarcadores y crear dispositivos que sean rápidos, simples, específicos y confiables, tal es el caso de los biosensores. Se conoce ampliamente la especificidad de las quitinasas con la quitina, por lo que, la identificación de los hongos podría llevarse a cabo mediante un biosensor que integre a las quitinasas. En este manuscrito se revisó información acerca de la síntesis de quitinasas en plantas cuando se someten a estrés, enfocándose en los patosistemas planta-patógeno. Se mencionan también las técnicas y métodos de identificación de los hongos, resaltando el uso de biosensores. Finalmente, se propone la utilización de quitinasas como biomarcadores enzimáticos para su identificación por medio de un biosensor y su aplicación en el control de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: hongos, mecanismos de defensa, quitina.

Recibido: abril de 2022

Aceptado: mayo de 2022

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, la cual se sintetiza por una gran cantidad de organismos y se encuentra, en la cutícula de insectos, arácnidos, exoesqueletos de crustáceos e invertebrados como moluscos, anélidos y cefalópodos. También es un componente de la pared celular de algas, huevos de nematodos y es característica primordial en la pared celular de los hongos (Ramírez *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2011).

Químicamente, la quitina se compone de moléculas de N-acetil-D-glucosamina unidas con enlaces β -1,4, lo que requiere para su síntesis la acción de la enzima quitina sintetasa que se encuentra en los quitosomas. Esta enzima emplea UDP-N-acetilglucosamina como sustrato y un catión divalente, generalmente Mg como cofactor. Una vez que el polímero se forma en los sitios citoplasmáticos, los quitosomas lo translocan a través de la membrana al espacio extracelular donde cada polímero se ensambla espontáneamente para formar microfibrillas cristalinas que permanecen adyacentes a la membrana plasmática (Muzzarelli, 2011).

La quitina y sus derivados como el quitosano y sus oligosacáridos de N-acetilglucosamina tienen una gran estabilidad química y térmica; sin embargo, son susceptibles a la acción de las enzimas quitinolíticas (Ramírez *et al.*, 2010) y según los patrones de escisión, las enzimas quitinolíticas se dividen en: N-acetilglucosaminidasas y quitinasas. Las primeras son las glucósido hidrolasas que catalizan la liberación de residuos de N-acetilglucosamina; mientras que, las quitinasas son las glucósido hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4 en quitina y quito-oligómeros de cadena corta, promoviendo su liberación con tamaños que van desde 20 kDa hasta aproximadamente 90 kDa (Seidl, 2008).

Las quitinasas pueden clasificarse de acuerdo con el lugar de escisión de la cadena de quitina en endoquitinasas o exoquitinasas, las primeras degradan en cualquier parte de la cadena, mientras que las exoquitinasas cortan al final de la cadena dando lugar a moléculas de quitobiosa (dos unidades de N-acetilglucosamina) o moléculas de N-acetilglucosamina (Seidl, 2008). Además, según la secuencia de aminoácidos, los mecanismos de catálisis, la especificidad del sustrato y la sensibilidad a los inhibidores, las quitinasas se clasifican filogenéticamente en cinco clases: clase I, II, III, IV y V. Las clases III y V pertenecen a la familia 18 del glucósido hidrolasas y están presentes en la mayoría de los organismos como hongos, bacterias, virus, animales y plantas superiores; mientras que, el resto de las clases son parte de la familia 19 de los glucósidos hidrolasas y se encuentran principalmente en algunas bacterias y plantas superiores tales como maíz y tomate, entre otros (Jashni *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016).

La diferencia entre la clase I y II radica en que, las primeras tienen el dominio de unión a la quitina en la región N-terminal de 40 aminoácidos rico en cisteína en la clase I; mientras que, las quitinasas de clase V contienen dos dominios de unión a la quitina (Grover *et al.*, 2012). La presente revisión de literatura menciona la acción de las quitinasas como parte del sistema de defensa de las plantas y su activación en estreses abióticos y bióticos, resaltando su síntesis en las plantas como respuesta a la infección causada por hongos fitopatógenos; asimismo, se mencionó las diferentes técnicas para la identificación de estos microorganismos destacando el uso de biosensores. Igualmente, se consideró la síntesis de quitinasas como un posible biomarcador durante la interacción planta-hongo con la finalidad de integrarlas en el diseño de un biosensor.

