

Scanning electron microscopy and enzymatic analysis in *Agave americana* during *Fusarium oxysporum* infection

Microscopía electrónica de barrido y análisis enzimático en *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*

Sheila Jazmín Reyes-Zambrano*, Carlos Alberto Lecona-Guzmán, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; Nancy Santana-Buzzy¹, Ignacio Islas-Flores¹, Miguel Tzec-Simá¹, Felipe Alonso Barredo-Pool², Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas¹, Unidad de Biotecnología², Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México; Nancy Ruiz-Lau, CONACYT-Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; Martín Eduardo Ávila-Miranda, Laboratorios de Fitopatología, DEPI del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco, México. *Autor para correspondencia: shey26reyesam@gmail.com

Recibido: 17 de Mayo, 2020.

Aceptado: 26 de Julio, 2020.

Reyes-Zambrano SJ, Lecona-Guzmán CA, Gutiérrez-Miceli FA, Santana-Buzzy N, Islas-Flores I, Tzec-Simá M, Barredo-Pool FA, Ruiz-Lau N and Ávila-Miranda ME. 2020. Scanning electron microscopy and enzymatic analysis in *Agave americana* during *Fusarium oxysporum* infection. Mexican Journal of Phytopathology 38(3).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-3

Primera publicación DOI: 05 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 05, 2020.

Resumen. La quitinasa y β -1,3-glucanasa desempeñan una función importante en la reacción de defensa contra patógenos fúngicos. En *Agave americana* existe poca información sobre el comportamiento de estas proteínas en respuesta a la infección de *Fusarium oxysporum*. En este estudio, se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) en raíces de *A. americana* infectadas

Abstract. Chitinase and β -1,3-glucanase play an important role in the defense reaction against fungal pathogens. In *Agave americana* there is limited information on the behavior of these proteins in response to the *Fusarium oxysporum* attack. In this study, a scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed using roots of *A. americana* infected with *F. oxysporum*, and the activity of chitinase and β -1,3-glucanase in roots of *A. americana* was evaluated to 0, 7, 15 and 30 days after inoculation with *F. oxysporum*. SEM revealed that 15 days after inoculation (DAI) is enough for the fungus to infect the roots of *A. americana*. It was observed that the activity of chitinase in infected plants increased significantly at 15 DAI with respect to non-infected plants, while the activity of β -1,3 glucanase did not show a significant statistical difference with control plants. These results suggest that, in response to *F. oxysporum* infection, the activation of the chitinase-type PRs proteins is induced in *A. americana*.

con *F. oxysporum* y se evaluó la actividad de quitinasa y β -1,3-glucanasa en raíces de *A. americana* a 0, 7, 15 y 30 días después de inoculación con *F. oxysporum*. MEB reveló que 15 días después de la inoculación (DDI) son suficientes para que el hongo infecte las raíces de *A. americana*. La actividad de quitinasa en plantas infectadas incrementó significativamente a los 15 DDI con respecto a las plantas no infectadas, mientras que la actividad de β -1,3 glucanasa no presentó diferencia estadística significativa con plantas testigo. Los resultados sugieren que, en respuesta a la infección por *F. oxysporum*, *A. americana* activa proteínas PRs de tipo quitinasas.

Palabras clave: actividad enzimática, β -1,3-glucanasa, quitinasa, marchitez del agave.

Las plantas se encuentran constantemente defendiéndose de los fitopatógenos mediante una amplia gama de respuestas que les permite de manera temprana reconocer, detener y contrarrestar la infección (Prusky *et al.*, 2013). La familia de proteínas PRs son un grupo de proteínas vegetales que se considera juegan un papel importante en la resistencia a las enfermedades causadas por diversos patógenos en plantas, incluyendo, hongos, virus, bacterias y oomicetos (Mahendranathan *et al.*, 2016). Este grupo de proteínas tiene una amplia distribución en el reino vegetal; en las plantas sanas, las proteínas PRs se encuentran en cantidades mínimas, pero su expresión aumenta significativamente durante y/o después del ataque de patógenos (Durrant y Dong, 2004). Entre las proteínas PRs, la quitinasa (PR3) y la β -1,3-glucanasa (PR2), son dos grupos de enzimas hidrolíticas que abundan en diferentes especies de plantas, después de la infección por diferentes hongos fitopatógenos. Estas desempeñan un papel principal en la reacción de

Key words: enzyme activity, β -1,3-glucanase, chitinase, agave wilting.

Plants are continually defending themselves from phytopathogens by developing a wide range of responses that let them recognize, stop, and counteract infections in time (Prusky *et al.*, 2013). The family of PRs proteins consists of a group of vegetal proteins that are thought to play an important role in resistance to diseases caused by diverse pathogens in plants, including fungi, viruses, bacteria, and oomycetes (Mahendranathan *et al.*, 2016). This group of proteins is widely distributed in the plant kingdom; in healthy plants, PRs are found in minimum amounts, but their expression is significantly increased during and/or after a pathogen attack (Durrant and Dong, 2004). Among the PRs proteins, chitinase (PR3) and β -1,3-glucanase (PR2) are two groups of hydrolytic enzymes that increase their concentration in different plant species after phytopathogenic fungal infection. These enzymes play an important role in the defense reaction against pathogens by degrading the cell wall of the pathogen, because chitin and β -1,3-glucan are important structural components of pathogens cell wall. The β -1,3-glucanase seem to be coordinately expressed along with the chitinases after fungal infections in plants (Durrant and Dong, 2004).

