

# Evaluación de metodologías para el análisis de perfil de proteínas secretadas por aislados de *Trichoderma* spp al medio de cultivo

## Evaluation of methodologies for the analysis of the profile of secreted proteins by isolates of *Trichoderma* spp to the culture medium

Alberto Cubilla-Ríos<sup>1</sup>, María Eugenia Flores Giubi<sup>1</sup>, Javier E. Barúa<sup>1</sup>, María Cristina Romero-Rodríguez<sup>1\*</sup>, <sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Biológica. San Lorenzo, Paraguay. \*Autor de correspondencia: rromero@qui.una.py.

Recibido: julio 2019

Aceptado: diciembre 2019

Recibido en versión modificada: julio 2020

Cubilla-Ríos, A., Flores Giubi, M. E., Barúa, J. E. & Romero-Rodríguez, M. C. Evaluación de metodologías para el análisis de perfil de proteínas secretadas por aislados de *Trichoderma* spp al medio de cultivo. Metodologías para análisis de proteínas secretadas por *Trichoderma* spp. *Revista Investigaciones y Estudios-UNA*, 11(1), 47-51. <https://doi.org/10.47133/IEUNA6>

**Resumen.** Los hongos del género *Trichoderma* son ampliamente utilizados como agentes de control biológico para controlar diversos fitopatógenos, sin embargo, muchas moléculas implicadas en el biocontrol aún se desconocen. Existen numerosos trabajos en los cuales se evalúan las moléculas secretadas por el hongo, entre las que se encuentran las proteínas. Para evaluar estas moléculas se deben extraer del sistema experimental en el cual crece el hongo, y la metodología de extracción, la cual es altamente dependiente de diversos factores, requiere el ajuste de las condiciones experimentales. Así, se planteó la evaluación de dos metodologías para el análisis del perfil de proteínas secretadas por aislados de *Trichoderma* spp al medio de cultivo, partiendo de filtrado sin liofilizar y liofilizado.

Los perfiles proteicos obtenidos a partir de material liofilizado, aplicando la precipitación

de proteínas con ácido tricloacético en acetona seguida de una limpieza con metanol y cloroformo, generó un perfil adecuado para el análisis de las proteínas secretadas al medio de cultivo.

**Palabras clave:** biocontrol, liofilizado, proteínas secretadas.

**Abstract.** The *Trichoderma* genus are widely used as biological control agents against various plant pathogens, however, many molecules involved in biocontrol are still unknown. There are numerous works in which the molecules secreted by the fungus are evaluated, among which are proteins. To evaluate these molecules, they must be extracted from the system in which the fungus grows, and the extraction methodology, which is highly dependent on various factors, requires adjustment of experimental conditions. Therefore, the aim was the evaluation of two methodologies for the analysis of the profile of secreted proteins by isolates of *Trichoderma* spp to the culture medium, starting using filtrate without lyophilization and filtrate lyophilized. Protein profiles obtained from lyophilized material, applying protein

precipitation with trichloacetic acid in acetone followed by cleaning with methanol and chloroform, generated an adequate profile for the analysis of proteins secreted into the culture medium.

**Keywords:** biocontrol, lyophilized, secreted proteins.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos atacan un amplio rango de especies vegetales cultivadas, causando enfermedades fúngicas que ocasionan importantes pérdidas económicas en el rubro agrícola a nivel mundial (Kou & Naqvi, 2016).

Son los microorganismos más dañinos debido a que son los únicos fitopatógenos capaces de romper la pared celular intacta (Soanes, Richards & Talbot, 2007).

Actualmente se lleva a cabo una estrategia que ayuda a combatir a estos fitopatógenos utilizando agentes de control biológico (ACB) (Baker, 1987), la cual a su vez ayuda a reducir el impacto negativo al medio ambiente y la salud humana causado por los agentes de control químico. Los hongos del género *Trichoderma* son ampliamente utilizados como ACB, se han llevado a cabo una serie de experimentos que evidencian la secreción de un gran número de moléculas, entre las cuales se han encontrado enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los fitopatógenos (Vargas-Hoyos & Gilchrist-Ramelli, 2015), así también estos hongos son capaces de interactuar con la planta para inducir una respuesta benéfica en las mismas (Vinale et al., 2008). Por otra parte la identificación de cepas con una alta capacidad de producción de enzimas podría ser de utilidad para aplicaciones industriales (Souza, Silva & Bon, 2018). Un trabajo de nuestro Departamento ha demostrado la capacidad biocontroladora de las cepas de referencia de *Trichoderma* contra aislados nativos de *Macrophomina phaseolina*, además, se ha evaluado el perfil de proteínas secretadas