Quitinasas en plantas

Las plantas, al ser organismos sésiles, dedican parte de su energía para su defensa contra las adversidades del medio ambiente que las rodea (Ortiz *et al.*, 2014). En este sentido, la síntesis de quitinasas en plantas, que se acumulan en el apoplasto o en las vacuolas, está involucrada en la protección contra factores bióticos y abióticos, así como en diferentes procesos fisiológicos de la misma planta (Sahai y Minocha, 1993). A continuación, se describe brevemente cada uno de los factores que causan la síntesis de estas enzimas, centrando la investigación en los factores bióticos, en particular en los hongos fitopatógenos.

Estrés abiótico

El estrés abiótico en las plantas abarca todas las condiciones ambientales que reducen su correcto rendimiento y desarrollo; sin embargo, para reducir los efectos negativos del medio ambiente que las rodea, las plantas responden a este estrés de maneras diferentes y complejas (Cramer *et al.*, 2011). Los principales problemas debidos al estrés abiótico se deben, entre otros, a la luz ultravioleta, cambios osmóticos, temperatura, sequía y salinidad. En todos estos casos, se estimula la síntesis de quitinasas que actúan como mecanismo de defensa (Grover, 2012; Xu *et al.*, 2016). En el Cuadro 1 se mencionan algunos ejemplos de la producción de quitinasa debido a algunos factores de estrés abiótico.

Cuadro 1. Resumen de algunos reportes científicos de la producción de quitinasas por estrés abiótico.

Producto agrícola evaluado	Tipo de estrés abiótico	Observaciones en la producción de quitinasas	Autores
<i>Arabidopsis</i>	Cambio osmótico	La sobreexpresión de una quitinasa presente en <i>Arabidopsis</i> , provocó mayor tolerancia al estrés osmótico inducido por NaCl durante la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas.	Hong y Hwang (2006)
Azafrán (<i>Crocus sativus</i>)	Heridas	Dos horas después de provocar heridas a los cormos de plantas de azafrán, se observó la expresión de una quitinasa promoviendo la defensa de la planta.	Castillo y Gómez-Gómez (2009)
Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>)	Frío	Hubo un aumento prolongado en la expresión de quitinasas en la chirimoya sometida a 6 °C durante nueve días de almacenamiento.	Goñi <i>et al.</i> (2009)
Manzanas (<i>Malus hupehensis</i>)	Fitohormonas	Se observó una sobreexpresión de tres genes que codifican quitinasas en manzanas después de ser tratadas con ácido salicílico, metil jasmonato y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico en 48 h.	Zhang <i>et al.</i> (2010)

Producto agrícola evaluado	Tipo de estrés abiótico	Observaciones en la producción de quitinasas	Autores
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Metales pesados	Se evaluó la respuesta de toxicidad al cadmio de dos genotipos de arroz: uno susceptible y otro tolerante al cadmio, encontrando una sobreexpresión de quitinasas en las raíces de arroz del genotipo tolerante.	Cai <i>et al.</i> (2011)
Planta del té (<i>Camellia sinensis</i>)	Fitohormonas	Se reportó un aumento en la transcripción de un gen que codifica una quitinasa presente en las hojas de planta del té expuestas al metil jasmonato.	Roy y Chakraborty (2012)

Actividad de las quitinasas durante la patogénesis por hongos

Entre las múltiples y complejas vías de defensa que tienen las plantas, existen reportes de la acción de las quitinasas en la protección contra los hongos fitopatógenos, tomando el papel de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y siendo una parte integral del mecanismo de resistencia a enfermedades que actúan como inductores categorizándose en las clases de PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11 (Sánchez-García *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016).

Los hongos fitopatógenos contienen quitina en su pared celular; por lo que la acción de las quitinasas se dirige hacia esta zona para provocar lisis del hongo. Las quitinasas actúan en respuesta de defensa al ataque de estos inhibiendo la germinación de las esporas, acortando los tubos germinales y degradando las puntas de las hifas (Ntui *et al.*, 2011). Cuando las hifas penetran en el espacio intracelular, las quitinasas apoplásticas liberan moléculas inductoras que activan los mecanismos de defensa y sintetizan quitinasas vacuolares y más quitinasas apoplásticas mejorando la señalización de la infección; mientras tanto, cuando las hifas destruyen la célula que causa la lisis, las quitinasas vacuolares son responsables de degradar las cadenas de quitina del hongo invasivo inhibiendo su crecimiento (Kasprzewska, 2003).