One of the most serious phytosanitary problems that the *Agave* genus faces is the wilt and dry bud rot disease, which is mainly associated with the fungus *F. oxysporum* (López-Bautista *et al.*, 2020). This pathogen attacks *Agave* plants regardless of their development stage. The infection starts as whitening of the basal leaves, followed by wilt, necrosis, and rot inside the bud, which eventually causes the plant to die (Flores *et al.*, 2009; López-Bautista *et al.*, 2020). However, the

defensa contra dichos patógenos, pues actúan degradando la pared celular del patógeno, debido a que la quitina y el β -1,3-glucano son componentes estructurales importantes de las paredes celulares de dichos organismos. Las β -1,3-glucanasas parecen expresarse coordinadamente junto con las quitinasas después de la infección por hongos en plantas (Durrant y Dong, 2004).

En el género *Agave*, la enfermedad de marchitez y pudrición seca del cogollo es uno de los problemas fitosanitarios más graves que enfrenta, esta enfermedad ésta asociado principalmente con el hongo *F. oxysporum* (López-Bautista *et al.*, 2020). Este patógeno ataca a las plantas de *Agave* sin importar su etapa de desarrollo; inicia con un aclaramiento en las hojas basales, seguido de marchitez, necrosis y pudrición en el interior del cogollo, generando finalmente la muerte de la planta (Flores *et al.*, 2009; López-Bautista *et al.*, 2020). Sin embargo, en *Agave* spp. se desconoce la actividad enzimática de defensa que se promueven durante la infección por *F. oxysporum*, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad de proteínas relacionadas a la patogénesis, tales como β -1,3-glucanasa y quitinasa en plantas de *A. americana* infectadas con *F. oxysporum*, así como observar el crecimiento intracelular del patógeno en la raíz por microscopía electrónica de barrido.

La cepa de *F. oxysporum* que se utilizó en este estudio, se obtuvo de tejido de la base del tallo de una planta de *A. americana* de aproximadamente tres años de haber sido trasplantada, que presentaba síntomas de marchitez, aunado a clorosis y enrollamiento foliar. Esta planta se localizó en una plantación comercial en el municipio de Comitán, Chiapas, México (16° 17' 30" N, 92° 10' 1" O). Para su aislamiento, se cortaron segmentos de tallo de aproximadamente 0.25 cm por lado, de la zona de la corona, que se desinfectaron sumergiéndolos durante 2 min en una mezcla de hipoclorito de

enzymatic defense activity that is promoted during the infection caused by *F. oxysporum* in *Agave* spp. is unknown, the objective of this study was to evaluate the activity of the proteins associated with the pathogenicity, such as β -1,3-glucanase and chitinase on *A. americana* plants infected with *F. oxysporum*, as well as to observe the pathogen intracellular growth in agave roots using the scanning electron microscopy technique.

The *F. oxysporum* isolate that was used in this study was obtained from tissue of the stem base of an *A. americana* plant approximately three years after being transplanted; the plant had wilt symptoms, as well as chlorosis, and leaf rolling. The plant was found in a commercial agave plantation in the Comitán municipality, Chiapas, Mexico (16° 17' 30" N, 92° 10' 1" W). For isolation, cuts approximately 0.25 cm in size per side of stem segments from the crown area were made and then disinfected by submerging them for 2 min in a mixture of sodium hypochlorite (6%), ethyl alcohol (100%) and sterile distilled water at 1:1:8 ratio. The fragments were rinsed twice with sterile distilled water, and then sown in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium supplemented with 0.12 g L⁻¹ of streptomycin and 0.25 g L⁻¹ of chloramphenicol. Once morphologically identified, according to the characteristics reported for *F. oxysporum* (Leslie and Summerell, 2006), a monosporic culture of the fungus was obtained, sown again in PDA culture medium, and covered with a sterilized sweet cellophane film so mycelium can grow and be easily removed. The mycelium was used to obtain DNA and amplify the ITS1-5.8S-ITS4 fragment using end-point PCR and the primers ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990). The strain was reactivated in PDA by incubation at 28±2 °C for 15 days, and after that period, a mycelial square 1 cm² in size was

sodio (6%), alcohol etílico (100%) y agua destilada estéril en proporción 1:1:8. Posteriormente, estos fragmentos se enjuagaron en dos ocasiones con agua destilada estéril. Los fragmentos se sembraron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) suplementado con 0.12 g L⁻¹ de estreptomycin y 0.25 g L⁻¹ de cloranfenicol. Una vez identificado morfológicamente de acuerdo a las características reportadas a *F. oxysporum* (Leslie y Summerell, 2006), se obtuvo un cultivo monospórico, se sembró nuevamente en medio PDA, con una película de celofán dulce esterilizado cubriendo el medio, con el fin de generar micelio y separarlo fácilmente. El micelio se utilizó para obtener ADN y amplificar el fragmento ITS1-5.8S-ITS4 por PCR punto final utilizando los iniciadores ITS1 5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990). La cepa se reactivó en PDA incubándolo a 28 ± 2 °C durante 15 días, transcurrido este tiempo, se inoculó un cuadro micelial de 1 cm² en 250 mL de caldo papa dextrosa (24 g L⁻¹). El matraz se mantuvo en agitación constante a 120 rpm durante 10 días para obtener la suspensión de esporas. La concentración de conidios se determinó con una cámara de Neubauer.

