

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINASA EN PROCESOS DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* EN TOMATE, MEDIANTE FITOINVIGORIZACIÓN DE SEMILLAS EN PRESENCIA DE *Trichoderma koningii*

EVALUATION OF CHITINASE ACTIVITY IN BIOLOGICAL CONTROL PROCESS OF *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* IN TOMATE, BY USING SEED PRIMING IN THE PRESENCE OF *Trichoderma koningii*

Clavijo A., Cotes A.M¹.

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue el de establecer el posible papel de las quitinasas en un modelo de control, utilizando pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. Este método mostró ser eficiente para el control de *Rhizoctonia solani* y de *Fusarium oxysporum* en tomate. Al analizar los extractos y exudados de semillas y los extractos de suelo sembrado con semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii*, se encontró que éstos presentaron niveles significativamente mayores de actividad endoquitinasa que los provenientes de semillas pregerminadas en ausencia del antagonista y que los provenientes de semillas no pregerminadas. Al evaluar *in-vitro* la actividad hidrolítica de dichos extractos y exudados, utilizando paredes celulares de *R. solani* y de *Fusarium oxysporum*, los provenientes de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* también mostraron significativamente mayor actividad endoquitinasa que la presentada en los otros tratamientos. Se pudo concluir que la pregerminación controlada de semillas en presencia de *T. koningii* estimula la actividad endoquitinolítica de las semillas y que esta actividad quitinasa estuvo relacionada con la protección previamente obtenida.

Palabras claves: *Trichoderma koningii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, chitinases, control biológico, fitoinvigorización de semillas

SUMMARY

The present work intended to establish in a control model, the possible role of chitinases by using seed priming in the presence of *Trichoderma koningii*. This method showed to be efficient to control *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* in tomato. The analysis of seed extracts and exudates, and soil extracts from soil seeded with seeds primed in the presence of *T. koningii* showed high endochitinase activity in the samples. This activity was higher than that exhibited by samples from primed seeds without antagonist and unprimed seeds. *In vitro* evaluation of the hydrolytic activity of the extracts and exudates were performed using *F. oxysporum* and *R. solani* cell walls. The results also showed that the samples from seeds primed in the presence of *T. koningii* exhibited higher endochitinase activity than the others. These data allowed us to conclude that seed priming in the presence of *T. koningii* promotes endochinolytic activity in seeds. It was also concluded that this chitinase activity is related with the protection previously observed.

¹Investigadores. Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias - Corpoica.

Keywords: *Trichoderma koningii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, chitinases, biological control, seed priming

INTRODUCCIÓN

El control biológico de fitopatógenos mediante el uso del hongo antagonista *Trichoderma* spp. utilizado en forma combinada con técnicas de pregerminación controlada de semillas, ha demostrado resultados consistentes y promisorios para el control de varios fitopatógenos (Harman *et al.*, 1980; Harman y Taylor, 1989., Cotes, 1993). Saldamando en 1996 encontró que la técnica de pregerminación controlada de semillas de tomate variedad Chonto en presencia de *T. koningii* es una alternativa promisoriosa para contrarrestar el efecto *Rhizoctonia solani*, mostrando porcentajes de protección del 70%, mientras que el tratamiento que consistió en semillas no pregerminadas y tratadas con *T. koningii* presentó sólo un 15% de protección. De igual forma, Betancourth en 1997, encontró que dicha combinación era efectiva para contrarrestar el efecto de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, mostrando porcentajes de protección del 80%, mientras que el tratamiento que consistió en semillas no pregerminadas y tratadas con el antagonista presentó sólo un 32% de protección.

Los microorganismos antagonistas utilizan diferentes mecanismos de acción para contrarrestar el efecto nocivo de los fitopatógenos. En condiciones de laboratorio se ha establecido que uno de los principales mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* spp. está basado en la hidrólisis de la pared del patógeno mediante la excreción de las enzimas hidrolíticas exoquitinasas y b 1-3 glucanasas (Ridout *et al.*, en 1989, Sivan y Chet en 1989, Cotes en 1993). Las quitinasas microbiales son enzimas que hidrolizan la quitina (polímero de b-1,4 N-acetil glucosamina); el cual es el principal carbohidrato (aproximadamente 80%) de la pared celular de los hongos. Por ésto dichas enzimas cobran un papel importante en el control biológico de fitopatógenos. Por otro lado, las quitinasas vegetales, las cuales no tienen un sustrato en las plantas, también tienen un efecto en la disminución del ataque de los fitopatógenos. Esto ha sido ilustrado por Cotes en 1993, quien determinó la importancia de estas enzimas en el control biológico de *Pythium splendens* y de *Rhizoctonia solani* en frijol y Mattieu *et al.*, en 1989, quienes le atribuyeron a estas enzimas la reducción del efecto de *Cladosporium fulvum* (Syn: *Fulvia fulva*) en tomate.

La dilucidación de los mecanismos de acción, con un propósito de biocontrol permite potenciar el efecto antagónico de los biocontroladores, permitiendo así reducir los daños producidos por los fitopatógenos, bajo un modelo que tenga en cuenta las interacciones que

tienen lugar entre la planta, el suelo, el fitopatógeno y el antagonista.

La mayoría de los estudios sobre mecanismos de acción en el control biológico de fitopatógenos se llevan a cabo *in-vitro*, teniendo en cuenta la interacción que existe entre el patógeno y el antagonista, ignorando su relación con la planta. Con el propósito de estudiar la interacción planta-biocontrolador-fitopatógeno y así contribuir al esclarecimiento de los mecanismos de acción, el objetivo principal del presente trabajo fue el de establecer el posible papel de las quitinasas en los procesos de bioprotección contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate, logrado mediante el uso combinado de pregerminación controlada de semillas y del antagonista *Trichoderma koningii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y Medios de Cultivo

Como agente biocontrolador se empleó la cepa TH11 de *Trichoderma koningii*, la cual fue seleccionada en trabajos previos por su alta actividad biocontroladora en cultivos de frijol y pepino contra *Pythium splendens* (Cotes, 1993) y en tomate contra *Fusarium oxysporum* (Betancourth, 1997) y *Rhizoctonia solani* (Saldamando, 1996).