Sobre este tema, Garg y Gupta (2010) probaron la producción de quitinasas de plantas de frijol (*Phaseolus aconitifolius*) al inocularlas con *Macrophomina phaseolina*, mostrando una mayor actividad en comparación con las plantas no tratadas; se tuvieron los mismos resultados en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Del mismo modo, Chaturika *et al.* (2011) descubrieron la actividad antifúngica de la quitinasa presente en la fase acuosa del látex de la fruta del mango (*Mangifera indica*), que digirió las paredes de las conidias de *Colletotrichum gloeosporioides*. En el Cuadro 2 se muestran ejemplos de la actividad de las quitinasas dentro del sistema de defensa de las plantas.

Cuadro 2. Resumen de algunos reportes sobre la actividad antifúngica de las quitinasas durante el proceso de infección.

Hongo evaluado	Principales descubrimientos	Autores
<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	Se promovió la inducción de quitinasas en raíces de tabaco (<i>N. tabacum</i>) tratadas con quitosano, obteniendo mayor resistencia a <i>P. parasitica</i> en comparación con el control.	Falcón <i>et al.</i> (2002)

Hongo evaluado	Principales descubrimientos	Autores
<i>Sphaerotheca humuli</i>	Se observó el retraso de la enfermedad causada por <i>S. humuli</i> en plantas de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>) asperjadas con una quitinasa aislada y purificada del tubérculo de ñame (<i>Dioscorea alata</i>).	Karasuda <i>et al.</i> (2003)
<i>Pyricularia grisea</i>	Se observó mayor producción de quitinasas y menor incidencia de <i>P. grisea</i> en plantas de arroz cuyas semillas se trataron con quitosano a diferencia del control.	Rodríguez-Pedroso <i>et al.</i> (2006)
<i>Colletotrichum falcatuma</i>	Se reportó mayor presencia de quitinasas en hojas de caña de azúcar (<i>S. officinarum</i>) resistentes a <i>C. falcatuma</i> al someterlas al tratamiento de una glucoproteína aislada de la pared celular del hongo para la inducción de proteínas de resistencia en comparación con una variedad susceptible.	Sundar <i>et al.</i> (2008)
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Hojas de plátano (<i>Musa spp.</i>) resistentes a <i>M. fijiensis</i> se inocularon con el hongo y se observó un aumento en la actividad de quitinasa a diferencia de la variedad la susceptible.	Sánchez-García <i>et al.</i> (2012)
<i>Oidiopsis taurica</i>	Se identificó un aumento de quitinasas en raíces y hojas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) var. Amalia, cuyas semillas se inocularon previamente con los hongos micorrízicos arbusculares <i>Glomus cubense</i> y <i>G. mosseae</i> , después de ser expuestas a <i>O. taurica</i> .	Pérez <i>et al.</i> (2015)
<i>Colletotrichum falcatum</i>	Se reportó resistencia a <i>C. falcatum</i> en plantas de caña de azúcar con la adición de un gen codificante de quitinasas.	Tariq <i>et al.</i> (2018)

Asimismo, el desarrollo de plantas transgénicas ha sido de gran ayuda en la agricultura, favoreciendo su rendimiento y producción al mejorar sus características genéticas específicas; por lo que, uno de los objetivos de la modificación genética de las plantas es su protección contra los organismos fitopatógenos. Sabiendo de la acción de las quitinasas contra los organismos que contienen quitina en su morfología, la síntesis de una mayor cantidad de quitinasas es el propósito de la alteración genética de muchas plantas (Grover, 2012).

Sin embargo, a pesar de la eficacia del sistema de defensa de las plantas para evitar la infección por hongos fitopatógenos por medio de la síntesis de quitinasas, existen algunos hongos tales como *Fusarium verticillioides*, *F. oxysporum*, *Bipolaris zeicola*, *Stenocarpella maydis* y *Bipolaris zeicola* que pueden minimizar dicho sistema de defensa por medio de la síntesis de proteínas modificadoras de quitinasas (CMP), por sus siglas en inglés y de proteasas que degradan a las quitinasas (Naumann, 2011; Jashni *et al.*, 2015). El Cuadro 3 muestra algunas investigaciones sobre plantas genéticamente modificadas que sobreexpresan algún gen que codifica quitinasas para otorgar resistencia contra patógenos.

Cuadro 3. Resumen de algunos reportes científicos sobre la actividad antifúngica de las quitinasas en plantas transgénicas.

