

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *Macrophomina phaseolina* AL MEDIO DE CULTIVO

Benegas López, Andrea C.; Flores-Giubi, M. Eugenia; Romero-Rodríguez, M. Cristina.
Afilación Institucional: Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas,
Departamento de Química Biológica

RESUMEN

Macrophomina phaseolina, es un hongo necrotrófico capaz de infectar cultivos de importancia económica, tales como la soja y el sésamo. Éste hongo secreta una amplia variedad de proteínas que le permiten invadir a la planta e iniciar el proceso de infección. Por lo tanto, numerosos estudios se basan en las proteínas con actividad hidrolítica secretadas por este hongo, sin embargo, las proteínas sin actividad enzimática también podrían estar implicadas en este proceso. En el presente trabajo se planteó el desarrollo de una metodología para la evaluación de proteínas secretadas por *M. phaseolina* al medio de cultivo Papa Dextrosa Caldo (PDB). Se optimizó una metodología de purificación de proteínas para la posterior evaluación del perfil proteico mediante una electroforesis unidimensional SDS-PAGE mediante la evaluación de tres metodologías de purificación de proteínas. El método más efectivo de purificación fue la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético(TCA) el cual permitió obtener un rendimiento de 3,9 mg de proteína por gramos de liofilizado y un perfil proteico nítido para su análisis.

Palabras Claves: *Macrophomina phaseolina*, proteínas secretadas, perfil electroforético

1. INTRODUCCIÓN

Macrophomina phaseolina, es un hongo fitopatógeno agente causal de la enfermedad denominada pudrición carbonosa del tallo (Martínez-Villarreal, Garza-Romero, Moreno-Medina, & Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl Hernández-Delgado, 2016), infecta más de 500 especies de plantas, incluye cultivos económicamente importantes como los cultivos de maíz (Su G, 2001), poroto (Mayek-Pérez N, 2001), yute (BK, 1992), algodón (Aly, Abdel-Sattar, 2007), girasol (S. Khan, 2007), soja (Erlei Melo, 2014), sésamo (Ayala R, 2006), entre otras especies.

La infección primaria de *M. phaseolina* se produce a través de los microesclerocios (Beas-Fernández, et al De Santiago-De Santiago, Hernández-Delgado & Mayek-Pérez,2006;Mayek-Pérez, López-Castañeda, et al, 2001). Los mismos pueden sobrevivir por períodos prolongados de tiempo que van de uno a tres años en el suelo, lo cual dificulta su control (Short GE, Wyllie TD, 1980). Para infectar al huésped, los microesclerocios deben germinar (Beas-Fernández et al., 2006), posteriormente, los tubos germinativos penetran de forma directa o indirecta a través de la epidermis de la planta (Mayek-Perez, García-Espinosa, López-Castañeda, Acosta-Gallegos, & Simpson, 2002). La colonización prosigue hasta llegar a la raíz principal, causando la detención del crecimiento, clorosis y marchitamiento foliar, finalizando en algunos casos con la muerte de la planta (Garrido Bigotes et al., 2016).

Éste hongo presenta una amplia variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética, mediante la cual ha podido adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a su vez tener una amplia distribución geográfica (Ivancovich, A., Flores, C. y Lavilla, 2016). Por lo tanto, *M. phaseolina* puede ocasionar graves pérdidas de cultivos, afectando al cultivo de la soja, el cual constituye uno de los más importantes rubros en nuestro país, ya que Paraguay se encuentra dentro de los ocho principales países productores de soja produciendo 3,6 millones de toneladas; en esta lista se encuentran también E.E.U.U., Brasil, Argentina, China, India, Canadá y Bolivia (Wrather, A., Shannon, G., Balardin, R., Carregal, L., Escobar, R., Gupta, GK, Ma, Z., Morel, W., Ploper, D. y Tenuta, 2010).

Para minimizar el impacto negativo de *M. phaseolina* en el rendimiento de los cultivos se han realizado numerosos esfuerzos a nivel mundial para conocer las moléculas secretadas por el mismo (Sarkar, Biswas, Ghosh, & Ghosh, 2014). Se han identificado y descrito fitotoxinas de *M. phaseolina*, entre ellas, asperlina, isoasperlina, fomalactona, ácido faseolínico, fomenona, faseolinona (Dhar TK, 1982), macrophominol (Trigos, Reyna, & Matamoros, 1995) y botriodiplodina (Ramezani et al., 2007).

Las proteínas secretadas por los hongos fitopatógenos cumplen una determinada función en el proceso de infección, la gran mayoría presentan actividad enzimáticas y se las conoce como enzimas degradadoras de pared celular (Kubicek, Starr, & Glass, 2014). En un estudio *in silico* previo se constató que *M. phaseolina* contiene el menor número de proteasas entre las demás especies de hongos pertenecientes a la división *Ascomycota* (Rohan, Lowe, & Howlett, 2012). A su vez, el genoma de *M. phaseolina* se diferencia de los demás hongos al poseer el mayor número de citocromo P450, glucósido hidrolasa y genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios. En otros estudios se analizaron las proteínas secretadas por *M. phaseolina* mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en donde se encontró un perfil bastante complejo compuesto por proteínas de entre 17 a 135 KDa (Sarkar et al., 2014). Así también se evidenció que *M. phaseolina* secreta proteínas con actividad amilasa, lipasa y proteasa que están implicadas en el proceso de infección (Khan A. N. et al., 2017).

A nivel local se ha evaluado la actividad fitotóxica de extractos liofilizados de aislados paraguayos de *M. phaseolina* en donde podrían estar contenidas proteínas con y sin actividad hidrolítica (Arias, Barúa, & Flores-Giubi, 2014), sin embargo, no se ha evaluado el perfil de las proteínas que podrían estar presentes en el liofilizado evaluado. En el presente trabajo se pretende poner a punto una metodología para evaluar las proteínas secretadas por *M. phaseolina* al medio de cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollar una metodología de purificación de proteínas para evaluar las proteínas secretadas por aislados locales de *M. phaseolina* al medio de cultivo

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el rendimiento de tres métodos de purificación de proteínas secretadas por *M. phaseolina* al medio de cultivo
- Comparar el perfil de proteínas de los extractos proteicos obtenidos mediante los métodos de purificación de proteínas utilizados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo del hongo

Se utilizó *Macrophomina phaseolina* FCQ 39, aislado de rastrojos de cultivo de soja de la ciudad de Edelira, Departamento de Itapúa. Fue mantenido en discos de micelio sumergidos en una solución acuosa de glicerol al 80% a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los discos fueron inoculados en placas Petri conteniendo medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), fueron crecidos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad hasta que el micelio cubra la totalidad de la placa. El cultivo en medio líquido se realizó en medio Caldo Papa Dextrosa (PDB) que fue inoculado con tres discos de micelio obtenidos del medio PDA, se incubaron durante ocho días en estufa microbiológica a 30°C , en oscuridad. Se utilizaron como control negativo medio de cultivo PDB sin inocular que fueron mantenidos en las mismas condiciones que los medios que fueron inoculados con el hongo.

3.2 Obtención del liofilizado

Posterior a los ocho días de crecimiento, se procedió a la separación del micelio y el medio líquido mediante filtración al vacío. El filtrado obtenido fue congelado a -20°C y posteriormente liofilizado en un liofilizador Labconco Freezone 4.5 hasta la obtención de un polvo homogéneo y libre de agua. El liofilizado fue pesado y luego mantenido a -20°C hasta su utilización.

3.3 Purificación de proteínas

3.3.1 Método A: Resuspensión en medio de solubilización (MS)

El liofilizado obtenido, fue pesado y resuspendido en un mínimo volumen de medio de solubilización (MS) entre 250 a $600\mu\text{L}$ dependiendo de cada liofilizado. El extracto proteico resultante fue mantenido a 4°C hasta su uso.

3.3.2 Método B: Precipitación con ácido tricloro acético (TCA)-Acetona

Los liofilizados, previamente pesados y resuspendidos en MS, se purificaron mediante precipitación con 2mL de ácido tricloro acético (TCA)(González-Fernández et al., 2014). Las muestras se mantuvieron a -20°C durante toda la noche para favorecer la precipitación de las proteínas. Se recuperó el precipitado por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min. El precipitado fue lavado con acetona pura para eliminar los restos de TCA y

fue resuspendido en MS. Posteriormente fueron almacenadas a 4°C para su posterior utilización.

3.3.3 Método C: Partición líquido-líquido (agua-metanol-cloroformo)

Los liofilizados, previamente resuspendidos en MS, se purificaron siguiendo el protocolo de Fic, Kedracka-Krok y colaboradores (Fic, Kedracka-Krok, Jankowska, Piro, & Dziedzicka-Wasylewska, 2010). Se agregaron cuatro volúmenes de metanol con respecto al volumen de extracto proteico resuspendido, se sometió a centrifugación a 9000rpm durante 10 segundos. Posteriormente, se añadió un volumen de cloroformo, se centrifugó a 9000 rpm durante 10 segundos. Al mismo tubo se agregaron tres volúmenes de agua respecto a la muestra, se centrifugó a 9000 rpm durante 10 segundos, se formó un anillo blanco entre las dos fases. La fase superior fue descartada sin tocar el anillo, se agregó tres volúmenes de metanol, se procedió a centrifugar y el precipitado obtenido fue resuspendido en MS. Las proteínas extraídas fueron almacenadas a 4 °C hasta el momento de su uso.

3.4 Cuantificación de proteínas

Las proteínas contenidas en el extracto proteico proveniente de los tres métodos fueron cuantificadas por triplicado siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Los extractos de proteínas se separaron mediante una electroforesis discontinua unidireccional en condiciones desnaturalizantes para evaluar las diferencias en los perfiles electroforéticos del liofilizado obtenido. Veinte microgramos de proteína fueron separadas en gel de poliacrilamida al 12% siguiendo la metodología descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Los gels obtenidos fueron teñidos con Azul de Coomassie R-250 para la visualización de las bandas de proteínas y se digitalizaron con el fotodocumentador GelDocEZ (BioRad).

3.6 Análisis de imagen y asuntos estadísticos

Los rendimientos de proteína recuperada fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación entre las medias se estimaron mediante la prueba de Tukey ($p = 0.05$), se utilizó el paquete estadístico GraphPadPrism. Se consideraron diferencias significativas con un 95 % de confianza $p < 0.05$ para ANOVA y para la Prueba de Tukey. Los perfiles proteicos de *M. phaseolina* provenientes del medio de cultivo PDB fueron analizados utilizando el programa ImageLab de BioRad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las proteínas fueron purificadas mediante tres métodos de purificación seleccionados descritos previamente: Método A, Método B y Método C. Las proteínas contenidas en el extracto proteico resultantes fueron cuantificadas mediante el método de Bradford.

En la **tabla 1** se observa la cantidad de proteínas recuperadas, expresada en mg de proteína/g de liofilizado, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas al realizar la comparación de los rendimientos obtenidos mediante los diferentes métodos de purificación. Sin embargo, el rendimiento obtenido con los métodos B y C fueron menores en comparación al método A, lo cual puede deberse a las pérdidas que ocurren durante el proceso de purificación.

Tabla 1: Rendimiento de extracción de proteínas y bandas detectadas en el análisis de imagen

Medio de cultivo	Rendimiento de proteína* (mg de proteínas/g de liofilizado)			Número de bandas**		
	Met-A	Met-B	Met-C	Met-A	Met-B	Met-C
PDB-H***	7,1 ± 3,1	3,9 ± 0,8	3,7 ± 0,8	5	15	15

* Rendimiento de proteínas expresado en mg de proteína por gramo de liofilizado.

Las bandas fueron detectadas en el programa ImageJ. La comparación de medias mediante ANOVA no presentó diferencias estadísticamente significativas.*PDB-H: medio de cultivo PDB inoculado con hongo

Los perfiles proteicos de las proteínas secretadas por *M. phaseolina* al medio de cultivo PDB, obtenidos mediante los tres métodos de purificación evaluados presentaron diferencias en la resolución de las bandas (**Fig.1**).

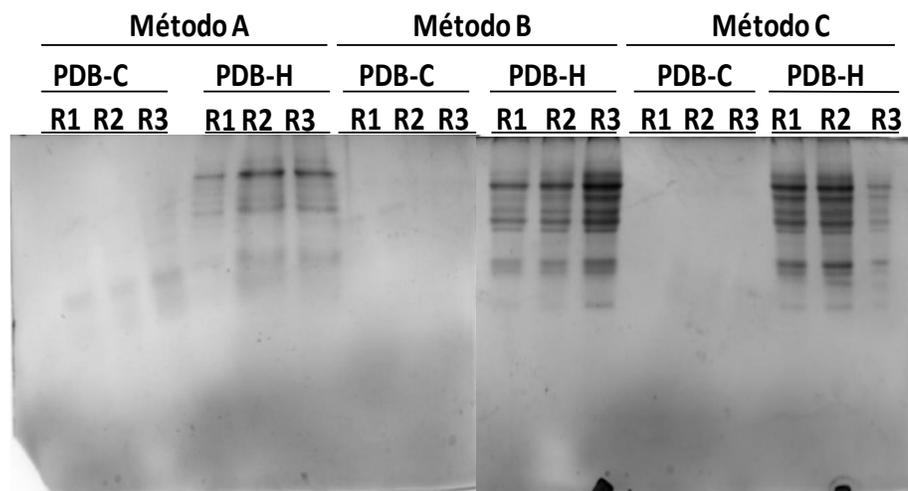


Figura 1. Perfiles de proteínas secretadas por *M. phaseolina* obtenidos utilizando los diferentes métodos evaluados. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y fueron teñidos con Azul de Coomassie R250. En cada carril fueron separadas 20µg de proteínas. PDB-C: medio de cultivo sin hongo. PDB-H: medio inoculado con el hongo. R1, R2 y R3 son las repeticiones de cada extracto analizado.

En los perfiles proteicos obtenidos por el método A no se observa una separación adecuada de las bandas proteicas; los perfiles provenientes del extracto proteico del medio de cultivo utilizado como control (PDB-Control) presenta bandas tenues que pueden pertenecer a las proteínas del medio de cultivo debido a que es un medio que se prepara a base de papa, en cambio se puede observar que en el medio de cultivo en el cual fue inoculado el hongo (PDB-H)(Fig. 1), el perfil proteico presenta mayor complejidad y las bandas son más intensas con lo cual se puede señalar que las mismas corresponden a proteínas secretadas por *M. phaseolina*.

En los perfiles proteicos evaluados con el método B (precipitación de las proteínas con TCA-Acetona) y el método C (Partición Metanol/Cloroformo), se observa que en el medio de cultivo inoculado con el hongo presenta una adecuada separación de las bandas proteicas, en cambio en los carriles correspondientes a los controles del medio PDB, no se observan proteínas, esto puede deberse a que las trazas de proteínas que fueron observadas en el método A, fueron eliminadas durante el proceso de purificación.

En el análisis de imagen realizado con el programa ImageLabBio-Rad, se examinaron los perfiles proteicos obtenidos por SDS-PAGE. El análisis demostró que los métodos basados en la extracción de proteínas por medio de la precipitación con el Método B y C, fueron los más eficientes. Ambos métodos arrojaron un promedio de 14 a 15 bandas, en comparación al método A que solo permitió la visualización de 5 bandas proteicas (**Tabla 1**). Por lo tanto, se puede decir que los métodos B y C son más eficientes para analizar el perfil proteico de proteínas secretadas por *M. phaseolina* en las condiciones experimentales evaluadas en el presente trabajo.

Con los resultados obtenidos se puede seleccionar el método B o C para evaluar las proteínas secretadas por *M. phaseolina* debido a que los rendimientos obtenidos mediante los tres métodos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 1**). Se sugiere optar por la precipitación con TCA, debido a que el método incluye menor número de pasos para llegar al extracto proteico a ser evaluado en comparación al método C.

5. CONCLUSIONES

Se seleccionó una metodología para analizar las proteínas secretadas por *M. phaseolina* al medio de cultivo, mediante la cual se obtuvo una buena recuperación de proteínas y permitió una buena resolución de los perfiles proteicos, las proteínas deben concentrarse por liofilización y posteriormente resuspendidas en un medio conteniendo urea-tiourea-tritonX-100, y finalmente concentradas por precipitación con ácido tricloroacético.

Este trabajo constituye un inicio de la evaluación de proteínas secretadas por *M. phaseolina* y sienta las bases para el análisis de las proteínas que podrían estar implicadas en la patogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Aly, A., Abdel-Sattar. (2007). Differential antagonism of *Trichoderma* sp. against *Macrophomina phaseolina*. *J Plant Protection*, 47, 91–102.
- Arias, L., Barúa, J., & Flores-Giubi, M. E. (2014). Evaluación preliminar de la actividad fitotóxica del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* aislado en Paraguay. Universidad Nacional de Asunción.
- Ayala R. (2006). Eficiencia del tratamiento químico para el control de la pudrición carbonosa del tallo en el cultivo de sésamo (*Sésamum indicum*). *Investigación Agraria*, 11(3), 2–5.
- Beas-Fernández, R., De Santiago-De Santiago, A., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2006). Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *Plant Pathology*, 88(1), 53–60.
- Beas-Fernández, R., Reyes-Franco, M., Hernández-Delgado, S., Medina-Fernández, M., & Mayek-Pérez, N. (2006). Morphological, pathogenic and genetic diversity patterns in *Macrophomina phaseolina*. *Plant Pathol J*, (88), 53–60.
- BK, D. (1992). Effect of potash on stem rot diseases of jute caused by *Macrophomina phaseolina*. *J Mycopathol*, 30, 51–55.
- Bradford, M. 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.
- Dhar TK, A. E. (1982). Structure of Phaseolinone, a novel phytotoxin from *Macrophomina phaseolina*. *Tetrahedron*, (23), 5459–5462.
- Erlei Melo. (2014). *Macrophomina phaseolina*: density and longevity of microsclerotia in soybean root tissues and free on the soil, and competitive saprophytic ability. *Summa Phytopathologica*, 40(2), 128–133.
- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Piro, A., & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010). Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis*, 31(21), 3573–3579.
- Garrido Bigotes, A., Espinoza Galindo, G. I., Sáez Delgado, P., Cañal Villanueva, M. J., Von Stowaser, E., & Hasbún Zaror, R. (2016). Early events in the infection process of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in *Pinus radiata* D. Don seedlings and its effects

- on photosynthetic efficiency as biotic stress indicator. *Gayana Bot*, 73(2), 430–437.
- González-Fernández, R., Aloria, K., Valero-Galván, J., Redondo, I., Arizmendi, J. M., & Jorrín-Novo, J. V. (2014). Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *Journal of Proteomics*, 97, 195–221.
- Ivancovich, A., Flores, C. y Lavilla, M. (2016). Podredumbre carbonosa de la soja, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., un hongo oportunista muy dependiente del estrés hídrico y térmico., 2–6.
- Khan, A. N., Shair, F., Malik, K., Hayat, Z., Khan, M. A., Hafeez, F. Y., & Hassan, M. N. (2017). Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolinia* strains causing pathogenicity on Sunflower and Chickpea. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1309.
- Khan, S. (2007). *M. phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. *Mycopath*, 5, 111–118.
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Phytopathology*, 52(1), 427–451.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T. S., Moreno-Medina, V. R., & Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl Hernández-Delgado, S. (2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 11.
- Mayek-Pérez N. (2001). *Macrophomina phaseolina* resistance in common bean under field conditions in Mexico. *Agrociencia*, (35), 649–661.
- Mayek-Perez, N., García-Espinosa, R., López-Castañeda, C., Acosta-Gallegos, J., & Simpson, J. (2002). Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiol Mol Plant Path*, (60), 85–95.
- Ramezani, M., Shier, W., Abbas, H., Tonos, J., Baird, R., & Sciumbato, G. (2007). Soybean Charcoal Rot Disease Fungus *Macrophomina phaseolina* in Mississippi Produces the Phytotoxin (-)-Botryodiplodin but No Detectable Phaseolinone. *J. Nat*, 70, 128–129.
- Rohan, G., Lowe, B., & Howlett, J. (2012). Indifferent, affectionate, or deceitful: Lifestyles and secretomes of fungi. *PLoS Pathog*, 8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002515>.
- Sarkar, T. S., Biswas, P., Ghosh, S. K., & Ghosh, S. (2014). Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease

of jute: Complexity of the interplay between necrotroph-host plant interactions. *PLoS ONE*, 9(9).

Short GE, Wyllie TD, B. (1980). Survival of *M. phaseolina* in soil and residue of soybeans. *Phytopathology*, 70, 13–17.

Su G, Suh SO, Schneider R. W. and Russin J. S. (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2), 120-126

Trigos, A., Reyna, S., & Matamoros, B. (1995). Macrophominol, a diketopiperazine from cultures of *Macrophomina phaseolina*. *Phytochemistry*, 40(6), 1697–1698.

Wrather, A., Shannon, G., Balardin, R., Carregal, L., Escobar, R., Gupta, GK, Ma, Z., Morel, W., Ploper, D. y Tenuta, A. (2010). Efecto de las enfermedades en el rendimiento de la soja en los ocho principales países productores en 2006. *Progreso de Salud Vegetal*.