

Interacción de *Trichoderma harzianum* (T36) versus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e implicación de la proteína putativa quinasa (*ThSNF1*) y su relación con la actividad biocontroladora del hongo benéfico.

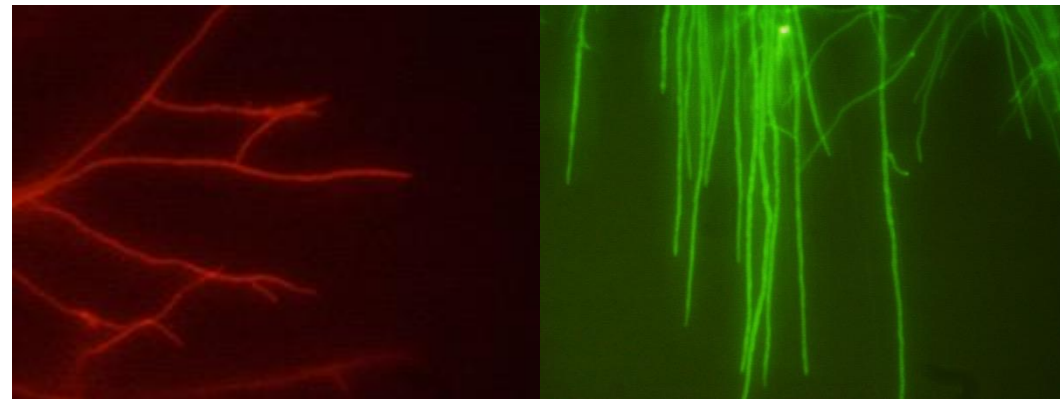
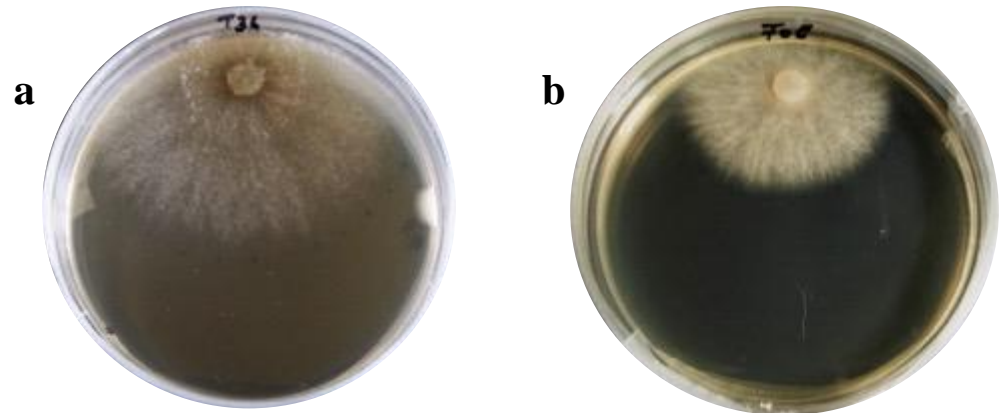
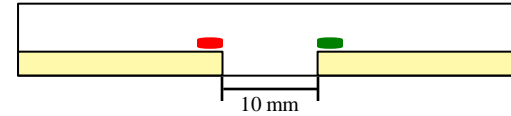
Luis Galarza Romero Ph.D.



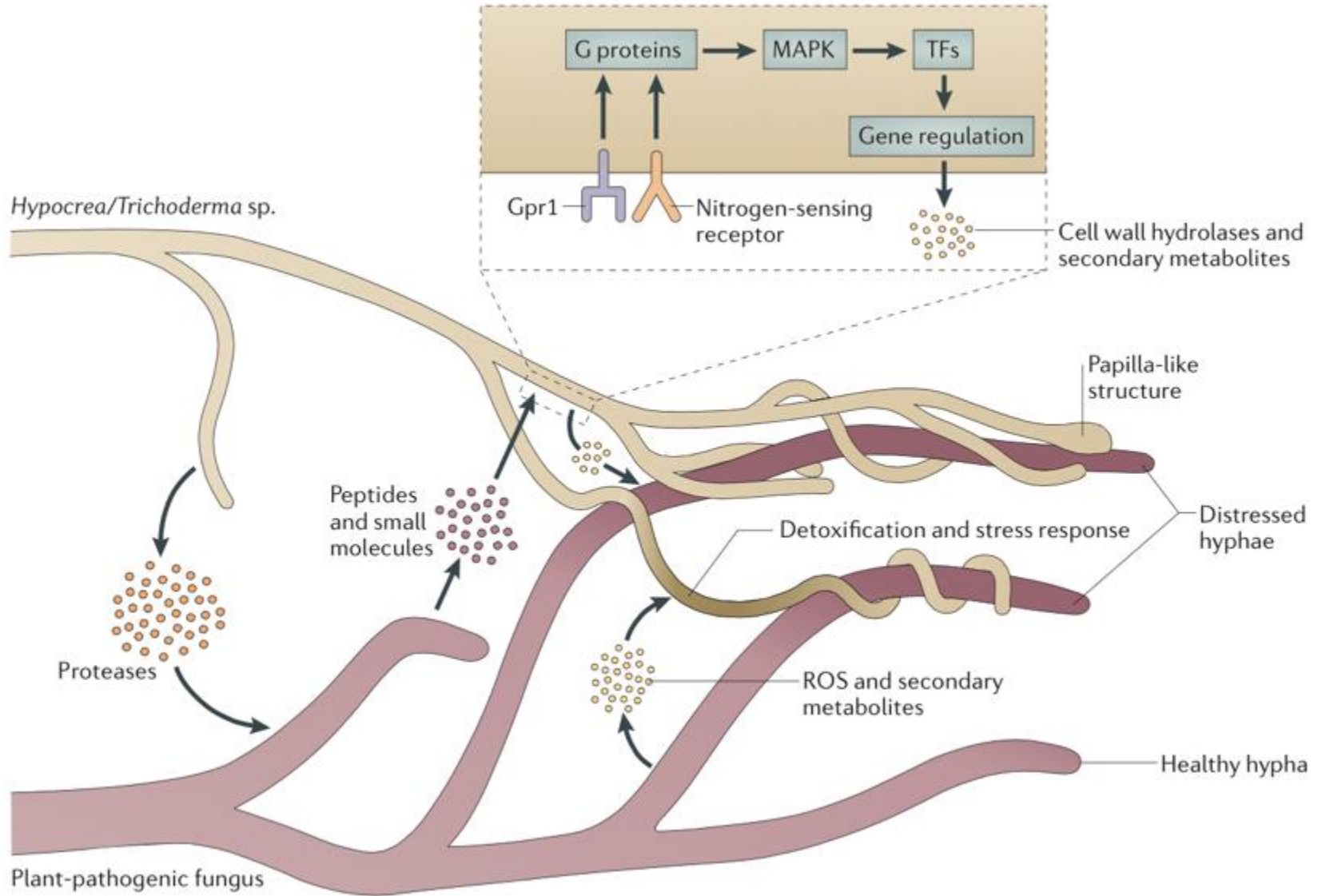
Interacción microscópica de *T. harzianum* T36 usando Ds-RED y GFP

La habilidad antagonista de las diferentes especies de *Trichoderma* contribuyen conjuntamente al alto potencial biocontrolador de esta especie.