Hongo	Principales descubrimientos	Autores
<i>Venturia inaequalis</i>	Los genes de <i>Trichoderma atroviride</i> que codifican endoquitinasas o exoquitinasas se insertaron en manzanas (<i>M. domestica</i>) ‘Marshall’ y ‘McIntosh’ individualmente y en combinación. Las plantas resultantes se seleccionaron para determinar la resistencia a <i>V. inaequalis</i> , obteniendo la disminución de la enfermedad cuando ambos genes estuvieron presentes en comparación con la expresión de uno solo.	Bolar <i>et al.</i> (2001)
<i>Phoma tracheiphila</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	El gen que codifica la endoquitinasa chit42 de <i>T. harzianum</i> se insertó en plantas de limón (<i>Citrus limon</i>) ‘Femminello siracusano’. Se probaron contra <i>P. tracheiphila</i> y <i>B. cinerea</i> inhibiendo significativamente ambos patógenos en comparación con plantas sin el gen.	Gentile <i>et al.</i> (2007)
<i>Alternaria solani</i>	Plantas de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) se transformaron genéticamente con la inserción del gen que codifica la quitinasa (ChiC) de la cepa <i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037. Las plantas mostraron alta resistencia contra el hongo <i>A. solani</i> en comparación con el control.	Khan <i>et al.</i> (2008)
<i>Fusarium graminearum</i>	Plantas de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) se modificaron genéticamente con la inserción del gen que codifica una quitinasa de clase II en la cebada. Las plantas se inocularon con <i>F. graminearum</i> , las cuales mostraron resistencia a este patógeno.	Shin <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Plantas de algodón transgénicas (<i>Gossypium hirsutum</i>) que expresan el gen de una endoquitinasa de <i>T. vires</i> se confrontaron contra <i>R. solani</i> , mostrando una mayor defensa contra este patógeno en comparación con las plantas no transgénicas.	Kumar <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizoctonia solani</i>	El gen que codifica la quitinasa (CHIT42) en el hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> se transfirió por modificación genética a las plantas de tabaco, que eran consistentemente resistentes a <i>R. solani</i> al compararlas con plantas sin el gen.	Kern <i>et al.</i> (2010)

Quitinasas como biomarcadores para la detección de hongos

Técnicas para la detección de hongos

El ataque por hongos fitopatógenos ocasiona pérdidas importantes en frutos en pre y postcosecha; por ello, es necesario un método que identifique la presencia de estos patógenos en forma oportuna para aplicar algún tratamiento que los controle. De acuerdo con Ray *et al.* (2017) existen técnicas que permiten la detección de dichos patógenos que se clasifican en dos tipos: convencionales y

emergentes. Las primeras hacen referencia a métodos de cultivo por aislamiento y examinación visual, donde se identifican subjetivamente hongos o sus esporas basándose en manuales de acuerdo a su morfología; mientras que, las técnicas emergentes son técnicas más específicas y se categorizan en dos métodos: directos e indirectos.

En los métodos indirectos se encuentran técnicas como los métodos inmunológicos y métodos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); sin embargo, a pesar de ser precisos, requieren de tiempo para dar resultados; en cambio, en los métodos indirectos se utilizan técnicas basadas en biomarcadores las cuáles son en tiempo real. Las técnicas basadas en biomarcadores se enfocan en detectar el impacto del patógeno en la fisiología de la planta o el estrés producido luego del contacto y se categorizan en técnicas espectroscópicas y de imagen y en técnicas de detección de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).

Dentro de estos métodos se encuentra la espectroscopía de fluorescencia, rayos X, resonancia magnética nuclear, infrarrojo visible, termografía, cromatografía de gases acoplado a masas, entre otros (Ray *et al.*, 2017). Por otro lado, existen trabajos que utilizan técnicas basadas en marcadores biológicos. Ejemplo de ello es el trabajo realizado por Crespo *et al.* (2008) quienes investigaron la composición de los VOCs liberados por *Beauveria bassiana* en presencia de n-octacosano por medio de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS). Asimismo, Jones *et al.* (2011) utilizaron tinciones fluorescentes basadas en blanco de calco-flúor para detectar la quitina en organismos del género *Cryptomycota*.

Por su parte, Berdugo *et al.* (2014) detectaron cambios en la temperatura de hojas de pepino relacionadas con la transpiración durante la infección de *Sphaerotheca fuliginease* por medio de termografía infrarroja digital, diferenciando plantas sanas de plantas enfermas. En este sentido, las investigaciones recientes podrían considerar técnicas basadas en biomarcadores para crear dispositivos que sean rápidos, simples, específicos y confiables para identificar fitopatógenos de interés. Tal es el caso de los biosensores.

