



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS:

“ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH y LA FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE LA
CONIDIACIÓN EN CULTIVO SUMERGIDO DE *Trichoderma virens* TVK1”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTADO POR:

p. Q.F.B. KENIA LÓPEZ GARCÍA

ASESOR DE TESIS:

D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

MORELIA MICHOACÁN

MARZO DE 2008



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE HONGOS DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA, PERTENECIENTE A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D. C. CARLOS CORTÉS PENAGOS.

AGRADECIMIENTOS

Para las personas que juntos han sido el ejemplo para ser la persona en que hoy me he transformado. Mi papá (Gerardo López) con su impulso diario de lo que parece un simple “échale ganas” pero con un gran significado para seguir siendo cada día mejor en mi transcurso como estudiante. Mi mamá (Maribel García), la mujer incansable y luchadora con una fortaleza inquebrantable que me ha formado y dado furza como mujer y ser humano. Mis hermanos Javier y Daniel. Gracias por su apoyo.

Mi familia

A Mireya Ramos “Yeya” por estar conmigo y por su apoyo acertado en el momento preciso, a David Cruz, no sólo por su apoyo durante la realización de éste trabajo, si no por su apoyo moral e incondicional.

Mis amigos

A la persona que me despierta a la realidad, la conciencia impulsora de mi YO interno, mi amigo, mi compañero en la vida, Israel Morales G.

Dalia, Sergio, George, Paco, Navor, Macario, Luis, Carlos H.

Mis compañeros de laboratorio

A mi asesor por su apoyo en el desarrollo de éste trabajo y por su amistad. D.C. Carlos Cortés Penagos.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| AGRADECIMIENTOS | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| RESUMEN | |
| Resumen (Versión en español) | x |
| Resumen (Versión en inglés) | xi |
| Capítulo | |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Aspectos generales del crecimiento y reproducción de hongos filamentosos | 1 |
| 1.2 El microciclo de conidiación como un sistema modelo para estudios de esporulación | 2 |

| | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.3 | <i>Trichoderma</i> spp: clasificación y características generales | 4 |
| 1.4 | <i>Trichoderma</i> spp. en el Control Biológico | 5 |
| 1.5 | Papel de las MAP cinasas en procesos micoparasíticos | 7 |
| 1.6 | TVK1, una MAP cinasa de <i>Trichoderma virens</i> | 9 |
| 2 | JUSTIFICACIÓN | 11 |
| 3 | OBJETIVOS | |
| 3.1 | General | 12 |
| 3.2 | Particulares | 12 |
| 4 | MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 4.1 | Microorganismos | 13 |
| 4.2 | Medios de cultivo | 13 |
| 4.3 | Reactivos | 14 |
| 4.4 | Equipo | 15 |

| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5 | Cultivo y propagación de las cepas de <i>Trichoderma</i> | 15 |
| 4.6 | Preparación de la suspensión de conidias | 15 |
| 4.7 | Cinética de crecimiento en cultivo sumergido | 16 |
| 4.8 | Determinación de la biomasa durante la cinética de crecimiento en cultivo sumergido | 17 |
| 4.9 | Determinación del pH durante la cinética de crecimiento en cultivo sumergido | 17 |
| 4.10 | Observación microscópica del crecimiento | 18 |
| 4.11 | Evaluación del crecimiento en cultivo sumergido a pH constante | 18 |
| 4.12 | Estadística | 19 |
| | | |
| 5 | RESULTADOS | |
| | | |
| 5.1 | Cinética de crecimiento y conidiación de <i>Trichoderma virens</i> TVK1 en MM utilizando diferentes fuentes de C | 20 |
| | | |
| 5.2 | Cinética de crecimiento y conidiación de <i>T. virens</i> TVK1 en VMG con NH₄Cl como fuente de N | 24 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3 | Cinética de crecimiento y conidiación de <i>T. virens</i> TVK1 en VMG con KNO₃ como fuente de N | 28 |
| 5.4 | Evaluación del crecimiento en cultivo sumergido de TVK1 a pH constante | 31 |
| 6 | CONCLUSIONES | 39 |
| 7 | BIBLIOGRAFÍA | 40 |
| 8 | APÉNDICE | 46 |
| 8.1 | Evaluación del crecimiento en cultivo sumergido de la <i>T. virens</i> 29.8 a pH constante | 47 |
| 8.2 | Análisis microscópico de las estructuras reproductivas obtenidas en cultivo sumergido de TVK1 | 48 |
| 8.3 | Relación del efecto de la fuente de N y pH sobre el crecimiento y conidiación de <i>Trichoderma virens</i> 29.8 y <i>Trichoderma virens</i> TVK1 | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Pag. |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1 | Esquema del microciclo de conidiación de <i>Aspergillus nidulans</i>. | 3 |
| 2 | Morfología colonial de <i>Trichoderma</i> | 5 |
| 3 | Determinación de la producción de conidias en la cepa <i>Trichoderma virens</i> TVK1 | 22 |
| 4 | Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa <i>T. virens</i> TVK1 por efecto de la fuente de C y la concentración de la fuente de N | 23 |
| 5 | Determinación de la producción de conidias en la cepa <i>Trichoderma virens</i> TVK1 | 24 |
| 6 | Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa <i>T. virens</i> 29.8 por efecto de la concentración de NH₄Cl como fuente | 26 |
| 7 | Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa <i>T. virens</i> TVK1 por efecto de la concentración de NH₄Cl como fuente | 27 |
| 8 | Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa <i>T. virens</i> 29.8 por efecto de la concentración de KNO₃ como fuente | 29 |

