



IV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS AGRARIAS

“Conocimiento e Innovación para el desarrollo sostenible”

LIBRO DE RESÚMENES

19, 20 y 21 / Abril / 2017
Campus UNA
San Lorenzo, Paraguay



Universidad Nacional de Asunción
Facultad de Ciencias Agrarias

Congreso Nacional de Ciencias Agrarias. (4a. : 2017 abr. 19-21; San Lorenzo, Paraguay).
Libro de resúmenes / editores Enrique Asterio Benítez León, Guillermina Macchi
Leite, Alba Liz González. – San Lorenzo, Paraguay: FCA/UNA, 2017.
1 pendrive ; capacidad 116 Mb.

Incluye tablas, figuras, bibliografías.

1. Producción agrícola. 2. Producción animal. 3. Producción forestal. 4. Economía.
5. Desarrollo rural. 6. Bosques. 7. Medio ambiente. 8. Suelos. 9. Ingeniería agrícola. 10.
Protección Vegetal. 11. Biotecnología. I. Benítez León, Enrique Asterio, ed. II. Macchi Leite,
Guillermina, ed. III. González, Alba Liz, ed. IV. Título.

CDD : 630

Diseño editorial e interactividad: ERVAZ Arte Digital - Tel. 021 420 844
Colaboración: Lourdes Monserrat Mora Insfrán

Fotos de tapa: Lourdes María González Soria, Jorge Daniel Caballero Mascheroni,
Gloria Arminda Resquín Romero, Enrique Asterio Benítez León, Luis Dario Macchi Leite.

ISBN: 978-99967-831-3-5



9 789996 783135



Evaluación de la producción de moléculas de alto y bajo peso molecular implicadas en la antibiosis de tres especies de *Trichoderma* contra *Macrophomina phaseolina*

Alberto Anastacio Cubilla Rios¹, María Cristina Romero Rodríguez¹, María Eugenia Flores-Giubi¹,
Javier E. Barúa^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

*Autor para correspondencia: javierbarua@qui.una.py

Introducción

Paraguay es conocido por su gran capacidad de producción agrícola, sin embargo, el sector productivo se enfrenta a grandes pérdidas económicas ocasionadas por la infección con hongos fitopatógenos como los ocasionados por hongos necrotróficos del género *Macrophomina*, los cuales poseen una gran capacidad destructiva, pudiendo infectar a más de 500 especies de plantas (Mihail et al. 1995). La creciente preocupación por el uso indiscriminado de sustancias químicas para el control de fitopatógenos ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias que permitan reemplazar o minimizar el uso de sustancias químicas que pudieran ser nocivas.

El control biológico constituye una alternativa que consiste en utilizar organismos vivos con el objetivo de controlar las poblaciones de otro organismo. Los hongos del género *Trichoderma* poseen la capacidad de controlar el crecimiento de los hongos fitopatógenos (Harman et al. 2004; Lorito et al. 2010), actuar como biofertilizantes cuando entran en contacto con algunas plantas y también de promover en ellas una respuesta de defensa (Shoresh et al. 2010; Hermosa et al. 2012). La acción biocontroladora de este género puede deberse a un mecanismo de antibiosis en el cual participan moléculas con actividad antifúngica sobre otros hongos sensibles, estas moléculas pueden ser proteínas de alto peso molecular y/o péptidos o metabolitos de bajo peso molecular.

En el presente trabajo se evaluó la contribución de moléculas, separadas por peso molecular,

secretadas por especies del género *Trichoderma* para el control del crecimiento de dos aislados de *Macrophomina phaseolina* de Paraguay. Además, se caracterizó el perfil de las proteínas secretadas al medio de cultivo.

Metodología

Se utilizaron tres cepas de referencia: *Trichoderma harzianum* T34 (CECT2413), *Trichoderma brevicompactum* (IBT40841) y *Trichoderma arundinaceum* (IBT40837); dos cepas nativas *Macrophomina phaseolina* FCQ6 aislado de soja y *Macrophomina phaseolina* FCQ9 aislado de sésamo, todos mantenidos en PDA (Papa-Dextrosa-Agar). Todos los microorganismos son mantenidos en el cepario micológico de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción.