Biosensores

Un biosensor es un dispositivo compacto que integra un biorreceptor (ácido nucleico, enzima, proteína, anticuerpo, célula, etc.) asociado a un sistema de transducción que permite detectar la señal emitida por la interacción entre el biorreceptor con el analito de interés; el resultado de dicha interacción produce una variación de una o varias propiedades fisicoquímicas tales como pH, color, calor, etc., la cual será detectada por el transductor y transformada en una señal electrónica que indique la presencia del analito (González-Rumayor *et al.*, 2005).

Entre las ventajas de un biosensor se encuentran, entre otros: tiempo de análisis corto, tiempo de vida largo, costo de producción bajo, automatización, manejo sencillo y portabilidad, capacidad de multianálisis y alta selectividad, entre otros. De acuerdo con su sistema de transducción, los biosensores se clasifican en piezoeléctricos, electroquímicos, termométricos y ópticos (González-Rumayor *et al.*, 2005). En el Cuadro 4 se explica el principio de algunos de ellos.

Cuadro 4. Clasificación de biosensores de acuerdo a su sistema de transducción.

Biosensor	Principio
Electroquímico	Transforma la señal entre el analito el biorreceptor en una señal eléctrica; a su vez, se subdivide en biosensores conductimétricos, amperométricos, potenciométricos e impedimétricos de acuerdo con la detección de cambios en dichas propiedades.
Óptico	Mide las variaciones de las propiedades de la luz como absorción, dispersión, luminiscencia, fluorescencia, dispersión o índice de difracción durante de la interacción del biorreceptor con el analito.
Piezoeléctrico	Mide cambios en la masa producidos por la interacción de antígeno-anticuerpo detectando la variación en la frecuencia de oscilación.
Termométrico	Detectan el calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas.

A la fecha, las aplicaciones de los biosensores son amplias en distintos campos, por ejemplo, en el campo de la salud para la detección de ciertas enfermedades y el cuidado del medio ambiente; asimismo, las aplicaciones en el ámbito agroalimentario de un biosensor están dirigidas a la seguridad y calidad alimentaria y el control en procesos industriales (González-Rumayor *et al.*, 2005; Castro-Ortíz *et al.*, 2007).

Existe poca información de biosensores que detecten los hongos fitopatógenos en alimentos; sin embargo, en los últimos años se han desarrollado algunas investigaciones con este interés. El Cuadro 5 muestra algunas investigaciones de biosensores para determinar la presencia de hongos.

Cuadro 5. Resumen de algunos reportes sobre el diseño de biosensores para la identificación de hongos fitopatógenos.

Detección de	Resumen informativo	Autores
<i>Aspergillus niger</i>	Se realizó un prototipo de un biosensor sintetizando nanopartículas y nanocapas de óxido de cobre para detectar <i>Aspergillus niger</i> mediante el dióxido de carbono producido por el hongo por medio de una resistencia eléctrica.	Etefagh <i>et al.</i> (2013)
1-octen-3-ol de las esporas de <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i>	Biosensor basado en un sistema olfativo integrado a plataformas de nanotubos de carbono para detectar 1-octen-3-ol de las esporas de <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> presentes en granos.	Ahn <i>et al.</i> (2015)
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	Inmunosensor para detectar <i>P. fijiensis</i> en extractos de hojas de banano por medio de la inmovilización en un chip recubierto de oro de un anticuerpo policlonal (anti-HF1), producido contra HF1 en la pared celular del hongo.	Luna-Moreno <i>et al.</i> (2019)
<i>Penicillium digitatum</i>	Biosensor para detectar <i>P. digitatum</i> en naranjas a través de las respuestas luminiscentes de bacterias a los cambios en los compuestos orgánicos volátiles del fruto durante la infección.	Chalupowicz <i>et al.</i> (2020)

Otra forma de clasificación de los biosensores es acorde al tipo de biorreceptor que contenga (Monošíka *et al.*, 2012). Consecuentemente, se pueden tener biosensores enzimáticos cuya principal característica es que contienen enzimas como elemento de reconocimiento; una vez que las enzimas se unen en su sitio activo con el analito de interés catalizando la reacción, se producen cambios de temperatura, masa, calor y cargas eléctricas que pueden ser traducidas por un sistema de transducción acorde a dicha reacción (Torres-Ramírez y Méndez-Albores, 2014). Este tipo de biosensores pueden utilizarse en mezclas complejas presentando alta selectividad y respuesta rápida, logrando utilizarse en más de una ocasión (Serna-Cock *et al.*, 2009).

