

## EVALUACIÓN DE UNA QUITINASA RECOMBINANTE DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LOS HONGOS *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*

### EVALUATION OF A RECOMBINANT CHITINASE FROM *Trichoderma harzianum* AND ITS EFFECT ON *Botrytis cinerea* AND *Alternaria alternata* FUNGI

Lorena Niedmann<sup>1\*</sup>, Claudio Sandoval<sup>2</sup>, y Luis Meza-Basso<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile.  
E-mail: lniedman@utalca.cl

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile.  
E-mail: csandova@utalca.cl

<sup>3</sup> Universidad de Talca, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile. E-mail: mezasbas@utalca.cl  
Autor para correspondencia E-mail: lniedman@utalca.cl

#### RESUMEN

La quitina es el principal constituyente de la pared celular de la mayoría de los hongos y son las quitinasas las encargadas de su degradación. Estas son proteínas relacionadas con la patogenicidad y respuesta defensiva de las plantas ante la infección de algún patógeno. En este estudio un gen de quitinasa, indexado como Chit33, fue aislado desde una cepa nativa de *Trichoderma harzianum*, para ser expresado en *Escherichia coli* (*E. coli*). La actividad del extracto proteico parcialmente purificado fue evaluado sobre los hongos *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*. Los resultados indican una reducción en un 50% en la velocidad de crecimiento e inhibición del crecimiento micelial. En cuanto a su estructura se observaron hifas atrofiadas y lisadas.

**Palabras clave:** *Trichoderma*, *Botrytis*, *Alternaria*, quitinasa.

#### ABSTRACT

Chitin is the main component of the cell wall of most fungi and the chitinase is essential for chitin degradation. The chitinase are proteins associated with pathogenicity and plant defensive responses to many pathogen infections. In this study, a gene that codified for a chitinase, indexed as Chit33, was isolated from a native *Trichoderma harzianum* strain. Gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The activity of the partially purified protein extract was evaluated against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternate* fungi. The results showed a 50% reduction in the growth rate and inhibition of mycelial growth. Regarding structure, atrophied hyphae were also observed.

**Key words:** *Trichoderma*, *Botrytis*, *Alternaria*, chitinase.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por hongos son uno de los principales problemas en la agricultura. Se estima que las pérdidas a consecuencia de éstos puede llegar al 25% en países desarrollados y a un 50% en países en vías de desarrollo (Kirubakaran y Sakthivel, 2007).

De los hongos utilizados para el biocontrol de patógenos fúngicos de suelo, varias especies de *Trichoderma* han concitado una mayor atención. Su accionar resulta de una combinación de micoparasitismo, producción de metabolitos antifúngicos y de proteínas relacionadas a la defensa contra patógenos (PR) (Stefonova et al., 1999).

Las proteínas relacionadas a patógenos (PR) se acumulan en respuesta a una infección causada por un patógeno o bien en respuesta a señales que se relacionan con el sistema de defensa de las plantas. Estas proteínas fueron identificadas, inicialmente, en hojas de tabaco que mostraron una reacción de hipersensibilidad al virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Ordeñana, 2002). Recientemente, han sido clasificadas en once grupos (Gutierrez y Torre-Almaráz, 2007) y la mayoría de estas proteínas actúan dañando las estructuras del parásito. Las proteínas denominadas PR-1 y PR-5 interactúan con las membranas plasmáticas, mientras que las  $\beta$  1,3 glucanasas (PR-2) y las quitinasas (PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11) tienen como sustratos los  $\beta$  1,3 glucanos y a la quitina, ambos componentes esenciales de las paredes celulares de muchos de los hongos superiores (Fritig et al., 1998; Ordeñana, 2002). Entre las endoquitinasas más importantes que presenta *Trichoderma harzianum* se encuentran Chit-33 y Chit-42. En ambos casos se ha reportado actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *A. solani* y *Botrytis cinerea* (Duo-Cuan, 2006). La secuencia aminoacídica de la quitinasa Chit-33 tiene una homología significativa con las quitinasas de plantas de la clase III, como también diferencias sustanciales, a nivel bioquímico, con otras quitinasas de *Trichoderma* (Dana et al., 2006). Lo anterior podría contribuir al desarrollo de sinergismo entre las quitinasas propias de las plantas y la quitinasa extraída desde *Trichoderma* (Chit-33), favoreciéndose de esta forma la resistencia hacia diferentes patógenos.