Para el ensayo de antibiosis de moléculas de alto y bajo peso molecular se utilizó el método de Malmierca et al. (2012), empleando placas de Petri estériles con PDA, sobre las cuales se colocaron membranas de celofán o diálisis (Sigma®), previamente cortadas y sobre ellas un disco de micelio del género *Trichoderma*, se incubó a 30°C durante 48 horas (h). Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la membrana con el micelio de *Trichoderma* spp., y sobre el mismo punto en el que estuvo el disco de micelio de *Trichoderma* spp., se colocó un disco de micelio del hongo fitopatógeno. Se incubaron todas las placas a 30°C y se registraron cada 24 h la evolución en crecimiento diametral de cada colonia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para el control se emplearon placas

con membranas sin discos de *Trichoderma* spp., con lo que se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial. Los promedios de los porcentajes de inhibición radial obtenidos en cada ensayo se compararon con la prueba de *t* de Student; para ello, se utilizó el paquete estadístico *Graph Pad Prism* (Motulsky 1999). Se consideraron diferencias significativas con un 95% de confianza $p < 0,05$.

Para la obtención del perfil electroforético de proteínas secretadas por *Trichoderma* spp. se cultivó el hongo en medio líquido PDB (Papa-Dextrosa-Caldo) en condiciones estáticas, de oscuridad y a 30°C. Los cultivos de cada cepa de *Trichoderma* spp. se realizaron por triplicado. Después de 120 h de crecimiento, el cultivo se filtró al vacío y el filtrado se liofilizó. El liofilizado fue resuspendido con una solución buffer (urea-tiourea-tritón X100) para su posterior cuantificación. Las proteínas de las muestras de cada una de las cepas de *Trichoderma* fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (Bradford 1976). Para la separación de las proteínas secretadas por *Trichoderma* spp. se procedió a la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, la cual se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Para ello se utilizó el sistema de Mini Protean (Bio-Rad, Estados Unidos). Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie para la visualización de las bandas. Los perfiles proteicos de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. fueron analizadas mediante análisis de imagen con el programa Image Lab (Bio-Rad).

Resultados y discusión

Inhibición de crecimiento de *M. phaseolina* por moléculas de alto y bajo peso molecular secretados por *Trichoderma* spp.:

Para el aislado FCQ6, se observó la inhibición por completo del crecimiento del fitopatógeno; esta inhibición se observó tanto en las placas que contenían membranas de celofán como las de diálisis para las tres especies de *Trichoderma* spp. utilizadas en este trabajo. Por lo tanto, las moléculas de alto y bajo peso molecular secretados por hongos del género *Trichoderma* resultaron en un 100% de inhibición de crecimiento de *M. phaseolina* aislada de la planta de soja. Para el aislado FCQ9 las mediciones fueron realizadas cada 24 h y se extendieron hasta llegar a las 144 h. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de inhibición radial obtenidos contra el fitopatógeno *M. phaseolina* FCQ9.

Se observó que a las 120 h de exposición, moléculas de alto y bajo peso molecular secretadas por las tres especies de *Trichoderma* inhibieron 100% el crecimiento de *M. phaseolina* FCQ9, este porcentaje de inhibición sólo fue alcanzado por la exposición a moléculas de bajo peso molecular secretadas por *T. arundinaceum* evaluadas en el mismo período de tiempo.

Sin embargo, a las 144 h de incubación sólo las moléculas de alto y bajo peso molecular juntas secretadas por *T. harzianum* mantuvieron el 100% de inhibición del crecimiento de *M. phaseolina*. Para las demás especies de

Tabla 1. Porcentaje de inhibición radial de moléculas de las tres cepas de *Trichoderma* spp. contra *M. phaseolina* FCQ9 a las 120 y 144 horas.