- *T. harzianum* T36 y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*
- Plásmido pMK412 (Watanabe et al. 2007) contiene un gen GFP (*egfp*). Plásmido pDs-Red2 (Takara Bio, Ohtsu, Japan) contiene a *dsred2*.
- Transformación realizada por PEG y protoplastos
- Colonias resistentes Hygromicina fueron seleccionadas

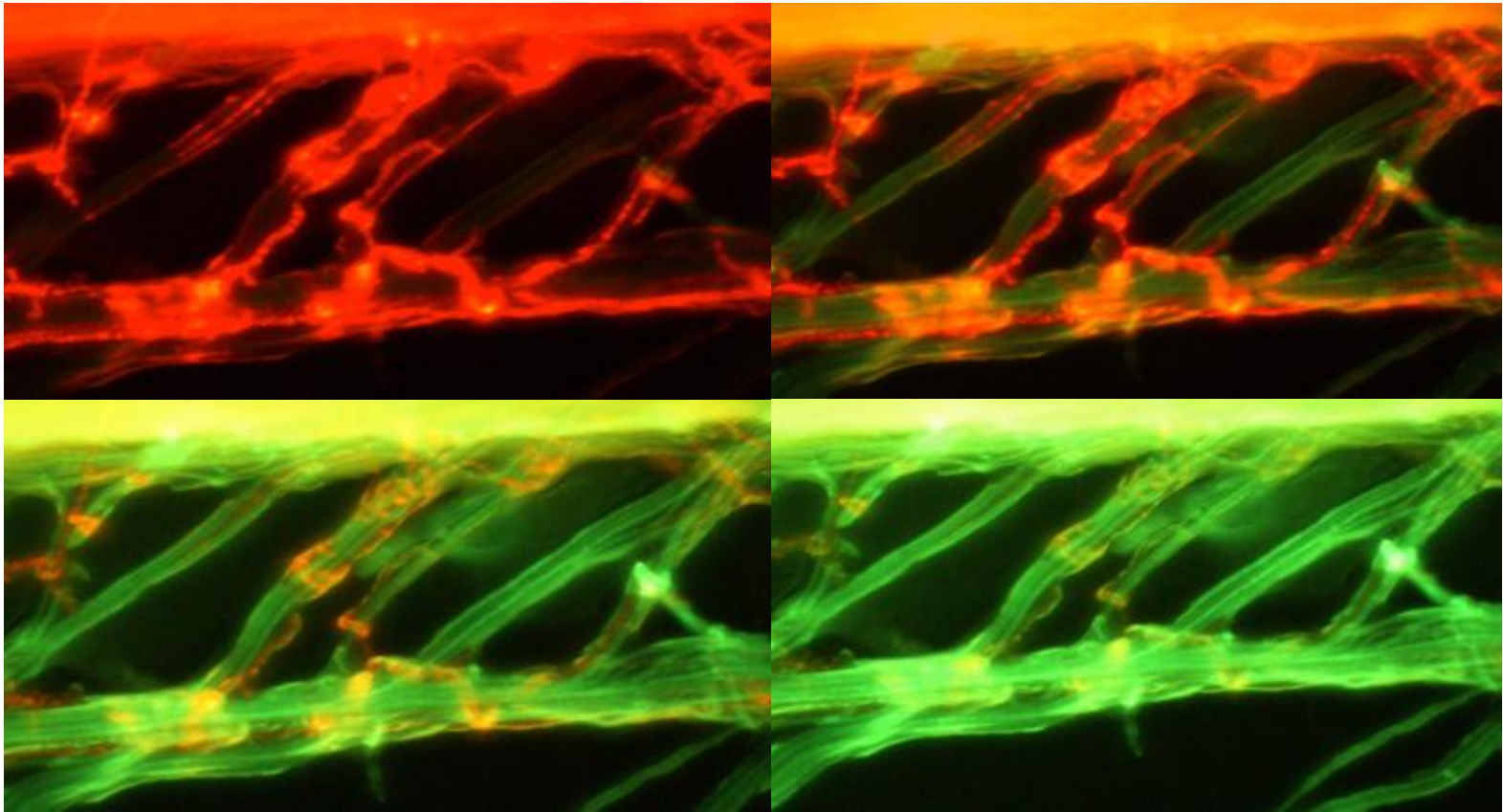


Micoparasitismo de *Trichoderma* spp.



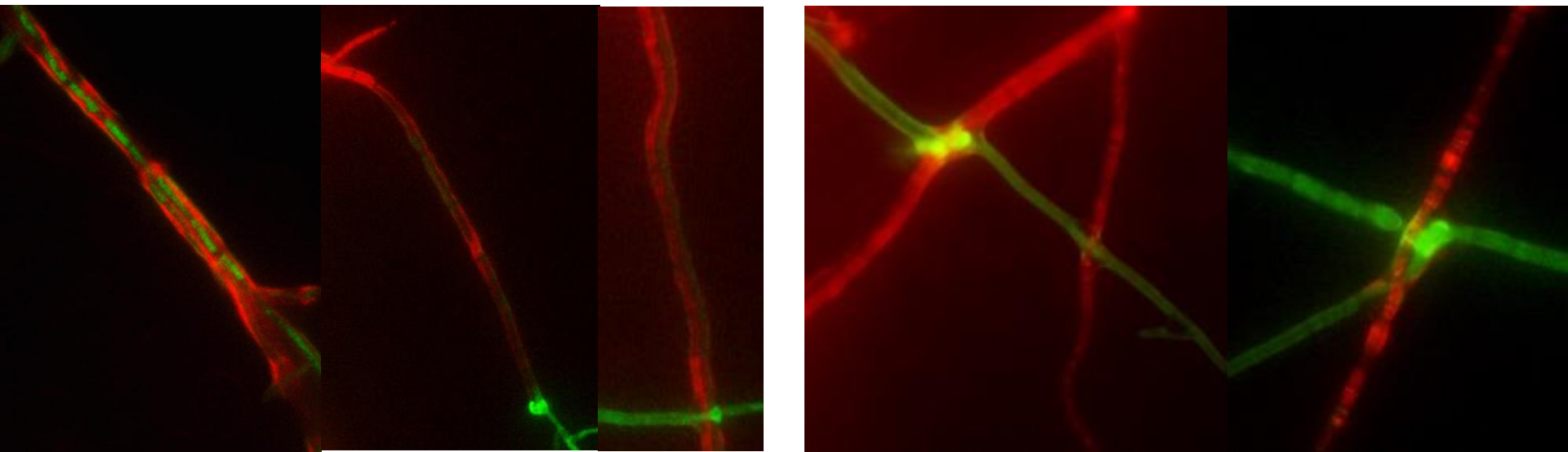
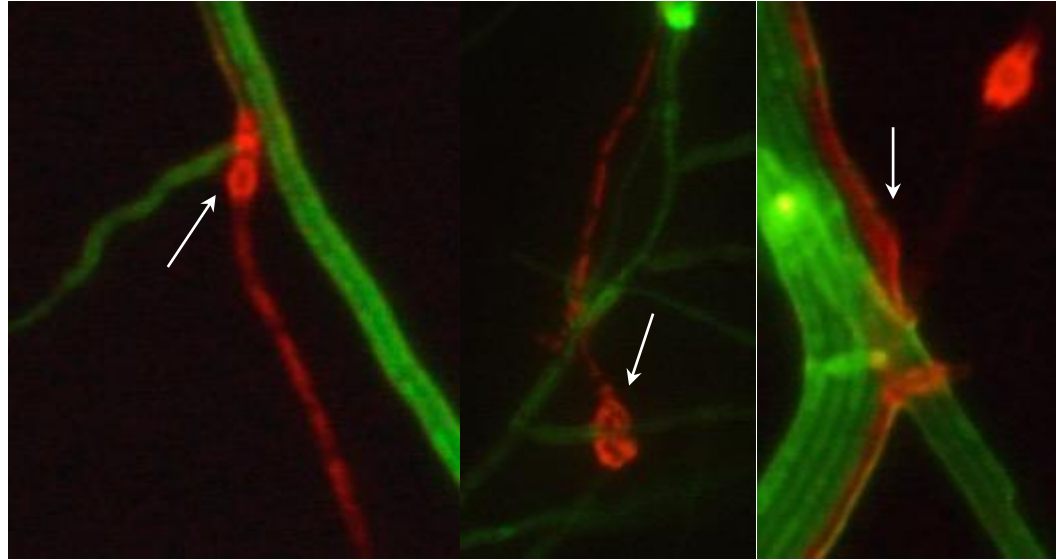
Micoparasitismo

T. harzianum T36 (*ThDsred*) vs *F. oxysporum* f. sp. *cubense*
Fo-01 (*FocGFP*)



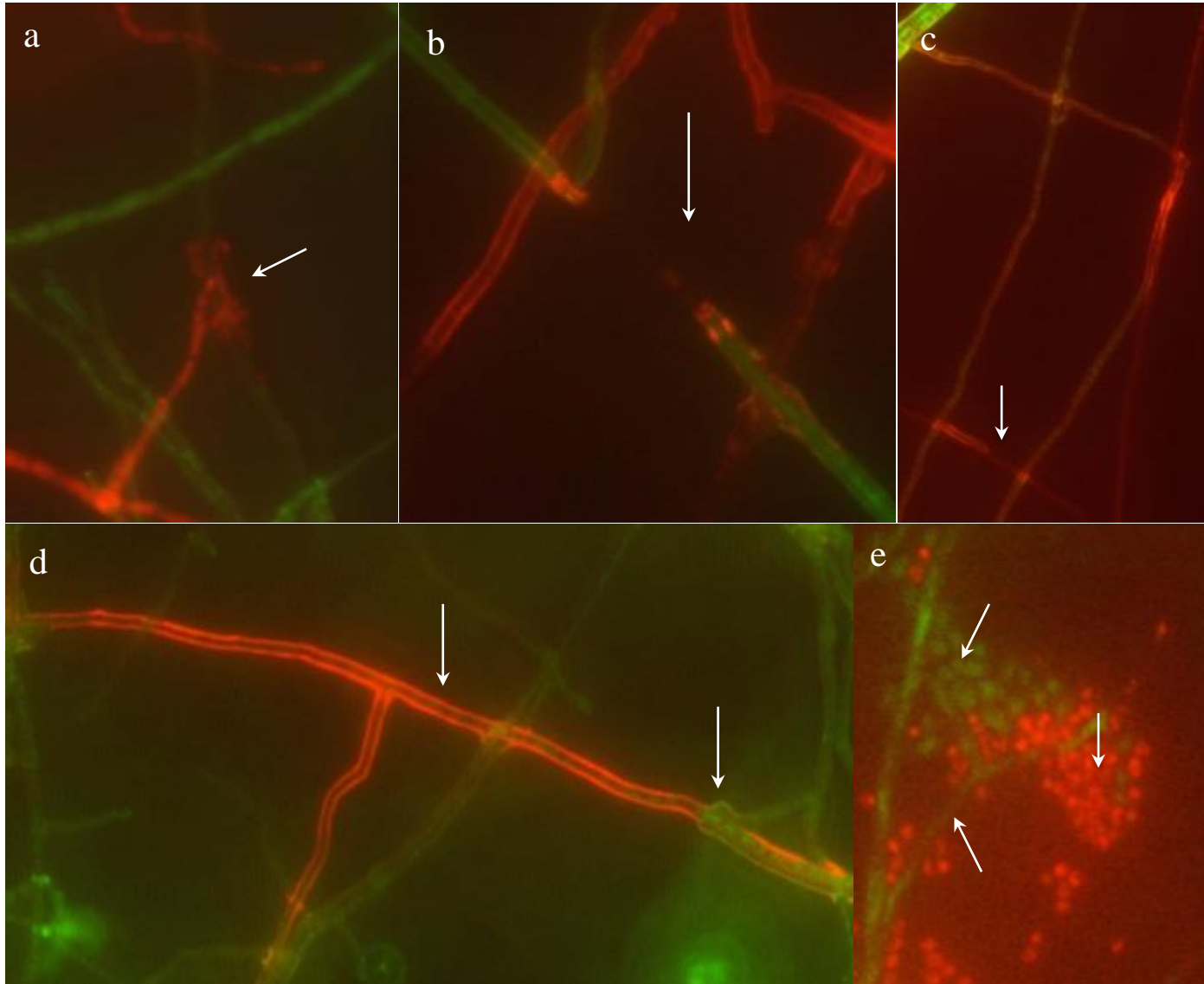
Micoparasitismo

T. harzianum T36 (*ThDsred*) vs *F. oxysporum* f. sp. *cubense*
Fo-01 (*FocGFP*)



Micoparasitismo

T. harzianum T36 (*ThDsred*) vs *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Fo-01 (*FocGFP*)



Identificación y Análisis funcional del gen de Proteína Quinasa (*ThSNF1*) en *Trichoderma harzianum*

SNF1(sucrosa no-fermentativa)

-juega un rol principal en la represión catabólica del carbón en:

Saccharomyces cerevisiae

-es una proteína quinasa que fosforila MIG1y es un represor transcripcional de unión del ADN.

Mutaciones homólogos de *SNF1* en *Cochliobolus carbonum* y *Fusarium oxysporum* causaron una significativa reducción en la actividad enzimática degradadora de pared celular además de su virulencia.

Se examinó la participación de múltiples enzimas de degradación de la pared celular en el micoparasitismo de un agente de control biológico como *T. harzianum* utilizando SNF1 mutantes de la disrupción de *T. harzianum*.

Identificación y Análisis funcional del gen de Proteína Quinasa (*ThSNF1*) en *Trichoderma harzianum*

- La cepa original fue sometida a un análisis de secuenciación *T. harzianum* T36.
- Mediante PCR se construyeron vectores de interrupción del gen en estudio.
- Transformación mediante PEG y protoplastos
- Colonias del hongo resistentes a Hygromicina fueron seleccionadas, mediante PCR se detectó la interrupción del gen en estudio.