La quitina es el componente mayoritario del exoesqueleto de insectos y de las paredes de hongos. Los cuerpos de estos últimos consisten, generalmente, en filamentos ramificados conformados en un 80 a 90% de polisacáridos, siendo la quitina el constituyente más frecuente (Khan y Shih, 2004). Este componente de la pared, junto a otros polisacáridos, proteínas y lípidos, otorga al

organismo protección ante un ambiente hostil (Seitrennikoff, 2001) por cuanto la disrupción de esta pared los hace vulnerables a la acción de agentes externos. Sin embargo, la quitina se encuentra presente en el grupo taxonómico Oomicetes cuya pared está constituida por celulosa y glucanos, principalmente. Un número importante de hongos fitopatógenos presentan quitina en su estructura, destacándose por su connotación fitopatogénica *B. cinerea* y *A. alternata*. Estos hongos imperfectos o Deutoromycetes (hongos asexuales) afectan a hortalizas, plantas ornamentales y frutales en todo el mundo, ocasionando grandes pérdidas del punto de vista económico (Agris, 2005).

Además la quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Merzendorfer, 2003; Matroudi et al., 2008). Este sustrato es degradado por enzimas líticas, denominadas quitinasas, que se encuentran en diversos organismos, tales como bacterias, virus, hongos, plantas y animales, tanto invertebrados como vertebrados. En hongos, las quitinasas cumplen funciones autolíticas, nutricionales y morfogenéticas; en bacterias cumplen un papel en la digestión de quitina para la obtención de energía a partir de ésta; en crustáceos e insectos, las quitinasas participan en los procesos de muda, mientras que en las plantas actúan en la defensa y el desarrollo (Dahiya et al., 2006; Ping-mei et al., 2011).

Las quitinasas son enzimas que degradan quitina y dada su actividad son consideradas como enzimas antifúngicas, que impiden la proliferación de hongos, en general. Pertenecen a la familia de proteínas "relacionadas con patogénesis" (PR), catalogadas como PR-3, siendo su característica principal la capacidad de hidrolizar enlaces  $\beta$ -(1, 4) de las unidades de N-acetil-D-glucosa-2-amina (Slusarenko et al., 2000).

En general, las quitinasas están clasificadas en tres familias y poseen un tamaño molecular que varía entre los 26 y 43 kDa. La familia 18, presente en bacterias, hongos, levaduras, virus, plantas y células animales; la familia 19 que se encuentra exclusivamente en plantas y la familia 20, consistente en  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas halladas en bacterias, hongos y vertebrados superiores (De la Cruz et al., 1992; Seitrennikoff, 2001; Duo-Chuan, 2006).

Estas clasificaciones se basan en las diferencias encontradas entre estas familias, tanto a nivel de secuencia nucleotídica como en su estructura proteica tridimensional. Es así como las quitinasas de la familia 18 presentan 5 dominios: la región N-terminal del péptido señal, la región rica en serinas/treoninas del dominio catalítico, el dominio de unión a quitina y la región C-terminal (Duo-Chuan, 2006). Sin embargo, numerosas quitinasas han perdido los últimos tres dominios sin dejar de

ser funcionales. Un ejemplo de lo anterior corresponde a una quitinasa (33 kDa) que fue extraída de un aislado nativo de *Trichoderma harzianum* y que se caracteriza por exhibir una actividad controladora de hongos patógenos de plantas (Prakash et al., 2001). Esta quitinasa 33 (*chit33*) se induce en presencia de restos de paredes celulares de hongos como también, por la presencia de quitina coloidal, o por efecto de la ausencia de fuentes de carbono apropiadas (Duo-Chuan, 2006; Kirubakaran y Sakthivel, 2007).

Estudios recientes muestran que la expresión de genes de quitinasas en plantas es una alternativa para el control de infecciones causadas por diversos hongos patógenos. Existe información además que algunas quitinasas aplicadas exógenamente tendrían un efecto deletéreo sobre insectos (Saguez et al., 2005). La acción sobre los insectos se explicaría por la presencia de una membrana peritrófica, compuesta de quitina, que recubre la zona media intestinal (Kramer, 1997; Merzendorfer, 2003).