La implementación de quitinasas para el diseño de biosensores que detecten hongos ha sido muy poco explorada; sin embargo, Pretty y Hodda (2018) diseñaron un biosensor óptico para detectar la quitina de hongos. Los autores utilizaron quitinasas de *Vigna mungo* y la enzima N-acetil β glucosaminidasa (NAGasa) de *Canavalia ensiformis* para la detección de quitina de hongos en granos de trigo, concluyendo que donde hubo presencia de hongos aumentó el contenido de quitina, porque las quitinasas degradaron al biopolímero en sus oligómeros que aumentaron la absorbancia.

Conclusiones

El desarrollo actual de nuevas técnicas para la detección de hongos fitopatógenos requiere de procesos rápidos, precisos y confiables. En este sentido, los biosensores podrían ser una opción viable en comparación a otras técnicas tradicionales que, además de incorporar mayores costos y/o personas capacitadas para dicha identificación, son lentas. Teniendo en cuenta la actividad de las quitinasas en las plantas como parte de su sistema de defensa ante la presencia de hongos fitopatógenos, el diseño de un biosensor que incorpore a estas enzimas como biomarcadores podría generar información valiosa en el campo agroalimentario. Para lograrlo, primero es necesario cuantificar la actividad de quitinasas en plantas al ser atacadas por hongos y posteriormente, diseñar un dispositivo que integre a las quitinasas como biorreceptor y que identifique a la quitina de los hongos como analito de interés presente una pequeña muestra de la planta; la señal de interacción entre ambas puede ser traducida por un sistema de transducción adecuado en tiempo real.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta aquellos hongos fitopatógenos que degradan a las quitinasas y que silencian la síntesis de estas enzimas; para ello, se hace necesario la detección de las proteínas modificadoras de quitinasas o proteasas específicas antes de obtener la medición de quitinasas. Un dispositivo de este tipo, tendría las ventajas de especificidad y precisión en tiempo real que se requieren en el campo de la fitopatología.

Agradecimientos

Las autoras (es) agradecen a CONACYT y al Instituto Politécnico Nacional en su programa de becas BEIFI por su financiamiento.

Literatura citada

Ahn, J. H.; Lim, J. H.; Park, J.; Oh, E. H.; Son, M.; Hong, S. and Park, T. H. 2015. Screening of target-specific olfactory receptor and development of olfactory biosensor for the assessment of fungal contamination in grain. *Sensors and actuators B: chemical*. 210(1):9-16. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.12.060>.

- Berdugo, C. A.; Zito, R.; Paulus, S. and Mahlein, A. K. 2014. Fusion of sensor data for the detection and differentiation of plant diseases in cucumber. *Plant Pathol.* 63(6):1344-1356. <https://doi.org/10.1111/ppa.12219>.
- Bolar, J. P.; Norelli, J. L.; Harman, G. E.; Brown, S. K. and Aldwinckle, H. S. 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10(6):533-543. <https://doi.org/10.1023/A:1013036732691>.
- Cai, Y.; Cao, F.; Wei, K.; Zhang, G. and Wu, F. 2011. Genotypic dependent effect of exogenous glutathione on Cd-induced changes in proteins, ultrastructure, and antioxidant defense enzymes in rice seedlings. *J. Hazard. Mater.* 192(3):1056-1066. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.011>.
- Castillo, L. R. and Gómez-Gómez, L. 2009. Isolation of a new fungi and wound-induced chitinase class in corms of *Crocus sativus*. *Plant Physiol. Biochem.* 47(5):426-434. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.007>.
- Castro, L.; Flores, L. y Uribe, L. 2011. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. *Agron. Costarricense.* 35(2):21-32. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43622356002>.
- Castro-Ortíz, L. P.; Luna Pabello, V. M. y Villalobos-Pietrini, R. 2007. Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Rev. Internac. Contam. Amb.* 23(1):35-45. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37023104>.
- Chalupowicz, D.; Veltman, B.; Droby, S. and Eltzov, E. 2020. Evaluating the use of biosensors for monitoring of *Penicillium digitatum* infection in citrus fruit. *Sensors and actuators B: Chemical.* 311(1):127896. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127896>.
- Chathurika, K. L.; Adikaram, N.; Mallika, K. B. M.; Ratnayake, B. B. M. and Abayasekara, C. 2011. Role of antifungal gallotannins, resorcinols and chitinases in the constitutive defence of immature mango (*Mangifera indica* L.) against *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Phytopathol.* 159(10):657-664. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01818.x>.
- Cramer, G. R.; Urano, K.; Delrot, S.; Pezzotti, M. and Shinozaki, K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* 11(1):1-14 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>.
- Crespo, R.; Pedrini, N.; Juárez, M. P. and Dal Bello, G. M. 2008. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol. Res.* 163(2):148-151. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.013>.
- Etefagh, R.; Azhir, E. and Shahtahmasebi, N. 2013. Synthesis of CuO nanoparticles and fabrication of nanostructural layer biosensors for detecting *Aspergillus niger* fungi. *Scientia Iranica.* 20(3):1055-1058. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2013.05.015>.
- Falcón, A. B.; Ramírez, M. A.; Márquez, R. and Hernández, M. 2002. Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. *Cultivos Tropicales.* 23(1):61-66. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218105009>.
- Garg, N. and Gupta, H. 2010. Isolation and purification of fungal pathogen (*Macrophomina phaseolina*) induced chitinase from moth beans (*Phaseolus aconitifolius*). *J. Pharmacy Bioallied Sci.* 2(1):38-43. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.62708>.
- Gentile, A.; Deng, Z.; La Malfa, S.; Distefano, G.; Domina, F.; Vitale, A.; Polizzi, G.; Lorito, M. and Tribulato, E. 2007. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. *Plant Breed.* 26(2):146-151. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01297.x>.