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *ThSNF1* y los ortólogos *SNF1* en otros hongos ascomicetos

```
ThSNF1 --MAPRGFED--ELTISMSSTHVRHROPQPPQED-----VATAPKNIARTDQOPQEKKS 51
FoSNF1 --MAPRGFED--ELTISLSSSHVRRPQOQQOQQOQQOQQOQHASSDAPTGPSRPADAPLKERI 58
CcSNF1 MSAADINDEDLEELSISMPSQRRGAQTSTTKAQDF-----APPPTALGTAVHETKSKDT 55
      * . . * * * * * * * * * * * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
      * . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

RAEQRIGAYTVIRTLGEESFGKVLRAIHNGTQQQVALKI ITRKKLISRDMAGRVEREIEY 111
KTEQRIGAYKVLRTLGEESFGKVLRAIHNGTQQQVALKI IARKKLISRDMAGRVEREIEY 118
KASQRLGQYTVIRTLGEESFGKVLATHQVSGQKVALKI INRKRLLVTRDMAGKIEREIQY 115
::.*.*.* * . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
      * . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

LQLLRHPHIIKLYTVIKTPAEIIMVLEYAGGELFDYIVONGRMKEAEARRFFQOMICAVE 171
LQLLRHPHIIKLY----TFNEIIMVLEYAGGELFDYIVQHRMKEPEARRRFFQOMLCAVE 174
LQLLRHPHIIKLYTVITPTEIIMVLEYAGGELFDYIVNHGKLOEAQAREFFQOIVCAVE 175
*****
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

YCHRRKIVHRDLKPENLLLDENLVKIIDFGLSNIMTDGNFLKTS CGSPNYAAPEVIGGK 231
YCHRRKIVHRDLKPENLLLDENLVKIADFGLSNIMTDGNFLKTS CGSPNYAAPEVIGGK 234
YCHRRKIVHRDLKPENLLLDHDSNVKIADFGLSNIMTDGNFLKTS CGSPNYAAPEVIGK 235
*****

LYAGSEVDVWSCGVILYVLLVGRLPFDDEHIPSFLAKIARGTYSMPQWMPAGAALIKGM 291
LYAGPEVDVWSCGVILYVLLVGRLPFDDEHIPSFLAKIAGTYSIPQWMPAGAANLIKHM 294
LYAGPEVDVWSCGVILYVLLVGRLPFDDEYIPTLFKKAAGQYSTPSYLSPGATSLIKHM 295
*****

LVVNPVQRMTIDEIRADPWFTDLPTYLQPPVEEFPHTGVDPNKAIQKSDIAPNAPEKVO 351
LVVNPVHRATIEDIRADPWFTDLPAYLQLPVEEFPHTGVDPNKAIKKNDIAPNASEKVO 354