En el presente trabajo se evaluó el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) y *Alternaria alternata* (*A. alternata*), de una quitinasa nativa aislada desde *Trichoderma* cuyo gen fue amplificado y expresado en *Escherichia coli* (*E. coli*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Subclonación y expresión del gen quitinasa

Preliminarmente, se disponía de gen *chit33* clonado en el vector pCambia 2300 en el sitio de restricción *SpeI*. El inserto fue liberado con *SpeI* y ligado al vector pBluescript KS(+), previamente cortado con la misma enzima (Wiwat et al., 2002). Con el vector recombinante *pkS-chit33* se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (F $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r<sub>k</sub>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *deoR thi-1 supE44* $\Delta$ -*gyrA96 relA1* $\lambda$ ). Para este fin, se sembraron en medio Luria Bertani (LB) suplementadas con ampicilina 50  $\mu$ g\*mL<sup>-1</sup> (Sambrook et al., 1989) incubándolo por 16 h. Al cabo de este tiempo se inoculó 100 mL de medio LB suplementado con ampicilina (50  $\mu$ g\*mL<sup>-1</sup>) en un frasco de cultivo de 250 mL a 37°C con agitación vigorosa. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 0,9 (DO) a 600 nm, se añadió isopropil  $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) y luego de 5 h de inducción, la biomasa fue colectada mediante centrifugación a 5000 rpm por 10 min a 4°C (Eppendorf, modelo 5415 C, Berlín, Alemania).

### Purificación parcial de la proteína recombinante

El precipitado resultante fue resuspendido en un tampón de lisis (50 mM de glucosa, 25 mM Tris

HCl y 10 mM EDTA, pH 8,0), sonificado y centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4°C (Eppendorf, modelo 5415 C, Berlín, Alemania). Se analizaron las proteínas presentes mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, tanto en la fracción soluble (sobrenadante) como en la fracción sedimentada, midiéndose su concentración a través del método de Bradford.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (12%) en condiciones desnaturalantes, según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Las proteínas suspendidas en tampón Laemmli (Tris HCl 1 M pH 6,8; SDS, Glicerol, EDTA Na 0,1 M y 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol) fueron centrifugadas brevemente y llevadas a ebullición por 5 min antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis fue conducida a 30 mA por tres horas. El gel fue fijado en una solución al 30% etanol y 10% ácido acético (v/v) durante 30 minutos y teñido con una solución colorante (0,3% de azul brillante de Coomassie R-250, 50% metanol y 10% ácido acético).

### Cultivo de hongos fitopatógenos

Las cepas de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* fueron mantenidas en agar papa dextrosa (PDA) a una temperatura constante de 25°C. Estos hongos fueron obtenidos del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca.

### Bioensayo del extracto proteico sobre el crecimiento y efecto inhibitorio sobre dos hongos de importancia agrícola (*B. cinerea* y *A. alternata*)

Para analizar el efecto en la velocidad de crecimiento del hongo *B. cinerea*, se sembró un trozo de agar (PDA), conteniendo el hongo en el centro de la placa. Previo a la siembra del bloque de agar con *Botrytis*, se depositó empleando una micropipeta en la superficie el extracto que contenía la proteína recombinante (22 mg mL<sup>-1</sup>) o con agua destilada como control. Las placas fueron incubadas a 25°C y se realizaron mediciones de crecimiento cada 24 h. Estas mediciones consistieron en medir el radio del crecimiento en sus cuatro puntos cardinales. El ensayo concluyó cuando la placa control alcanzó su máximo crecimiento. Los tratamientos se llevaron a cabo con tres repeticiones (n = 3).

El efecto inhibitorio del extracto sobre *B. cinerea* y *A. alternata* se determinó con el método del cilindro (Johnson, 1972).

Una vez que el hongo alcanzó un crecimiento de alrededor 3 cm de diámetro, se procedió a extraer cuatro discos de agar con medio utilizando un sacabocado estéril. Luego se agregó en estos orificios diferentes concentraciones del extracto proteico (5,5 mg mL<sup>-1</sup> a 22 mg mL<sup>-1</sup>). Las placas

fueron incubadas a 25°C hasta que el micelio de la zona de control alcanzó el perímetro de la placa. Para ambos ensayos se usó una concentración máxima de proteínas de 22 mg·mL<sup>-1</sup> determinadas por el método de Bradford. Esta concentración corresponde al extracto proteico original.

#### Análisis microscópico de la actividad quitinásica

La deformación del micelio (*B. cinerena* y *A. alternata*) fue observada en la zona de inhibición con un microscopio óptico con 400X de aumento (Nikon Eclipse E-4000) y tinción con lactofenol (Torres et al., 1988). Este procedimiento consistió en hacer crecer un micro-cultivo de *Botrytis* en un cuadrado de agar de 1 cm<sup>2</sup>, cubierto con un cubre objeto, en presencia y ausencia del extracto proteico. Una vez establecido el patógeno sobre el cubre objeto, éste fue depositado sobre un porta objeto que contenía una gota de lactofenol.