	Inhibición radial de FCQ9 (%)			
	Alto y bajo peso molecular		Bajo peso molecular	
	120 h	144 h	120 h	144 h
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	100±0	85,2±8,5	78,7±1,4	67,9±2,1
<i>Trichoderma harzianum</i>	100±0	100±0	77,8±1,8	73,5±6,1
<i>Trichoderma arundinaceum</i>	100±0	86,0±0	100±0	85,2±0

Trichoderma las moléculas de alto y bajo peso molecular disminuyeron su capacidad inhibitoria del crecimiento a las 144 h, esta misma tendencia se observó con la actividad de las moléculas de bajo peso molecular evaluadas de forma aislada.

Para *T. brevicompactum* y *T. harzianum* si bien las moléculas de bajo peso molecular ejercieron un importante papel en el efecto observado se requirió la presencia de las moléculas de alto peso molecular para lograr un 100% de inhibición. Esto demuestra que las moléculas de alto peso molecular, de alguna manera, contribuyen en el proceso de antibiosis de estas dos especies de *Trichoderma* frente a *M. phaseolina*. Este resultado es esperado, en el caso de *T. harzianum*, debido a que esta especie está ampliamente estudiada y ha sido descrita su capacidad de secretar moléculas de alto peso molecular con actividad enzimática como celulasas, xilanasas, quitinasas (Suárez et al. 2005).

En el caso de *T. arundinaceum*, a diferencia de las demás cepas, no se observó diferencia significativa entre la antibiosis alcanzada por moléculas de alto y bajo peso molecular con las de bajo peso molecular de forma separada, los

porcentajes de inhibición a las 120 h y 144 h tuvieron la misma tendencia.

Estos resultados podrían indicar que las moléculas de alto peso molecular no juegan un papel crítico en el proceso de inhibición del crecimiento del fitopatógeno o que *T. arundinaceum* no secreta moléculas de alto peso molecular que participen en la antibiosis en las condiciones estudiadas. Además se podría atribuir que los resultados obtenidos son a consecuencia de moléculas de bajo peso molecular bioactivas, como el Harzianum A o Trichodermol (Cardoza et al. 2015).

Obtención del perfil comparativo de moléculas de alto peso molecular secretadas por las especies de *Trichoderma* en medio de cultivo PDB:

Los perfiles de proteínas secretadas por las diferentes especies de *Trichoderma* se muestran en la Figura 1. Los controles corresponden a medio de cultivo líquido PDB. Para cada una de las especies se realizaron tres réplicas biológicas que fueron cargadas de forma independiente en cada carril.

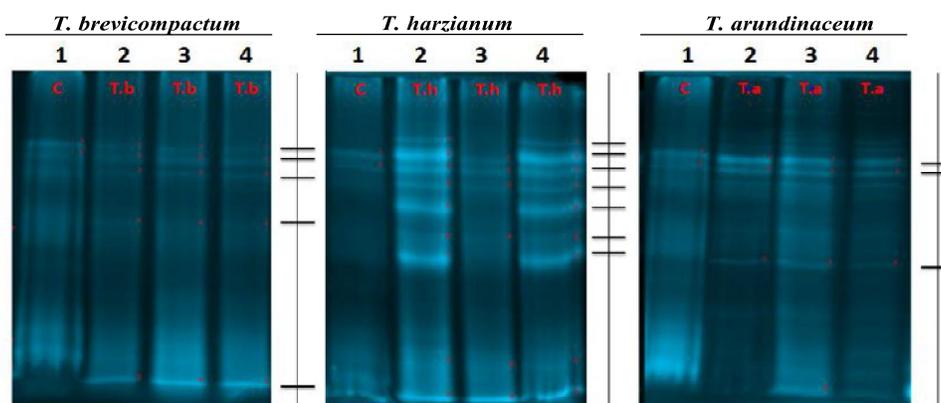


Figura 1. Perfil proteico de las diferentes especies de *Trichoderma*. Carriles 1 (C) con proteínas del control; carriles 2(T.b), 3(T.b) y 4(T.b), con réplicas biológicas, de proteínas secretadas por *Trichoderma brevicompactum*; carriles 2(T.h), 3(T.h) y 4(T.h), con réplicas biológicas, de proteínas secretadas por *Trichoderma harzianum*, carriles 2(T.a), 3(T.a) y 4(T.a), con réplicas biológicas, de proteínas secretadas por *Trichoderma arundinaceum*.