Por otro lado, la inoculación se realizó en plantas de *A. americana* obtenidas *in vitro* de seis meses de edad, las cuales fueron aclimatadas previamente por tres meses en condiciones de invernadero. Las plantas se trasplantaron a macetas de plástico de 10 cm, usando una mezcla de peat moss y agrolita (1:1) previamente esterilizado a una temperatura de 121 °C y 15 lb de presión por una hora y se mantuvieron por 60 días en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 °C. El inóculo consistió de una suspensión de conidios de *F. oxysporum* (2 x 10⁸ conidios mL⁻¹), el cual fue aplicado en las raíces de las plantas trasplantadas, donde previamente se les realizó una herida de aproximadamente 0.5 cm.

inoculated in 250 mL of dextrose-potato broth (24 g L⁻¹). The flask was kept in constant agitation at 120 rpm for 10 days to obtain a spore suspension. The concentration of conidia was determined using a Neubauer chamber.

On the other hand, inoculation was made in six-month old *A. americana* plants obtained *in vitro* that were previously acclimated under greenhouse conditions for three months. The plants were transplanted to 10 cm plastic pots filled with a mixture of peat moss and agrolite (1:1), previously sterilized at 121 °C temperature and 15 lb. pressure for one hour, and then kept for 60 days in a growth chamber at 25 °C temperature. The inoculum consisted of a *F. oxysporum* conidia suspension (2 x 10⁸ conidia mL⁻¹) that was applied to the root of the transplanted plants, where a wound of approximately 0.5 cm in size was previously made. Once this procedure was concluded, the plants were incubated in a growth chamber at 28 °C controlled temperature and 60-90% relative humidity. Sixty plants were inoculated (three replications with 20 plants in each replicate) and 20 plants without inoculation (control).

To observe the *F. oxysporum* infection process in *A. americana* plants, root samples of five infected plants were collected at 7, 15 and 30 days after inoculation (DAI), and roots of five non-inoculated plants were also taken. The samples were processed according to the protocol described by Ruíz-May *et al.* (2011) with slight modifications. The samples were fixed with glutaraldehyde (2.5% v/v) in a phosphate buffer (0.2 M; pH 7.2) for 72 h. Then, the samples were rinsed with a phosphate buffer (0.2 M; pH 7.2), gradually dehydrated with ethanol (30%, 50%, 70%, 85%, 96% and 100%) and dried with liquid CO₂ (Balzers CPD 020 Critical Point Dryer; Bal-Tec, Schalksmuhle, Germany). Samples approximately 0.5 mm in size were mounted on metal pieces with carbon conductive adhesive

Posterior a esto, las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento con una temperatura controlada a 28 °C y humedad relativa de 60-90%. Se inocularon 60 plantas (tres repeticiones de 20 plantas) y 20 plantas sin inocular (control).

Para observar el proceso de infección de *F. oxysporum* en plantas de *A. americana*, se recolectaron muestras de raíces de cinco plantas infectadas, a los 7, 15 y 30 días después de la inoculación (DDI); así mismo, se tomaron raíces de cinco plantas sin inocular. Las muestras se procesaron de acuerdo con el protocolo descrito por Ruíz-May *et al.* (2011) con ligeras modificaciones. Las muestras se fijaron durante 72 h con glutaraldehído (2.5% v/v) en un tampón fosfato (0.2 M; pH 7.2). La fijación fue seguida por un enjuague con tampón fosfato (0.2 M; pH 7.2), enseguida se deshidrataron gradualmente con etanol (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) y se secaron con CO₂ líquido (Balzers CPD 020 Critical Point Dryer; Bal-Tec, Schalksmuhle, Alemania). Posteriormente, las muestras de aproximadamente 0.5 mm se montaron en trozos metálicos con cinta adhesiva conductora de carbono, recubiertas por pulverización catódica con oro coloidal y se observaron a 10-20 kV utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 940A (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Muestras de raíces de cinco plantas infectadas por *F. oxysporum* y de cinco plantas control se recolectaron a los 0, 7, 15 y 30 DDI, este procedimiento se repitió tres veces. El extracto enzimático se obtuvo siguiendo la metodología de Pan *et al.* (1991), con ligeras modificaciones. Brevemente, se homogenizaron 0.3 g de raíces liofilizadas de *A. americana* con nitrógeno líquido, con 1.5 mL de amortiguador de extracción (acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0, adicionado con 250 mM sacarosa, 50 mM de NaCl 1mM de β -mercaptoetanol, 1 mM (PMS), se agregó 0.15 g de polivinil polipirrolidona (PVPP), el homogenizado se centrifugó a 13,000 rpm

