

Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico

✉ Ivonne González¹, Danay Infante¹, Benedicto Martínez¹, Yailén Arias¹, Noyma González¹, Ileana Miranda², Belkis Peteira¹

¹Grupo de Fitopatología

²Grupo de Plagas Agrícolas, Dirección Protección de Plantas
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA
AP 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
E-mail: marquetti@censa.edu.cu

RESUMEN

La secreción de enzimas hidrolíticas es uno de los mecanismos de los hongos del género *Trichoderma*, para ejercer el control biológico de plagas y enfermedades. Las quitinasas y glucanasas son dos de estas enzimas que degradan la pared celular de los hongos fitopatógenos y la cutícula de insectos y nematodos. Se evaluó la dinámica de inducción de esas enzimas en diez cepas de *Trichoderma* spp. en tres medios líquidos con inductores diferentes: medio basal, medio basal suplementado con quitina al 0.5% y medio basal suplementado con gelatina al 0.2%. Las actividades quitinasas y glucanasas se evaluaron al primer, tercer, quinto y séptimo día del cultivo. Los mayores valores de la actividad quitinasa se alcanzaron en los medios basal y basal suplementado con quitina, mientras que los medios basal y basal suplementado con gelatina resultaron mejores inductores de las β -1.3-glucanasas.

Palabras clave: *Trichoderma*, quitinasas, glucanasas, control biológico

Biotecnología Aplicada 2012;29:7-11

ABSTRACT

Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control Use of fungi of the *Trichoderma* genus for the biological control of pests and diseases is based, to a large extent, on their secretion of hydrolytic enzymes. The latter include chitinases and glucanases, which degrade the cell wall of phytopathogenic fungi as well as the cuticle of insects and nematodes. The aim of this study was to assess the induction dynamics of chitinases and glucanases in ten strains of *Trichoderma* spp. grown in liquid media with different inducers: basal medium, basal medium supplemented with 0.5% chitin and basal medium supplemented with 0.2% gelatin. Chitinase and glucanase activity were evaluated at the first, third, fifth and seventh day of culture. The highest values of chitinase activity were obtained in basal and basal media supplemented with chitin; β -1.3-glucanase, on the other hand, exhibited higher levels of activity in basal and basal media supplemented with gelatin.

Keywords: *Trichoderma*, chitinases, glucanases, biological control

Introducción

Los hongos del género *Trichoderma* son potentes agentes para el control biológico, debido a que atacan una amplia variedad de hongos fitopatógenos foliares y del suelo, lo que ha permitido utilizarlos exitosamente en casas de cultivo y en el campo [1-3]. Emplean diferentes mecanismos contra sus dianas: la competencia por el espacio y los nutrientes, el micoparasitismo, la producción de compuestos inhibidores, la inactivación de enzimas del agente patógeno y la inducción de resistencia [4-6].

Trichoderma puede parasitar la hifa del hongo fitopatógeno mediante enrollamientos, ganchos y cuerpos de tipo apresorios, que penetran la pared celular por la acción hidrolítica de las enzimas quitinasas y glucanasas [4]. Ello es posible porque la pared celular de los hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp. [7] está compuesta principalmente por β -1.3-glucanos y quitina, con celulosa encontrada en los Oomycetes, como *Pythium* spp. [8].

Esas enzimas pueden degradar la cutícula de los insectos, cuya estructura está compuesta por quitina [9-12]. La quitina está presente en la cutícula de los huevos de nematodos, por lo que se afectan grande-

mente con el tratamiento con las especies de *Trichoderma* [13, 14].

Las cepas de *Trichoderma* se diferencian entre sí por los niveles de expresión de las enzimas hidrolíticas, lo cual determina sus características antagónicas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de inducción de las enzimas quitinasas y glucanasas de un grupo de cepas de *Trichoderma*, promisorias como agentes para el control biológico utilizando tres medios líquidos con diferentes efectos inductores: medio basal, medio basal suplementado con quitina al 0.5% y medio basal suplementado con gelatina al 0.2%.

Materiales y métodos

Cepas y medios de inducción

Se emplearon las cepas de *Trichoderma* 1, 13, 17, 25, 75, 78, 79, 85, 90, ubicadas por métodos de biología molecular en la especie *Trichoderma asperellum* Samuels [15], procedentes del cepario del Laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), y la cepa TS3, del Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal (INISAV). Se se-

1. Jayalakshmi SK, Raju S, Usha Rani S, Benagi VI, Sreeramulu K. *Trichoderma harzianum* L. as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Aust J Crop Sci.* 2009;3(1):44-52.