Se pudieron observar diferencias tanto en el número de bandas como en la intensidad de las mismas en los carriles que contenían las proteínas secretadas por las diferentes especies de *Trichoderma* en cada conjunto de carriles (2(T.b), 3(T.b) y 4(T.b); 2(T.h), 3(T.h) y 4(T.h); 2(T.a), 3(T.a) y 4(T.a)). Entre los tres grupos, *T. harzianum* (T.h) fue el hongo que secretó mayor diversidad de proteínas al medio de cultivo (7 bandas). Con el ensayo de inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* sobre membrana por *T. harzianum* se infirió que las proteínas secretadas podrían tener un papel en la antibiosis, los geles de electroforesis demostraron un perfil de alta diversidad, las cuales podrían estar implicadas en la antibiosis contra *M. phaseolina* FCQ9. En el caso de *T. brevicompactum*, la cantidad de bandas observadas fue menor (al menos cuatro) a las secretadas por *T. harzianum*, sin embargo el papel de las proteínas en el ensayo de antibiosis quedó demostrado a las 120 h de exposición con membrana de diálisis.

Este resultado podría deberse a la diversidad proteica que es menor *T. brevicompactum* cuenta con las proteínas implicadas en la antibiosis que explicarían el efecto observado. En el ensayo de antibiosis, llevada a cabo por los moléculas de *T. arundinaceum*, no se observó diferencia en la inhibición del crecimiento cuando se separaron las moléculas de alto peso molecular mediante la membrana de diálisis, esta observación coincidió con el perfil proteico obtenido en la electroforesis, donde se observó una cantidad menor de bandas comparándolo con el perfil de *T. harzianum*. La diferencia observada, entre las dos cepas de *Macrophomina*, podría deberse a que las diversas cepas de *Macrophomina phaseolina*, presentan una amplia diversidad genotípica, dependiendo del hábitat del que son aislados (Almeida et al. 2003).

Conclusiones

Las tres especies de *Trichoderma* spp. inhibieron completamente el crecimiento de FCQ6. Tanto las moléculas de alto y bajo peso molecular de *T. brevicompactum* y *T. harzianum* participan de

la antibiosis contra FCQ9. Metabolitos de bajo peso molecular producidos por *T. arundinaceum* inhiben completamente a FCQ9. Se determinó el perfil de proteínas secretadas por las cepas de *Trichoderma* y se observaron diferencias entre las tres especies evaluadas.

Referencias bibliográficas

- Almeida, ÁMR; Abdelnoor, RV; Arias, CA; Carvalho, VP; Jacoud Filho, DS; Marin, SRR; Benato, LC; Pinto, MC; Carvalho, CGP. 2003. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 28(3):279-85.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Cardoza, RE; McCormick, SP; Malmierca, MG; Olivera, ER; Alexander, NJ; Monte E; Gutiérrez, S. 2015. Effects of trichothecene production on the plant defense response and fungal physiology: overexpression of the *Trichoderma arundinaceum tri4* Gene in *T. harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 81(18):6355-6366.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2(1):43-56.
- Hermosa, R; Viterbo, A; Chet, I; Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158:17-25.
- Laemmli, UK. 1970. No title cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lorito, M; Woo, SL; Harman, GE; Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* 48:395-417.
- Malmierca, MG; Cardoza, RE; Alexander, NJ; McCormick, SP; Hermosa, R; Monte, E; Gutiérrez, S. 2012. Involvement of



- Trichoderma trichothecenes* in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Applied Environmental Microbiol* 78(14):4856-4868.
- Mihail, JD; Taylor, SJ. 1995. Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity pycnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany* 1603(1):1596-603.
- Motulsky, HJ. 1999. Analyzing data with GraphPad Prism. San Diego, CA. Graph Pad Software Inc.
- Shoresh, M; Harman, GE. 2010. Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biology* 10:136.
- Suárez, MB; Sanz, L; Chamorro, MI; Rey, M; González, FJ; Llobell, A; Monte, E. 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genetics and Biology* 42(11):924-934.