LMVNPVHRITIPELRQDPWFTDLPAYLEPFAEFDSGADPNKAI DPKALAPLADAPRV 355
*****

EKLHNEVTEKISKTMGYGKDDVEEALQSEEPSAIKDAYMIVRENKMLAN----- 401
ERLHNEVTEKISKTMGYGKSDVEEALQAAEPAAIKDAYMIVRENKMMQVNH----- 405
QALHNEVVTKLGMTMGYAKHVDQDALARDEP SAIKDAYLIVRENEMMRENPLLNODGVP 415
: . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

----NPEGLTGEEGS--PMMSISSTR-----SAISPGGTSPRPYVVK 438
----NPEALLAEPESSPMLSMSSAR-----STTSQATTPRPYVSK 443
VWNHQSPPAHD SYMEKFRPQSLNAVSRPQFI PPAPSDHERAROGSNASSQLASIRSPVST 475
* . : : * . : . : . * . : . : . * . : . : . * . : . : . * . : . : .

VGILPSSLPAYHKDYMERENKNGTDHDLPPAIAINDELPAT--RTEAEKEEAARRLNPHA 496
VGILPSSLPAYHKDYMERKAGSVEN--SPPKVINDEPPSN--RTDAEKEETARRLRPHS 500
IALPSSLTEYHKAYMKG-----HPRPTNKISESEALPPTPEQTEEQRQISARRLKPNF 529
: . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

RNALRLDESSKRPOGMTPITPAKKPKPVRWQFGIRSRNAPWEALLCIHKALHKLGASHL 556
RSQLRMDEANTRPOGMTPIN--PPKKNKPVVRWQFGIRSRNSPWEALLCIHKALHKLGATYI 559
RTMP--EAGRTKPEPMTSLP--TKKPHATKWQFGIRSRNQAAMLAIFKALKAMGADWE 585
* . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

P-----DEGYDEAHGRGDDATSRDSFPANGVPLAR--KLNDAD-----PTKK----- 597
P-----DEDYESRTAEERAEEASG--EGSFADSHDNRGSSSID-----PKKR----- 600
VPKIRRAGGRSGSRSRSTSQAPEDRDKSKSRNHSQDSISSHSSDEDDQGRKSGSKPREPLSV 645
      * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . .

-----YKLPADPWHIQVRWF----- 612
-----YHLPADPWHINVRWD----- 615
RRNGTSEQEARGRQKKHYNHTNDWGYHVPEDPWVIHARFLKEGMFPPGVAHPSTHSSRV 705
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

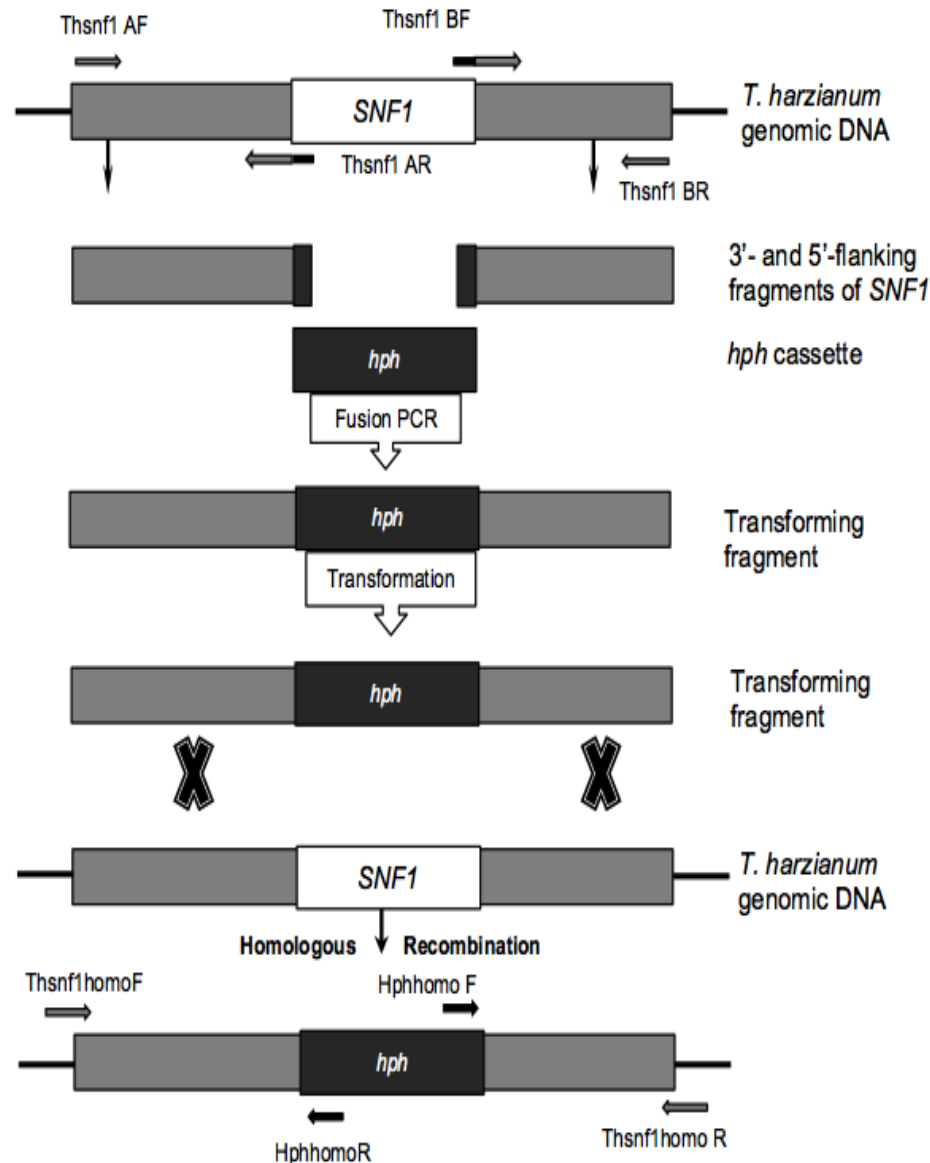
-----SSDIQREAEERRQDSEMK-----SGSPDSFHVYSPEDPTSRKDFVALHMDIQIYEM 662