tape coated by sputtering with colloidal gold and observed at 10-20 kV using a Zeiss DSM 940A scanning electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Root samples of five plants infected by *F. oxysporum* and five control plants were collected at 0, 7, 15 and 30 DAI; this procedure was done three times. The enzyme extract was obtained using the methodology described by Pan *et al.* (1991) with slight modifications. Briefly, 0.3 g of *A. americana* lyophilized roots were homogenized using liquid nitrogen, with 1.5 mL of extraction buffer (sodium acetate 0.05 M, pH 5.0, to which 250 mM of saccharose, 50 mM of NaCl, 1mM of β -mercaptoethanol and 1 mM (PMS) were added) to which 0.15 g of polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) were added. The homogenate was centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at room temperature, and finally, the supernatant was stored at -20 °C to be used in the enzyme essays. The protein contents of the enzyme extracts were determined by the method of Bradford (1976).

The chitinase or β -1,3 glucanase activity was determined using enzymatic extracts of the roots collected at 0, 7, 15 and 30 DAI with *F. oxysporum*, as well as from the control plants. The chitinase essay was done according to the methodology of Ferrari *et al.* (2014) with slight modifications. For the reaction mixture with the enzyme extracts, 50 μ L of 0.05% glycol-chitin as substrate and 448 μ L of 0.5 mM acetate buffer (pH 5.0) were used; tubes were incubated in a water bath at 40 °C for 30 min, and, once this procedure concluded, the tubes were cooled and a potassium ferrocyanide solution (C₆FeK₄N₆) was added. The tubes were kept at 95 °C for 15 min; after this time, the tubes were cooled, then the absorbance was determined at 420 nm. The pattern curve was obtained with N-acetylglucosamine. The chitinase activity was expressed as units of μ mol min⁻¹ mg⁻¹ of protein.

por 30 min a temperatura ambiente, finalmente el sobrenadante se almacenó a -20°C para su posterior uso en los ensayos enzimáticos. El contenido proteico de los extractos enzimáticos se determinó por el método de Bradford (1976).

La actividad de quitinasa o de β -1,3 glucanasa se determinó en los extractos enzimáticos de las raíces colectadas a los 0, 7, 15 y 30 DDI con *F. oxysporum*, así como de plantas control. El ensayo de quitinasa se realizó de acuerdo a la metodología de Ferrari *et al.* (2014) con ligeras modificaciones. Para la mezcla de reacción con extracto enzimático se utilizaron 50 μL de glicol-quitina al 0.05% como sustrato y 448 μL de amortiguador de acetato 0.5 mM (pH 5.0), con una incubación a baño maría de 40°C por 30 min, transcurrido el tiempo se enfriaron los tubos y se les agregó una solución de ferrocianuro de potasio ($\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$). Los tubos se colocaron a 95°C por 15 min, transcurrido el tiempo, los tubos se dejaron enfriar y se determinó su absorbancia a 420 nm. La curva patrón se realizó con N-acetilglucosamina. La actividad de quitinasa se expresó en unidades de $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

La actividad de β -1,3 glucanasa se determinó por el método de Honorato *et al.* (2015). La reacción se inició mediante la adición de alícuotas de 7 μL del extracto enzimático en una mezcla de 986 μL de amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) y 7 μL del sustrato laminarina (0.15%). La mezcla de reacción se incubó en baño de agua durante 10 min a 40°C . Después del período de incubación, la cantidad de azúcares reductores se determinó agregando 333 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS) a la mezcla y luego se incubó la mezcla resultante en baño maría durante 10 min a 90°C . La reacción se detuvo enfriando las muestras en hielo durante 5 min. Las absorbancias de las muestras se midieron a una longitud de onda de 540 nm. La actividad de glucanasa se expresó en unidades de $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

The β -1,3 glucanase activity was determined by the method of Honorato *et al.* (2015). The reaction started by adding 7 μL aliquots of the enzyme extract in a mixture of 986 μL of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and 7 μL of laminarin substrate (0.15%). The reaction mixture was incubated in a water bath at 40°C for 10 min. After the incubation period, the amount of the reducing sugars was determined by adding 333 μL of dinitrosalicylic acid (DNS) to the mixture and the resulting mixture was incubated in a water bath at 90°C for 10 min. The reaction was interrupted by cooling the samples on ice for 5 min. The absorbances of the samples were measured at 540 nm wavelength. The glucanase activity was expressed in units of $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein.

The data obtained was analyzed using an analysis of variance (ANOVA) in order to determine if there were significant differences between the treatments evaluated, followed by a comparison of means using Tukey test ($p \leq 0.05$). The statistical analysis of the data was conducted using the STATGRAPHICS® Centurion XVI.II software (Statgraphic, 2010).

The isolate was molecularly confirmed as *Fusarium oxysporum*, according to the database of the GenBank, and named ITTG_Foxy_C6, which is part of the strain pool of the Technological Institute of Tuxtla Gutiérrez, with accession number in the GenBank (MT791313).

