

INDUCCIÓN DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE PARED CELULAR DE HONGOS DE *Verticillium fungicola* Y SU INTERACCIÓN CON HONGOS FITOPATÓGENOS (ELICITORS OF FUNGAL CELL WALL DEGRADING ENZYMES PRODUCTION BY *Verticillium fungicola* AND ITS INTERACTION WITH PHYTOPATHOGENIC FUNGI)

Mariana Iglesias Arroyo, Nery Paniagua Paniagua, C. Patricia Larralde Corona² y Keiko Shirai*

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros. Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa. C.P.09340. México, D.F. Fax: 58 04 47 12, Tel: 58 04 49

21. ² Centro de Biotecnología Genómica-IPN, A.P. 152, Reynosa 88710, Tamaulipas. E-mail: smk@xanum.uam.mx

Abstract. Modern agriculture demands the use of biological control agents against phytopathogenic fungi, and studies on fungal mycoparasitism are indeed needed. Accordingly, we investigated the production in submerged culture of β -1,3-glucanases and chitinases by *Verticillium fungicola*, using different sources of carbon and nitrogen, and antagonism with three genus of phytopathogenic fungi (*Macrophomina*, *Aspergillus* and *Penicillium*) assessed in microcultures on dextrose potatoes agar. The presence of fungal walls and chitin elicited the production of extracellular glucanases and chitinases. Besides, it was observed a positive effect on enzyme induction by adding ammonium sulphate as an additional nitrogen source (figure 1). The confrontation on agar plates of *V. fungicola* and phytopathogenic fungi resulted on the formation of inhibition halos around *V. fungicola* colonies (figure 2). At the microscopic scale, the presence of *V. fungicola* caused important damages on the hyphae of all the phytopathogenic fungi tested, and it was possible to observe the formation of apresoria like structures, that penetrated and ruptured of the phytopathogens cell walls (figures 3 and 4).

Introducción. La agricultura requiere de la urgente disminución o eliminación del uso de productos químicos tanto en fertilización como en la lucha contra las enfermedades y plagas de las plantas. Una alternativa es el control biológico, que incluye microorganismos y enzimas como quitinasas y β (1-3)-glucanasas en bioinsecticidas. Además las β (1-3)-glucanasas tienen otras aplicaciones como clarificación de cerveza y coadyuvante en la filtración del mosto en la elaboración de vinos. Por otro lado, las quitinasas se han utilizado para hidrolizar quitina y producir quitoooligosacáridos y N-acetilglucosamina. El estudio del género *Verticillium* ha despertado gran interés por la producción de quitinasas en cultivo líquido y sólido [1], sin embargo reportes de β (1-3)-glucanasas producidas por este hongo son escasos. El propósito de este trabajo fue evaluar la producción de quitinasas y β (1-3)-glucanasas por *Verticillium fungicola* que ha sido reportado como micoparásito, con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno; y su interacción con hongos fitopatógenos como *Macrophomina*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

Metodología. Microcultivos duales. Se realizaron microcultivos antagonísticos en agar de papa y dextrosa entre *Verticillium fungicola* y algunos hongos fitopatógenos (*Macrophomina* cepas Mp1 y Mp2, *Aspergillus niger*, y *Penicillium* (cepas PH10 y PH13) incubándose durante 3 días a 25°C. Se hicieron observaciones con el microscopio óptico en la zona de contacto, midiéndose además los halos de inhibición.

Producción enzimática *Verticillium fungicola* (USDA 4519) fue utilizada para la producción de enzimas, la cual se hizo en un reactor de 1.5 L con medio Czapeck con paredes celulares al 0.02% y glucosa al 1% como fuentes de carbono (CPG), inoculando con esporas a una concentración de 1×10^7 esporas/mL, con tiempo de incubación de 144 horas, a una temperatura de 25°C y 180 rpm de agitación. La biomasa producida fue colectada y utilizada para inocular matraces Erlenmeyer de 125 mL con el medio MN que era el medio Czapeck modificado con glucosa al 0.1%, paredes celulares al 0.2%, quitina coloidal al 0.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.32 g/L), CaCl_2 (0.6g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6g/L), K_2HPO_4 (5g/L), y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05 g/L), con tiempo de incubación de 144 horas, tomando muestras por duplicado cada 24 horas. Medio Czapeck fue utilizado como control. La actividad quitinolítica se midió por la liberación de p-nitrofenol [2]. La actividad de β (1,3)-glucanasas se midió por la liberación de azúcares reductores a partir de laminarina [3] y la biomasa se midió por peso seco. Las paredes celulares se obtuvieron a partir de *Agaricus bisporus* según Zivanovich et al [4].

Resultados y Discusión. *Verticillium fungicola* (4519) es un hongo micoparásito aislado de *A. bisporus*, la producción de glucanasas y quitinasas fue determinada en cultivo sumergido en presencia de las paredes celulares de *A. bisporus* como inductor (figura 1). La producción de estas enzimas degradadoras de paredes celulares es parte determinante en el proceso infectivo, esto fue confirmado al evaluar su interacción y efecto antagonista contra hongos fitopatógenos (figuras 2, 3 y 4).

Comparando la producción de enzimas degradadoras contra los controles, se observó que la producción en estos últimos fue nula. Esto muestra que las paredes celulares y la quitina fueron inductores de β (1-3)-glucanasas y quitinasas, respectivamente. En cuanto a las diferencias entre los dos medios de cultivo, MN y CPG, que contenían inductores, de las actividades enzimáticas se observó que en el medio CPG la actividad gluconolítica fue detectada a partir de las 96h, tiempo en el cual ya se había consumido toda la glucosa y la máxima actividad de glucanasas fue a las 120h (60mU/ml) (figura 1). La producción de quitinasas solo se detectó después de las 120h, con muy bajos rendimientos (300mU/ml), esto debido a que la producción de quitinasas depende de la fuente de carbono en el medio siendo inducida por quitina, y las paredes celulares utilizadas contienen más glucano que quitina. La biomasa obtenida en este reactor se inoculó a matraces con medio MN, en el cual se substituyó el nitrato de sodio

por sulfato de amonio. La presencia de sulfato de amonio (MN) presentó un efecto positivo en la producción de las enzimas degradadoras de pared celular, la interacción de esta fuente de carbono con inductores fue previamente reportada [5]. Por otra parte, con el uso de micelio previamente adaptado las enzimas fueron producidas desde las primeras horas de cultivo y en mayor cantidad, es decir, se observó un incremento de los rendimientos obtenidos para glucanasas (160mU/ml) y para quitinasas (1340mU/ml) (figura 1). En los controles (medio Czapeck) el crecimiento fue mayor, mientras que la biomasa determinada en el medio MN fue baja debido a que el inóculo utilizado se encontraba en su etapa estacionaria (figura 1).

Al evaluar el efecto antagonista de *V. fungicola* contra los fitopatógenos se observó la formación de halos claros donde posiblemente las enzimas degradadoras de pared celular inhibieron el crecimiento del fitopatógeno, el cual evitó el contacto con *Verticillium* (figura 2). En las observaciones realizadas al microscopio óptico en los microcultivos muestran el daño al micelio y a la integridad celular del fitopatógeno, ligada a la aparición de estructuras reportadas como apresorio [6], que se adhieren a la superficie del fitopatógeno, penetrando y degradándolo (figuras 3 y 4)

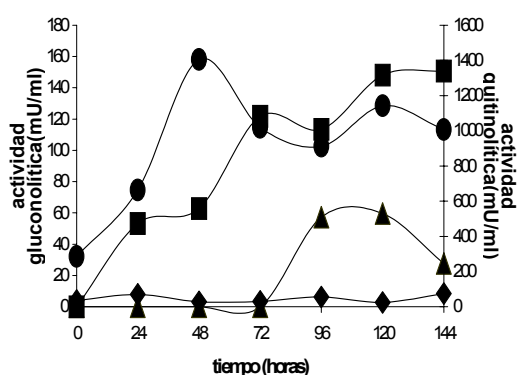


Figura 1. Actividades glucanolíticas MN ●, CPG ▲ y quitinolíticas MN ■, CPG ◆ de *V. fungicola* a 25° C y 180 rpm.

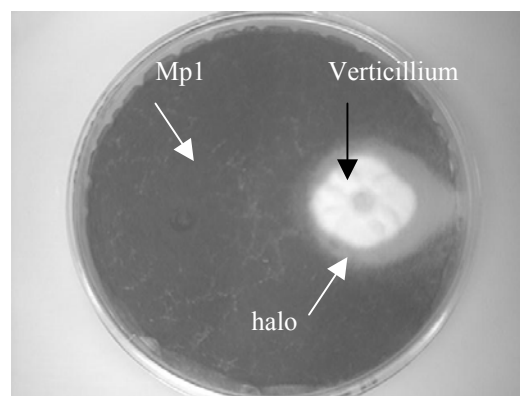


Figura 2. Actividad antagonista de *V. fungicola* contra *Macrophomina* Mp1.

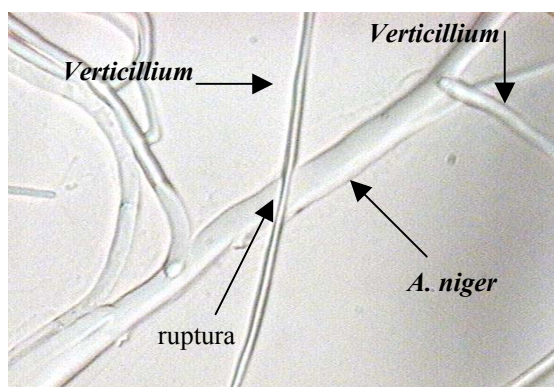


Figura 3. Observación microscópica a 100x en microcultivo dual de *V. fungicola* y *A. niger*.

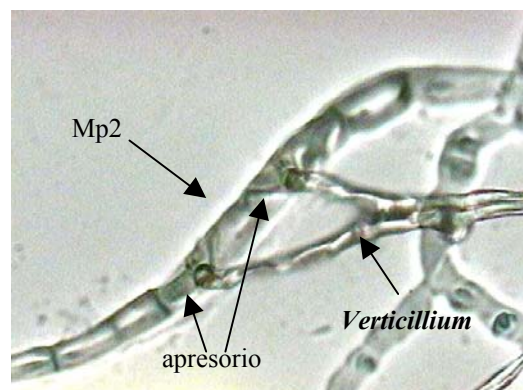


Figura 4. Observación microscópica a 100x en microcultivo dual de *V. fungicola* y *Macrophomina* Mp2

Referencias

1. Matsumoto Y, Revah S., Saucedo G., Shirai K. 2001. Chitinases production in solid state fermentation and submerged fermentation by *Verticillium lecanii* with silage shrimp as substrate. Chitin Enzymology. Editado por R.A.A. Muzzarelli, Atec Edizioni, Italia.
2. Coudron T. A.; Kroha M. J. y Ignoffo. C.M; Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. 1984. Comp. Biochemistry. Physiology. 79B(3): 339-348.
3. Vázquez-Garcidueñas, S. Leal, C. Herrera, A. 1998. Analysis of the β -1,3-Glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 64 (4): 1442– 1446.
4. Zivanovic, S. Buescher, R. Kim, K. 2000. Textural Changes in Mushrooms (*Agaricus bisporus*) Associated with Ultrastructure and Composition. Journal of Food Science, 65(8):1404-1408
5. Garisto, B. Harman, G. 2001. Interaction of Ammonium, Glucose, and Chitin Regulates the Expression of Cell Wall-Degradating Enzymes in *Trichoderma atroviride* Strain P1. Applied and Environmental Microbiology, 67: 5643-5647.
6. Deising H.B, Werner S., Wernitz M. 2000. The role of fungal appressoria in plant infection. Microbes and infection, 2, 1631-1641.