#### Diseño experimental

Los experimentos se desarrollaron mediante un diseño completamente al azar en arreglo simple. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y la comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Pedroza y Dicovsky, 2007).

### RESULTADOS

En este estudio, un gen de quitinasa aislado de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* fue

subclonado para ser expresado en *E. coli*. La proteína recombinante fue expresada y evaluada en ensayos *in vitro* contra dos hongos fitopatógenos (*B. cinerea* y *A. alternata*).

A partir de las bacterias transformadas con el vector pCambia-2300 se liberó un fragmento de 1420 pb, correspondiente al gen *chit33*, a través de una doble digestión (*Pst*I/*Spe*I). El gen *chit33* expresado bajo el promotor constitutivo 34S fue expresado en *E. coli*. El extracto proteico, conteniendo la enzima recombinante, fue empleado para evaluar el efecto sobre la velocidad de crecimiento y el poder inhibitorio sobre los hongos *B. cinerea* y *A. alternata*.

El análisis electroforético del extracto proteico, obtenido mediante la inducción del vector de expresión pBluescript KS(+) en *E. coli*, reveló una banda a la altura de los 33 kDa que corresponde al peso molecular de la quitinasa (Chit33) (Dana, 2006). Esta banda pudo ser apreciada tanto en el carril donde se analizó el extracto proteico soluble como en la muestra proveniente del sedimento (Fig. 1). Datos concordantes con los observados por Matroudi et al. (2008).

Se originó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *B. cinerea* y de *A. alternata* (Figs. 2-3; d) al aplicar 200 µL (22 mg·mL<sup>-1</sup>) del extracto proteico. No se observó efecto inhibitorio o sobre el crecimiento al administrar sólo agua destilada (Figs. 2-3; a). Esta acción inhibitoria se mantuvo aún pasada una semana de haber agregado el extracto, demostrando que su efecto fue perdurable. Ade-

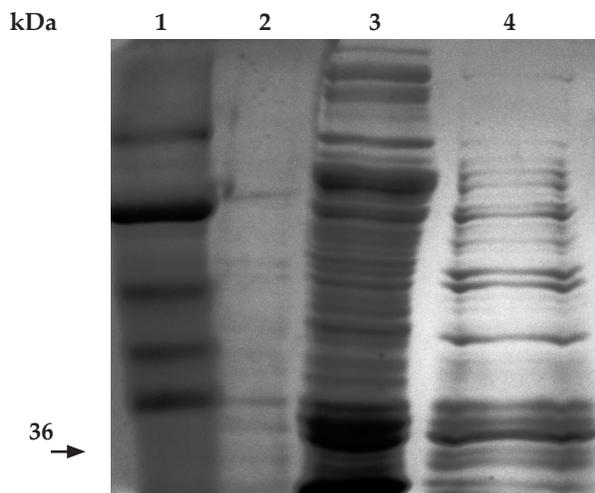


Fig. 1. Análisis SDS-PAGE. Carril 1, marcador de peso molecular (7B); Carril 2, proteínas totales extraídas desde *E. coli* conteniendo sólo el vector pBluescript; Carril 3, sedimento con proteínas totales extraídas desde *E. coli* conteniendo pBluescript-*Chit33*, y Carril 4, sobrenadante con proteínas totales extraídas desde *E. coli* conteniendo pBluescript-*Chit33*.

Fig. 1. SDS-PAGE analysis. Lane 1, molecular weight markers (7B); Lane 2, total proteins from *E. coli* containing only pBluescript; Lane 3, sediment with total proteins from *E. coli* harbouring *Chit33* gene; and Lane 4, supernatant with total proteins from *E. coli* harbouring *Chit33* gene.

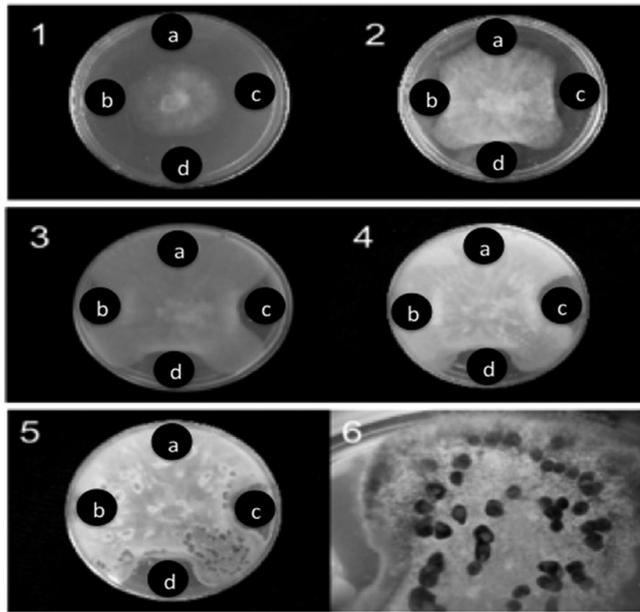


Fig. 2. Efecto inhibitorio del extracto proteico (quitinasa) sobre *B. cinerea*. a: control solución tampante; b: 50 µL del extracto; c: 100 µL del extracto; y d: 200 µL del extracto.