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 9 | Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa <i>T. virens</i> TVK1 por efecto de la concentración de KNO_3 como fuente | 30 |
| 10 | Evaluación del efecto de un pH constante sobre el fenotipo de conidiación en cultivo sumergido de <i>T. virens</i> TVK1 | 31 |
| 11 | Mecanismo propuesto de la interrelación del pH sobre la expresión del fenotipo de conidiación de <i>Trichoderma virens</i> TVK1 | 38 |
| 12 | Evaluación del efecto de un pH constante sobre el fenotipo de conidiación en cultivo sumergido de <i>T. virens</i> 29.8 | 45 |
| 13 | Documentación fotográfica del fenotipo de conidiación de la cepa <i>Trichoderma virens</i> TVK1 en cultivo sumergido | 46 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | | Pag. |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| I | Temperatura y condiciones nutricionales utilizadas para inducir el Microciclo de Conidiación en hongos filamentosos | 6 |
| II | MAP Kinase Homologues and Their Possible Functions in Fungi | 10 |
| III | Esquema de preparación del medio líquido VMG | 16 |
| IV | Esquema de preparación de soluciones Stock | 17 |
| V | Cinética de crecimiento, monitoreo de pH y efecto en la conidiación de <i>T. virens</i> TVK1 y <i>T. virens</i> 29.8 en cultivo sumergido VMG con un tiempo de incubación de 84h. | 47 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| MM | Medio Mínimo |
| VMG | Voguel más glucosa |
| μl | Microlitros |
| N | Nitrógeno |
| C | Carbono |
| NH₄Cl | Cloruro de amônio |
| NH₄NO₃ | Nitrato de amônio |
| KNO₃ | Nitrato de potasio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NN25 | Medio Mínimo Nitrato de amonio 25 mM |
| NN18.75 | Medio Mínimo Nitrato de amonio 18.75 mM |
| NN12.5 | Medio Mínimo Nitrato de amonio 12.5 mM |
| NH25 | Medio Mínimo Cloruro de amonio 25 mM |
| NH12.5 | Medio Mínimo Cloruro de amonio 12.5 mM |
| NO25 | Medio Mínimo Nitrato de potasio 25 mM |
| NO12.5 | Medio Mínimo Nitrato de potasio 12.5 mM |
| SAC | Sacarosa |
| CIT | Citrato |
| DEX | Dextrosa |
| ml | Mililitro |
| h | Horas |
| PDA | Potato Dextrose Agar |
| g | Gramos |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| °C | Grados Centígrados |
| mM | Milimolar |
| MRG | Mycoparasitism-related genes |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |

RESUMEN

El ambiente en el que se desarrollan la mayor parte de los hongos filamentosos ha condicionado de forma substancial sus características morfológicas y metabólicas incidiendo así sobre la forma de reproducción. El programa de desarrollo normal de la reproducción asexual a través de la formación de esporas ocurre como el resultado final de la expresión genética en respuesta a mensajes ambientales físicos y químicos, el cual comienza con la germinación de una spora para producir el crecimiento filamentosamente vegetativo. El hongo ascomiceto *Trichoderma virens* presenta una reproducción asexual a través de la formación de conidias producidas a partir de conidióforos no verticilados. *Trichoderma virens* TVK1, una mutante originada por sustitución del gen *tvk1* de la cepa silvestre *Trichoderma virens* 29.8, presenta un fenotipo de conidiación en cultivo sumergido, atípico en la especie. El gen *tvk1* codifica para una cinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPk), misma que participa como elemento central en rutas de señalización asociada al crecimiento y a la diferenciación celular. Factores nutricionales son condicionantes en el desarrollo y reproducción de los hongos por lo que en este trabajo se estudió el efecto de la naturaleza y concentración de la fuente de N sobre la expresión del fenotipo de diferenciación hacia la formación de conidias en cultivo sumergido de la mutante TVK1 de *T. virens*. Bajo condiciones estándar de amonio (NH_4NO_3) como fuente de N, la cepa TVK1 presentó un comportamiento similar al de la cepa silvestre, esto es, crecimiento vegetativo y formación de clamidosporas sin la formación de conidias verdaderas. Cuando la concentración fue disminuida 25 o 50%, el fenotipo de conidiación se hizo evidente. Esta respuesta fue similar cuando se utilizó NH_4Cl . Un análisis sobre el pH del medio de cultivo durante las cinéticas de crecimiento mostró una relación directa con la concentración del ión NH_4^+ utilizado como fuente de N. Esto es, si la concentración del ión que se establecía al inicio del cultivo era menor, el pH se mantenía en valores cercanos a la neutralidad. Confirmando así el transporte de NH_4^+ con el de H^+ y a su vez con la expresión del fenotipo de conidiación en cultivo sumergido de la mutante TVK1.

