

# ANÁLISIS DE UN POTENCIAL MECANISMO DE ACCIÓN DE *TRICHODERMA SPP.* DURANTE SU COMPORTAMIENTO COMO AGENTE BIOCONTROLADOR

de Elías, M.<sup>1</sup>; Camelino, S.<sup>1</sup>; Gaggioli Hernández, T.<sup>1</sup>; Caturelli Graffigna, J.<sup>1</sup>; Ortiz, J.<sup>1</sup>; Kovolinski, C.<sup>1</sup>; Kokic, M.<sup>1</sup>; Reniero, M.<sup>1</sup>; Vargas, L.<sup>2</sup>; Minchiotti, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Laboratorio de Química Orgánica. Córdoba. Argentina.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Laboratorio de Fitopatología. Córdoba. Argentina.

minchio@agro.unc.edu.ar

## RESUMEN

El presente trabajo estudia el mecanismo por el cual la *Trichoderma spp.* actúa como principal agente biocontrolador de hongos patógenos, tales como *Fusarium* y *Rhizoctonia spp.* Para el presente trabajo, se dispusieron de dos cepas de *Trichoderma spp.* regionales (*Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum*), las cuales fueron provistas por el Laboratorio de Fitopatología de la FCA – UNC. Un potencial mecanismo de biocontrol propuesto por el Laboratorio de Química Orgánica involucra la acción de la fosfolipasa A secretoria (PLA) que ataca los fosfolípidos de las membranas celulares. Con el objeto principal de determinar la actividad PLA de las cepas de *Trichoderma spp.*, se sembraron ambas cepas en medios de cultivo líquidos de papa y glucosa con lecitina de soja, que es una mezcla de fosfolípidos, siendo estos un sustrato natural de la PLA. En el medio de cultivo de papa-glucosa, la cepa *Trichoderma atroviride* presentó mayor actividad PLA durante los días de crecimiento del hongo que *Trichoderma harzianum*. En consecuencia, se continuó con el estudio de esta cepa, sembrándola en medio de cultivo papa-glucosa-lecitina de soja, donde también se evidenció mayor actividad. Esto indicaría que los fosfolípidos de la lecitina estimularon al hongo a aumentar la secreción de la enzima.

Palabras clave: *Trichoderma spp.*, controladores biológicos, fosfolipasas, actividad PLA.

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Este trabajo se llevó a cabo para acreditar el espacio curricular Iniciación Profesional desarrollado en la cátedra de Química Orgánica.

En otras investigaciones sobre las PLAs secretadas por *Trichoderma spp.*, se estudió la actividad enzimática de PLA de las cepas *Trichoderma harzianum* 1A y *Trichoderma atroviride*  $\alpha$ Cp8 en cultivos duales, incluyendo hongos patógenos como estimulantes para la secreción de enzima (Minchiotti *et al.*, 2021). Se utilizó un método turbidimétrico para medir la actividad PLA donde el medio de reacción es una dispersión de lecitina de soja en buffer Tris (0,015mg/20ml). Los fosfolípidos de la lecitina forman estructuras supramoleculares, vesículas multilaminares, que son sustrato en la reacción de hidrólisis catalizada por PLA. A medida que transcurre la reacción disminuye la absorbancia aparente como consecuencia de la formación de micelas por la presencia de lisofosfolípidos, producto de la actividad de la enzima. Como se observó que *Trichoderma spp.* mostró mayor actividad enzimática PLA en medios donde se encontraban otros hongos patógenos, se propuso

estimularlos con el agregado del sustrato natural de la PLA que son los fosfolípidos. Por esto, se agregó lecitina de soja al medio de cultivo líquido.

La hipótesis de este trabajo fue: los hongos *Trichoderma spp.* secretan enzimas del tipo PLA, para desarrollar su actividad como agentes biocontroladores e inhibir el crecimiento de hongos patógenos, destruyendo la membrana celular de estos.

A partir de evidencias publicadas por el grupo de trabajo de los laboratorios de Química Orgánica y Fitopatología de la FCA - UNC, se planteó como objetivo general, determinar la actividad PLA de las cepas de *Trichoderma spp.* desarrolladas en medios de cultivo líquidos de papa-glucosa con agregado de lecitina de soja.

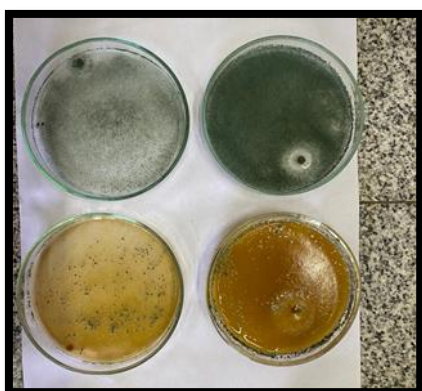
## METODOLOGÍA

Se prepararon los medios líquidos de papa-glucosa (PG) y PG con lecitina de soja donde se sembraron los inóculos de las cepas del hongo *Trichoderma*: *T. atroviride* y *T. harzianum*. Posteriormente, se llevaron a incubar desde 1 hasta 7 días (**Figura 1**).