Placa Petri 1: 0 h después de agregar el extracto; Placas Petri 2, 3, y 4: 24, 48 y 72 h después de agregar el extracto, respectivamente; Placa Petri 5: 6 días después de agregar el extracto, formación esclerocios; y Placa Petri 6: esclerocios.

Fig. 2. Inhibitory effect of the protein extract (chitinase) on *B. cinerea*. a: buffer solution control; b: 50 µL of the extract; c: 100 µL of the extract, and d: 200 µL of the extract.

Petri Plate 1: 0 h after adding the extract; Petri Plate 2, 3, and 4: 24, 48 and 72 h after adding the extract, respectively; Petri Plate 5: 6 days after adding the extract and esclerotia formation; and Petri Plate 6: esclerotia.

más, en el caso de *Botrytis*, la adición del extracto proteico tuvo como consecuencia la formación de esclerocios, estructuras típicas de resistencia que se generan bajo condiciones ambientales adversas (Fig. 2, placa 6).

Con el objeto de comprobar si el extracto proteico poseía un efecto fungicida sobre *Botrytis*, se extrajo un trozo de micelio de la zona de inhibición. Éste fue sembrado en una placa nueva sin la aplicación del extracto proteico, constatándose que el micelio presentó un crecimiento normal luego de 24 h de cultivo en el medio PDA (agar papa dextrosa). El resultado anterior indicaría que el extracto evaluado presentó sólo una actividad fungistática, pero no una actividad fungicida.

La tasa de crecimiento también se vio afectada, reduciéndose en un 50% aproximadamente por efecto del extracto proteico en comparación al control sin tratar (Fig. 4).

Las imágenes de las zonas de inhibición sobre los micelios de *B. cinerea* y *A. alternata* obtenidas con un microscopio óptico (Fig. 5), revelaron deformaciones, desplazamiento del contenido ci-

toplasmático, afinamiento y lisis de las paredes celulares (Fig. 5; B y D), mientras que el control mostró un crecimiento normal del micelio en ambos casos (Fig. 5; A y C).

## DISCUSIÓN

La existencia de quitina, como componente estructural de estos patógenos, explicaría el efecto detectado en los experimentos de inhibición (Figs. 2-3) que se observan para ambos hongos evaluados.

Se ha reportado que proteínas recombinantes expresadas en bacterias presentan con frecuencia una mayor concentración en su fase insoluble respecto a la fase soluble (Kirubakaran y Sakthivel, 2007). El presente estudio es coincidente con esos resultados, pues la quitinasa recombinante fue producida en mayor cantidad en la fracción insoluble (Fig. 1).

En la Fig. 4 se observa que la velocidad de crecimiento del hongo *B. cinerea* se vio reducida en un 50% en todo instante durante el ensayo, en comparación al control. Estos resultados indica-