Con el fin de obtener la biomasa del antagonista se partió de los cultivos puros en PSA de 7 días de edad, tomando 9 círculos de 5mm de diámetro cada uno. Los círculos de *Trichoderma* sp. se colocaron en un erlenmeyer de 1000 mL que contenía 500 ml de medio líquido de Saboureaud. La incubación se hizo durante 7 días a 120 revoluciones por minuto (rpm) y 25 °C.

Las cepas de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* (Rz 4) y *Fusarium oxysporum* (Fox5) se obtuvieron del banco de cepas del CIAT (Palmira, Valle Colombia) y del banco de cepas del laboratorio de control biológico de Corpoica (Tibaitata, Mosquera), respectivamente. Estas cepa fueron seleccionadas por presentar una alta actividad patogénica en tomate.

Para obtener la biomasa de estos fitopatógenos, se partió de los cultivos puros de estos hongos crecidos durante 7 días en PSA, se tomaron 9 círculos de 5mm de diámetro cada uno. Los círculos de *Rhizoctonia* sp. se colocaron en un erlenmeyer de 1000 mL que contenía 500 mL de medio líquido de YDB (levadura-peptona-dextrosa). La incubación se hizo durante 7 días a 120 revoluciones por minuto (rpm) y 25 °C. El cultivo de *Fusarium* sp. se llevó a cabo en medio líquido de Saboureaud, el cual fue incubado durante 7 días a 80 rpm y 25 °C.

Material Vegetal

El material vegetal empleado para la realización del presente trabajo consistió en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedad Chonto, extraídas

de tomates maduros adquiridos en el mercado local. La extracción de las semillas se realizó de acuerdo al procedimiento recomendado por Lobo en 1987 (citado por Betancourth, 1997).

Antes de llevar a cabo la prueba de pregerminación, las semillas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril durante 3 minutos cada vez (Betancourth, 1997).

Pregerminación Controlada en Matriz Sólida (Smp):

El procedimiento de pregerminación controlada que se utilizó en el presente trabajo fue el descrito por Saldamando, 1996. Como matriz sólida se emplearon 200 g de cascarilla de arroz estéril. Esta cascarilla fue humedecida con 250 mL de agua destilada estéril para lograr así 80% de capacidad de retención.

La pregerminación se realizó en una cámara de plástico de 300 x 200 x 150 mm, la cual se tapó para evitar la pérdida de humedad. Las semillas se colocaron en bolsas de muselina de 50 x 20 mm a una profundidad y distancia entre las bolsas de 100mm. La incubación se realizó durante 48 horas a temperatura ambiente.

Para la pregerminación controlada de las semillas en presencia de *Trichoderma* sp., las semillas (1g), previamente desinfectadas se sumergieron en una suspensión de *Trichoderma* sp. que contenía 10^7 propágulos/mL, durante 10 minutos. Otro gramo de semillas se sometió a los mismos procedimientos descritos, excepto que fueron sumergidas durante 10 minutos en agua destilada estéril. Al cabo de este tiempo éstas fueron secadas bajo una corriente de aire estéril, durante 10 minutos.

Actividad Quitinolítica de Exudados y Extractos de Semillas.

La determinación de la actividad quitinasa a partir de extractos crudos de origen vegetal se hizo siguiendo los procedimientos descritos por Cotes *et al.*, 1996. Para la evaluación de los tiempos de extracción de los exudados de semillas de tomate, se tomó 1 g de semillas correspondientes a cada uno de los tratamientos (no pregerminadas y pregerminadas tratadas y no tratadas *Trichoderma* sp.), las cuales fueron colocadas en 10 mL de tampón acetato de potasio pH 5.0 y 0.05M. Se realizaron extracciones con agitación constante cada hora a 4 °C., en una plancha de agitación a velocidad 7. Posteriormente, para obtener el extracto bruto, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 5000 rpm y 4 °C. El sobrenadante (extracto enzimático bruto) fue utilizado para realizar la reacción enzimática. Con estos últimos resultados se construyó una gráfica de actividad específica versus tiempo y se determinó el momento en

el que se presentaba la máxima actividad para cada tratamiento.

Para la obtención de los extractos de semillas, se tomó 1g de semillas no pregerminadas, pregerminadas y tratadas o no con el biocontrolador. Estas semillas fueron totalmente maceradas a 4 °C, en 10 mL de tampón acetato de potasio 0.05M y pH 5.0. Este macerado se centrifugó a 4°C, durante 3 minutos y 5000 rpm. El sobrenadante obtenido fue utilizado para determinar la actividad endo y exoquitinasa.

Evaluación de la Actividad Quitinolítica de Extractos de Suelo

La determinación de la actividad quitinasa en extractos de suelo se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Cotes *et al.*, 1994. El suelo utilizado en los ensayos provino del municipio de San Rafael (Cundinamarca) y presentaba un pH de 4,8. Para realizar estos experimentos se utilizaron recipientes de vidrio de 350 x 100 mm, que contenían 30 g de suelo tamizado a través de una malla No 60. Este suelo fue doblemente esterilizado a 120 °C, durante 25 minutos cada vez, después de la esterilización se le ajustó con agua destilada estéril la capacidad de retención al 80%. En cada frasco se sembraron cinco semillas a una profundidad y distancia entre ellas de 10mm. Los tratamientos utilizados en este experimento correspondieron a semillas no pregerminadas, y pregerminadas, tratadas y no tratadas con *Trichoderma* sp.

Todos los tratamientos se incubaron durante 7 días a 25 °C en completa oscuridad. Las extracciones de suelo de cada tratamiento se realizaron cada 24 horas, durante un total de 7 días. Para obtener los extractos de suelo, a cada recipiente de vidrio se le adicionaron 60 ml de tampón acetato de potasio pH 5,0 y 0,05M y se mezcló suficientemente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue utilizado para realizar las reacciones endo y exoquitinasas.