RESUME

(Versión en inglés)

The environment where most of the filamentous fungus developed has conditioned substantially their morphological and metabolic characteristics having the first role over their reproduction type. The normal developed process of the asexual reproduction with the spore formation occurs as the final result of genetic responses to physics and chemists environmental messenges beginning with the spore germination to produce the vegetative filament growth. The Ascomycete fungus *Trichoderma virens* presents an asexual reproduction through the conidia formation produced by conidiophores not verticillate. *Trichoderma virens* TVK1, a mutant obtained from the substitution of tvk1 gene in the wild type *Trichoderma virens* 29.8, presents a conidiation phenotype in submerged culture untypical in the wild type. The tvk1 gene encodes to a kinase of proteins activated by mitogens (MAPK) that take part as a central element in signalization pathways associated with the cellular differentiation and growth. Nutritional factors conditioned the reproduction in fungus developed, that's why we studied in this work the concentration and nature of N source over the expression of differentiation phenotype toward the conidia formation in submerged culture by TVK1 mutant of *T. virens*. Under this standard ammonium (NH_4NO_3) conditions as N source, the TVK1 strain presented a similar behaviour to the wild type, with a vegetative growth and clamidiospores formation without the real conidas formation. When the concentration was decrease 25 or 50%, the conidiation phenotype was evident. This response was similar when we used NH_4Cl . An analysis of the pH in the culture medium during the growth kinetics showed the direct relation with the NH_4^+ ion used as N source. This is, if the ion concentration at the beginning of the culture was less, the pH was maintained in values close to the neutrality. Confirming the NH_4^+ transport with H^+ and at the same time with the phenotype conidiation expression in submerged culture of TVK1 mutant.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales del crecimiento y reproducción de hongos filamentosos

Muchos hongos tienen sólo un tipo de reducción asexual mientras que otros tienen dos (o más) los cuales pueden desarrollarse en respuesta a diferentes estímulos ambientales. El programa de desarrollo normal de la conidiación de hongos comienza con la germinación de una conida para producir el crecimiento filamentosos vegetativo con las características propias de un organismo. Bajo un balance nutricional y condiciones ambientales favorables, el crecimiento del hongo puede ser vegetativamente normal. Sin embargo, las condiciones de crecimiento pueden cambiar y perder el balance por la deficiencia de nutrientes y/o por cambios críticos en los parámetros ambientales esenciales, en éste caso, el crecimiento vegetativo puede cambiar, dando como resultado la formación de morfología reproductiva asexual, esto es, la formación de conidióforos. Morfológicamente, los conidióforos pueden ser desde una simple célula o un sistema de células conidiogénicas con o sin una diferenciación estructural que orientan el desarrollo de conidias independientemente de un patrón de micelio y tipo de medio (Garry and Bryce, 1981).

A nivel molecular, la conidiación es el resultado de la integración de varias funciones celulares, cada una con una significativa y esencial aportación durante todo el proceso (Smith, 1978). Sin embargo, la conidiación solo ocurre como el resultado final de respuestas genéticas que se activan a través de mensajes ambientales físicos y químicos. Esto promueve cambios en los procesos, creando nuevos patrones celulares (Turian, 1974). Cuando las limitaciones de nutrientes dan como resultado un desbalance en el sistema, mayores alteraciones metabólicas (rutas metabólicas alternas, excreción de metabolitos intermediarios, síntesis de nuevos polímeros y diferenciación morfológica) ocurren (Bu'Lock, 1975; Smith, 1978).

1.2 El microciclo de conidiación como un sistema modelo para estudios de esporulación

El principal interés en el desarrollo de sistemas de microciclos de esporulación de hongos filamentosos está relacionado con el análisis bioquímico y genético durante la esporulación. Para hongos filamentosos, el microciclo de conidiación es la producción directa de conidióforos y conidias por la germinación de las conidias (Anderson y Smith, 1971). El uso de simples y complejos sistemas de fermentación en el estudio de la conidiación en hongos ha introducido nuevas dimensiones para la comprensión de ésta compleja forma de diferenciación (Smith, 1978). Ahora es posible examinar la conidiación bajo un grupo controlado de condiciones experimentales, permitiendo la explicación de cómo algunos parámetros ambientales, de manera individual, como la aireación, temperatura, pH, tipo de nutrientes y concentración afectan todo el proceso.

El crecimiento en cultivos sumergidos con agitación nos permite claramente examinar los efectos de la composición del medio sobre la diferenciación en comparación con el método de crecimiento en superficies estáticas. No obstante, la interpretación de respuestas a condiciones particulares del medio es complicada en muchos de los sistemas por la naturaleza transitoria de las condiciones ambientales durante el crecimiento. Por ejemplo, no es posible en algunos sistemas determinar cual de las condiciones resulta de la limitación de nutrientes o de la limitación del rango de crecimiento por esa condición (Smith and Berry, 1976).

La inducción del ciclo de esporulación por efecto de una variación conjunta de temperatura y nutrientes fue primeramente utilizada con *Aspergillus niger* (Anderson y Smith, 1971). El sistema se desarrolló utilizando un medio definido de esporulación en agitación con una temperatura crítica de incubación para el proceso de conidiación (44°C), la cual permite selectivamente el alargamiento conidial (crecimiento apical) pero inhibiendo la formación y germinación del tubo. Una reducción siguiente de temperatura a los 30°C permitió la directa producción

de uno o más conidióforos fértiles con la consecuente ausencia del desarrollo vegetativo filamentoso.

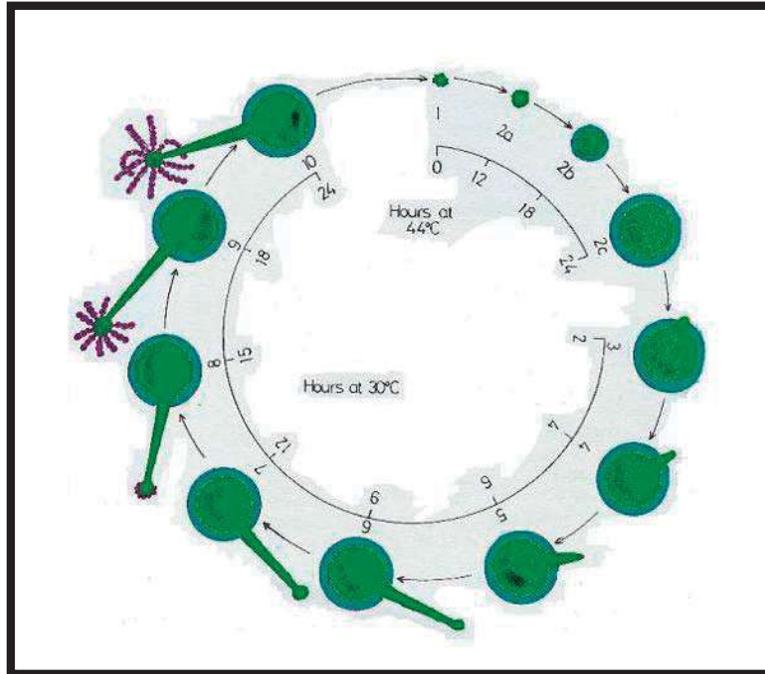


Figura 1. Esquema del microciclo de conidiación de *Aspergillus nidulans*.

Variaciones de éste sistema han dado como resultado la inducción exitosa del microciclo de esporulación también en *Penicillium urticae* (Sekiguchi *et al.*, 1975) y *Paecilomyces varioti* (Anderson *et a.*, 1978). Al igual que la inducción de un microciclo de macroconidiación (Cortat y Turian, 1974) y un microciclo de microconidiación en *Neurospora crassa* (Dossier *et al.*, 1977). En cada uno de los casos, el sistema comprende dos etapas. La etapa 1, consiste en aplicar una temperatura elevada que conlleva al alargamiento de la espora y la restricción de la hifa. La etapa 2, con una menor temperatura y la presencia de un ambiente nutricional apropiado promueven la fase de conidiación generando el microciclo. La temperatura debe ser precisa en el tiempo de cada una de las etapas, y el estado nutricional del medio es altamente específica para cada organismo. Un resumen de las condiciones utilizadas en cada una de las diferentes especies se presenta en la siguiente tabla.(Cole y Brice, 1981).

Tabla I. Temperatura y condiciones nutricionales utilizadas para inducir el Microciclo de Conidiación en hongos filamentosos

| Especies | Referencia ^a | Condiciones utilizadas para la Etapa 1 (alargamiento conidial) | | | Condiciones utilizadas para la Etapa 2 (desarrollo del conidioforo) | | |
|------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------|
| | | Temperatura (°C) | Tiempo (h) | Condiciones del medio | Temperatura (°C) | Tiempo (h) | Condiciones del medio |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | (1), (2) | 41-44 | 24-48 | Medio completo de crecimiento CO ₂ promueve la Etapa 1 | 30 | 18 | Mismo medio que para la Etapa 1 Glutamato promueve la conidiación |
| <i>Penicillium urticae</i> | (3) | 37 | 24 | Medio completo de crecimiento | 35 | 30 | El cultivo es transferido a un medio pobre en N |
| <i>Neurospora crassa</i> | | | | | | | |
| Microciclo/ microconidiación | (4) | 46 | 24-48 | Medio sin nutrientes (Buffer de fosfato) | 25 | 96 | Mismo medio que para la Etapa 1 |
| Microciclo/ macroconidiación | (5) | 46 | 15 | Medio completo de crecimiento | 25 | 12 | Mismo medio que para la Etapa 1 |
| <i>Paecilomyces varioti</i> | (6) | 48 | 24 | Medio completo de crecimiento | 40 | 15 | Mismo medio que para la Etapa 1 Glutamato promueve la conidiación |

^a Referencias: (1) Anderson y Smith (1971a); (2) Kuboye *et al.* (1976a); (3) Sekiguchi *et al.* (1975); (4) Rossier *et al.* (1977); (5) Cortart y Turian (1974); (6) Anderson *et al.* (1978).

1.3 *Trichoderma* spp: clasificación y características generales

La clasificación taxonómica actual para las especies del género *Trichoderma* lo ubica dentro de la División Mycota, Sub-división Eumycota, Clase Deuteromicetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae, Género *Trichoderma*. Su fase perfecta (estado anamorfo) está ubicada en la Clase Ascomycetes, Serie Pyrenomycetes, Orden Hipocreales, Género *Hypocrea* (Lewis y Papavizas, 1994). Las especies del género se caracterizan por poseer un crecimiento micelial ramificado desarrollando hifas de 5 a 10 µm de diámetro. La esporulación asexual ocurre de manera unicelular, a través de la formación de conidias típicamente de 3 a 5 µm de diámetro con una coloración verde, las cuales son producidas en grandes cantidades (**Fig.2B**). Éstas conidias se generan a partir de la formación conidióforos hialinos de forma larga, no verticilados (**Fig.2D**). Ocasionalmente pueden formarse clamidiosporas y pueden presentarse dos o más de manera fusionada (Lewis y Papavizas, 1994).