- González-Rumayor, V.; García-Iglesias, E.; Ruiz-Galán, O. y Gago-Cabezas, L. 2005. Aplicación de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid. 91 p.
- Goñi, O.; Sánchez-Ballesta, M. T.; Merodio, C. and Escribano, M. I. 2009. Regulation of defense and cryoprotective proteins by high levels of CO₂ in *Annona* fruit stored at chilling temperature. *J. Plant Physiol.* 166(3):246-258. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.005>.
- Grover, A. 2012. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical reviews in plant sciences.* 31(1):57-73. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616043>.
- Hong, J. K. and Hwang, B. K. 2006. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, CACHi2, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the CACHi2-overexpressing *Arabidopsis*. *Planta.* 223(3):433-448. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0099-6>.
- Jashni, M. K.; Dols, I. H. M.; Iida, Y.; Boeren, S.; Beenen, H. G., Mehrabi, R.; Collemare, J. and Wit, P. J. 2015. Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 28(9):996-1008. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0074-R>.
- Jones, M. D.; Forn, I. M.; Gadelha, C.; Egan, M. J.; Bass, D.; Massana, R. and Richards, T. A. 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature.* 474(7350):200-203. <https://doi.org/10.1038/nature09984>.
- Karasuda, S.; Tanaka, S.; Kajihara, H.; Yamamoto, Y. and Koga, D. 2003. Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Bio. Biotechnol. Biochem.* 67(1):221-224. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.221>.
- Kasprzewska, A. 2003. Plant chitinases-regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8(3):809-824. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12949620/>.
- Kern, M. F.; Faria-Maraschin, S.; Vom-Endt, D.; Schrank, A.; Vainstein, M. H. and Pasquali, G. 2010. Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. *Applied. Biochem. Biotechnol.* 160(7):1933-1946. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8701-1>.
- Khan, R. S.; Sjahril, R.; Nakamura, I. and Mii, M. 2008. Production of transgenic potato exhibiting enhanced resistance to fungal infections and herbicide applications. *Plant Biotechnol. Reports.* 2(1):13-20. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0043-x>.
- Kumar, V.; Parkhi, V.; Kenerley, C. M. and Rathore, K. S. 2009. Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. *Planta.* 230(2):277-291. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0937-z>.
- Luna-Moreno, D.; Sánchez-Álvarez, A.; Islas-Flores, I.; Canto-Canche, B.; Carrillo-Pech, M.; Villarreal-Chiu, J. F. and Rodríguez-Delgado, M. 2019. Early detection of the fungal banana black sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* by an SPR immunosensor method. *Sensors.* 19(3):1-12. <https://doi.org/10.3390/s19030465>.
- Monošíka, R.; Stredanský, M. and Sturdik, E. 2012. Biosensors-classification, characterization and new trends. *Acta chimica slovac.* 5(1):109-120. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>.
- Muzzarelli, R. A. A. 2011. Chitin: Formation and Diogenesis. *In: chitin nanostructures in living organisms*, vol. 1. Gupta, N. S. (Ed.). Springer. 1-34 pp. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9684-5>.