**Figura 1.** Preparación de las muestras.

Los medios de cultivo líquidos donde se desarrollaban las cepas, fueron filtrados y centrifugados para obtener un sobrenadante con los productos de secreción del hongo, entre ellos la PLA (**Figura 2**).



**Figura 2.** Cajas de Petri con cultivos de ambas cepas de *Trichoderma* spp. en medio papa glucosado y en medio papa glucosado con agregado de lecitina de soja.

Las cajas de arriba corresponden a *T. atroviride*, las otras a *T. harzianum*. Las cajas de la derecha que muestran mayor crecimiento del hongo, son las que tienen lecitina de soja agregada al medio.

Se determinó actividad enzimática PLA cada día, cada 24 horas, en los sobrenadantes de los medios. Para ello, se preparó un medio de reacción con 15 mg de lecitina de soja granulada en 20 ml de buffer Tris/HCl, pH 7,8, a una temperatura de 40°C. A 2 ml de este medio se le agregó 0,1 ml del medio de cultivo aislado y se determinó la actividad PLA utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Estas determinaciones se realizaron durante 180 segundos donde las vesículas multilaminares del medio de reacción van disminuyendo su tamaño por la formación de lisofosfolípidos, productos de la actividad enzimática, y la consecuente formación de micelas más pequeñas, por lo que también disminuye la absorbancia aparente (Minchiotti, 2006) (**Figura 3**).

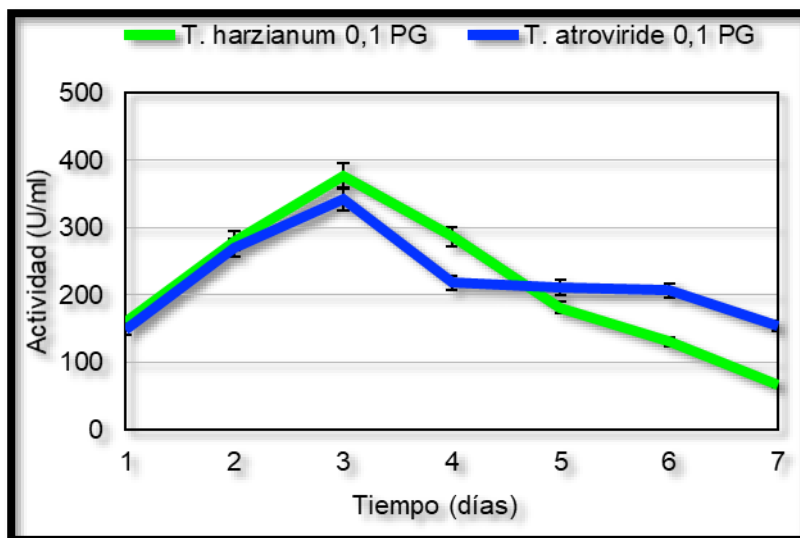


**Figura 3.** Operaciones realizadas para medir la actividad enzimática PLA.

## RESULTADOS

En los resultados que se obtuvieron a partir de los ensayos testigos, es decir, cuando las cepas fueron desarrolladas en medio PG, se evidenció una mayor actividad enzimática PLA en las muestras medidas a partir de los medios de cultivo de *T. harzianum*, observándose

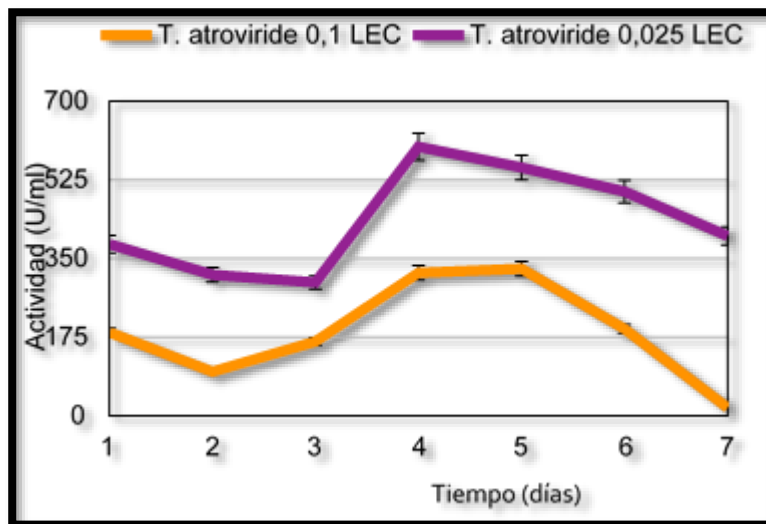
un pico de actividad el día 3 que disminuye de manera constante y sostenida hasta el día 7. Las muestras de *T. atroviride* también presentan un pico de actividad el día 3 aunque decae a la mitad hasta el día 6, continuando su tendencia a la baja hasta el día 7 de medición (Figura 4).