The colonization of roots by *F. oxysporum* was observed using scanning electron microscopy in the different sampling days (Figure 1). Although the longitudinal cuts made to the roots at 7 DAI did not indicate the presence of the fungus, mycelium and spores were observed on the root surface, which suggested that the fungus had not yet entered the root. Czymmek *et al.* (2007) and Padilla-Ramos *et al.* (2018) mentioned that, during the attachment of spores to the root surface, the fungus forms a dense network of hyphae (mycelium) and releases secretions and/or effectors that allow penetration.

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, seguido por una comparación de medias usando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software STATGRAPHICS® Centurion XVI.II (Statgraphic, 2010).

El aislamiento se corroboró molecularmente como *Fusarium oxysporum* de acuerdo a la base de datos de GenBank y se denominó ITTG_Foxy_C6, el cual forma parte del cepario del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez con número de accesión en GenBank (MT791313).

La colonización de las raíces por *F. oxysporum* se observó mediante microscopía electrónica de barrido en los diferentes días de muestreo (Figura 1). A los 7 DDI se realizaron cortes longitudinales de las raíces y no se observó la presencia del hongo, sin embargo, en la superficie de la raíz se observó micelio y esporas, lo cual sugiere que el hongo aún no había entrado en la raíz. Czymmek *et al.* (2007) y Padilla-Ramos *et al.* (2018) mencionan que, durante la adhesión de las esporas a la superficie de la

In addition, electronic microscopy has shown the absence of appressoria or specialized penetration hyphae of *F. oxysporum*, as well as the formation of hyphae that penetrate the wall of epidermal cells and the formation of a septum at the entry point (Perez-Nadales and Di Pietro, 2011). *F. oxysporum* hyphae were observed, in longitudinal cuts of roots at 15 DAI, which means that the fungus was able to overcome the defenses of the plant, invading and growing within the root across the inter- and intracellular spaces, and reaching the xylem vessels using the holes generated by the fungus. At 30 DAI, the fungus completely colonized the inside of the root, this is, as the mycelium grows, it expands and produces microconidia, which are carried upward within the xylem vessels by way of a stream of raw sap (mineral salts and water) (Figure 1). When the fungus invades and proliferates within the plant roots, the conductive vessels are obstructed causing a water imbalance and the leaves start to develop yellowing symptoms, followed by wilt (Wang *et al.*, 2015). Under optimal conditions, *F. oxysporum* requires 30 days to complete its infection process in *A. americana* roots.

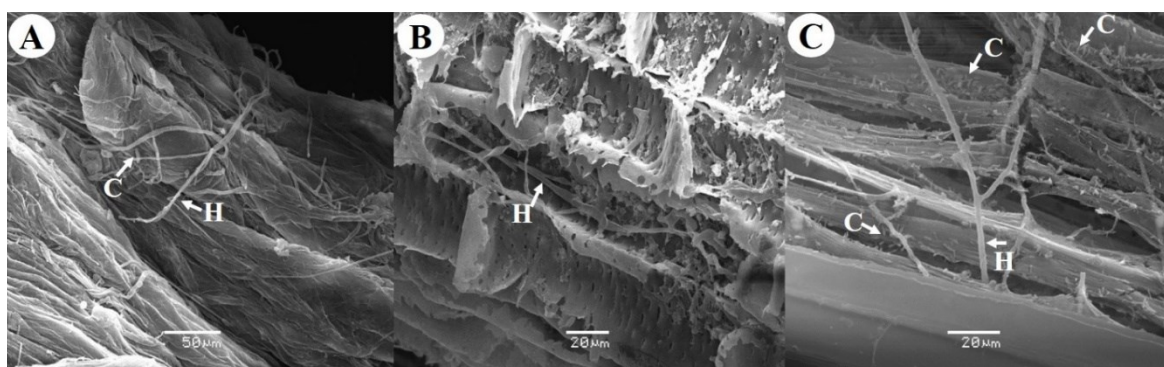


Figura 1. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de raíces de *Agave americana* infectadas con *Fusarium oxysporum* A) Superficie de raíz a los 7 DDI, B) Corte longitudinal de raíz a los 15 DDI, C) Corte longitudinal de raíz a los 30 DDI. C: Conidios, H: Hifas.

Figure 1. Scanning electron microscopy photographs of *Agave americana* roots infected with *Fusarium oxysporum* A) Root surface at 7 DAI, B) Longitudinal cut of root at 15 DAI, C) Longitudinal cut of root at 30 DAI. C: Conidia, H: Hyphae.

raíz, se forma una densa red de hifas (micelio) así como secreciones y/o efectores por parte del hongo que permiten iniciar la penetración. Además, mediante microscopía electrónica se ha demostrado la ausencia de apresorios o hifas especializadas de penetración en *F. oxysporum*, así como la formación de hifas que penetran la pared de las células epidérmicas y la formación de un septo en el punto de penetración (Perez-Nadales y Di Pietro, 2011). En cortes longitudinales de raíces de 15 DDI, se observaron hifas de *F. oxysporum*, esto significa que el hongo logró superar las defensas de la planta, invadiendo y creciendo dentro de la raíz por los espacios inter e intracelulares alcanzando los vasos del xilema a través de orificios generados por el hongo. A los 30 DDI, el hongo colonizó completamente el interior de la raíz, a medida que el micelio crece, se ramifica y produce microconidios, los cuales suben por los vasos del xilema gracias a la corriente de savia bruta (sales minerales y agua) (Figura 1). La invasión y proliferación del hongo dentro de las raíces provoca una obstrucción de los vasos conductores, lo cual origina un desequilibrio hídrico, en consecuencia, las hojas empiezan con síntomas de amarillamiento y posteriormente marchitez (Wang *et al.*, 2015). En condiciones óptimas *F. oxysporum* requiere de 30 días para llevar a cabo su proceso de infección en raíces de *A. americana*.

