

Enzimas Líticas Producidas por *Trichoderma* spp. y su Correlación con la Inhibición *in vitro* de Patógenos Causantes de la Pudrición de la Raíz del Garbanzo

Lytic Enzymes Produced by *Trichoderma* spp. and Their Correlation With *in vitro* Inhibition of Chickpea Root Rot Pathogens

Jesús Edén Paredes Escalante, José Armando Carrillo Facio, Josefa Adriana Sañudo Barajas, Raúl Allende Molar, Raymundo Saúl García Estrada, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Culiacán, Apdo. Postal 32A, km. 5.5 Carr. Culiacán-El Dorado, Culiacán, Sin., CP 80129, México; Roberto Gregori, CRIOF-Department of Agri-Food Protection and Improvement, University of Bologna, Italy; John M. Labavitch, Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA, 95616, USA. Corresponding author: acarrillo@ciad.edu.mx

(Recibido: Marzo 25, 2010 Aceptado: Noviembre 08, 2010)

Paredes Escalante, J. E., Carrillo Facio, J. A., Sañudo Barajas, J. A., Allende Molar, R., García Estrada, R. S., Gregori, R. y Labavitch, J.M. 2011. Enzimas Líticas Producidas por *Trichoderma* spp. y su Correlación con la Inhibición *in vitro* de Patógenos Causantes de la Pudrición de la Raíz del Garbanzo. Revista Mexicana de Fitopatología 29:73-75.

Resumen. Las cepas nativas de *Trichoderma viridae* (CIAD 01-570903 y CIAD 03-580903), *T. harzianum* (CIAD 04-560903 y CIAD 05-550903), y *T. lignorum* (CIAD 02-590903 y CIAD 06-540903) inhibieron *in vitro* a *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*. La actividad quitinasa y la inhibición de hongos patógenos de las cepas presentaron una correlación de Pearson's $r = 0.90$ para la inhibición de *S. rolfsii*. *T. lignorum* (CIAD 06 540903) fue cultivada bajo micoparásitos de hongos simulados contra paredes celulares de *F. oxysporum*, *S. rolfsii*, *R. solani* o glucosa como fuente de carbono. La cepa tuvo una inducción diferencial de quitinasa y una actividad de β -1,3-glucanasa contra las paredes celulares de *R. solani*, lo que sugiere su posible papel dentro de la lisis de la pared de estas últimas.

Palabras clave adicionales: *Trichoderma*, control biológico, β -1,3-glucanasa, quitinasa.

La capacidad de *Trichoderma* spp. de secretar β -1,3-glucanasa y quitinasas extracelulares se ha correlacionado con el control biológico de hongos patógenos vegetales, por su papel en la ruptura de las paredes celulares de los patógenos (Harman *et al.*, 1993). *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, y *Rhizoctonia solani* se distribuyen ampliamente en las regiones productoras de cártamo en México. Pueden

Paredes Escalante, J. E., Carrillo Facio, J. A., Sañudo Barajas, J. A., Allende Molar, R., García Estrada, R. S., Gregori, R. and Labavitch, J.M. 2011. Lytic Enzymes Produced by *Trichoderma* spp. and Their Correlation With *in vitro* Inhibition of Chickpea Root Rot Pathogens. Revista Mexicana de Fitopatología 29:73-75.

Abstract. Native strains of *Trichoderma viridae* (CIAD 01-570903 and CIAD 03-580903), *T. harzianum* (CIAD 04-560903 and CIAD 05-550903), and *T. lignorum* (CIAD 02-590903 and CIAD 06-540903) showed inhibition *in vitro* against *F. oxysporum*, *S. rolfsii*, and *R. solani*. The chitinase activity and the inhibition of fungal pathogens by the *Trichoderma* strains presented a Pearson's correlation $r = 0.90$ for *S. rolfsii* inhibition. *T. lignorum* (CIAD 06 540903) was grown under simulated mycoparasitism with *F. oxysporum*, *S. rolfsii* or *R. solani* cell walls or glucose used as a carbon source. *T. lignorum* showed a differential induction of chitinase and β -1,3-glucanase activity when grown with cell walls of *R. solani*, suggesting possible roles for these enzymes in pathogen cell wall lysis.