Determinación de la Actividad Quitinasa.

La actividad quitinolítica total se determinó siguiendo la metodología propuesta por Cotes, 1993. Se tomaron 10 mg de quitina coloidal que estaba diluida en 1 ml de tampón acetato de potasio de 0,05M y pH 5,0 y se le adicionó 1 mL del extracto a analizar. Seguidamente se le adicionó 1 mL de extracto de quitobiasa. Esta mezcla se homogeneizó, se incubó y reveló coloriméricamente. La incubación de la reacción enzimática se llevó a cabo en baño de María a 37°C durante un tiempo total de 6 horas, registrando lecturas cada hora. El extracto de quitobiasas consistió en jugo digestivo del caracol de jardín (*Helix pomatia*), el cual contiene estas enzimas, que son necesarias para completar la digestión ejercida

por las endoquitinasas sobre un substrato quitinoso. Para evaluar la actividad de las exoquitinasas se procedió de la forma indicada anteriormente, pero en lugar de agregar 1 ml de quitobiasas, se agregó a la reacción 1 ml de tampón de acetato de potasio 0,05M y pH 5,0. Después de la incubación, la actividad quitinasa se midió utilizando la técnica colorimétrica de Reissig, 1955. Adicionalmente, a todos los extractos crudos, se les midió la concentración de proteína total de acuerdo al método de Bradford, 1976. Los resultados fueron expresados como mg de N-acetyl glucosamina (N-AG) /mg proteína total*h. La actividad de las endoquitinasas se calculó a través de la siguiente fórmula: $Eq = Qt - Ex$, donde (Eq) son las endoquitinasas, (Qt) quitinasas totales y (Ex) exoquitinasas.

Actividad Hidrolítica de Exudados y Extractos de Semillas Suelo sobre el Micelio de los Fitopatógenos. Para evaluar el efecto hidrolítico de los extractos de semillas, extractos de suelo y de los exudados de semillas sobre los hongos fitopatógenos se realizó según los procedimientos descritos por Cotes, 1993.

La mitad de la biomasa fúngica obtenida de acuerdo a los procedimientos descritos anteriormente, fue esterilizada a 120 °C durante 25 minutos. La otra mitad se dejó como biomasa viva. Posteriormente, ambas fueron lavadas, utilizando 4 litros de agua destilada estéril. Los micelios muerto y vivo fueron suspendidos y homogeneizados como se explicó anteriormente. Posteriormente, fueron secados en una estufa con corriente de aire a 60 °C, durante 48 horas para el micelio muerto y durante 96 horas a 25 °C para la biomasa viable. Al cabo de este tiempo fue determinado el peso seco en condiciones de esterilidad de los polvos obtenidos y fueron almacenados a 0 °C durante un tiempo no mayor de 90 días para el micelio muerto y para la biomasa viable de 3 días.

Para determinar la capacidad quitinolítica de los exudados y extractos obtenidos a través del ensayo, sobre el micelio de los fitopatógenos, se tomaron 10 mg de micelio muerto y 10 mg de biomasa viable de *Rhizoctonia solani* y de *Fusarium oxysporum* y se dispersaron en 1 ml de tampón acetato 0,05M y pH 5,0. Se agitó fuertemente para favorecer la homogeneización. Luego, se adicionó 1 ml de extracto enzimático bruto correspondiente, según el caso, a exudados de semillas, extractos de semillas y extractos de suelo. Esta reacción enzima-sustrato se llevó a cabo como se describió anteriormente durante 6 horas. La actividad exo y endoquitinasa fue determinada. Para el control positivo de la reacción se utilizó quitina coloidal como sustrato.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico: El diseño experimental utilizado para las diferentes evaluaciones fue completamente al azar. Cada tratamiento se hizo con tres réplicas y cada una de éstas con tres repeticiones

en cada lectura colorimétrica. Los resultados fueron promediados.

Para asegurar la confiabilidad, sensibilidad y precisión de las técnicas colorimétricas utilizadas (Reissig, 1955 y Bradford, 1976), se emplearon las siguientes pruebas estadísticas: Prueba de hipótesis para el intercepto, prueba de hipótesis para la pendiente, prueba de hipótesis para la linealidad, análisis de varianza para la linealidad, límites de confianza para el intercepto, límites de confianza para la pendiente y regresión lineal. A los resultados de actividad enzimática se les aplicó un análisis de varianza, con una prueba de rango múltiple de mínima diferencia para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE EXUDADOS Y EXTRACTOS DE SEMILLAS SOBRE MICELIO VIVO Y MUERTO DE FITOPATÓGENOS

Teniendo en cuenta la alta actividad biocontroladora contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* reportada por Saldamando, 1996 y Betancourth, 1997 respectivamente, la cual fue obtenida en semillas pregerminadas en presencia de *Trichoderma koningii* (P+TH), la cual fue seguida por la presentada por semillas pregerminadas (P) y dada la baja actividad biocontroladora encontrada en semillas no pregerminadas (NP), se evaluó la actividad quitinolítica presentada por los exudados y los extractos de las semillas de tomate que habían sufrido los tres tratamientos descritos anteriormente, utilizando como substratos de la reacción enzimática quitina coloidal, micelio vivo y muerto de *Fusarium oxysporum* y de *Rhizoctonia solani*.

Inicialmente a través de una cinética de extracción de los exudados correspondientes a los tres tratamientos de semillas mencionados, se determinó el tiempo óptimo en el que se encontraba la mayor actividad quitinolítica, utilizando como sustrato de la reacción enzimática quitina coloidal, encontrándose que no importa el tratamiento que hubieran sufrido las semillas (NP, P y P+TH), el tiempo óptimo para la obtención de los exudados fue de cinco horas. Es así como, las semillas no pregerminadas presentaron una actividad endoquitinolítica, expresada como mg N-AG/mg proteína total*h, de 2,5, seguida por la presentada por las semillas pregerminadas y por las semillas pregerminadas en presencia del antagonista, cuyas actividades enzimáticas fueron de 4,7 y de 6,4 microgramos de N-AG por microgramo de proteína total*h, respectivamente (Figura 1). La actividad enzimática encontrada para los tres casos evaluados, correspondió a endoquitinasas, no detectándose actividad exoquitinasa. Lo anterior se encuentra en concordancia con lo reportado por Cotes en 1993, quien para estos mismos tratamientos de semillas en frijol encontró solamente endoquitinasas. Los resultados correspondientes a los tres tratamientos

evaluados fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el análisis estadístico de diferencia mínima significativa (d.m.s) (Fig. 2).

De otra parte, se evaluó la actividad endoquitinolítica de los extractos de semillas (ver Tabla 1), para cada tratamiento, utilizando quitina coloidal como sustrato de reacción enzimática, encontrándose al igual que en el caso anterior, que la actividad enzimática evaluada correspondió a endoquitinasas y que las semillas pregerminadas y tratadas con el antagonista presentaron la mayor actividad específica, expresada como $\mu\text{g N-AG}/\mu\text{g proteína total} \cdot \text{h}$, la cual fue de 94,8. Esta fue seguida por las encontradas en semillas pregerminadas y en semillas no pregerminadas que fueron de 61,5 y de 20,1 respectivamente. Estos resultados fueron significativamente diferentes según el análisis estadístico de d.m.s.

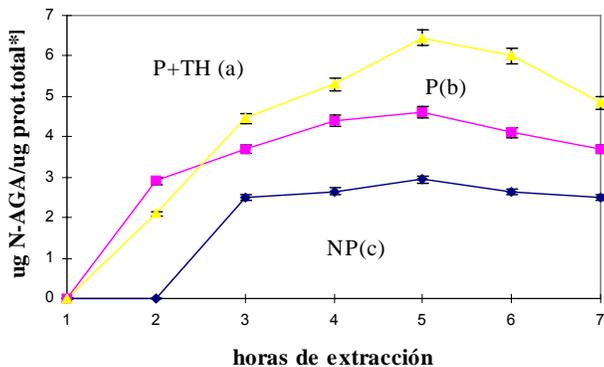


Figura 1. Actividad endoquitinolítica presentada por exudados de semillas extraídos en diferentes tiempos. La actividad enzimática fue evaluada utilizando quitina coloidal como sustrato de la reacción. Semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (P+TH), semillas pregerminadas (P) y semillas no pregerminadas (NP). Diferencia significativa según el d.m.s con $p < 0,05$ (a,b,c)

Tanto en los exudados como en los extractos de semillas pregerminadas en presencia y ausencia del antagonista, se encontró significativamente mayor actividad endoquitinasa que en los exudados y extractos de semillas no pregerminadas. Podríamos proponer entonces, que el tratamiento fisiológico de pregerminación controlada, estimula significativamente la actividad endoquitinolítica de las semillas, ya que estas semillas se encuentran en un estado de desarrollo más avanzado que el de las semillas no pregerminadas.

Tabla 1. Actividad endoquitinolítica presentada por extractos de semillas que habían sufrido diferentes tratamientos.

Tratamiento	Actividad Específica ($\mu\text{g N-AG}/\mu\text{g Proteína total} \cdot \text{h}$)
NP	$20,1 \pm 3,5$
P	$61,5 \pm 3,8$
P+TH	$94,8 \pm 2,7$

La actividad enzimática fue evaluada utilizando quitina

coloidal como sustrato de la reacción. Semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (P+TH), semillas pregerminadas (P) y semillas no pregerminadas (NP).

Este hecho está en relación con lo reportado por Cotes, 1993, quien al utilizar la técnica de pregerminación controlada de semillas de frijol en presencia de *T. koningii*, encontró una significativa protección contra *Pythium splendens*, la cual estuvo relacionada con la alta actividad endoquitinasa y endo-B-1,3 glucanasa de las semillas. Para el caso de los fitopatógenos vegetales, Pegg *et al.*, en 1973 y 1981 con *Verticillium albo-atrum*, Paulot en 1991 con *Pseudomonas syringae*, Mathieu *et al.*, en 1988 y 1990 y Wubben *et al.*, en 1992 con *Cladosporium fulvum* (syn *Fulvia fulva*) habían demostrado que estos microorganismos eran capaces de estimular la producción y la actividad de endoquitinasas y de endo-B-1,3 glucanasa propias de las semillas, junto con otras proteínas relacionadas con la patogénesis.

Para simular *in-vitro* el fenómeno biológico de hidrólisis enzimática que tiene lugar *in-vivo* sobre la pared de los patógenos, se evaluó la sensibilidad de diferentes sustratos frente a las quitinasas contenidas en los exudados y extractos de semillas provenientes de los diferentes tratamientos. Se utilizaron como sustratos de reacción enzimática micelio vivo y muerto de *R. solani* (Rzv y Rzm) y micelio vivo y muerto de *F. oxysporum* (Foxv y Foxm).

Cuando se evaluó la actividad endoquitinasa de los exudados utilizando diferentes sustratos para la reacción, se observó que ésta dependía del tratamiento que hubieran sufrido las semillas. Es así como los exudados de semillas pregerminadas en presencia del *T. koningii*, presentaron la mayor actividad endoquitinasa en los diferentes sustratos, expresada como $\mu\text{g N-AG}/\mu\text{g Proteína total} \cdot \text{h}$, siendo de 5,2 cuando se utilizó quitina coloidal como sustrato de la reacción, de 50,0 cuando se utilizó micelio muerto de *F. oxysporum* y de 58,15 cuando se utilizó micelio muerto de *R. solani*. Entre tanto, para las semillas pregerminadas en ausencia del biocontrolador, estos resultados fueron de 4,6, de 25,0 y de 30,0 respectivamente. Para los exudados de semillas no pregerminadas, la actividad fue inferior comparada con las dos anteriores, ya que para quitina coloidal fue de 2,8, para el micelio muerto de *F. oxysporum* fue de 12,20 y de 19,15 para el micelio muerto de *R. solani*. Estos resultados fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el análisis estadístico d.m.s.