2. Tondje P, Roberts DP, Bon M, Widner T, Samuels GJ, Ismaiel AA, et al. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol Control.* 2007;43:202-12.

3. Küçük Ç, Kivanç M. Mycoparasitism in the biological control of *Gibberella zeae* and *Aspergillus ustus* by *Trichoderma harzianum* strains. *J Agric Technol.* 2008; 4(2):49-55.

4. Zeilinger S, Omann M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regul Syst Bio.* 2007;1:227-34.

5. Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem Eng J.* 2007;37(1):1-20.

leccionaron estas cepas porque poseen alta capacidad antagónica [16]. Se conservaron en medio Agar-Malta (Centro de Biopreparados, Biocen) a 4 °C. Las cepas se subcultivaron en un medio papa-dextrosa-agua (PDA, Biocen) en placas Petri de 9 cm y se incubaron a 28 °C en cultivo estático en oscuridad durante 3 días, momento en que se tomó el micelio para el desarrollo del experimento de dinámica.

Inducción de proteínas en medio líquido

Para la inducción de proteínas en el medio líquido se utilizaron compuestos con diferente efecto inductor de las enzimas hidrolíticas: medio basal líquido que contenía extracto de levadura 1 g/L y peptona 4 g/L, medio basal líquido suplementado con quitina 5 g/L y medio basal líquido suplementado con gelatina al 0.2% (p/v) [17]. Los dos primeros medios se esterilizaron a 120 °C durante 20 min, mientras que el medio que contenía gelatina se esterilizó a 115 °C durante 15 min.

Los medios se dividieron en frascos de 100 mL, a razón de 20 mL por frasco, y se inocularon con cuatro discos de micelio de 5 mm de diámetro de la periferia de la colonia pura de cada cepa. Posteriormente, se incubaron en cultivo estático a 28 °C, en la oscuridad. De cada tratamiento se hicieron tres repeticiones y tres réplicas. Los frascos se retiraron de la incubadora al primer, tercer, quinto y séptimo día de la inoculación. Los sobrenadantes se filtraron con papel de filtro Whatman (3 mm CHR) y los extractos finales se conservaron a -20 °C, hasta su utilización en los análisis enzimáticos.

Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas totales se determinó por el método descrito por Bradford [18]. Las lecturas de la absorbancia fueron a 595 nm del complejo proteína-Azul de Coomassie G-250 en un espectrofotómetro (Lasso Spec III, Lasso Biotech LTDA), tomando como base para el cálculo una curva patrón a partir de una solución estándar de 1 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA).

Ensayos enzimáticos

Se determinó la actividad quitinasa con 0.2 mL de quitina coloidal 10 mg/mL preparada según Boller *et al.* [19], que se mezclaron con 0.5 mL del sobrenadante de los frascos. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h, y luego se añadió 0.1 mL de tetraborato de sodio 0.8 M, pH 8.8. Posteriormente, se centrifugaron a 6708 x g durante 5 min. De cada tubo se tomaron 500 µL del sobrenadante, que se pasaron a tubos de cristal donde se calentaron a 100 °C durante 3 min. Por último, se les adicionó 1 mL de p-dimetilaminobenzaldehído y se incubaron con esta solución a 38 °C durante 20 min. La curva patrón se determinó utilizando N-acetilglucosamina, a partir de una solución madre de 1 mg/mL a la cual se le hizo el mismo procedimiento que a las muestras. La lectura fue a 585 nm. El cálculo se efectuó según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{DO \times \cot \times V_{\text{ens}} \times Dil}{Tincub \times V_{\text{enz}}}$$

Donde *DO*: densidad óptica; *cot*: cotangente del ángulo de la curva patrón; *V_{ens}*: volumen de ensayo; *Dil*: dilución; *Tincub*: tiempo de incubación y *V_{enz}*: vo-

lumen de enzima. Las unidades de actividad fueron: µmol del producto formado/min·mL de la enzima.

Para la determinación de la actividad enzimática de las β-1.3-glucanasas se utilizó una variante en microplacas de 96 pozos, desarrollada por Zheng y Wozniak [20], a partir del sobrenadante de los cultivos.

La actividad específica se determinó según la expresión:

Actividad específica = Actividad enzimática / concentración de proteínas (mg/mL).