- Naumann, T. A. 2011. Modification of recombinant maize Chita chitinase by fungal chitinase-modifying proteins. *Mol. Plant Pathol.* 12(4):365-372. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00677.x>.
- Ntui, V. O.; Azadi, P.; Thirukkumaran, G.; Khan, R. S.; Chin, D. P.; Nakamura, I. and Mii, M. 2011. Increased resistance to *Fusarium* wilt in transgenic tobacco lines co-expressing chitinase and wasabi defensin genes. *Plant Pathol.* 60(2): 221-231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02352.x>.
- Ortiz, D.; Noguera, R. y Posada, S. 2014. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livestock research for rural development.* 26(121):1.12. <http://www.lrrd.org/lrrd26/11/orti26211.html>.
- Pérez, O. E.; Noval, B. M.; Martínez, C. B.; Torres, N. W.; Medina, C. A.; Hernández, A. y León, O. 2015. Inducción de mecanismos de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) micorrizadas frente al ataque de *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm. *Cultivos Tropicales.* 36(1):98-106. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36n1/ctr13115.pdf>.
- Pretty and Hooda, V. 2018. A novel polyurethane/nano ZnO matrix for immobilization of chitinolytic enzymes and optical sensing of chitin. *Int. J. Biol. Macromol.* 106(1):1173-1183. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.114>.
- Ramírez, M. Á.; Rodríguez, A. T.; Alfonso, L. and Peniche, C. 2010. La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Biotechnol. Aplicada.* 27(4):270-276. <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v27n4/bta02410.pdf>.
- Ray, M.; Ray, A.; Dash, S.; Mishra, A.; Achary, K. G.; Nayak, S. and Singh, S. 2017. Fungal disease detection in plants: traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 87(1):708-723. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.032>.
- Rodríguez-Pedroso, A. T.; Ramírez-Arrebato, M. Á.; Cárdenas-Travieso, R. M.; Falcón-Rodríguez, A. y Bautista-Baños, S. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24(1):1-7. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224101>.
- Roy, S. C. and Chakraborty, B. N. 2012. Analysis of chitinase gene specific transcript accumulation in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] during induced systemic resistance by methyl jasmonate. *Indian J. Biotechnol.* 11(2):142-147. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/14011>.
- Sahai, A. S. and Manocha, M. S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Reviews.* 11(4):317-338. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00004.x>.
- Sánchez-García, C.; Cruz-Martín, M.; Alvarado-Capó, Y.; Rojas, L.; Leiva-Mora, M.; Acosta-Suarez, M. y Roque, B. 2012. Detección y cuantificación de quitinasa en hojas de banano (*Musa* spp.) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotechnol. Vegetal.* 12(2):119-124. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/163/140>.
- Seidl, V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews.* 22(1):36-42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>.
- Serna-Cock, L.; Zatty-Arenas, A. M. and Ayala-Aponte, A. 2009. Use of enzymatic biosensors as quality indices: A synopsis of present and future trends in the food industry. *Chilean J. Agric. Res.* 69(2):270-280. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000200017>.
- Shin, S.; Mackintosh, C. A.; Lewis, J.; Heinen, S. J.; Radmer, L.; Dill-Macky, R.; Baldrige, G. D.; Zeye R. J. and Muehlbauer, G. J. 2008. Transgenic wheat expressing a barley class 2 chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *J. Exp. Bot.* 59(9):2371-2378. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern103>.

- Sundar, A. R.; Velazhahan, R.; Nagarathinam, S. and Vidhyasekaran, P. 2008. Induction of pathogenesis-related proteins in sugarcane leaves and cell-cultures by a glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum*. Biol. Plant. 52(2):321-328. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0066-8>.
- Tariq, M.; Khan, A.; Tabassum, B.; Toufiq, N.; Bhatti, M.; Riaz, S.; Nasir, I. A. and Husnain, T. 2018. Antifungal activity of chitinase II against colletotrichum falcatum Went. Causing red rot disease in transgenic sugarcane. Turk. J. Biol. 42(1):45-53. <https://doi.org/10.3906/biy-1709-17>.
- Torres-Ramírez, E. y Méndez-Albores, A. 2014. Biosensores enzimáticos. Rev. Digital Universitaria, 15(12):1-8. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art97/index.html>.
- Xu, J.; Xu, X.; Tian, L.; Wang, G.; Zhang, X.; Wang, X. and Guo, W. 2016. Discovery and identification of candidate genes from the chitinase gene family for *Verticillium dahliae* resistance in cotton. Scientific Reports. 6(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/srep29022>.
- Zhang, J.; Du, X.; Wang, Q.; Chen, X.; Lv, D.; Xu, K.; Qu, S. and Zhang, Z. 2010. Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) rehd. BMC Res. Notes. 3(1):1-6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-208>.