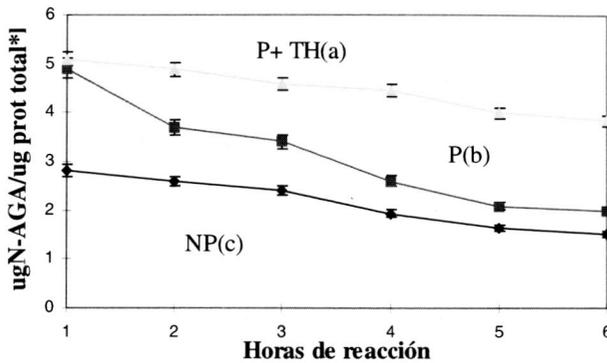


Figura 2. Efecto de la pregerminación sobre la actividad endoquitinasa de exudados de semilla. La actividad enzimática fue obtenida utilizando quitina coloidal como sustrato de la reacción. Diferencia significativa según el d.m.s con $p < 0,05$ (a,b,c).

Cuando se utilizó micelio muerto de *R. solani* y de *F. oxysporum* como sustrato de la reacción, la tendencia de la curva de hidrólisis fue la misma, pues en presencia de ambos sustratos, los exudados de semillas provenientes de los diferentes tratamientos presentaron una máxima hidrólisis a la primera hora de reacción, declinando bruscamente hasta la sexta hora.

Por otro lado, la tendencia de la cinética de hidrólisis cuando se utilizó micelio vivo de *R. solani* y de *F. oxysporum* fue diferente a la presentada en el caso anterior (micelio muerto), ya que tan sólo hasta la cuarta hora se observó la mayor actividad endoquitinasa, la cual descendió hasta la sexta hora. El comportamiento hidrolítico de los exudados sobre estos sustratos, también dependió del tratamiento que hubieran sufrido las semillas. Es así como los exudados provenientes de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* presentaron significativamente mayor actividad endoquitinasa expresada como $\mu\text{g N-AG}/\mu\text{g proteína total}\cdot\text{h}$, que la observada al utilizar micelio vivo de *R. solani* ésta fue de 32,5 y al utilizar micelio vivo de *F. oxysporum* ésta fue de 26,58, mientras que los exudados de semillas pregerminadas presentaron actividades de 20,60 y 17,89, respectivamente y en los exudados de semillas no pregerminadas la actividad enzimática fue de 8,5 y de 6,8, respectivamente.

Al comparar la cinética de hidrólisis sufrida por el micelio vivo y muerto de los dos fitopatógenos estudiados, al utilizar los exudados de semillas provenientes de los diferentes tratamientos, se evidenció que el micelio muerto de ambos patógenos fue más sensible a la hidrólisis que el micelio vivo. Esto podría ser debido a algunos aspectos de la fisiología de estos microorganismos, que al estar vivos interfieren con la reacción enzimática, por factores tales como la producción de proteasas que lisarían las endoquitinasas o la producción de inhibidores enzimáticos. De otra parte, el micelio de *R. solani* mostró mayor sensibilidad a las endoquitinasas que el de *F. oxysporum*.

Esto podría ser debido al grupo de anastomosis que presentó la cepa de *R. solani* que podría hacer más disponible la quitina, lo que tendría como consecuencia, la mayor actividad enzimática (Ridout, 1996). Aunque por otro lado, Potgieter y Alexander en 1966, sugirieron que la melanina presente en la pared de *R. solani*, en una proporción del 8,5% del peso de la pared, protege a la hifa de la lisis microbiana.

En cuanto a la actividad endoquitinasa de los extractos de semillas (Figura 3), se observaron similitudes con respecto a la presentada por los exudados, en lo referente a la relación entre la actividad enzimática y el tratamiento sufrido por las semillas, así como en el comportamiento de los extractos frente al micelio vivo y muerto de ambos fitopatógenos.

Los extractos de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii*, presentaron mayor actividad endoquitinasa que los extractos provenientes de los demás tratamientos de semillas. La actividad expresada como $\mu\text{g N-AG}/\mu\text{g Proteína total}\cdot\text{h}$, en presencia de los diferentes sustratos de la reacción enzimática, fue de 100 al utilizar quitina coloidal como sustrato de la reacción, de 101 al utilizar micelio muerto de *F. oxysporum* y de 120,0 al utilizar micelio muerto de *R. solani*. Entre tanto, para las semillas pregerminadas en ausencia del biocontrolador, ésta fue de 70,0, de 60,0 y de 85,0, respectivamente. Para los extractos de semillas no pregerminadas, la actividad fue significativamente inferior comparada con las dos anteriores, ya que al utilizar quitina coloidal como sustrato de la reacción, ésta fue de 20,0, al utilizar el micelio de *F. oxysporum* muerto fue de 18,45 y fue de 26,65 al utilizar el micelio de *R. solani* muerto (Figura 3).

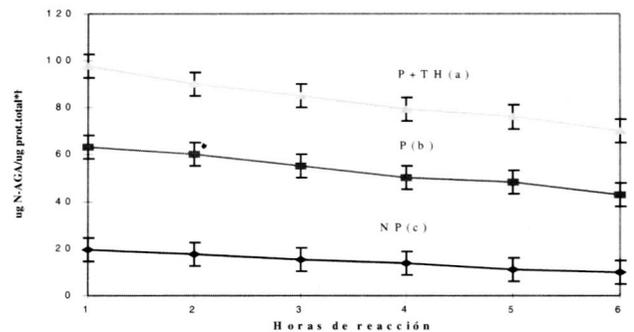


Figura 3. Efecto de la pregerminación controlada en presencia y ausencia de *T. koningii*, sobre la actividad endoquitinasa de extractos de semillas. La actividad enzimática fue obtenida utilizando quitina coloidal como sustrato de la reacción. Semillas pregerminadas y tratadas con *T. koningii* (P+TH), semillas pregerminadas (P) y semillas no pregerminadas (NP). Diferencia significativa según el d.m.s con $p < 0,05$ (a,b,c).