Para determinar las cepas que mostraron los mayores niveles de actividades específicas quitinasas y glucanasas en cada uno de los medios de cultivo, se empleó el análisis de varianza simple. Para la comparación entre las medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan en los casos donde hubo diferencias ($p < 0.05$). Para identificar los medios de cultivo y los días de la dinámica que favorecen la inducción de las actividades quitinasas y glucanasas, se analizaron los componentes principales mediante el paquete informático estadístico InfoStat versión 2009 [21].

Resultados y discusión

Las especies del género *Trichoderma* se utilizan como agentes para el control biológico, debido a que atacan una amplia variedad de hongos fitopatógenos [14]. Las quitinasas y las glucanasas están involucradas en la interacción parasítica de las especies de *Trichoderma* con sus hospedantes [22]. La *T. asperellum* es una de las especies menos estudiadas en este género [23]; no obstante, se han purificado y caracterizado endoquitinasas y β-1.3-glucanasas de esta especie y se ha analizado la expresión de estas enzimas ante diferentes fuentes de carbono [23-25]. Se ha demostrado la influencia del tipo de cepa, las condiciones de cultivo y el sustrato empleado en la producción de las enzimas que degradan la pared celular [26, 27].

Las actividades enzimáticas específicas de las quitinasas permitieron establecer cinco grupos, según los niveles de expresión de las cepas analizadas: I (75), II (78), III (1, 79, 85), IV (13, 17, 25, 90), V (TS3) (Figura 1). La cepa 75 expresó la mayor actividad enzimática quitinasa. Los medios líquidos que favorecieron esta expresión fueron el medio basal al quinto y al séptimo día del cultivo, y el medio basal suplementado con quitina al primer día del cultivo.

El medio basal suplementado con quitina al séptimo día del cultivo indujo elevados niveles de la actividad quitinasa en la cepa 78. La cepa TS3 mostró bajos niveles de actividad quitinasa, y alcanzó el mayor valor al primer día del cultivo en medio basal suplementado con gelatina. Los grupos III y IV presentaron niveles intermedios de actividad quitinasa. La expresión de esta enzima en el primer grupo se favoreció con los medios basal (al primer día) y basal suplementado con gelatina (al séptimo día). En el segundo grupo, la expresión de esta enzima se favoreció con los medios basal (al tercer día) y basal suplementado con quitina y gelatina (al quinto día del cultivo).

Según los niveles de la actividad glucanasa alcanzados, se establecieron cuatro grupos (Figura 2). En esta ocasión, el grupo I incluyó a las cepas 1, 13, 17 y 25; el grupo II estuvo formado por la cepa 75; el grupo III por las cepas 79, 85, 90 y TS3; y el grupo IV por la cepa 78.

6. Kapulnik Y, Chet I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *T. harzianum* strain T-203. *Plant Physiol Biochem.* 2000;38:863-73.

7. Chet I. *Trichoderma*-application and mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet I, editor. *Innovative approaches to plant disease control.* New York: John Wiley; 1987. p. 137-60.

8. Bartnicki-García S. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. In: Ashworth JM, Smith JE, editors. *Microbial differentiation.* Cambridge: Cambridge University Press; 1973. p. 245-68.

9. Sharma P, Pandey R. Biological control of root-knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. *Afr J Agric Res.* 2009;4(6):564-7.

10. Shakeri J, Foster HA. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme Microb Technol.* 2007; 40(4):961-8.

11. Goswami J, Pandey RK, Tewari JP, Goswami BK. Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *J Environ Sci Health. Part B: Pestic, Food Contam, Agric Wastes.* 2008;43(3):237-40.

12. Bokhari F. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 2009;42(4): 361-9.

13. Haggag WM, Amin AW. Efficiency of *Trichoderma* species in control of *Fusarium*-rot, root knot and reniform nematodes disease complex on sunflower. *Pakistan J Biol Sci.* 2001;4(3):314-8.

14. Jin RD, Suh JW, Park RD, Kim YW, Krishnan HB, Kim KY. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Nematology.* 2005;7:125-32.

15. Martínez B, Infante D, Reyes Y. About to identification of some *Trichoderma* isolates reported in Revista de Protección Vegetal. *Rev Protección Veg.* 2010;25(2):135.

16. Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev Protección Veg.* 2008;23(2):118-25.

17. Peteira B, Estévez I, Montes de Oca N, Hidalgo-Díaz L. Estabilidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en medio sólido. *Rev Protección Veg.* 2007;22(2):124-7.

18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

19. Boller T, Gehri A, Mauch F, Vögeli U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta.* 1983;157:22-31.

20. Zheng Y, Wozniak CA. Adaptation of a beta-1,3-glucanase assay to microplate format. *Biotechniques.* 1997;22(5):922-6.