Previo a esta investigación, en *A. americana* no se tenían reportes de la confirmación de la marchitez ocasionada por *F. oxysporum* mediante microscopía electrónica de barrido en especies de *Agave*. Sin embargo, sí hay trabajos similares en diferentes cultivos como en chile criollo tipo serrano CM334 (*Capsicum annum*) donde se determinó el avance de la necrosis a los 3, 23 y 30 después de la infección causada por el hongo, reportándose su avance hasta el tallo de la planta; registrando la presencia de micelio, microconidios y macroconidios en todos los segmentos evaluados (Sanzón *et al.*, 2012). En

Before this study there were no reports about the use of scanning electron microscopy to confirm that *A. americana* wilt in *Agave* species is caused by *F. oxysporum*. However, similar studies have been conducted for different crops such as serrano type CM334 criollo chili (*Capsicum annum*), where the advance of necrosis was determined at 3, 23 and 30 days after infection caused by the fungus, which advanced up to the plant stem. The symptoms reported were the presence of mycelium, microconidia, and macroconidia in all the evaluated segments (Sanzón *et al.*, 2012). In chickpea crops (*Cicer arietinum*), *F. oxysporum* colonized the inside of the root in only three days (Joshi *et al.*, 2012). Although the symptomatology observed on *A. americana* plants is attributed to *F. oxysporum*, more thorough analyses must be conducted since López-Bautista *et al.* (2020), recently demonstrated that wilt and/or dry rot symptoms in *Agave tequilana* are associated with five *Fusarium* species, which through a phylogenetic study were classified in three complexes: *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) and *F. fujikuroi* (FFSC), being *F. oxysporum* (FOSC) the predominant complex with 56% of representation at the regional level. Therefore, the agave wilt and dry bud rot symptoms are considered as a syndrome caused by different *Fusarium* species with differential parasitic suitability at the intra- and interspecies level (López-Bautista *et al.*, 2020).

The specific activity of the chitinase during the period analyzed showed a significant increase ($63.43 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g protein}$) at 15 DAI compared to those of the non-infected plants ($27.24 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g protein}$). The increase of the activity could be explained by the fact that some PRs proteins are expressed at basal levels, but their expression increases in response to a pathogen attack and the subsequent activation of the systematic acquired resistance (SAR) (Durrant and Dong, 2004).

el caso del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum*) se observó que *F. oxysporum* colonizó el interior de la raíz en solo tres días (Joshi *et al.*, 2012). Aunque la sintomatología observada en plantas de *A. americana* es atribuida a *F. oxysporum* es conveniente realizar análisis más exhaustivos, ya que recientemente López-Bautista *et al.* (2020), demostraron la asociación de cinco de especies de *Fusarium*, asociados con síntomas de marchitez y/o pudrición seca en *Agave tequilana*, las cuales mediante un estudio filogenético se clasificaron en tres complejos: *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) y *F. fujikuroi* (FFSC), con predominación de *F. oxysporum* (FOSC) con 56% de representatividad regional. Por lo anterior, síntomas de marchitez y pudrición seca del cogollo del agave se consideran un síndrome causados por diferentes especies de *Fusarium* con adaptabilidad parasítica diferencial a nivel intra e interespecie (López-Bautista *et al.*, 2020).

La actividad específica de quitinasa durante el tiempo analizado mostró un aumento significativo ($63.43 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$) a los 15 DDI con respecto a las plantas no infectadas ($27.24 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$), dicho incremento en la actividad puede deberse a que algunas proteínas PRs se expresan en niveles basales de forma constitutiva, pero su expresión aumenta en respuesta a un ataque de patógeno y a la posterior activación de la respuesta sistemática adquirida (SAR) (Durrant y Dong, 2004). Además, la inducción de proteínas PRs es una forma de limitar la entrada o propagación del patógeno al interior de la planta (Gupta *et al.*, 2013). En presencia de hongos fitopatógenos, las plantas producen enzimas como la β -1,3-glucanasa y la quitinasa (Santos *et al.*, 2004) para desintegrar los componentes de la pared celular de hongos hasta sus unidades estructurales básicas, glucanos y quitina. Se observó diferencia estadística significativa en la actividad de quitinasa a los 30 DDI

Furthermore, the induction of PRs proteins is a way to control the pathogen from entering and spreading within the plant (Gupta *et al.*, 2013). In the presence of phytopathogenic fungi, plants produce enzymes such as β -1,3-glucanase and chitinase (Santos *et al.*, 2004) to disintegrate the components of the fungi cell wall up to their basic structural units, glucans, and chitin. A significant statistical difference was observed on the chitinase activity at 30 DAI in the infected and non-infected plants (Figure 2) with lower activity on the infected plants ($21.1 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g protein}$). On the other hand, the activity of β -1,3 glucanase was lower on the infected plants ($30.484 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g protein}$) than on the non-infected plants ($32.167 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g protein}$). However, at 15 DAI, there was a slight increase of activity on the infected plants (Figure 3).