por las cepas de *Trichoderma* (Cubilla-Ríos, et al, 2019) se ha encontrado que las proteínas secretadas por las diferentes cepas evaluadas contribuyen en el biocontrol de *M. phaseolina*, sin embargo, no se ha establecido la identidad de las mismas y el perfil de proteínas obtenido resultó con una baja resolución. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar dos metodologías de extracción de proteínas que permitan analizar las proteínas secretadas por *Trichoderma* spp, incluyendo proteínas con y sin actividad hidrolítica. La identificación de estas proteínas permitirá comprender su implicancia en la actividad biocontroladora contra fitopatógenos que hasta la fecha se desconocen, así como también los procesos implicados en la interacción con la planta, estos datos podrían proporcionar nuevas perspectivas y estrategias en la lucha contra las enfermedades fúngicas. A largo plazo, finalmente permitirá la disminución del uso de fungicidas, que representa un elevado costo económico y causan varios efectos perjudiciales al medio ambiente y la salud humana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo de microorganismos.** Se utilizaron hongos del género *Trichoderma* spp.; pertenecientes al cepario del Departamento de Química Biológica, almacenados como discos de 5 mm de diámetro en glicerol al 80% a -20 °C, codificados de la siguiente manera: FCQ14, FCQ16, FCQ28, FCQ36 y *T. harzianum* T34 (CECT2413). Los discos de micelio fueron inoculados en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) e incubados en estufa a 30°C. Posteriormente, se extrajeron nuevos discos de micelio que fueron inoculados en 100 mL de medio de cultivo líquido Caldo Papa Dextrosa (PDB) contenidos en matraz Erlenmeyer. Los matraces Erlenmeyer, conteniendo los aislados nativos fueron mantenidos durante ocho días en estufa a 30°C y en oscuridad, mientras que contenía la cepa de referencia fueron mantenidos en agitación,

durante cuatro días a 30°C y en oscuridad. Se utilizaron como controles negativos medios de cultivos sin inocular hongos, mantenidos en las mismas condiciones que los medios que fueron inoculados con los hongos. Posterior a los días de crecimiento, se separó el micelio del medio líquido mediante filtración al vacío. Los filtrados fueron utilizados para extraer las proteínas secretadas.

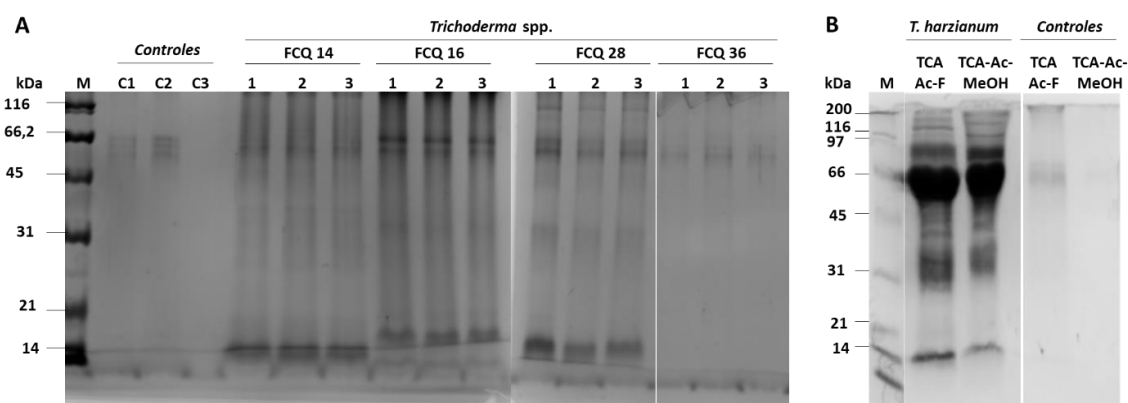
**Extracción de proteínas.** las proteínas secretadas por los aislados FCQ14, FCQ16, FCQ28 y FCQ36 fueron extraídas por precipitación directa a partir de 1 mL de filtrado. Para la extracción de proteínas secretadas por *T. harzianum* T34 (CECT2413), 90 mL del filtrado fue previamente liofilizado utilizando un liofilizador de la marca BIOBASE modelo BK-FD10, las proteínas fueron extraídas a partir de 200 mg de liofilizado resuspendidos en un volumen mínimo de una solución de urea 8M. Las metodologías de extracción de proteínas evaluadas fueron las siguientes: precipitación con ácido tricloroacético en acetona (TCA-Ac) (Suárez et al., 2005) y partición con fenol seguida de precipitación con ácido tricloroacético en acetona (TCA-Ac-F) (Wang, Vignani, Scali, & Cresti, 2006). El extracto proteico obtenido por TCA-Ac partiendo de liofilizado fue concentrado mediante

(Wessel & Flügge, 1984). Todos los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en una solución que contenía Urea 7 M, Tiourea 2 M, Triton X-100 2% y  $\beta$ -mercapto-etanol 100 mM y las proteínas fueron cuantificadas mediante el método descrito por Bradford (Bradford, 1976).

**Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).** Las proteínas extraídas fueron separadas por medio de una electroforesis desnaturizante descrita por Laemmli (1970). Para la visualización de las bandas de proteínas los geles fueron teñidos con de Azul de Coomassie (Mathesius et al., 2001). La imagen de los geles fue digitalizada mediante el sistema de fotodocumentador de geles Gel-Doc-EZ (BioRad).

## RESULTADOS

Se han evaluado dos metodologías de extracción de proteínas partiendo de dos tipos de muestra, filtrado líquido para los aislados FCQ14, FCQ16, FCQ28 y FCQ36 y filtrado previamente liofilizado para el aislado de *T. harzianum*., para optar por la metodología que permita obtener una buena resolución de



**Figura 1. Perfiles proteicos de proteínas secretadas por *Trichoderma* spp obtenidos para los diferentes aislados. A.** Perfiles proteicos de proteínas secretadas obtenidas por precipitación con ácido tricloroacético en acetona (TCA-Ac) a partir del filtrado sin liofilizar, los números 1, 2 y 3 indican las réplicas biológicas obtenidas para cada aislado. **B.** Perfiles representativos de proteínas secretadas por *T. harzianum* T34 (CECT2413) obtenidas a partir del filtrado liofilizado mediante los métodos de partición con fenol seguida de precipitación con ácido tricloroacético en acetona (TCA-Ac-F) y precipitación con ácido tricloroacético en acetona seguido de lavado con metanol y cloroformo (TCA-Ac-MeOH). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes y fueron teñidos con Azul de Coomassie R250. En cada carril de A y en los controles de B se separaron 10 $\mu$ L de extracto proteico debido a que el volumen para cargar 20  $\mu$ g supera la capacidad del pocillo. Se separaron 20  $\mu$ g de proteína de *T. harzianum*. En A C1-C3 corresponde a los controles.

bandas que permitirá analizar el perfil proteico de proteínas secretadas por diferentes aislados del género *Trichoderma*.

Utilizando el método de precipitación con TCA-Ac-F, partiendo del filtrado sin liofilizar, no se obtuvo ningún precipitado proteico al finalizar el proceso de extracción. Por otro lado, con el método de TCA-Ac si se obtuvo precipitado proteico, el cual se pudo visualizar en un gel electroforético (Figura 1 A). En la Figura 1 B se muestra los perfiles proteicos representativos que fueron obtenidos con el método de TCA-Ac-F y TCA-Ac-MeOH a partir de 200 mg de filtrado liofilizado para la cepa de referencia *T. harzianum* y sus controles.

## DISCUSIÓN

Se evaluó la precipitación directa de las proteínas secretadas al medio de cultivo, debido a que la liofilización se realiza mediante un equipo costoso cuya disponibilidad no siempre es factible. La ausencia de precipitado proteico utilizando el método TCA-Ac-F puede deberse a que existe poca cantidad de proteína en el volumen de filtrado utilizado y las proteínas se pudieron haber perdido en los pasos de lavado que incluye la metodología para la eliminación de los contaminantes, como se ha descrito previamente en la literatura para otros tejidos (Maldonado, Echevarría-Zomeño, Jean-Baptiste, Hernández & Jorrín-Novó, 2008; Wu, Gong & Wang, 2014).