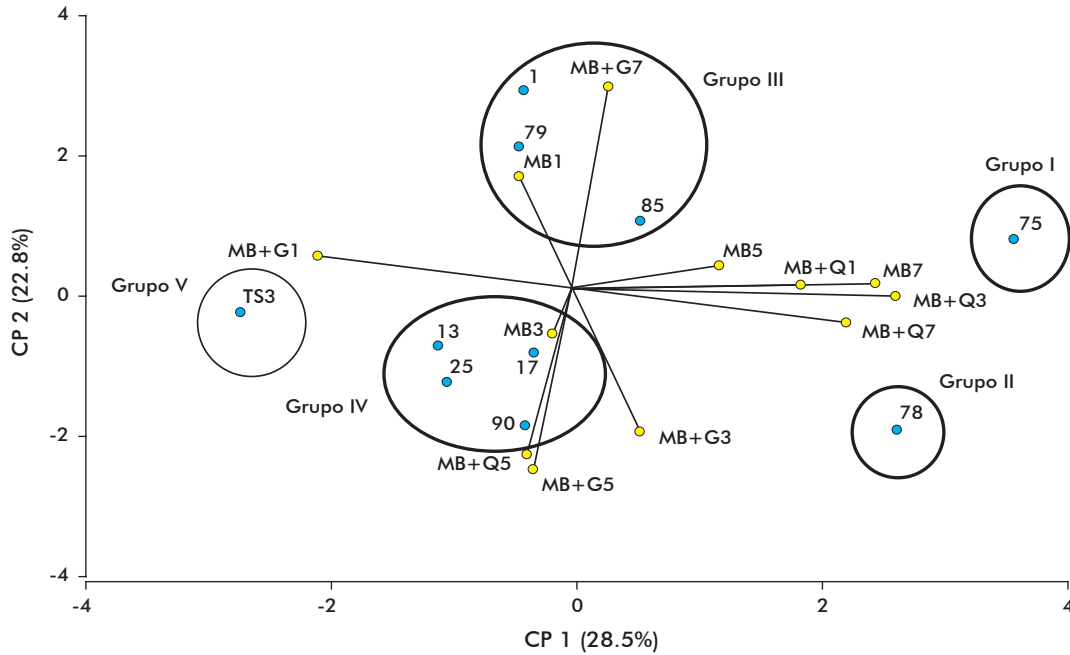


Figura 1. Análisis de componentes principales (CP) del comportamiento de la actividad enzimática quitinasa en los diferentes medios de inducción. MB: medio basal (1; 3; 5 y 7: días de cultivo); MB+Q: medio basal suplementado con quitina; MB+G: medio basal suplementado con gelatina. Aislamientos: color azul, medios de inducción: color amarillo.

Los medios basal (al primer y quinto día del cultivo) y suplementado con gelatina (al primer día del cultivo) indujeron las mayores actividades enzimáticas en el grupo I, mientras que el grupo II fue favorecido por los medios basal (al séptimo día del cultivo) y suplementado con gelatina (después de tres días del cultivo). El resto de las cepas presentaron bajos niveles de actividades enzimáticas.

El medio con gelatina indujo la mayor actividad β -1,3-glucanasa en las cepas 1, 13, 17, 25 y 75 de *T. asperellum*. Marcello *et al.* demostraron que *T. asperellum* produjo niveles elevados de β -1,3-glucanasa cuando se cultivó en medios que contenían almidón y pared celular de *R. solani* [23].

La caracterización de ambas enzimas es una herramienta útil, que junto con otros parámetros podría

21. Di Rienzo JA, Balzarini M, Gonzalez L, Casanoves F, Tablada M, Robledo C. InfoStat. Software estadístico [Internet]. Versión 2009. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; 2009.

22. Limon MC, Pintor-Toro JA, Benitez T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology*. 1999; 89(3):254-61.

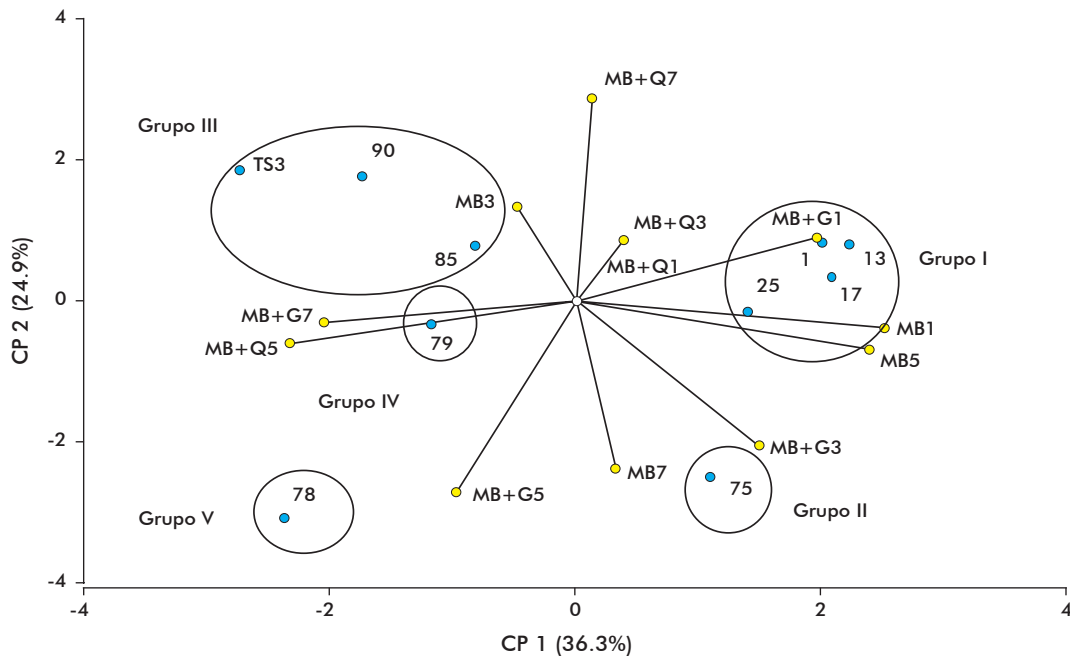


Figura 2. Análisis de componentes principales del comportamiento de la actividad enzimática β -1,3-glucanasa en los diferentes medios utilizados. MB: medio basal (1; 3; 5 y 7: días de cultivo); MB+Q: medio basal suplementado con quitina; MB+G: medio basal suplementado con gelatina. Aislamientos: color azul, medios de inducción: color amarillo.

emplearse para la selección de aislamientos promisorios para el control biológico de plagas.

La cepa 75 de *T. asperellum* tuvo los mayores niveles de actividades enzimáticas quitinasas y glucanasas (Figura 3). A ella sigue la cepa 78 y el grupo conformado por 1, 13, 17 y 25. En todos los momentos, la cepa TS3 presentó los menores niveles de actividades enzimáticas.

Las cepas 17, 75 y 78 han mostrado gran eficacia como agentes para el control biológico de *S. rolfisii* y *R. solani* [15], resultado que concuerda con los altos niveles de quitinasas y glucanasas exhibidos durante este estudio.

La cepa TS3 manifestó bajos niveles de actividades quitinasas y β -1,3-glucanasas. Esta se utiliza para el control de nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* [28]. En el micoparasitismo no solo participan las quitinasas y las β -1,3-glucanasas, sino también las β -1,6-glucanasas, α -1,3-glucanasas y proteasas, enzimas que no se determinaron en este estudio y pudieran influir sobre la acción antagonista de esta cepa [5, 29]. Un ejemplo de ello fue el desarrollo de transformantes de *Beauveria bassiana* (Balsa-

mo) Vuillemin, que expresaron la fusión de proteasa con quitinasa (CDEP1:Bbchit1), y permitió penetrar mucho más rápido la cutícula de insectos [30]. A su vez, la TS3 pudiera emplear mecanismos como la competencia por el espacio y los nutrientes, la producción de compuestos inhibidores [4] y la resistencia inducida [6] para el control de sus organismos dianas. Estos mecanismos también los emplea *Trichoderma* en su acción antagonista. Dennis y Webster [31], y Elad y Henis [32], indicaron que varias cepas de *Trichoderma* spp. producían antibióticos y enzimas líticas intracelulares, que intervienen y son responsables del mecanismo de antagonismo. *Trichoderma harzianum* actuó como antagonista frente a los huevos de *Meloidogyne incognita* por la producción de compuestos antinematodos: limitó la penetración de la plaga en las raíces, por afectar directamente al nematodo o por hacer que las raíces fueran menos atractivas.

El medio basal también mostró gran efectividad en la inducción de las actividades enzimáticas. Las cepas 75 y 78 resultaron las más promisorias como candidatas a productos biofungicidas.

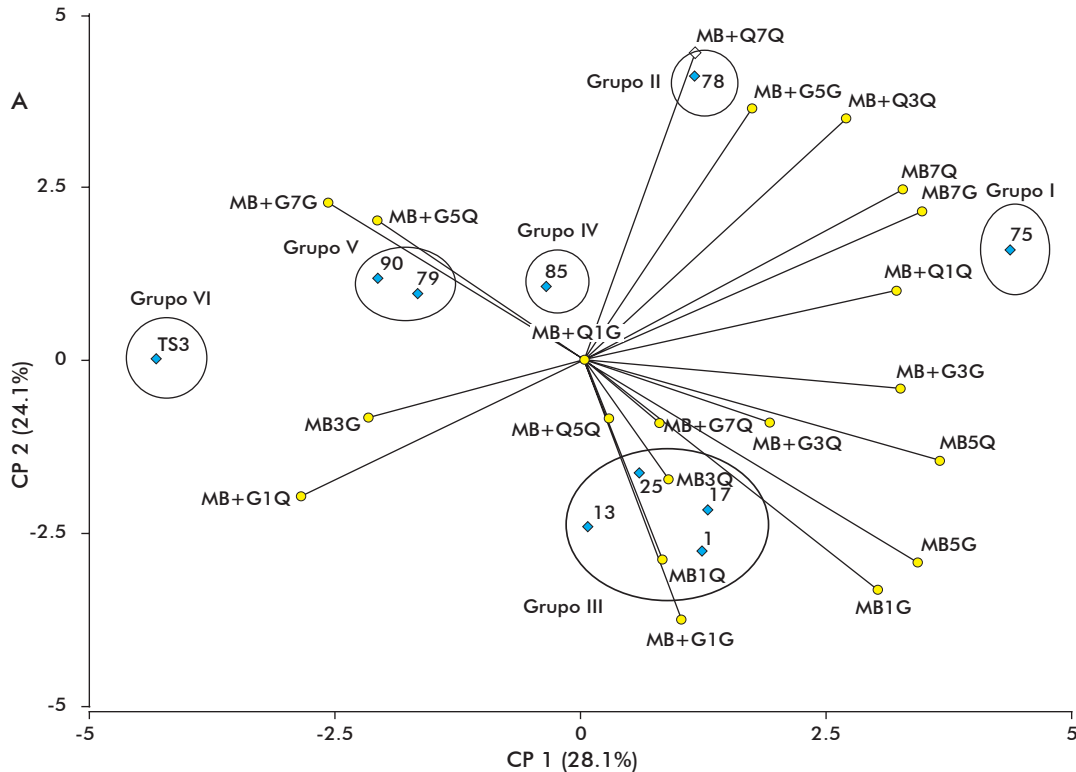


Figura 3. Análisis de componentes principales del comportamiento de la inducción simultánea de quitinasas y β -1,3-glucanasas en los diferentes medios líquidos. MB: medio basal (1; 3; 5 y 7: días de cultivo); MB+Q: medio basal suplementado con quitina; MB+G: medio basal suplementado con gelatina. Aislamientos: color azul, medios de inducción: color amarillo.

23. Marcello CM, Steindorff AS, da Silva SP, Silva Rdo N, Mendes Bataus LA, Ulhoa CJ. Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiol Res. 2010; 165(1):75-81.

24. Viterbo A, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A, et al. Expression regulation

of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). Curr Genet. 2002;42(2):114-22.

25. Bara MT, Lima AL, Ulhoa CJ. Purification and characterization of an exo-beta-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiol Lett. 2003;219(1):81-5.

26. Howell CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 2003;87(1):4-10.

27. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2004;2(1):43-56.

28. Muño BL, Botta E, Pérez E, Moreno D, Fernández E. Uso de *Trichoderma* como alternativa al bromuro de metilo en los cultivos protegidos, flores y ornamentales en Cuba. *Fitosanidad*. 2006;10(2):179-80.
29. Radjacommaré R, Venkatesan S, Samiyappan R. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Arch Phytopathol Plant Prot*. 2010;43(1):1-17.
30. Fang W, Feng J, Fan Y, Zhang Y, Bidochka MJ, Leger RJ, *et al.* Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol*. 2009; 102(2):155-9.
31. Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. II. Production of Volatile antibiotics. *Trans Br Mycol Soc*. 1971;57:41-8.
32. Elad Y, Chet I, Henis Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol*. 1982;28(7):719-25.

Recibido en junio de 2011. Aprobado en noviembre de 2011.