The increase in chitinase and β -1,3-glucanase activity induced by different fungi has been reported in different plant species such as tomato (*Solanum lycopersicum*), melon (*Cucumis melo*) and lemon (*Citrus x limon*) (Ramammoorthy *et al.*, 2002; Baldé *et al.*, 2006; Fanta *et al.*, 2003). Our results suggest that the activity of chitinase and β -1,3 glucanase on *A. americana* plants acts as a defense mechanism against infection by *F. oxysporum* at 15 DAI. However, increasing the activity of the PRs proteins activity is probably not enough to keep the fungus from colonizing the roots, as shown in Figure 1.

The scanning electron microscopy analysis confirmed the infection caused by *F. oxysporum* in *A. americana* roots at 15 DAI. A molecular analysis confirmed the identity of the fungus. These results suggest that in *A. americana* plants, the induction of the defense mechanism is mediated by the activation of chitinase, which is involved in the plant defense during *F. oxysporum* infection. However, the increment of this enzyme activity

en plantas infectadas y no infectadas (Figura 2) con menor actividad en las plantas infectadas ($21.1 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$). Por otro lado, la actividad de la β -1,3 glucanasa fue menor en plantas infectadas ($30.484 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$) en comparación con las no infectadas ($32.167 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$). Sin embargo, a los 15 DDI se observó un ligero incremento de su actividad en plantas infectadas (Figura 3).

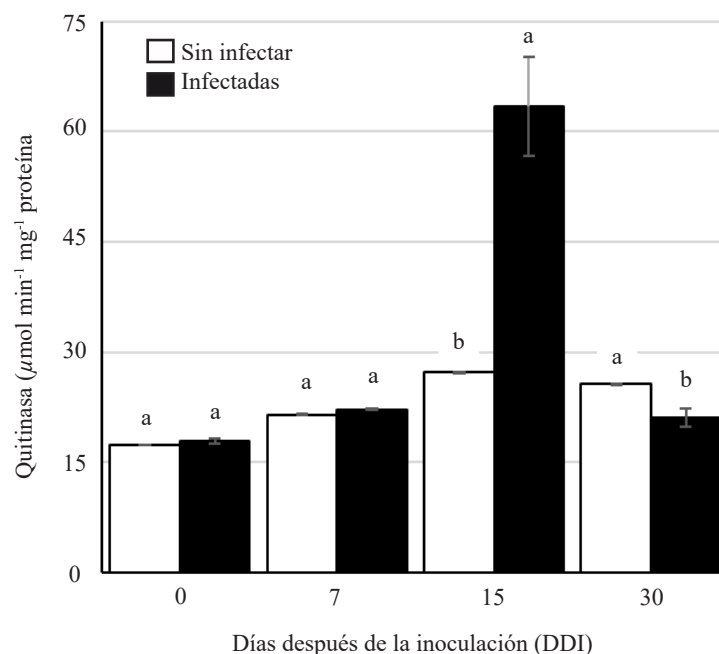
El aumento de la actividad de quitinasa y β -1,3-glucanasa por diferentes hongos se ha reportado en diversas especies de plantas tales como, jitomate (*Solanum lycopersicum*), melón (*Cucumis melo*) y limón (*Citrus x limon*) (Ramammoorthy *et al.*, 2002; Baldé *et al.*, 2006; Fanta *et al.*, 2003). Nuestros resultados sugieren que, en plantas de *A. americana*, la actividad de quitinasa y β -1,3 glucanasa actúan como mecanismo de defensa ante la infección

is not enough to avoid the fungus colonization in roots of these species. This study provides the first insights into the enzyme activity of chitinase and β -1,3-glucanase as possible defense mechanisms in *Agave americana*.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

por *F. oxysporum* a los 15 DDI. Sin embargo, este incremento en las actividades de las proteínas PRs probablemente no es suficiente para impedir la colonización del hongo en las raíces como se muestra en la Figura 1.

El análisis de microscopía electrónica de barrido confirmó la infección de *F. oxysporum* en raíces de *A. americana* a los 15 días después de su inoculación. La identidad el hongo fue confirmado



**Figura 2.** Actividad de quitinasa (PR3) en raíces de *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

**Figure 2.** Chitinase activity (PR3) on *Agave americana* roots during *Fusarium oxysporum* infection. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