Los extractos de semillas presentaron el mismo fenómeno observado para los exudados, por cuanto presentaron mayor actividad hidrolítica sobre el micelio

muerto de ambos patógenos, que sobre el micelio vivo, siendo el micelio *R. solani* el más sensible al ataque de las endoquitinasas evaluadas. Sin embargo, en los extractos se encontró significativamente mayor actividad enzimática (casi el doble) que la presentada por los exudados. Esto podría ser debido, a que al macerar los tejidos que conforman la semilla se podrían liberar las enzimas endoquitinolíticas intracelulares. Este hecho fue reportado por Tsune y Nester en 1987.

Estos resultados de actividad endoquitinolítica estuvieron en concordancia con los estudios de protección encontrados en tomate contra *R. solani* y *F. oxysporum* por Saldamando en 1996 y Betancourth en 1997 respectivamente, quienes determinaron al comparar la protección conferida por los tratamientos de pregerminación controlada de semillas, en presencia y ausencia de *T. koningii* y semillas no pregerminadas, que los mejores resultados de protección contra los fitopatógenos, expresados como plantas sanas correspondieron al tratamiento conjunto de pregerminación controlada en presencia del agente de biocontrol *T. koningii*. Para el caso de *R. solani*, Saldamando encontró en presencia del fitopatógeno el 96% de plántulas sanas, mientras que dicho porcentaje cuando las semillas fueron pregerminadas en ausencia del biocontrolador fue de 90%. Estos resultados de protección fueron significativamente superiores a los encontrados en semillas no pregerminadas, cuyas plántulas presentaron sólo un 54% de plántulas sanas.

De igual manera, para *F. oxysporum*, Betancourth encontró que semillas de tomate pregerminadas en presencia del antagonista ofrecieron protección contra este fitopatógeno, de 59%, mientras que las semillas pregerminadas en ausencia del antagonista presentaron una protección de 54 %, siendo estos resultados significativamente diferentes del encontrado en el testigo de semillas no pregerminadas y tratado con el antagonista (22%).

De acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo, se podría proponer que existe una relación directa entre los tratamientos que sufrieron las semillas y la actividad enzimática de sus exudados y extractos. Es así que los mayores niveles de actividad endoquitinolítica se encontraron en el tratamiento de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii*, el cual ofreció la mayor protección en el control biológico de fitopatógenos radicales en tomate (*R. solani* y *F. oxysporum*). Esto nos permite sugerir que la pregerminación estimula la producción y actividad quitinasa, la cual se ve incrementada por el efecto inductor de *T. koningii*. Lo anterior está en relación directa con la capacidad hidrolítica del micelio de los fitopatógenos que presentaron los exudados y extractos de estas semillas. Esta alta actividad hidrolítica permitiría sugerir que

efectivamente las quitinasas presentes en las semillas tratadas y en sus exudados tienen un importante rol en el control biológico de fitopatógenos radicales en tomate.

Estos resultados fueron concordantes con los hallazgos de Mezui M'ella, Cotes y Semal en 1993, quienes argumentaron que el efecto benéfico de la pregerminación en las semillas se podría explicar en parte por el hecho de que al liberarse los exudados de la semilla durante la pregerminación se reduce la posibilidad de ataque por parte de los fitopatógenos. Adicionalmente, la combinación de la técnica de pregerminación controlada con el biocontrolador, facilita la colonización y establecimiento por parte de éste sobre la semilla, asegurando así la actividad biocontroladora. Cotes en 1993 reportó que *T. koningii* aplicado en combinación con la pregerminación controló a los fitopatógenos *Pythium splendens* y *R. solani* en frijol, ya que además de los aspectos mencionados, las semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* sufren un significativo incremento en la actividad de las enzimas hidrolíticas α -1,3 glucanasas y endoquitinasas, las cuales demostraron su capacidad para hidrolizar el micelio de los fitopatógenos.

ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE EXTRACTOS DE SUELO SOBRE MICELIO VIVO Y MUERTO DE LOS FITOPATÓGENOS

Para estudiar la actividad quitinolítica de las semillas tratadas y no tratadas con *T. koningii* en suelo, se realizó una cinética de obtención de los extractos del suelo durante 7 días, sembrando semillas no pregerminadas (NP), pregerminadas en presencia de *T. koningii* (P +TH) y pregerminadas (P), para así determinar el momento en el que se obtuviera la máxima actividad quitinasa. Con estos extractos de suelo obtenidos diariamente, se hizo la determinación de la actividad exo y endoquitinasa, utilizando quitina coloidal como sustrato de la reacción (Figura 4), encontrándose que la máxima actividad para todos los tratamientos se presentó en los extractos obtenidos dos días después de haber incubado el suelo. Dicha actividad correspondió a endoquitinasas.

El extracto de suelo obtenido al segundo día de incubación, sembrado con las semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* mostró al utilizar quitina coloidal como sustrato de la reacción, mayor actividad endoquitinasa (expresada como $\mu\text{g N-AG}/\mu\text{g Proteína total} \cdot \text{h}$) que todos los demás tratamientos, siendo ésta de 6,4. Estos resultados fueron seguidos por los registrados por los extractos de suelo sembrados con semillas pregerminadas, en los cuales se observó una actividad endoquitinasa de 3,5. Los extractos de suelo sembrado con semillas no pregerminadas presentaron una actividad de $0,9 \mu\text{g N-AG}/\mu\text{g proteína total} \cdot \text{h}$. Los anteriores tratamientos fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), según el análisis d.m.s.