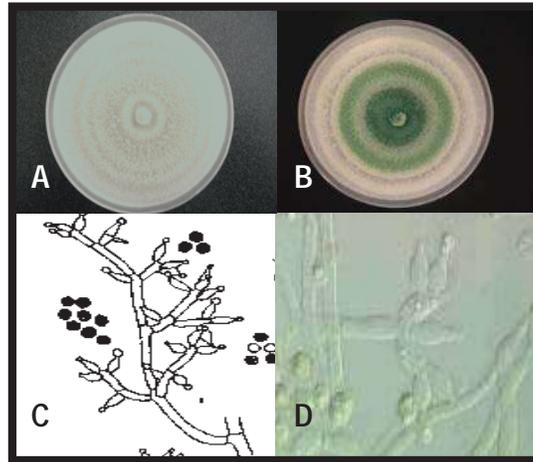


Figura 2. Morfología colonial de *Trichoderma*, **A)** colonia joven con desarrollo abundante de micelio; **B)** colonia madura con la formación de anillos concéntricos de conidias; **C)** representación de la estructura típica de un conidióforo; **D)** Microfotografía de un conidióforo, fialides y conidias.

1.4 *Trichoderma* spp. en el Control Biológico.

Según Baker y Cook (1974) se entiende por *control biológico* la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del agente patógeno que se quiere controlar. Se hará referencia al *control biológico* haciendo hincapié en la utilización de microorganismos antagonistas para el control de enfermedades, entendiéndose por antagonistas, aquellos organismos que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de una gran variedad de patógenos. Entre otros se encuentran: antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, interacciones directas el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia en la planta (Cook y

Baker 1983). En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que éstos últimos contribuyen a que no haya enfermedad, es decir, el control biológico funciona de manera natural (Cook y Baker 1983). Existen tres componentes básicos a los sistemas del biocontrol: a) la tensión altamente eficaz del agente utilizado en el biocontrol; b) la producción y formulación del agente, y c) los métodos de uso que deben permitir la acción completa del mismo (<http://www.nysaes.cornell.edu>).

Utilizadas como un potente agente de biocontrol contra una gran variedad de hongos fitopatógenos de tierra, las especies de *Trichoderma*, de las cuales se conocen alrededor de 30, responden a la presencia de huéspedes con la producción de compuestos antibióticos, formación de estructuras especializadas y degradación de la pared celular de sus huéspedes seguida de la asimilación de su contenido celular, mecanismo denominado como *micoparasitismo* (Mendoza y col., 2003). De esta forma *Trichoderma*, clasificado como un hongo hiperparasítico, tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee además de varios mecanismos antagonísticos, un rápido crecimiento y desarrollo. La mayor parte de sus especies se desarrollan en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita la producción masiva para su uso en formulaciones comerciales. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas le permite ser eficiente sobreviviendo aun en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos. Las principales enzimas hidrolíticas producidas y que facilitan el hiperparasitismo son quitinasas, β -1-3 glucanasas, β -1-6 glucanasas y proteasas (Herrera-Estrella y col., 2003). Las cepas de ésta especie, transformadas para sobre expresar dichas enzimas hidrolíticas han mostrado ser mejores agentes de biocontrol en comparación con sus cepas parentales. Como consecuencia, éstas enzimas han sido nombradas como MRGs (*mycoparasitism related genes*) (Mendoza y col., 2003).

Los productos que utilizan como base *Trichoderma* y que son comercializados hoy en día como agentes de biocontrol, están compuestos de concentrados de conidias en suspensión, por lo que la reproducción asexual de éste tipo de especies es determinante para la producción en masa de dichos

productos. Las especies de *Trichoderma* más estudiadas y utilizadas en el desarrollo del biocontrol son: *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* y *T. asperellum*. Algunas preparaciones comerciales utilizan una combinación de cepas como es el caso de TRICHOVAB®, el cual contiene *T. polysporum*, *T. stromatocum* y *T. virens*. Muchas de las cepas de *Trichoderma virens* (*Gliocladium virens*) puede parasitar fitopatógenos importantes en la agricultura, entre los que se incluyen: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, y *Pythium* spp. Adicionalmente, esta especie produce una gran variedad de metabolitos antifúngicos y presentan la capacidad de colonizar las raíces plantas, promoviendo así el fenómeno de resistencia cruzada (Seidl, 2006).

1.5 Papel de las MAP cinasas en procesos micoparasíticos.

El **micoparasitismo**, ha sido propuesto como el mecanismo central de la actividad antagónica del género *Trichoderma*, interfiriendo así en la supervivencia y/o desarrollo de los patógenos. El micoparasitismo es una interacción hongo-hongo que por consiguiente representan un modelo de interacción patógeno-huésped. Elementos de señalización conservados en eucariotes parecen ser importantes en el fenómeno, como se ha descrito para las interacciones planta-hongo (**Cortés y col., 2007**).

Las MAP cinasas, enzimas activadas por mitógenos, son bien conocidas en células eucarióticas por llevar a cabo la transducción de una gran variedad de señales externas para regular el crecimiento y diferenciación celular. En hongos fitopatógenos, recientes estudios indican que estas vías de transducción juegan un papel importante no solo en la regulación del crecimiento celular y diferenciación, sino también en la supervivencia, conidiación, proliferación, respuestas al estrés, fertilidad y la misma patogenicidad (Rong Xu, 2000). La cascada de las MAP cinasas están integradas por elementos consecutivos donde la proteína MAPKKK (cinasa de la cinasa de a MAP cinasa) activa por fosforilación de la MAPKK (cinasa de la MAP cinasa) y ésta a su vez a la MAPK (MAP cinasa). Típicamente la fosforilación estimula la transferencia de la MAPK

del citosol hacia el núcleo, donde ésta fosforila sobre el blanco serina/treonina a alguna proteína reguladora de la transcripción. Sin embargo, una porción de la MAPK activa se encuentra en el citoplasma para regular los efectos postransduccionales. La activación de MAPKKKs puede ocurrir por la fosforilación a través de una proteína cinasa o por la interacción con otras proteínas, un proceso que puede involucrar proteínas G pequeñas (González y col., 2002). Las MAPKKKs no se encuentran asociadas directamente con el receptor membranal, necesitan activarse por componentes intermediarios cuya actividad sí puede depender de él, ejemplo de ellos son la cinasa de proteína dependientes de calcio (PKC) (Saucedo y col., 2005). Ésta cascada de MAPKKK-MAPKK-MAP kinase ha sido conservada en una gran variedad de organismos desde levaduras hasta el humano (Herskowitz, 1995; Schaeffer y Weber, 1999). Su principal función consiste en transducir los estímulos extracelulares reconocidos por los receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco que en relevo integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo inicial (Ichimura y col. 2002). En células de mamíferos y levaduras, las MAP cinasas son enzimas que se han subdividido de acuerdo a la especificidad por su sustrato y al estímulo extracelular que regula su actividad, mientras que en las plantas no existe una co-relación que permita dividir a las MAP cinasas de forma análoga (Saucedo y col. 2005).

Tabla II. MAP Kinase Homologues and Their Possible Functions in Fungi

| MAP kinase homologues | | | |
|----------------------------------------|------------------------|-------------------|----------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | Fus3/Kss1 | Hog1 | Sh2 (Mpk1) |
| <i>C. albicans</i> | Cek1 | CaHog1 | Mkc1 |
| <i>S. pombe</i> | Spk1 | Sty1 (Spc1, Phh1) | Smp1 (Pmk1) |
| <i>M. grisea</i> | Pmk1 | Osm1 | Mps1 |
| <i>Possible functions</i> ^a | Mating & filamentation | Osmoregulation | Cell integrity |
| | Hyphal growth | Stress responses | Nutrient sensing |
| | Pathogenesis | Pathogenesis | Pathogenesis |
| | Conidiation | | Conidiation |
| | Conidial germination | | Aerial hyphal growth |

^a Combined from functions reported in different fungi (Jin-Rong Xu, 2000).

En muchos hongos, las rutas de señalización, incluyendo la cascada de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), han sido implicadas en el parasitismo de plantas. Genes que codifican para homólogos de MAPK son esenciales para el desarrollo y patogenicidad de los hongos filamentosos. Las cinasas de proteína activada por mitógenos (MAPK) traduce una variedad de señales en eucariotes, incluyendo levaduras, donde existen cinco genes que codifican para MAPK y transmiten señales para reproducción, crecimiento filamentoso, integridad celular, respuesta a estrés osmótico y formación de ascosporas. En el hongo fitopatógeno *Magnaporthe grisea*, por ejemplo, tres genes que codifican para MAPK han sido identificados (Mukherjee y col., 2003). La proteína Pmk1, el prototipo de YERK1 (cinasa relacionada a señales extracelulares en levaduras), es indispensable para el crecimiento y esporulación mientras es requerido también para la diferenciación y crecimiento patógeno-invasivo. Por otra parte, Fmk1 de *Fusarium oxysporum* es requerido para la invasión del huésped (tomate) así como para la transcripción del gen que codifica para una pectato liasa indispensable para el crecimiento vegetativo y esporulación (Mukherjee y col., 2003). Por consiguiente, una variedad de hongos patógenos establecen sus relaciones parasíticas a través de una señalización dependiente de una MAPK perteneciente a la clase YERK1, Fus3 y Kss1 para el caso de la levadura (Mukherjee y col., 2003).

1.6 TVK1, una MAP cinasa de *Trichoderma virens*

De acuerdo al alineamiento de la secuencia denominada como Tvk1 de *T. virens* (programa MEGALIGN-CLUSTAL, DNAS-TAR, Madison, WI), ésta corresponde a una MAPK, similar a la actualmente reportada proteína TmkA de *T. viride* IMI1306092, compartiendo un 98% de identidad con la Tmk1 de *T. atroviride*, un 95% con Cmk1, Pmk1 y Fmk1 de *F. oxysporum*, *C. lagenarium* y *M. grisea*, respectivamente, no sin antes olvidar la identidad que comparte con Kss1 de *S. cerevisiae* (Mendoza y col., 2003). La delección del gen *tvk1* en *T. virens* 29.8 reportada por Mendoza y col (2003) generó la cepa TVK1 la cual permitió establecer el papel de las vías de transducción relacionada con las MAPK

asociadas al parasitismo que establece *Trichoderma* con otros hongos. A partir de esta estrategia se esperaba que sobre un fondo genético nulo para *tvk1*, la cepa *T. virens* 29.8 disminuyera su capacidad micoparasítica, con base a lo reportado para otros hongos. Sin embargo, se observó un claro incremento en el nivel de expresión de los genes relacionados con el micoparasitismo (aquellos que codifican para enzimas líticas) comparada con la cepa silvestre y por lo tanto, una eficiencia mucho mayor en el control de hongos fitopatógenos. Adicionalmente, la cepa TVK1 presentó un fenotipo de conidiación en cultivo sumergido. Éstos datos colocan a *tvk1* como un modulador negativo de la conidiación y la respuesta a un huésped potencial en *T. virens* (Mendoza y col., 2003).

Los ciclo de vida de diversos hongos filamentosos comienza y termina en la formación de esporas, el proceso de conidiación es altamente regulado para controlar la efectividad de dispersión y supervivencia de las especies. La conidiación en cultivo sumergido es raramente estudiada. Sin embargo, la delección o la actividad constitutiva de elementos del AMP cíclico (PKA) o rutas de las MAP cinasas dan como resultado una conidiación inesperada en cultivo sumergido en diferentes hongos filamentosos (Banno y col., 2005; Kays y sol., 2000; Mendoza-Mendoza y col., 2003; Rocha-Ramírez y col., 2002). La delección de los componentes de las MAP cinasas da como resultado la producción de conidias en cultivos en agitación, como es el caso de la delección del gen *nrc-1*, el cual codifica para una MEK cinasa en *Neurospora crassa* (Kothe y Free, 1998) y del gen *tvk1* en *Trichoderma virens*, el cual codifica para una MAP cinasa (Mendoza-Mendoza y col., 2003).

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

La producción de conidias de las cepas de hongos utilizadas en el control biológico, como es el caso del género *Trichoderma*, puede ser un factor limitante para la producción en masa de éstas y su empleo en la elaboración de productos biotecnológicos comerciales. La cepa *T. virens* TVK1, mutante nula del gen *tvk1* el cual codifica para una MAP cinasa similar a Kss1 de *S. cerevisiae*, presenta un fenotipo de conidiación en cultivo sumergido similar al proceso de reproducción asexual aéreo, mismo que no presenta la cepa silvestre (*T. virens* 29.8). Es por ello que resulta de interés particular el estudio de los principales factores nutricionales y fisicoquímicos, tales como la fuente de carbono, nitrógeno y pH, que puedan influir en la capacidad de formación de conidias por efecto de la reproducción asexual en cultivo sumergido de la cepa *T. virens* TVK1.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar la influencia de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la conidiación en cultivo sumergido de *Trichoderma virens* TVK1.

3.2 Objetivos Particulares

1. Determinar el efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre el crecimiento, conidiación así como del pH en el medio en *T. virens* TVK1.
2. Establecer las condiciones óptimas respecto a los factores nutricionales y factores químicos (pH) que promuevan una producción mayor de conidias en cultivo sumergido de la cepa *T. virens* TVK1.

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

4.1 Microorganismos

Las cepas de hongos utilizadas en los ensayos fueron: *Trichoderma virens* 29.8 (wild type) y *Trichoderma virens* TVK1 (mutante). Ambas cepas fueron provistas por el CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato (Mendoza-Mendoza, A., *et al.* 2003).

4.2 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: a) **Agar Papa Dextrosa (PDA)** (BD Bioxon), preparado según las especificaciones del proveedor; b) **Medio Mínimo VOGUEL (VMG)** (Davis, R. L. y D. Deserres. 1970); preparado a partir de un stock 50X [750 ml de medio de: (150 g citrato de Na₃, 5 ½ H₂O; 250g KH₂PO₄ anhidro; 100 g NH₄NO₃ anhidro; 10 g MgSO₄, 7 H₂O; 5 g CaCl₂, 2 H₂O) Solución de Elementos Traza (5 ml)(5 g Acido cítrico, 1 H₂O; 5 g ZnSO₄, 7 H₂O; 1 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂,6 H₂O; 0.25 g CuSO₄,5 H₂O; 0.05 g MnSO₄,1 H₂O; 0.05 g H₃BO₃ anhidro; 0.05 g Na₂MoO₄,2 H₂O)]. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 121 °C (15 lb/in²) por 15 min.

El medio líquido VMG se preparó en diferentes versiones de acuerdo a la Tabla I: **NN25** (NH₄NO₃ 25mM), **NN12.5** (NH₄NO₃ 12.5mM), **NH25** (NH₄Cl 25mM), **NH12.5** (NH₄Cl 12.5mM), **NO25** (KNO₃ 25mM) y **NO12.5** (KNO₃ 12.5mM).

Tabla III. Esquema de preparación del medio líquido VMG.

| Medio * | Stock 2M Fuente de N (ml) | Stock 2M Glucosa (ml) | Stock 50X Medio Voguel (ml) |
|---------|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| NN25 | 1.250 | 5.5 | 2ml |
| NN12.5 | 0.625 | 5.5 | 2ml |
| NH25 | 1.250 | 5.5 | 2ml |
| NH12.5 | 0.625 | 5.5 | 2ml |
| NO25 | 1.250 | 5.5 | 2ml |
| NO12.5 | 0.625 | 5.5 | 2ml |

*Para preparar 100ml de medio.

Brevemente, la preparación de los medios líquidos VMG se llevó a cabo adicionando 70ml de agua destilada a los matraces. Posteriormente se agregaron 5.5 ml correspondientes la fuente de C (Glucosa), 2 ml de solución stock 50X de Voguel y finalmente la fuente de N a partir del stock 2M, 0.625 ml (12.5mM) y 1.250 ml (25mM).

4.3 Reactivos

Solución Stock de Nitrato de Amonio (NH_4NO_3) 2 M (J. T. Baker®). Solución Stock de Cloruro de Amonio (NH_4Cl) 2 M. Solución Stock de Nitrato de Potasio (KNO_3) 2 M. Solución Stock de Ácido Tartárico 10% (J. T. Baker®). Solución Stock de Hidróxido de Sodio (NaOH) 2N (J. T. Baker®). Cada una de las soluciones Stock utilizadas se prepararon diluyendo la cantidad en peso del reactivo, en frascos con tapa, en agua destilada y esterilizando en calor húmedo como se indica en la Tabla II.