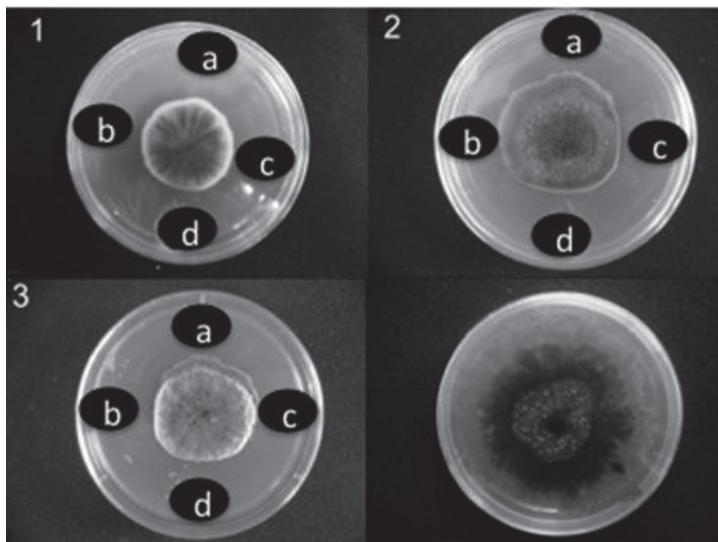


Fig. 3. Efecto inhibitorio del extracto proteico sobre *Alternaria alternata*. a: control solución tamponante; b: 50 µL; c: 100 µL; y d: 200 µL del extracto. Placa Petri 1: 0 h después de agregar el extracto; Placa Petri 2: 12 días después de agregar el extracto, crecimiento basal; Placa Petri 3: 12 días después de agregar el extracto, crecimiento aéreo; y Placa Petri 4: control sin extracto.

Fig. 3. Inhibitory effect of the protein extract on *Alternaria alternata*. a: buffer solution as control; b: 50 µL; c: 100 µL; and d: 200 µL of the extract. Petri Plate 1: 0 h after adding the extract; Petri Plate 2: 12 days after adding the extract; Petri plate 3: 12 days after adding the extract, aerial growth; and Petri Plate 4: control without extract.

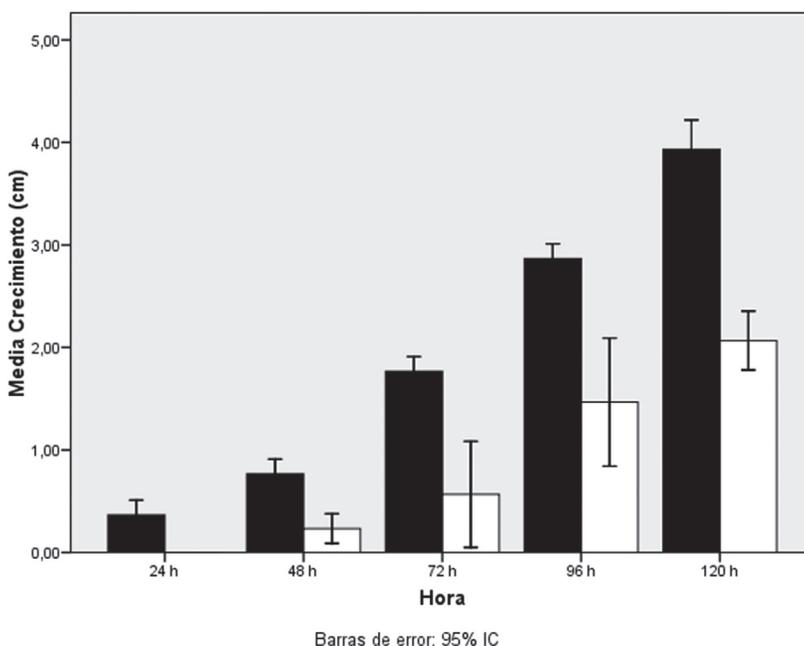


Fig. 4. Actividad del extracto proteico (quitinasa) sobre *B. cinerea* (n = 3). Barras negras control sin extracto proteico y barras blancas con extracto proteico.  
 Fig. 4. Protein extract activity (chitinase) on *B. cinerea* (n = 3). Black bars: control with no protein extract, and white bars: with protein extract.

rían una supresión del crecimiento del hongo, probablemente debido a la presencia de metabolitos antifúngicos en el extracto proteico. Este efecto fue perdurable en el tiempo, pues al cabo de 120 h la tasa de crecimiento se mantuvo en todas las repeticiones.

La observación al microscopio óptico reveló cambios a nivel estructural que podrían ser atribuibles a la acción de la quitinasa recombinante contenida en el extracto proteico. Al examinar en detalle la zona inhibitoria, se observó que la causa de este retraimiento puede estar asociado a una deformación y a la lisis de las hifas del hongo (Fig. 5). Estos resultados son concordantes con los encontrados por Mauch et al. (1988), quienes trataron diferentes tipos de hongos tanto con extractos proteicos conteniendo enzimas hidrolíticas, como con la respectiva enzima purificada. En ambos casos, los autores observaron hifas atrofiadas. Lo anterior podría ser atribuido a la pérdida del balance que existe entre la síntesis y degradación de los componentes de la pared celular de las hifas (quitina y glucano) bajo la acción tanto de quitinasas como glucanasas.

Otra observación se refiere a que las hifas crecen por su extremo terminal o apical, lugar que corresponde a la región de crecimiento más activo de la pared y que es más sensible a cambios de temperatura y luz. La observación al microscopio óptico permitió constatar que las zonas que presentaban deformación se concentraban en la región más cercana al ápice. Se podría pensar que la estructura quitinosa en formación parece ser la más sensible a la acción de las quitinasas.