-----TSAIKKKAASVPGTSS-----PSTPE--GQHHPKEP-----FVALHMDIQIYEM 658
DLANDSSGARRRSTNTSTSSAGHGVEGMPERAGSVSEHDHVNPEAVVIYMSIQLYSI 765
      * . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

EQGVYLVDFKCSGYETQD----- 680
EHGVYLVDFKCSGYETAH----- 676
DRDFFVVDFKACAGYERLVNTLVREIKASIPLSGSHQPPPHHQDGDWDEQGVWRRLDENEP 825
: . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

-----GRLLLEEKVTSPFPFLDRAAKLIMQLAEAD 710
-----GRLLLEEKDVTSFPFPFLDMAAKLIMQLAEAD 706
LPEDLAKKLNEGGTEILRRETELVGAGRQEGEKIVTSFPFPFLDVASTLILQLSCE-- 880
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

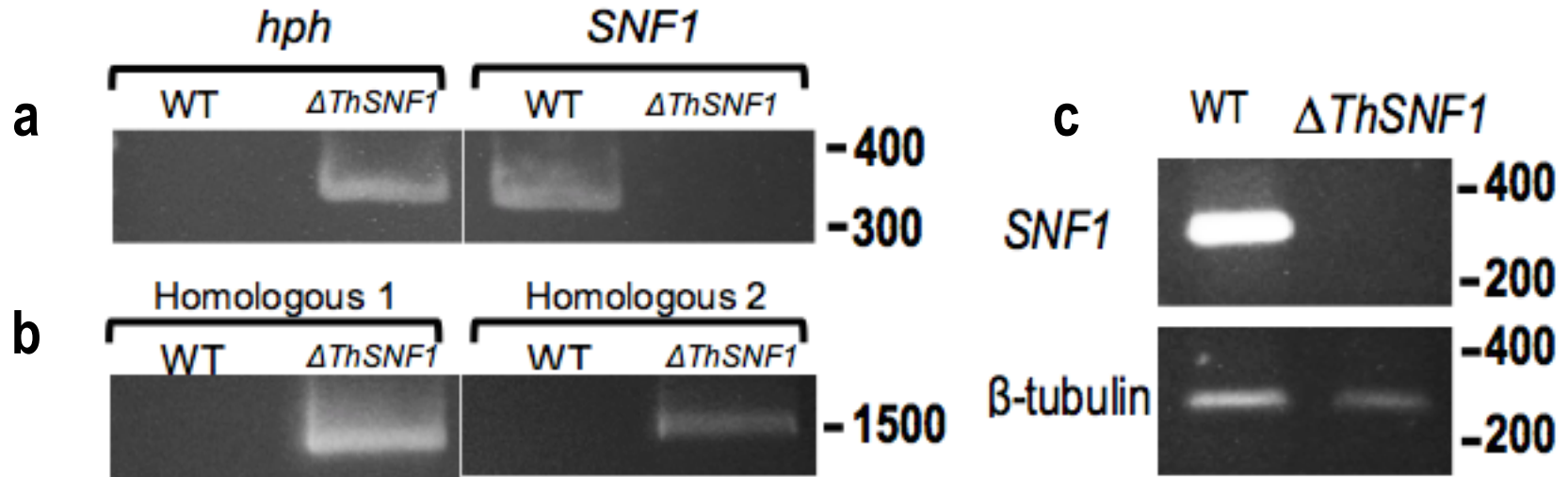
Las secuencias de aminoácido fueron alineadas con el programa Clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). La predicción de dominio de la proteína *ThSNF1* fue realizada por InterProScan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>). *CcSNF1* y *FoSNF1* son *SNF1* ortólogos de *Cochliobolus carbonum* (AF159253) y *Fusarium oxysporum* (AF420488), respectivamente. Lo subrayado muestra el dominio catalítico de la proteína serine/treonina quinasa.

Estrategias de disrupción de *ThSNF1* en el genoma de *T. harzianum* T36.



El método de PCR de fusión fue utilizado para construir el vector *ThSNF1*. La región 5' de *SNF1* fue amplificada por PCR con los cebadores *ThSNF1AF/ThSNF1AR*, y la región 3' fue amplificada con los iniciadores *ThSNF1BF/ThSNF1BR*. El gen *hph* fue amplificado con los cebadores *fushphF/fushphR*, este producto de PCR fue usado para realizar la transformación. Los colores blancos, negro y plomo indican la secuencia de *SNF1*, *hph* y los extremos de la región *SNF1*, respectivamente.

Análisis de PCR del reemplazo genómico en *ThSNF1* en la cepa original (WT) y la cepa mutante $\Delta ThSNF1$

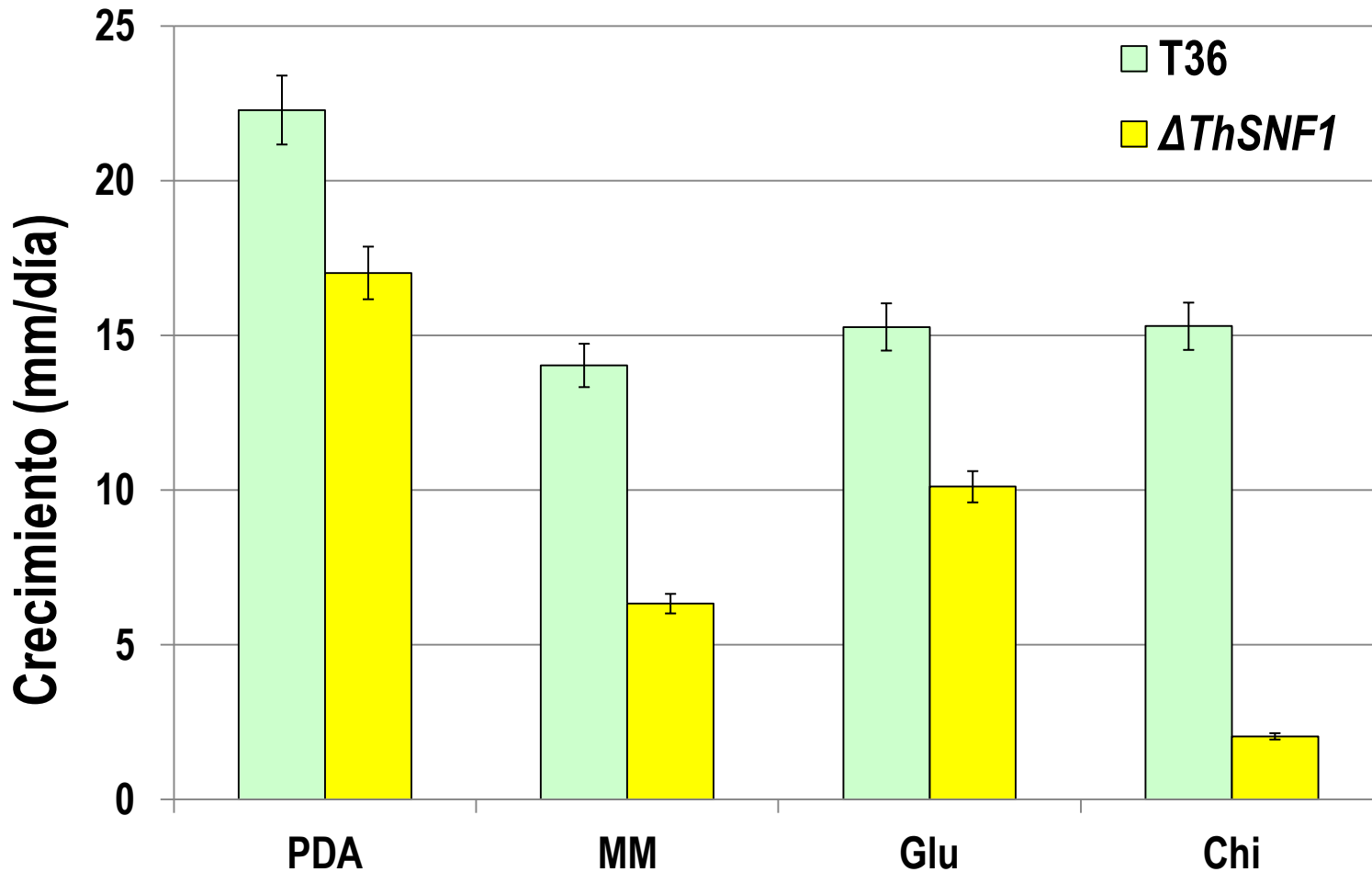


(a)-*hph* hphF/hphR, (a)-*SNF1* Thsnf1inF/Thsnf1inR.

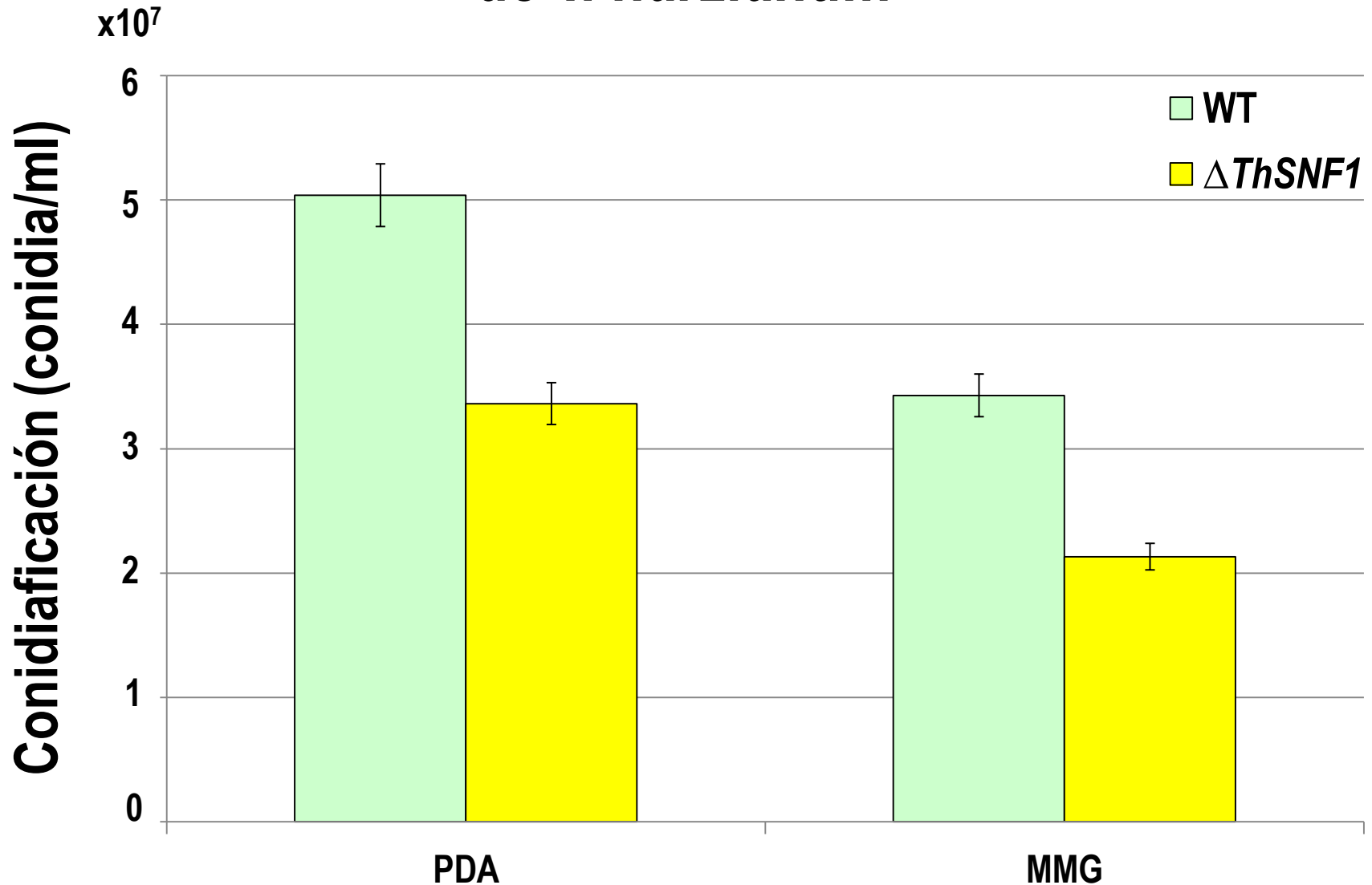
(b)-Homologous 1 Thsnf1homoF/HphhomoR, y (b)-Homologous 2 HphhomoF/Thsnf1homoR.

(c) Expression of *ThSNF1* in the wild type T36 (WT) and $\Delta ThSNF1$ strains of *T. harzianum*.

Tasa de crecimiento de cepas WT y $\Delta ThSNF1$ de *T. harzianum*

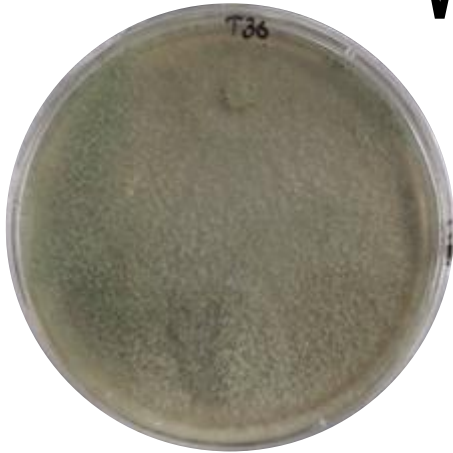


Producción de Conidios en la cepas WT y $\Delta ThSNF1$ de *T. harzianum*

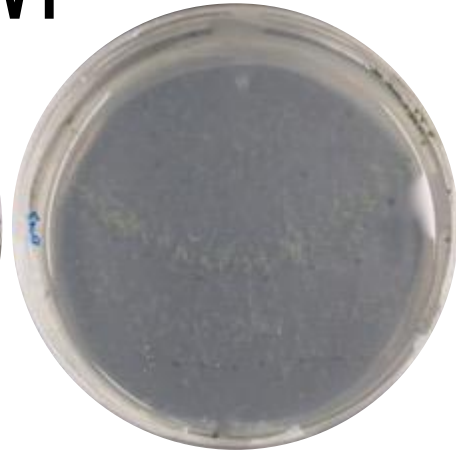


Crecimiento de las colonias de las cepas WT y *ThSNF1*

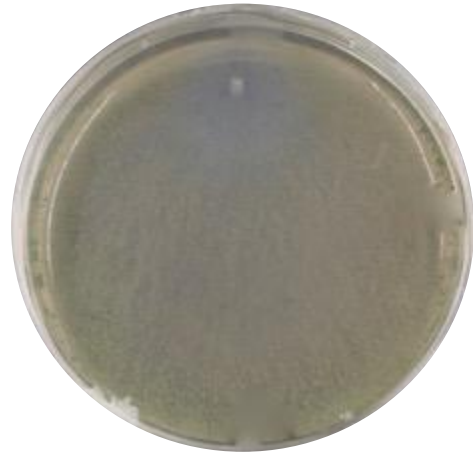
WT



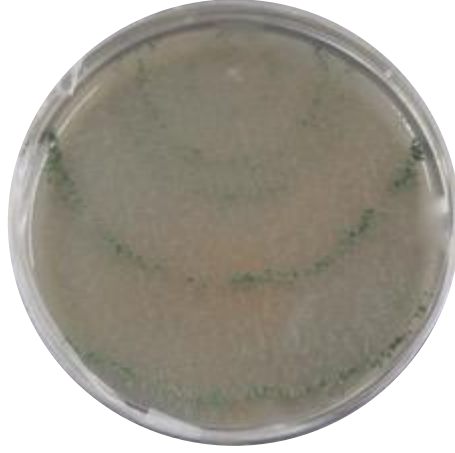
PDA



MM

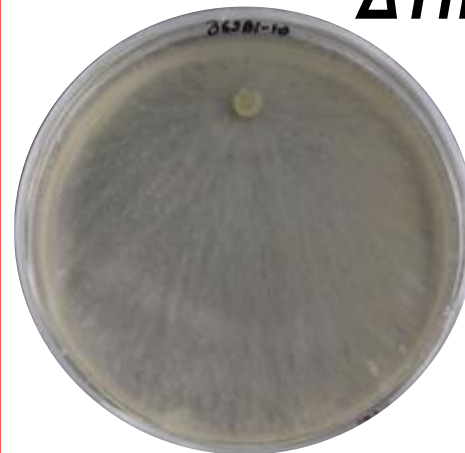


GLU

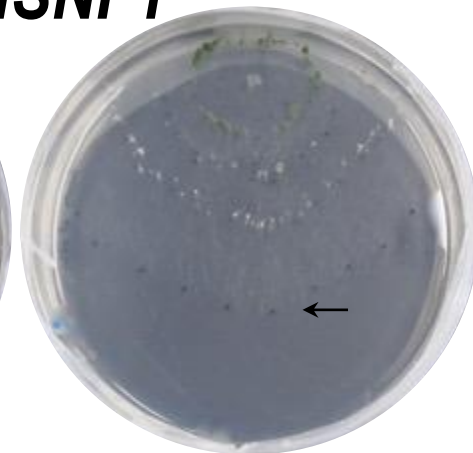


CHI

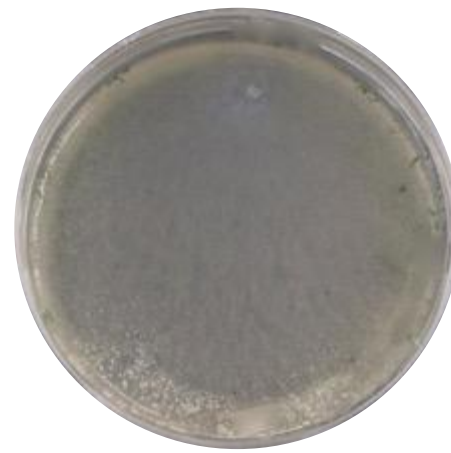
Δ ThSNF1



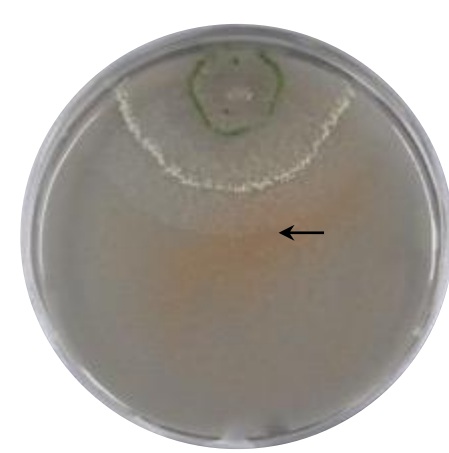
PDA



MM

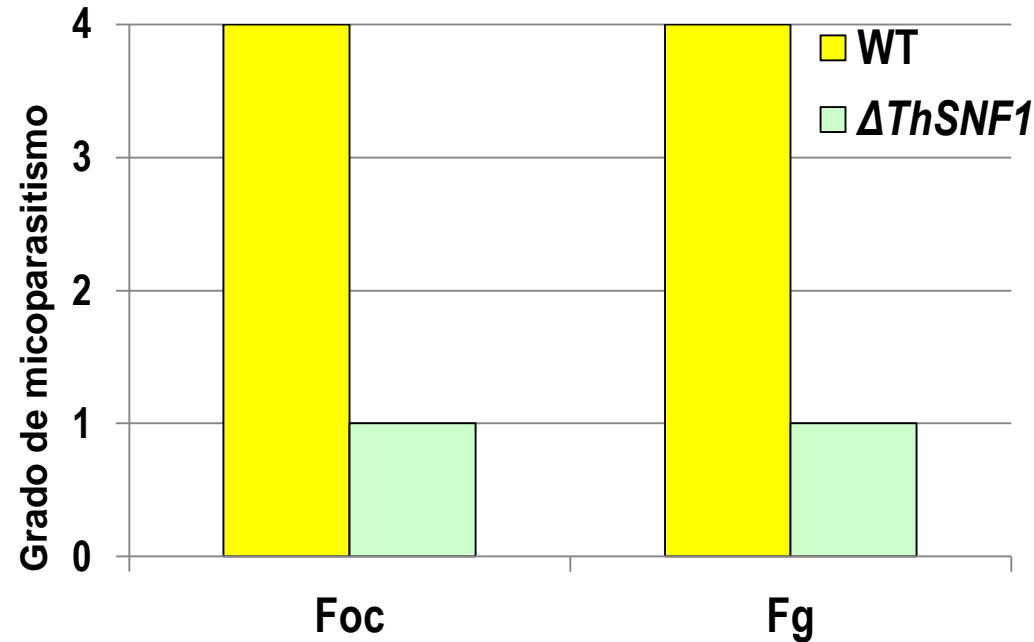
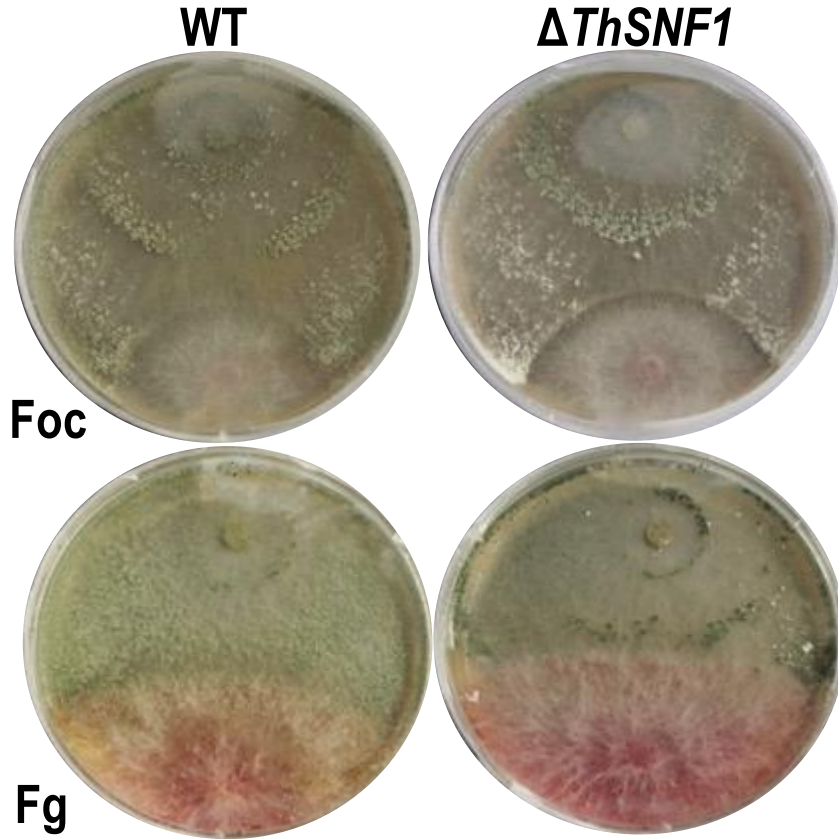


GLU



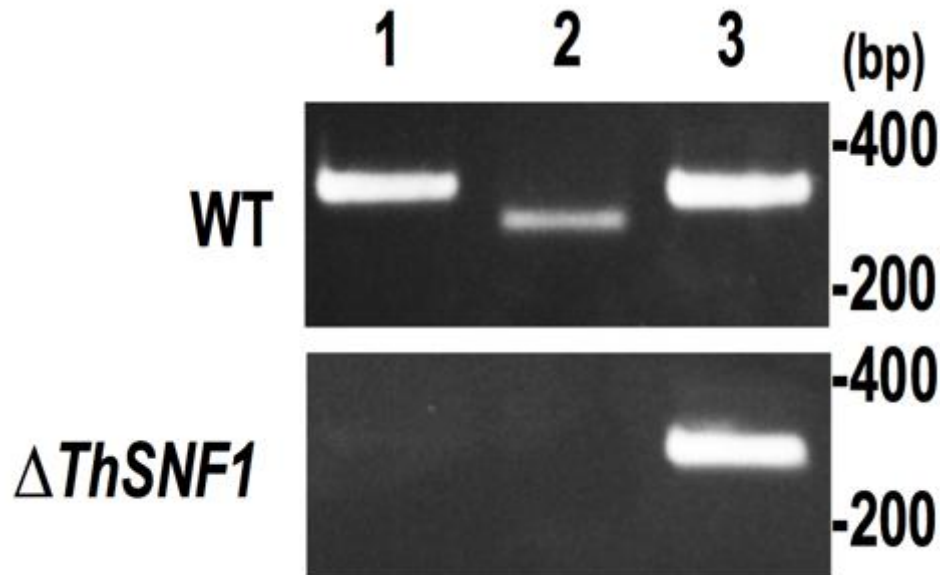
CHI

Pruebas *In vitro* de Micoparasitismo de las cepas original (WT) y $\Delta ThSNF1$ de *T. harzianum*



La prueba de antagonismo se realizó en PDA colocando un disco de micelio (5 mm de diámetro) de cada hongo patógeno (*F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) o *F. graminearum* (Fg)) en un lado de una placa de Petri; el lado opuesto de cada plato fue inoculado con las cepas *Trichoderma*. Las placas se incubaron a 25 °C durante 10 días.