**Figura 4.** Resultados de actividad de *T. harzianum* y *T. atroviride* con el agregado de 0,1 ml del concentrado enzimático obtenido en medio PG.

Los resultados de los experimentos desarrollados en medio de cultivo PG con agregado de lecitina de soja de *T. atroviride* mostraron un incremento en la actividad enzimática PLA con un máximo en los días 4 y 5. A partir de estos resultados se llevaron a cabo otros ensayos con

*T. atroviride* desarrollada en medio PG con lecitina de soja, donde se agregaron 0,025 ml del extracto enzimático. Los datos obtenidos fueron aún mayores como se observa en la Figura 5.



**Figura 5.** Resultados de actividad de *T. atroviride* con el agregado de 0,1 ml y 0,025 ml del concentrado enzimático obtenido en medio PG con lecitina de soja.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se puso a punto el desarrollo de los medios líquidos de cultivo para la siembra de inóculos de las cepas de *T. atroviride* y *T. harzianum*. Los primeros

resultados obtenidos en medio de cultivo de papa-glucosa mostraron una mayor actividad PLA por parte de *T. atroviride* en los días de ensayo experimentados. Por lo que se continuó con esta cepa para determinar la actividad en el medio de cultivo de papa-glucosa-lecitina

de soja. Los datos recopilados a partir de este medio mostraron una mayor actividad enzimática, lo que sugeriría una estimulación por parte de los fosfolípidos de la lecitina para mayor secreción de enzima por el hongo y por consiguiente mayor expresión de actividad PLA.

Además, se observó que, utilizando una concentración menor del extracto, en este caso 0,025 ml, aumenta la actividad PLA, por lo que se debería continuar con el aislamiento y purificación de los extractos enzimáticos. Este aumento de actividad a menor cantidad de enzima nos indica que hay inhibidores en el medio que compiten con el sustrato (Segel, 1993).

En otras investigaciones que continuaron después de nuestro trabajo, se realizaron experimentos con *T. harzianum* desarrollada en medio de papa-glucosa-lecitina de soja.

## CONCLUSIONES

Se concluye que *Trichoderma atroviride* presenta actividad enzimática más sostenida a lo largo de los días que *Trichoderma harzianum*, bajo las mismas condiciones experimentales.

Se produjo mayor expresión de la enzima cuando se agregaron fosfolípidos (lecitina) al medio. Su presencia estimuló al hongo para secretar al medio las enzimas fosfolipasas cuyos sustratos naturales son los fosfolípidos. Este puede ser un posible mecanismo que tiene *Trichoderma spp.* como agente biocontrolador. Esta conclusión es de gran importancia para tener en cuenta a la hora de formular el medio de cultivo que se destinaría para la repicación del hongo y obtención de la enzima PLA.

El aumento de actividad PLA al agregar menor cantidad de extracto al medio de reacción indica una competencia entre sustrato e inhibidores por lo que, se debería

continuar con el aislamiento y purificación de los extractos enzimáticos. Al disminuir la cantidad de extracto, disminuimos también en gran medida la cantidad de inhibidores por lo que la actividad aumenta, disminuyendo así la competencia entre sustrato e inhibidores por el sitio activo de la enzima.

## EXPLICITACIÓN DE INTEGRACIÓN DE LA I, E Y E A TRAVÉS DEL ESTUDIO REALIZADO

Este trabajo fue realizado por alumnos de la carrera Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias para acreditar el espacio curricular Iniciación Profesional. Ha sido una integración de docencia e investigación y ha formado parte de un proyecto subsidiado por Secyt-FCA.

## BIBLIOGRAFIA

Madoery, R. & Minchiotti, M. (2006) Un método espectrofotométrico directo y continuo para la determinación de actividad fosfolipasa A2. *LabCiencia* 1 (02/2006), 13-15.

Minchiotti, M. (2006). Purificación, caracterización y estudio de propiedades de fosfolipasa A2 presente en soja (*Glycine max*) [Tesis para optar el título de Doctorado en Ciencias Químicas]. Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.

Minchiotti, M., Vargas, L., & Madoery, R. (2021). Phospholipase A activity and the biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma atroviride*. *Biocontrol Science and Technology* 31(11), 1231-1247.

Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley.