

Trichoderma COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL DAÑO CAUSADO POR *Fusarium verticillioides* Y LA ACUMULACIÓN DE FUMONISINAS EN MAÍZ.

Fauguel, C.M.¹; Campos Bermudez, V.²; Rius, S.²; Presello, D.A.¹; Fernandez, M.¹; Andreo, C.² y Vargas, W.A.²

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Pergamino. C.C. 31. 2700. Pergamino. Pcia. Bs. As. Argentina. fauguel.carolina@inta.gob.ar.

²Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI). Suipacha 531. Rosario. Argentina.

Abstract

Fusarium verticillioides is the predominant fungal pathogen in corn kernels from Argentina. This fungus causes ear rot and food contaminations with fumonisins, threatening health in farm animals and human. Due to the high social and economic impact of such maize disease, it is desirable to reduce the incidence of the pathogen in fields and consequently the levels of fumonisin in maize kernels. The genus *Trichoderma* includes a group of filamentous soilborne fungi with positive effects on plants. The beneficial strains belonging to this genus act as antagonists of phytopathogenic organisms and stimulate plant immune system to reduce later incidence of several plant pathogens. One of the most striking phenomena during *Trichoderma sp.* host root colonization is the priming of plant immunity in distant tissues. When plant defenses are primed, a more rapid and effective response is triggered to subsequent attack by pathogens reducing disease incidence and severity. However, the regulatory processes that mediate the priming of plant defense mediated by *Trichoderma sp.* are still unknown. In this work we study the role of secondary metabolites and their connection with plant defense priming induced by *Trichoderma*. Improve food security in maize fields will contribute to better standards of public health and also increase the competitiveness of Argentinean products in the global market.

Keywords: *Trichoderma*, maize, flavonoids, *Fusarium verticillioides*.

Palabras clave: *Trichoderma*, maíz, flavonoides, *Fusarium verticillioides*.

Introducción

En nuestro país las especies del género *Fusarium* causan grandes problemas en los cultivos de maíz, trigo y soja, entre otros, ya que comprometen la calidad de harinas y otros productos de consumo masivo para humanos y animales domésticos. En el caso del maíz el agente patógeno causante de la podredumbre de la mazorca es *F. verticillioides*, este hongo puede ingresar principalmente a través de los estigmas y descender hasta el grano para inducir la síntesis de micotoxinas, especialmente fumonisinas y causar deterioro en la calidad del grano (Bush et al. 2004). Uno de los problemas más importantes que enfrenta la producción de maíz es que no existen en el mercado variedades comerciales completamente resistentes a *Fusarium* en las cuales se prevenga la entrada de *F. verticillioides* o la acumulación de micotoxinas. Por el momento, la única alternativa es tratar de reducir la incidencia de este hongo mediante el manejo de los ciclos de siembra. Por otra parte, existen evidencias que demuestran que el ciclo de vida de *Fusarium sp.* puede interrumpirse con el uso de agentes de control biológico como *Trichoderma sp.* Estudios recientes demostraron que diversas especies de *Trichoderma* tienen efectos antagónicos sobre el crecimiento de distintos aislamientos de *Fusarium sp.* y a su vez en la producción de micotoxinas (Sobowale et al.2009; Matarese et al. 2012; Rojo et al. 2007). Un aspecto importante de la inmunología vegetal es el cebado o "priming" del sistema inmune de las plantas que hace referencia al estado fisiológico por el cual las células vegetales están preparadas (en un estado de alerta) para responder de una manera más rápida y más agresiva a un futuro estrés biótico o abiótico (Frost et al. 2008). Evidencias previas han demostrado que la inoculación de plantas de maíz con *Trichoderma virens* interfiere con el metabolismo secundario del hospedador y conduce al estado de priming inmunológico protegiéndolas contra el ataque posterior de diversos patógenos (Vargas et al., 2008). Sin embargo, las bases moleculares y bioquímicas responsables de la activación del priming luego de la inoculación con *Trichoderma* no han sido muy estudiadas en plantas de interés agronómico. El objetivo general de este trabajo abarca el estudio de las bases bioquímicas del priming del sistema inmune vegetal inducido por *Trichoderma* en maíz, su relación con el

metabolismo de flavonoides y su importancia en la prevención de la podredumbre de espiga en maíz causadas por *F. verticillioides*.

Materiales y métodos

Material vegetal y aislamientos fúngicos. Se analizó la capacidad de cuatro cepas de *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. reesei*, *T. harzianum* y *T. virens*) para activar el sistema inmune en las hojas por inoculación en las raíces. Como material vegetal se utilizó la línea de maíz B73. Un grupo de plantas sin inocular se utilizaron como control del experimento.

Estudio del efecto in vitro de extractos metanólicos. Se evaluó el efecto de extractos metanólicos obtenidos de hojas sobre el crecimiento *in vitro* de *F. verticillioides*. Se prepararon cajas de Petri con medio agar papa glucosado (APG). Previo al agregado sobre el medio de cultivo, los extractos obtenidos se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa (0,22 µm). Se sembraron 50 µl de cada extracto con espátula de Drigalsky dejándose evaporar por 2 hs. Se realizó un orificio en la parte central de cada medio y se sembró una suspensión conidial del aislamiento P364 de *F. verticillioides* (1x10⁶ conidios/ml). Se incluyeron testigos con el agregado de la misma cantidad del solvente de extracción sin la presencia del extracto. Se evaluó el crecimiento radial del hongo durante 5 días de incubación en cámara de cultivo a 25°C.

Análisis de flavonoides y antocianinas. Los metabolitos se extrajeron con 50% metanol en agua en una proporción de 50 µg/µl de peso seco. Las muestras se incubaron durante 16 h a -20°C. Luego los extractos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min. y se recuperaron los sobrenadantes. El contenido de antocianinas se cuantificó midiendo la absorbancia a 530 nm. Las extracciones para análisis de flavonoides por HPLC se realizaron según lo descrito previamente (Casati y Walbot 2005). La absorbancia se determinó a 368 nm. Los tiempos de retención de los productos analizados se compararán con estándares comerciales (Sigma-Aldrich).

Por otro lado, mediante PCR en tiempo real determinamos los niveles de expresión de un grupo de genes relacionados con el metabolismo de flavonoides [GRMZM2G422750 (C2), GRMZM2G151227 (WHP1), GRMZM2G152801 (FLS1)], en hojas de plantas inoculadas con las diferentes cepas de *Trichoderma*.

Resultados y discusión

Se confirmó la presencia de hifas del hongo solamente en raíces (Figura 1), lo cual indica que cualquier cambio fisiológico inducido en las hojas sería debido a respuestas activadas de forma sistémica y que, basado en los antecedentes, serían consecuencia del priming del sistema inmune vegetal.

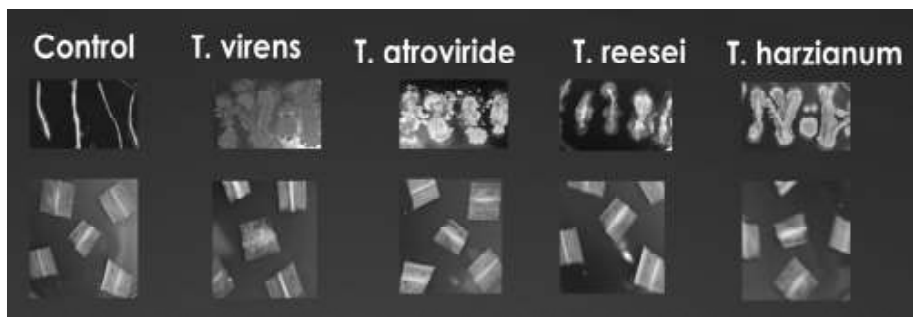


Figura 1. Porciones de raíces y hojas de plántulas de maíz inoculadas con *Trichoderma* en raíces.

Estudio del efecto in vitro de extractos metanólicos. Se observó inhibición del crecimiento fúngico para todos los extractos obtenidos desde plantas inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma*. Luego de 24 horas del inicio del ensayo, se registró una inhibición de hasta el 50% del crecimiento de *F. verticillioides* en las muestras provenientes

de plantas inoculadas con *T. atroviride* (Figura 2). La inoculación con cepas de *Trichoderma* indujo en hojas la síntesis de compuestos capaces de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno.

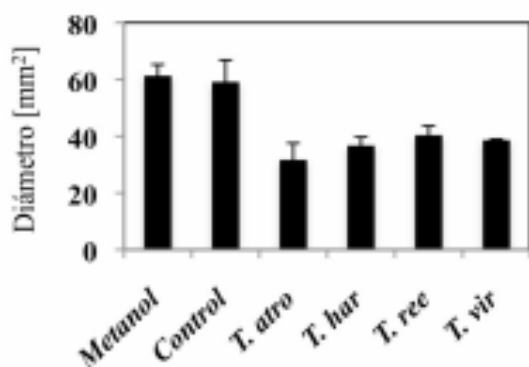


Figura 2. Crecimiento *in vitro* de *Fusarium verticillioides* en placas de Petri con medio APG con agregados de extractos metanólicos de hojas de plantas inoculadas con *Trichoderma* en raíz.

Análisis de antocianinas y flavonoides. La colonización de raíces por parte de *Trichoderma* condujo a un incremento (más del doble) en el contenido de antocianinas respecto a las plantas control (no inoculadas con *Trichoderma*) (Figura 3). A su vez, el análisis del contenido de flavonoides mediante HPLC reveló que el flavonoide mayoritario en las hojas control es la quercetina, mientras que las plantas inoculadas con *T. reesei* acumulan mayores niveles de apigenina (Figura 4). Sin embargo, luego de la inoculación con *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. virens*, la quercetina ya no pudo ser detectada pero se encontraron otros flavonoides que no pudieron ser identificados.

En relación con la acumulación diferencial de metabolitos secundarios, también determinamos los niveles de expresión de un grupo de genes relacionados con el metabolismo de flavonoides [GRMZM2G422750 (C2), GRMZM2G151227 (WHP1), GRMZM2G152801 (FLS1)], en hojas de plantas inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma*. Los resultados muestran cambios de expresión en hojas de plantas inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* respecto a las plantas control. Estos resultados estarían indicando una modificación en la expresión de los genes que codifican para enzimas responsables de la síntesis de estos metabolitos, los cuales podrían actuar como iniciadores del priming. Los cambios más destacados se observaron para el gen WHP1, codificante para una chalcona sintasa, que presentó aumentos de expresión de aproximadamente 45 veces en plantas inoculadas con *T. atroviride* respecto de las plantas control, resaltando los efectos diferenciales inducidos sistémicamente por *T. atroviride* en maíz en comparación a las demás cepas en estudio.

Conclusiones

Estos resultados confirman cambios metabólicos inducidos sistémicamente y que afectan los niveles de flavonoides en plantas inoculadas con *Trichoderma* y, más aún, que dichos cambios también conducen a la acumulación de compuestos con actividad antifúngica.

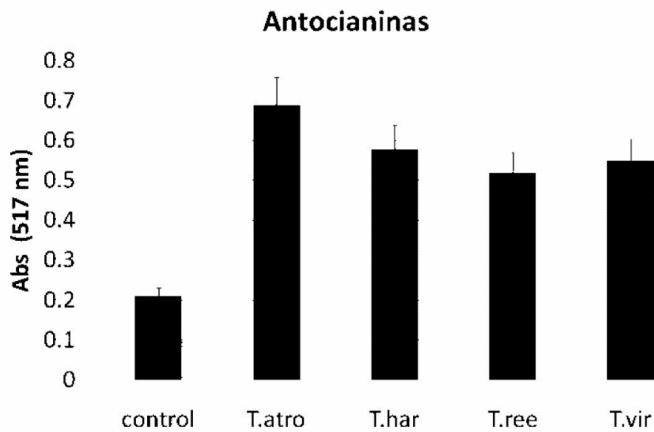


Figura 3. Contenido de antocianinas en hojas determinadas por espectroscopía de absorción a 517nm.

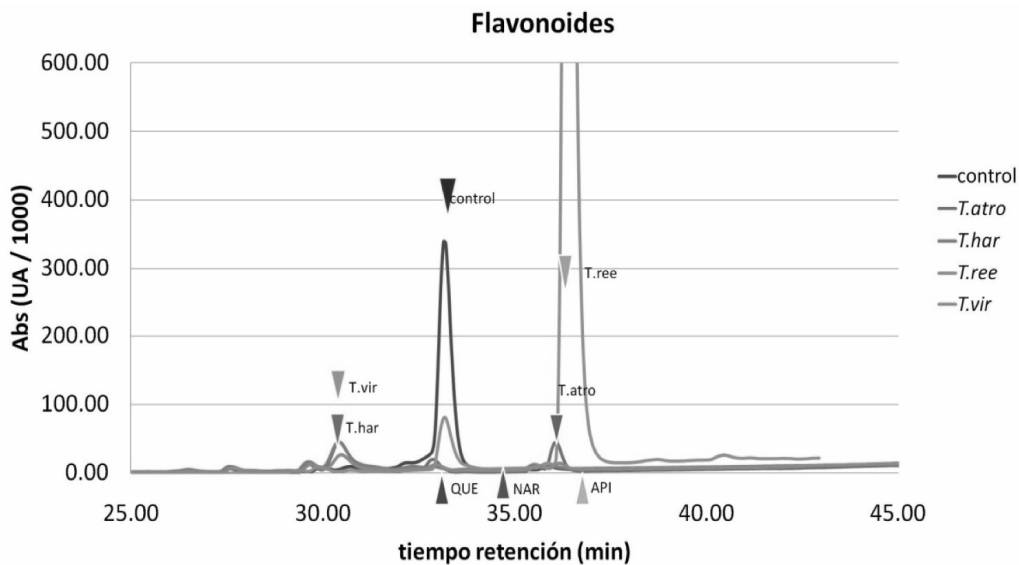


Figura 4. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de flavonoides en extractos metanólicos de hojas provenientes de plantas inoculadas con distintas cepas de *Trichoderma*. Estándares: QUE, quercetina; NAR, naringenina; API, apigenina.

Citas Bibliográficas

- Bush, B.J.; Carson, M.L.; Cubeta, M.A.; Hagler, W. M. and Payne, G. A. 2004. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology* 94: 88-93.
- Casati, P. and Walbot, V. 2005. Differential accumulation of maysin and rhamnosylisoorientin in leaves of high-altitude landraces of maize after UV-B exposure. *Plant, Cell & Environment*, 28, pp. 788-799
- Frost, C.J.; Mescher, M.C.; Carlson, J.E.; De Moraes, C.M. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiol* 146 818-824
- Matarese, F.; Sarrocco S.; Gruber S.; Seidl-Seiboth V. and Vannacci G. 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology* 158, 98-106.
- Rojo et al. 2007. *Mycotoxin Research* 23: 173-179
- Sobowale et al. 2009. *Journal of Plant Protection Research* 49: 452-459
- Vargas et al. 2008. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 19804-19815