El efecto directo del extracto celular sobre los micelios de *B. cinerea* y *A. alternata* se expresó en deformaciones del micelio, desplazamiento del contenido citoplasmático, afinamiento y lisis de las paredes celulares, resultados que ofrecen respuesta al origen de los cambios estructurales microscópicos originados por el contacto entre el patógeno y el extracto proteico que contiene la quitinasa recombinante.

Se ha encontrado en numerosos estudios que la acción biocontroladora de especies del género *Trichoderma* se relaciona con la síntesis activa de metabolitos y macromoléculas extracelulares con actividad micolítica (Cherif y Benhamou

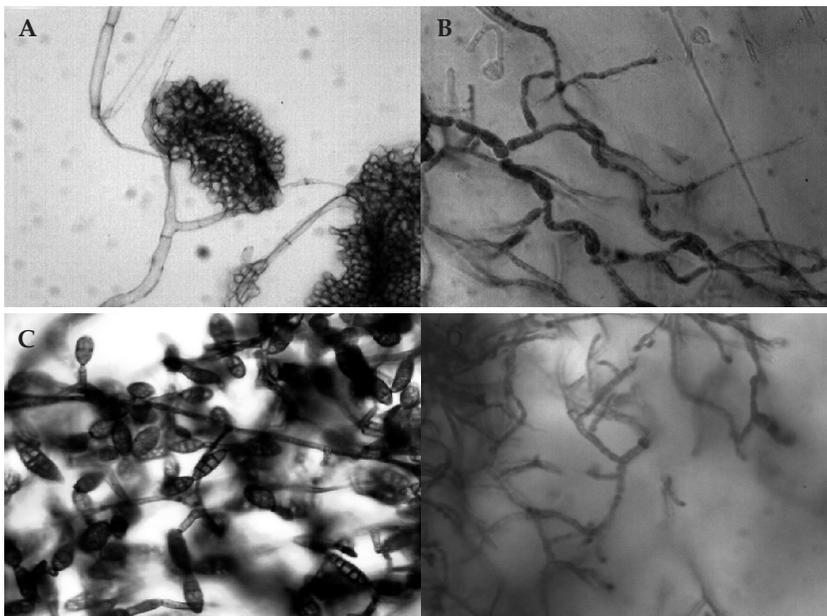


Fig. 5. Observación bajo microscopio óptico (400X) de hifas de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*. (A)-(C) Tratamiento control de *B. cinerea* y *A. alternata* respectivamente, mostrando un desarrollo normal de micelio junto a los conidióforos, y (B)-(D) Crecimiento del micelio en la zona de inhibición mostrando deformación de las hifas y ausencia de estructuras reproductivas (*B. cinerea* y *A. alternata*, respectivamente).

Fig. 5. Observation under optical microscope (400X) of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* mycelia. (A)-(C) Control treatments of *B. cinerea* and *A. alternata* respectively, showing a normal development of the mycelia and the conidiophores, and (B)-(D) Mycelium growth in the inhibition zone showing deformation of hyphae and absence of reproductive structures (*B. cinerea* and *A. alternata*, respectively).

1990; Uloha y Peberdy 1991). En la actualidad, se está explorando la manipulación genética de los genes de proteinasas con el propósito de incrementar la actividad biológica de *T. harzianum*. Por otra parte, investigaciones recientes indican que la inhibición de los hongos se hace más efectiva mediante la utilización de combinaciones de  $\beta$  1,3 glucanasa y quitinasa (Dana et al., 2006; Duo-Cuan, 2006). Los aislamientos A-34, A-53, A-86 y PR-617 (Uloha y Peberdy 1991) se emplean en forma de biopreparados para combatir los hongos del suelo en tabaco, hortalizas, granos y otros cultivos. Parte de la efectividad de los mismos se puede atribuir a la producción de metabolitos y macromoléculas y su efecto sobre los patógenos, como lo demuestran los resultados anteriormente expuestos.

La proteína recombinante Chit-33 expresada en *E. coli* disminuyó el crecimiento de ambos hongos fitopatogénicos, *B. cinerea* y *A. alternata*. Lo anterior permitiría concluir que el extracto proteico posee una actividad fungistática contra dos hongos de importancia agrícola y es por tanto, una alternativa a considerar para el diseño de estrategias apropiadas para lograr obtener cultivos resistentes o más tolerantes a las enfermedades provocadas por hongos.