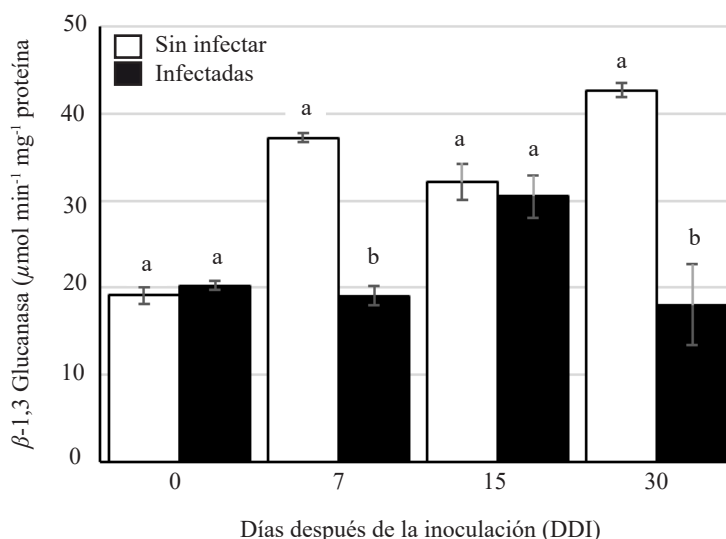


Figura 3. Actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa (PR2) en raíces de *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

Figure 3.  $\beta$ -1,3 glucanase activity (PR2) on *Agave americana* roots during *Fusarium oxysporum* infection. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

molecularmente. Estos resultados sugieren que en plantas de *A. americana* se induce el mecanismo de defensa mediado por la activación de quitinasa, la cual está implicada en la defensa durante la infección de *F. oxysporum*; sin embargo, el incremento de esta enzima no es suficiente para impedir la colonización de raíces en esta especie. Estos resultados son los primeros aportes sobre la actividad enzimática de quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa como posibles mecanismos de defensa en el *Agave americana*.

## LITERATURA CITADA

- Baldé JA, Francisco R, Queiroz A, Regalado AP, Ricardo CP and Veloso MM. 2006. Immunolocalization of a class III chitinase in two muskmelon cultivars reacting differently to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Journal of Plant Physiology 163(1): 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.02.004>
- Bradford MN. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Czymmek KJ, Fogg M, Powell DH, Sweigard J, Park SY and Kang S. 2007. *In vivo* time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the Arabidopsis root vascular system by *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology 44: 1011-1023. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.01.012>
- Durrant WE and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 42(1): 185-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Fanta N, Ortega X and Pérez LM. 2003. The development of *Alternaria alternata* is prevented by chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases from *Citrus limon* seedlings. Biological Research 36: 411-420. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602003000300012>
- Ferrari AR, Gaber Y and Fraaije MW. 2014. A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. Biotechnology for Biofuels 7(1): 37. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-37>
- Flores LHE, Ireta JM, Pérez DJF, Ruíz CJA, Álvarez MC and Byerly KFM. 2009. Identificación de zonas de riesgo fitopatológico y opciones de prevención y/o control en el *Agave tequilana* weber variedad azul en Jalisco. Informe de investigación. INIFAP. CIRPAC. CECEAJAL. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. 34 p.
- Gupta P, Ravi I and Sharma V. 2013. Induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. Journal of Plant Interactions 8(2): 155-161.

- <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.679705>
- Honorato JJ, Zambolim L, Aucique-Pérez CE, Resende RS and Rodrigues FA. 2015. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 123: 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.016>
- Joshi NS, Rao KS and Subramanian RB. 2012. Anatomical and biochemical aspects of interaction between roots of chickpea and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 2. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45(15): 1773-1789. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.674709>
- Leslie JF., Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Hoboken, Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470278376.fmatter>
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 79-106. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-4>
- Mahendranathan C, Adikaram NKB and Jayasingam T. 2016. Enhancement of natural disease resistance of *Capsicum annum* L. against anthracnose disease through selected postharvest treatments. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> Australasian Soil-borne Symposium*, Lincoln University, New Zealand. 14-17
- Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R and Reveles-Torres LR. 2018. A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 95-114. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-6>
- Pan SQ, Ye XS and Kue J. 1991. A technique for detection of chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. *Phytopathology* 81(9): 970-974. <https://doi.org/10.1094/phyto-81-970>
- Perez-Nadales E and Di Pietro A. 2011. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 23(3):1171-1185. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.07509>
- Prusky D, Alkan N, Mengiste T and Fluhr R. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology* 51:155-176. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349>
- Ramamoorthy V, Raguchander T and Samiyappan, R. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Soil* 239(1):55-68. <https://www.jstor.org/stable/24120999>
- Ruiz-May E, De la Peña C, Galaz-Avalos RM, Lei Z, Watson BS, Sumner LW and Loyola-Vargas VM. 2011. ATP biosynthesis deficiency revealed by proteomics approach is correlated with oxidative burst in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots treated with methyl jasmonate. *Plant and Cell Physiology* 52:1401-1421. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr086>
- Santos IS, Machado OLT, Da Cunha M and Gomes VM. 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterization and immunolocalization. *Plant Science* 167(6):1203-1210. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.021>
- Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI, Zavaleta ME, Mora AMA and Guevara OL. 2012. Cambios morfológicos en células de chile CM334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30: 66-71
- Statgraphics Centurion XVI.II. 2010. StatPoint Technologies, Inc.
- Wang M, Sun Y, Sun G, Liu X, Zhai L, Shen Q and Guo S. 2015. Water balance altered in cucumber plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*. *Scientific Reports* 5:7722. <https://doi.org/10.1038/srep07722>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications* Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ and Innis MA (Eds). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>