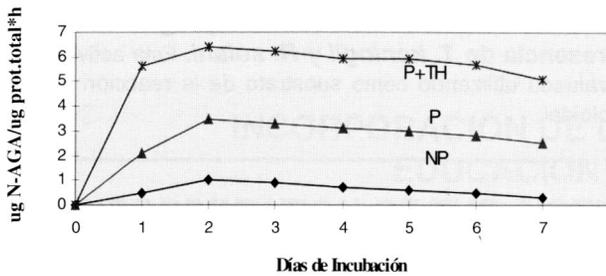


Figura 4. Cinética de actividad endoquitinasa de extractos de suelo sembrados con semillas de tomate sometidas a diferentes tratamientos, al utilizar quitina coloidal como sustrato de la reacción. Semillas pregerminadas y tratadas con el antagonista (P+TH), semillas pregerminadas (P), semillas no pregerminadas (NP). $p < 0,005$ (a,b,c)

También se evaluó la actividad endoquitinasa de los extractos de suelo obtenidos después del segundo día de incubación, sobre micelio vivo y muerto de *R. solani* y de *F. oxysporum* muerto, mediante una cinética de hidrólisis miceliar (durante 7 horas). Y es así que para el micelio muerto de ambos fitopatógenos, también se observó que la cinética de hidrólisis de los extractos de suelo, sobre los diferentes sustratos de reacción evaluados, dependió del tratamiento que la semilla hubiera sufrido.

Al utilizar micelio vivo de *R. solani* y de *F. oxysporum* como sustratos de la reacción enzimática, el pico de actividad endoquitinasa para semillas no pregerminadas, semillas pregerminadas y semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* fue a la quinta hora de reacción enzimática.

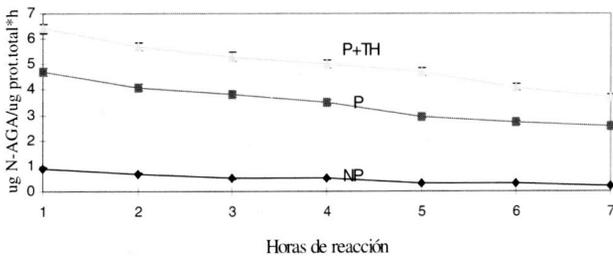


Figura 5. Efecto de la pregerminación sobre la actividad endoquitinasa de extractos de suelo extraídos después de dos días de incubación. La actividad enzimática fue obtenida utilizando quitina coloidal como sustrato de la reacción. Semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (P+TH), semillas pregerminadas (P), semillas no pregerminadas (NP). $p < 0,05$ (a,b,c).

Ahora bien, comparando los resultados de la actividad hidrolítica de los exudados y extractos de semilla con la actividad de los extractos de suelo, se observó que en estos últimos se produjo una reducción bien marcada en la actividad enzimática. Es posible que el suelo, a pesar de encontrarse en condiciones estériles, simule muy bien las condiciones

reales de desafío a las cuales deben enfrentarse estas enzimas. Según Jaleed *et al.*, 1987 la producción y actividad de éstas podría verse afectada por el pH del suelo, ya que el pH del suelo utilizado era de 4,8, mientras que el reportado como óptimo está entre 5 a 7, las partículas coloidales que capturan o atrapan a las enzimas también podrían haber reducido su actividad, la producción de proteasas propias del antagonista o del fitopatógeno sería otro factor a considerar y la temperatura de incubación ya que la utilizada fue de 25 °C y la reportada como óptima para las enzimas es de 37 °C.

Existen evidencias que señalan que con el uso de *Trichoderma* spp., es posible reducir la incidencia de *R. solani* en rábano, cuando el suelo es enriquecido con una fuente de carbono como quitina o laminarina (Sneh *et al.*, 1971 y Henis *et al.*, 1978). Adicionalmente, Mitcheli, en 1963, reportó que en suelos enriquecidos con paredes muertas de *Fusarium oxysporum*, f.sp. *phaseoli*, se disminuía la incidencia de este fitopatógeno en fríjol, lo que está en relación con los resultados presentados en la figura 6, en donde se observó la sensibilidad a la hidrólisis por parte del micelio de los fitopatógenos. Esta sensibilidad a la hidrólisis podría estar demostrando la importancia de las quitinasas en la protección biológica de las semillas.

En 1994 Cotes *et al.*, encontraron una correlación positiva entre la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. sobre los agentes causantes del volcamiento y los niveles de actividad quitinasa en suelo.

De otra parte, en el único tratamiento en donde se detectaron niveles de actividad exoquitinasa, fue en los extractos de suelo sembrado con semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* y de *R. solani*. Esta última actividad se manifestó durante los siete (7) días del seguimiento, aunque nunca superó la actividad de las endoquitinasas durante este tiempo (Figura 7).

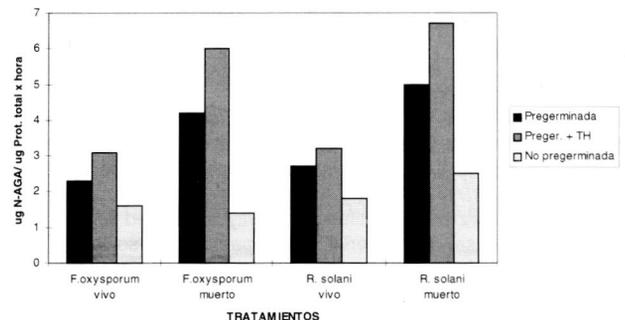
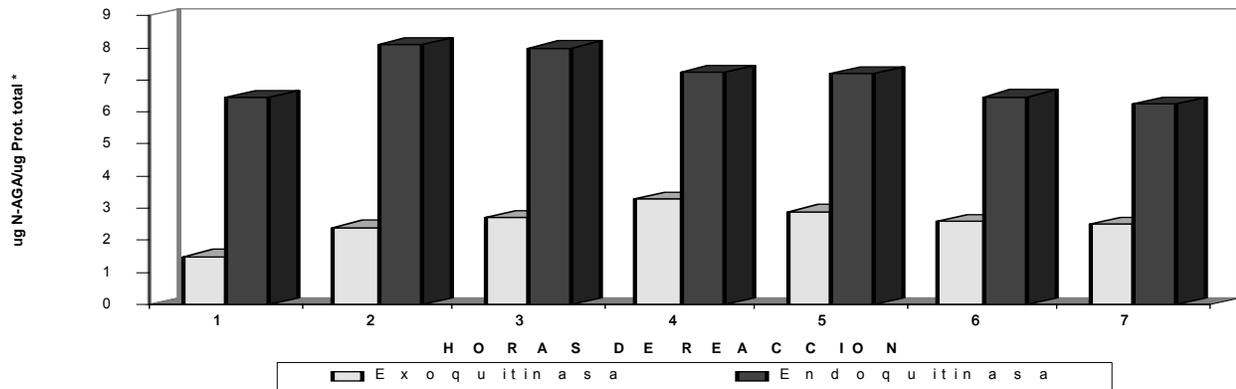