Additional keywords: *Trichoderma*, biological control, β -1,3-glucanase, chitinase.

The ability of *Trichoderma* spp. to secrete extracellular β -1,3-glucanases and chitinases has been correlated with their biocontrol against plant pathogenic fungi by its role in the breakdown of pathogen cell walls (Harman *et al.*, 1993). *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, and *Rhizoctonia solani* are extensively distributed and can infect roots and produce yield losses of chickpea (Akram *et al.*, 2008).

infectar raíces y producir pérdidas en la producción de garbanzo (Akram *et al.*, 2008). Aún cuando existen biofungicidas producidos a base de *Trichoderma* spp, es de suma importancia realizar la detección continua de nuevas cepas con una amplia gama de actividad contra distintos fitopatógenos. El presente estudio correlaciona la actividad extracelular de la quitinasa, la proteasa y β -1,3-glucanasa de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizósfera del garbanzo y su capacidad para antagonizar a *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfisii*.

Las cepas de *Trichoderma* fueron evaluadas en cultivos duales en agar de papa dextrosa (PDA) para seleccionar inhibidores de crecimiento de micelio de *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfisii*. La quitinasa y la proteasa en las cepas de *Trichoderma* fueron inducidas de acuerdo a Harman *et al.* (1993) y la actividad fue evaluada mediante la técnica de difusión radial. La quitina (0.02%) o gelatina (3%) se incluyeron dentro de un gel de agarosa de 0.8 % preparado en 25 mL de acetato de sodio (50 mM, pH 6). Después de la solidificación, se cortaron pozos con un diámetro de 6 mm; se agregaron 50 μ L de medio de cultivo filtrado y se incubaron las placas (24 h a 37 °C). Una tinción con un 1% de solución rojo Congo (Sigma) produjo halos claros de la actividad de quitinasa, mientras que la proteasa se visualizó sin manchas. El experimento se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar y los tratamientos se repitieron cuatro veces. La correlación entre el crecimiento de inhibición y las actividades enzimáticas se presentaron como un coeficiente Pearson (r). La cepa de *T. lignorum* se utilizó para asemejar micoparasitismo contra el hongo (Harman *et al.*, 1993). Los hongos se cultivaron en caldo de papa-dextrosa (CPD) (110 rpm y 25 °C) durante siete días y después se autoclavearon; el micelio se centrifugó (3500 g, 10 min), se lavó con acetona, se secó (50°C 48 h), posteriormente se utilizó como fuente de carbono o glucosa como control. Los tratamientos se repitieron cinco veces. Se recuperaron las enzimas secretadas en los cultivos (0.45 μ m de membrana de tamaño poro) y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La generación de extremos reductores contra quitina o laminarina (0.5%, Sigma) fue controlada a 37 °C durante 40 minutos con el ensayo de la 2-cianoacetamida. Una unidad de quitinasa o de actividad de β -1,3-glucanasa fue la cantidad de enzima que catalizó la liberación de 1 μ mol de *N*-acetilglucosamina o glucosa por minuto, respectivamente. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y se compararon las medias (Tukey's test $P < 0.05$).

Todas las cepas mostraron una mayor inhibición de *S. rolfisii* y *R. solani* que *F. oxysporum*, así como diferencias en su capacidad para inhibir el crecimiento de micelio (datos no presentados). La quitinasa en la cepa *T. lignorum* (CIAD 06-540903) hidrolizó 4.5 mm² de substrato por mL de cultivo y resultó significativamente superior a 2.03 y 2.74 mm² mL⁻¹ de la actividad producida por los aislamientos de *T. viridae* (CIAD 01-570903 y CIAD 03-580903). La correlación más alta entre la actividad de la quitinasa y la inhibición *in vitro*, se observó en *S. rolfisii* (0.902) y *F. oxysporum* (0.862); se encontró una correlación lineal no representativa para la actividad de la proteasa (0.5). *T. lignorum* CIAD 06-540903

Although there are commercial biofungicides based on *Trichoderma* spp, is important to screen continuously new strains with a broad spectrum of activity against different phytopathogens. This study correlates the extracellular activity of chitinase, protease and β -1,3-glucanase of *Trichoderma* spp. strains isolated from chickpea rhizosphere and their capacity to antagonize *F. oxysporum*, *R. solani* and *S. rolfisii*.