Este trabajo contribuye a ser un reporte de la actividad de una quitinasa obtenida de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* y expresada en *E. coli* que presenta la capacidad de inhibir el crecimiento de dos hongos de importancia agrícola como son *B. cinerea* y *A. alternata*.

## CONCLUSIÓN

Mediante análisis morfológicos de las hifas de ambos hongos estudiados (*B. cinerea* y *A. alternata*) más el efecto del extracto proteico sobre el crecimiento sobre ellos, fue posible comprobar el efecto inhibitorio de la quitinasa recombinante extraída desde la cepa nativa de *Trichoderma harzianum*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del programa de Doctorado en Ciencias, con mención en Ingeniería Genética Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca.

## LITERATURA CITADA

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 948 p. 5<sup>th</sup>. ed. Elsevier Academic Press, New York, USA.  
Cherif, M., and N. Benhamou. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. spp *Radiciis lycopersici*. Phyto-

pathology 80(12):1406-1414.  
Dahiya, N., and R. Tewari. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Appl Microbiol Biotechnol 71:773-782  
Dana, M., J. Pintor-Toro, and B. Cubero. 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. Plant Physiology 142:722-730.  
De La Cruz, J., A. Hidalgo-Gallego., J. Lora., T. Benítez., J. Pintor-Toro, and A. Llobell. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem 206:859-867  
Duo-Chuan, L. 2006. Review of fungal chitinases. Mycopathologia 161:345-360.  
Fritig, B., T. Heitz, and M. Legrand. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. Current Opinion Immunology 10:16-22.  
Gutierrez, G., and R. Torre-Almaráz. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. Revista Chapingo, serie Ciencias Forestales y del Ambiente 13(2):157-162.  
Khan, A., and K. Shih. 2004. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from the strawberry plant. Plant Science 166:753-762.  
Kirubakaran, I., and N. Sakthivel. 2007. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. Protein Expresión Purification 52:159-166.  
Kramer, K., and S. Muthukrishnan. 1997. Mini-review Insect chitinase: Molecular biology and potential use as biopesticides. Insect Biochem. Molec. Biol. 27(11):887-900.  
Johnson, L., and E. Curl. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Protein Expresión and Purification 52:159-166.  
Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature 227:680-685.  
Mautroudi, S., M.R. Zamani, and M. Motallebi. 2008. Molecular cloning of chitinase 33 (*chit33*) gene from *Trichoderma atroviride*. Brazilian Journal of Microbiology 39:433-437.  
Mauch, F., B. Mauch-Mani, and T. Boler. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. Plant Physiol. 88:936-942.  
Merzendorfer, H. and L. Zimoch. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. The Journal of Experimental Biology 206:4393-4412.  
Ordeñana, K. 2002. Mecanismo de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas 63:22-32.  
Pedroza, H., y L. Dicovskyi. 2007. Sistema de

- análisis estadístico con SPSS. IICA, INTA, Managua, Nicaragua.
- Ping-mei, Y., R. Yu-Kui, Y. Xiao-yan., C. Zheng., W. Qing, D. Jian-zhong, and S. Yi. 2011. Comparison of nutrition composition of transgenic maize (chitinase gene) with its non-transgenic counterpart. *Cien. Inv. Agr.* 38(1):149-153
- Prakash, J., J. Norelli., G. Harnan., S. Brown, and H. Aldwinckle. 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Research* 10:533- 543.
- Saguez, J., R. Hainez., A. Cherqui., O. Wuytswinkel., H. Jeanpierre., G. Lebon., N. Noiraud., A. Beaujean., L. Jouanin., J. Alberche., C. Vincent, and P. Giordanengo . 2005. Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linné) and *in vitro*. *Transgenic Research* 14:57-67.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Selitrennikoff, C. 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2883-2894.
- Slusarenko A., R. Fruser R, and L. Van Loon. 2000. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. 375 p. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, U.S.A.
- Stefonova A., L. Larrinaga, y M. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatogenos del suelo. *Rev. Fac. Agron.* 16:509-516.
- Torres, E., M. Mendoza, y T. Medero. 1988. Coloración y montaje de cultivo en lámina de hongos. *Dermatología Venezolana* 26:97-98
- Wiwat, C., A. Thepouyporn., P. Siwayaprahm, and A. Bhumirata. 2002. Cloning, sequencing, and expression of a chitinase-encoding gene from *Bacillus circulans* N° 41. *Current Microbiology* 44:167-172.
- Uloha, C., and J. Peberdy. 1991. Purifications and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. *Curr. Microbiol.* 23(5):285-289.