Figura 6. Actividad endoquitinasa de extractos de suelo provenientes de diferentes tratamientos sobre micelio vivo y muerto de *R. solani* y *F. oxysporum*.

Esto permitiría pensar que existe un sinergismo en la actividad hidrolítica de las enzimas de las semillas (endoquitinasas) y de las enzimas del antagonista (exoquitinasas) y que *T. koningii* estimula procesos metabólicos en las semillas. Lo anterior corrobora, los

beneficios que ofrece la combinación de la pregerminación controlada de semillas y *Trichoderma* spp. para el control biológico de fitopatógenos del suelo.

Figura 7. Actividad exo y endoquitinasa de extractos de suelo sembrado con semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* y *R. solani*. Esta actividad fue evaluada utilizando como sustrato de la reacción quitina coloidal.



BIBLIOGRAFÍA

- Cotes, A.M., Thonart P and P., Lepoivre.** 1994. Relationship Between the Protective Activities of Several Strains of *Trichoderma* against damping-off Agents and their Ability to Produce Hydrolytic Enzymes Activities in Soil or in Synthetic Media. Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent. Gante, Belgica. 59; 931-941.
- Cotes A.M., Lepoivre P., Semal J.** 1996. Correlation Between Hydrolytic Enzyme Activities Measured in Bean Seedlings after *Trichoderma koningii* Treatment Combined with Pregermination and the Protective Effect Against *Pythium splendens*. European Journal of Plant Pathology. 102; 497-506.
- Curl E.A.** 1982. The rhizosphere. Plant Disease. 66(7); 624-630
- Geremia,R., Jacobs,G.H., Goldman,M and Herrera,E.** 1990. Induction and Secretion of Hidrolytic Enzymes by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Laboratorium voor Genetika. Belgica.
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway,R.M., DI Pietro, A., Peterbauer,C., Tronsmo,A.** 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum* Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. The American Phytopathological Society. 83:313-318.
- Hartman,J. Fletcher,J.** 1991. *Fusarium* crown and root of the tomatoes in the UK.Plant. Pathology.40:82-92.
- Henis, Y., A. Ghaffar, and R. Baker.** 1978. Integrated Control of *Rhizoctonia solani* Damping -off of Radish: Effect of Succesive Plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on Pathogen and Disease. Phytopathology. 68; 900-907.
- Jaleed, S.,Baker.R.** 1987. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 77; 182-189.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway,R.M., DI Pietro, A., Woo, S.L.** 1993. Tronsmo,A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. The american Phytopathological society. 83: 303-307.
- Matthieu H.A., Joosten J., Pierre J.G.** 1989. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3 b-glucanases and chitinases. Plant physiology. 89:945-951.
- Mezui Mella, J.G., Cotes, A.M., Lepoivre, J.** 1993. Semal. *In vitro* evaluation of seed priming and *Trichoderma* treatment for the biological control of damping-off. Diseases and Insects in forest nurseries, Dijon France). 189-196.
- Mitchell, R.** 1963. Addition of Fungal Cell-Wall Components to Soil for Biological Disease Control. Phytopathology. 53: 1068-1071.
- Mohamed,C. and Benhamou, N.** 1990. Cytochemical Aspects of Chitin Breakdown During the Parasitic Action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology.1406-1413.
- Paulot,V., Holzer,F.M., y Walling L.L.** 1991. Diferential expression of tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. Molecular Plant Microbe Interactions. 4; 284-292.
- Pegg,G.C., Vessey, J.C.** 1973. Chitinase activity in *Lycopersicon esculentum* and its relationship to the in vivo lysis of *Verticillium albo-atrum* mycelium.Physiological Plant Pathology. 3:207-222.
- Pegg,G.C., Young,D.H.** 1981. Changes in glycosidase activity and their realtionship to fungal colonization during infection of tomato by *verticillium albo-atrum*.Physiological Plant Pathology. 19:371-382.
- Potgieter,H.J., and alexander,M.** 1966. Susceptibility and Resistance of Several Fungi to Microbial Lysis. Journal of Bacteriology. Apr: 1526-1532.
- Reissig, J.L., J.L. Strominger., L.F. Leloir.** 1956. A Modified Colorimetric Method for the Estimation of N-Acetylmino Sugars. Journal Biological Chemistry. 217: 959-966.
- Ridout,C.J., Coley, J.R. Lynch, J.M.** 1986. Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. Journal of General Microbiology. 132:2345-2352.
- Saldamando C.** 1996. Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate (*Lycopersicum sclulentum*) mediante una combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii* Oudemans. Santafe de Bogotá. Trabajo de Grado. Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Carrera de Biología.
- Sivan. A., I. Chet.** 1989. Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology. 135; 675-682.
- Sneh, B. y Y. Henis.** 1971. Production of Antifungal Substances Active Against *Rhizoctonia solani* in Chitin-Amendend Soil. Phytopathology. 62: 595-600.
- Wubben J.P., Matthieu H.A., Joosten J.** 1992. Subcellular localization of plant chitinases and 1,3 b-glucanases in *Cladosporium fulvum* (syn *Fulvia fulva*) infected tomato leaves. Physiological and Molecular Plant Pathology. 41; 23-32.