Trichoderma strains were dual cultured on potato dextrose agar (PDA) to select inhibitors of *F. oxysporum*, *R. solani* and *S. rolfisii* mycelial growth. Chitinase and protease in the *Trichoderma* strains was induced according to Harman *et al.* (1993) and the activity was evaluated with the radial diffusion technique. Chitin (0.02%) or gelatin (3%) was included into a 0.8 % agarose gel prepared in 25 mL of sodium acetate (50 mM, pH 6). After solidification, 6 mm-diameter wells were cut, 50 μ L of filtered culture medium was added and plates were incubated (24 h at 37 °C). A staining with a 1 % Congo red solution (Sigma) produced clear haloes of chitinase activity while protease was visualized without staining. The experiment was arranged in a completely randomized design and treatments replicated four times. Correlation among growth inhibition and enzyme activities is presented as a Pearson's coefficient (r). The *T. lignorum* strain was used to simulate micoparasitism against cell wall of the pathogens (Harman *et al.*, 1993). Fungi were grown in PD broth (110 rpm and 25 °C) for seven days and then autoclaved; the mycelia was centrifuged (3500 g, 10 min), washed with acetone, dried (50°C 48 h) and used as carbon source or glucose as a control. Treatments had five replicates. Enzymes secreted into the culture were recovered (0.45 μ m pore-size membrane) and stored at -80°C until use. Reducing ends generation against chitin or laminarin (0.5%, Sigma) was monitored at 37 °C during 40 min with the 2-cianoacetamide assay. One unit of chitinase or β -1,3-glucanase activity was the amount of enzyme that catalyzed the release of 1 μ mol of *N*-acetylglucosamine or glucose per min, respectively. Data were subjected to ANOVA and the means compared (Tukey's test $P < 0.05$).

All strains showed higher inhibition of *S. rolfisii* and *R. solani* than *F. oxysporum* and varied in their ability to suppress mycelial growth (data not shown). Chitinase in the strain *T. lignorum* (CIAD 06-540903) cleaved 4.5 mm² of substrate per mL of culture and was significantly higher to 2.03 and 2.74 mm² mL⁻¹ of the activity produced by the isolates of *T. viridae* (CIAD 01-570903 and CIAD 03-580903). The highest correlation was observed between chitinase activity and the *in vitro* inhibition of *S. rolfisii* (0.902) and *F. oxysporum* (0.862), and non representative linear correlation was found for protease activity (0.5). *T. lignorum* CIAD 06-540903 was notable in the inhibition of mycelial growth and the ability to produce chitinase activity and a correlation higher to 0.7 was found on the radial diffusion assay. *F. oxysporum* revealed a relatively low *in vitro* susceptibility to the *Trichoderma* spp. tested. A possible explanation is the protein layer (7 or 8 % dry weight) that covers chitin and glucan wall layers and may protect from the action of chitinases and glucanases (Schoffemeer *et*

destacó para inhibir el crecimiento de micelio y en la capacidad para producir actividad de quitinasa, así como por una correlación mayor a 0.7 en el ensayo de difusión radial. *F. oxysporum* reveló una susceptibilidad relativamente baja *in vitro* a las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas. Una posible explicación es la capa de proteínas (7 o 8 % peso seco) que cubre las capas de las paredes celulares de la quitina y el glucano, pudiendo así proteger la acción de quitinasas y glucanasas (Schoffemeer *et al.*, 1999); sin embargo, en este estudio la actividad de proteasa no se correlacionó con el antagonismo.

Bajo micoparasitismo simulado, *R. solani* indujo la mayor actividad de quitinasa y β -1,3-glucanasa (Cuadro 1) de *T. lignorum*. La actividad de quitinasa frente a *F. oxysporum* y *S. rolsfii* no fue distinta a la del control. Una alta actividad enzimática de β -1,3-glucanasa y una actividad menor de quitinasa se reportó en *Trichoderma* cuando se cultiva en medio mineral suplementado con micelio o pared celular de patógenos de las plantas (El-Katatny *et al.*, 2000). Sin embargo, la actividad de β -1,3-glucanasa en *T. lignorum*, crecido en la glucosa, fue menor que en el medio con paredes celulares del patógeno, lo que sugiere que los β -1,3-glucanos no son totalmente necesarios para inducir la expresión de β -1,3-glucanasa (El-Katatny *et al.*, 2000). La actividad de quitinasa en el medio con pared celular de *R. solani* tuvo el doble de actividad que en los medios con *S. rolsfii*, *F. oxysporum* o glucosa (Cuadro 1). La quitinasa ha sido propuesta como regulador de las reacciones metabólicas relacionadas con el crecimiento y desarrollo en el micoparásito; y la actividad exo-quitinasa de *Trichoderma* fue reportada en medios suplementados con mono y disacáridos lo cual surgió una inducción constitutiva. Nuestro ensayo no discriminó entre acción endo y exo para sugerir la expresión constitutiva de la exo-quitinasa de la cepa evaluada.

Cuadro 1. Quitinasa y actividad de β -1,3-glucanasa producida por *T. lignorum* CIAD 06 540903 sembrados bajo condiciones simuladas de micoparasitismo.

Table 1. Chitinase and β -1,3-glucanase activity produced by *T. lignorum* CIAD 06 540903 grown under simulated conditions of micoparasitism.

Enzyme	Enzymatic activity (U mL ⁻¹) on cell wall source			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. rolsfii</i>	<i>R. solani</i>	Dextrose
Chitinase	0.116b	0.098b	0.229a	0.111b
β -1,3-glucanase	1.145b	0.891c	1.616a	0.128d

Different letter by rows indicates significant difference (Tukey P 0.05).

LITERATURA CITADA

- Akram, A., Iqbal, S.M., Qureshi, R.A., and Rauf, C.A. 2008. Variability among isolates of *Sclerotium rolsfii* associated with collar rot disease of chickpea in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 40:453-460.
- El-Katatny, M.H., Somitsch, W., Robra, K.H., El-Katatny, M.S. and Gubitz, G.M. 2000. Production of chitinases and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of

al., 1999); however, in this study the protease activity did not correlate with the antagonism.

Under simulated micoparasitism, *R. solani* induced the highest chitinase and β -1,3-glucanase activity (Table 1) of *T. lignorum*. Chitinase activity against *F. oxysporum* and *S. rolsfii* was not different to the control. A high enzymatic activity of β -1,3-glucanase and less chitinase activity was reported when *Trichoderma* is cultured in mineral media supplemented with mycelia or cell wall of plant pathogens (El-Katatny *et al.*, 2000). However, the activity of β -1,3-glucanase in *T. lignorum* grown in glucose was lower than in medium with pathogen cell walls, suggesting that β -1,3-glucans are not fully required to induce the expression of β -1,3-glucanase (El-Katatny *et al.*, 2000). Chitinase activity on culture with *R. solani* cell wall had twice the activity of the media with *S. rolsfii*, *F. oxysporum* or glucose (Table 1). Chitinase has been proposed as a regulator of the metabolism of the growth and development in the micoparasite; and, *Trichoderma* exo-chitinase activity was reported in media containing mono and disaccharides, suggesting a constitutive induction (El-Katatny *et al.*, 2000). Our assay did not discriminate among endo and exo action to suggest the constitutive expression of exo-chitinase in the strain tested.

the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolsfii*. *Food Technology Biotechnology* 38:173-180.

- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di Pietro, A., Peterbauer, C. and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83:313-318.
- Schoffemeer, E.A.M., Klis, F.M., Sietsma, J.H., and Cornelissen, B.J.C. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 27:275-282.