Por otra parte, los perfiles obtenidos por el método TCA-Acetona partiendo directamente del filtrado sin liofilizar, no mostraron una buena separación de las bandas como se muestra en la **Figura 1 A**, esto puede deberse a una degradación de las proteínas o a presencia de impurezas que coprecipitan con las proteínas; así también, se puede ver que la complejidad del perfil es mayor en los carriles correspondientes a los extractos proteicos de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp en comparación a los controles, sin embargo, la

intensidad de bandas en los carriles de cada aislado es diferente, considerando que se cargó el mismo volumen de extracto proteico, puede deberse a que existe una diferencia en la cantidad de proteína secretada por cada aislado, sin embargo, se requieren más experimentos para asegurar esto.

Los perfiles proteicos obtenidos partiendo de 200 mg de liofilizado, presentan una mejor resolución de las bandas y la mancha continua en el carril ha disminuido, comparando los perfiles de las dos metodologías aplicadas, tanto TCA-Ac-F como TCA-Ac-MeOH, se observó que presentaron una gran similitud.

Considerando la complejidad de las metodologías, la extracción TCA-Ac-MeOH incluye menos pasos por lo cual se recomienda utilizar este método para realizar el análisis de las proteínas secretadas por *Trichoderma*. Teniendo en cuenta el material de partida, filtrado sin liofilizar o liofilizado, se puede ver que el proceso de concentración del filtrado por liofilización permite concentrar las proteínas y facilita la extracción de las mismas utilizando pequeños volúmenes de muestra.

El perfil proteico obtenido para *T. harzianum* que se obtuvo difiere de los descritos previamente en la literatura para la misma especie (Do Vale et al., 2012; Suárez et al., 2005), debido quizás a que se trata de cepas diferentes.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados demostraron que la extracción de proteínas a partir del filtrado sin liofilizar no permite obtener un perfil proteico nítido y con bandas resueltas. Los perfiles proteicos obtenidos a partir extracto proteico extraído con el método de precipitación con ácido tricloroacético en acetona seguido de una concentración con metanol y cloroformo, partiendo de material liofilizado presentan una mayor resolución de las bandas por lo que se recomienda esta metodología para analizar proteínas secretadas por *Trichoderma* spp.

## AGRADECIMIENTOS

Los investigadores agradecen al Laboratorio de Química y Toxicología y al Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica por realizar la liofilización de las muestras y digitalización de la imagen de los geles.

## FINANCIACIÓN

La investigación fue presentada por la Facultad de Ciencias Químicas y financiado con fondos de investigación del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Convocatoria 2018.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, K. F. (1987). Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 67–85
- Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., Romero-Rodríguez, M. C., Flores-Giubi, M. E. & Barúa-Chamorro, J. E. (2019). Antibiosis of proteins and metabolites of three species of *Trichoderma* against paraguayan isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 63–77. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- Do Vale, L. H. F., Gómez-Mendoza, D. P., Kim, M. S., Pandey, A., Ricart, C. A. O., Edivaldo, X. F. F., & Sousa, M. V. (2012). Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*, 12(17), 2716–2728. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200063>
- Kou, Y., & Naqvi, N. I. (2016). Surface sensing and signaling networks in plant pathogenic fungi. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 57, 84–92.
- <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.019>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Maldonado, A. M., Echevarría-Zomeño, S., Jean-Baptiste, S., Hernández, M. & Jorrín-Novó, J. V. (2008). Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics*, 71(4), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.06.012>
- Mathesius, U., Keijzers, G., Natera, S. H. A., Weinman, J. J., Djordjevic, M. A., & Rolfe, B. G. (2001). Establishment of a root proteome reference map for the model legume. *Scanning*, 1424–1440
- Souza, M. F. de, Silva, A. S. A. da, & Bon, E. P. S. (2018). A novel *Trichoderma harzianum* strain from the Amazon Forest with high cellulolytic capacity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14(October 2017), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.008>
- Suárez, M. B., Luis, S., Chamorro, M. I., Rey, M., González, F. J., Llobell, A. & Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 924–934. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.08.002>
- Vargas-Hoyos, H. A. & Gilchrist-Ramelli, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) *Revista Mexicana de Micología*, 42, 9–16.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M. & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), 2782–2786. <https://doi.org/10.1002/ELPS.200500722>
- Wu, X., Gong, F. & Wang, W. (2014). Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. *Proteomics*, 14(6), 645–658. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300239>