Expresión de genes que codifican enzimas que degradan la pared celular en las cepas T36 (WT) y $\Delta ThSNF1$ de *T. harzianum*



El ADN total se extrajo de micelio fúngico cultivado en medio mínimo complementados con micelio de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* autoclavado siendo el micelio la única fuente de carbono. Se usaron cebadores de RT-PCR para la detección del gen de quitinasa Chi18-17 (carril 1), el gen de poligalacturonasa PGX1 (carril 2) y el gen de β -tubulina (carril 3) de *T. harzianum*.

Conclusiones Generales

- El complejo de *T. harzianum* puede producir cierta sustancia, cambiando el color de los medios en el ensayo de confrontación.
- Exitosa inserción de los genes ds-red y GFP en *T. harzianum* T36 y *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Fo-01 respectivamente y control efectivo de la actividad antagonista de *T. harzianum* T36.
- Identificación de serina treonina proteína quinasa en el genoma de *T. harzianum* T36.
- Implicación de ThSNF1 en la actividad de antagonismo en *T. harzianum* T36.
- La modificación de SNF1 es una estrategia valiosa para examinar la contribución del complejo enzimático degradante de la pared celular, incluidos los genes quitinasa, poligalacturonasa y glucanasa, en virulencia contra plantas hospedadoras y por hongos patógenos o micoparasitarios.

Agradecimientos

Tottori University, Faculty of Agriculture

Global Center of Excellent (COE)

Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt)

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL)