Tabla IV. Preparación de las soluciones Stock

| Reactivo | gr del Reactivo | Concentración del Stock |
|---------------------------------|-----------------|-------------------------|
| NH ₄ NO ₃ | 16.008 | 2 M |
| NH ₄ Cl | 10.692 | 2 M |
| KNO ₃ | 20,02 | 2 M |
| Ácido Tartárico | 10 | 10% |
| NaOH | 8 | 2 N |

*Para preparar 100ml de Stock (w/v)

4.4 Equipo

Incubadora Rotatoria (ENVIRON SHAKER-®). Campana de Flujo Laminar (MINIHELIC® DWYER INSTRUMENTS INC). Equipo de Filtración al vacío (SIEMENS®). Estufa (felisa HORNO). Báscula analítica (Sartorius® BL120S). Microscopio (ZEIZZ). Potenciómetro (HANNA®). Desecador.

MÉTODOS

4.5 Cultivo y propagación de las cepas de *Trichoderma*

Cajas con medio PDA se inocularon colocando una alícuota de 20 µl, correspondiente al volumen de una gota de suspensión de conidias, en el centro de la caja y se incubaron a una temperatura de 28°C por un periodo de 5 a 7 días.

4.6 Preparación de la suspensión de conidias

A partir de un cultivo de *Trichoderma* de 7 días se realizó la cosecha de conidias agregando 5ml de agua destilada-estéril y raspando suavemente con una espátula sobre la superficie de la colonia evitando arrastrar demasiado micelio. La suspensión así obtenida se filtró sobre tela estéril (marca comercial: magitel) y se

conservó a 4°C por un periodo no mayor a 30 días (un periodo mayor a los 30 días de conservación altera la respuesta metabólica de las conidias durante los ensayos y genera resultados no reproducibles). El conteo de conidas se llevó a cabo con ayuda de una cámara de Neubauer (Improved bright-line-MARIENFELD). Este procedimiento se llevó a cabo realizando una dilución conocida de la suspensión de conidias original y colocando en la cámara una alícuota correspondiente a 10 µl. La concentración total final de la suspensión se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{(No.esporas)(5)(F.D.)(10000)= Conidias/ml}$$

Donde: **No. Esporas** corresponde al número de esporas que se encuentran en 5 de los cuadrantes de la cámara, cuatro correspondientes a cada una de las esquinas y el cuadrante central de la cámara; el **(5)** corresponde al factor que multiplicado da el total de cuadrantes; **F.D** es el factor de dilución, **10000** es una Constante y **Esporas/ml** es el número de conidias en 1 ml de la suspensión evaluada.

4.7 Cinética de crecimiento en cultivo sumergido

Matraces conteniendo 100 ml de los medios líquidos VMG anteriormente descritos (ver Medios de Cultivo) fueron inoculados con 1×10^6 esporas/ml. Los medios se incubaron a 28°C y 150 rpm en la incubadora rotatoria por un periodo de 84h. Los parámetros de pH, biomasa y análisis microscópico se evaluaron cada 12h.

4.8 Determinación de la biomasa durante la cinética de crecimiento en cultivo sumergido

El crecimiento (biomasa) se determinó por el método de Peso Seco. Para ésta determinación se tomó una alícuota de 5ml de cada uno de los cultivos utilizando puntas cuyo extremo mas delgado fue recortado a fin de permitir el paso del micelio generado. Posterior a la recolección de la alícuota, ésta se filtró al vacío en a través de papel filtro de un poro de 2.7 μm (WHATMAN* tipo GF/D). El papel filtro, previamente puesto a peso constante se obtuvo mediante un procedimiento que consistió en cortar el papel en cuadros de 5 x 5cm, se colocaron en la estufa a una temperatura 80°C durante 12 h, al término de éstas se colocaron en un desecador para evitar que éstos adquirieran humedad del medio, las piezas de papel se mantuvieron en el desecador por 15min para que se atemperaran. Pasado este tiempo se tomó un primer peso en la balanza analítica. Posteriormente se colocaron por segunda ocasión en la estufa siguiendo el mismo protocolo antes descrito para finalmente tomar un segundo peso. Los pesos registrados se promediaron a fin de obtener el peso constante final. Las muestras de biomasa fueron sometidas al mismo procedimiento para *peso constante*. Para calcular la cantidad de biomasa obtenida se restó el *peso constante* del papel al *peso* del papel con micelio. La incubación repetida de los papeles en la estufa por periodos de 12 h nos garantiza un margen de error menor al llevar a cabo los reportes de cinética de crecimiento apartando las condiciones y factores externos que puedan influir y alterar de manera directa en un aumento o disminución de la biomasa final obtenida.

4.9 Determinación del pH durante la cinética de crecimiento en cultivo sumergido

El monitoreo del parámetro de pH se realizó de cada uno de los cultivos a los tiempos establecidos para cada ensayo. Para ésto se tomó una alícuota de 1

ml en un tubo de ensayo y se dejó sedimentar por unos minutos. Al sobrenadante se le determinó el pH de forma directa.

4.10 Observación microscópica del crecimiento

A partir de cada uno de los cultivos y según los tiempos señalados para cada experimento se tomaron alícuotas del micelio con ayuda de una micropipeta. El micelio así obtenido se colocó en un portaobjetos adicionando 10ml de azul de lactofenol e incubándose durante 1min (tiempo necesario para que la muestra se tiña correctamente). La muestra fue observada a través de un microscopio óptico para fotodocumentar el crecimiento y desarrollo.

4.11 Evaluación del crecimiento en cultivo sumergido a pH constante

El crecimiento de las cepas fue evaluado en medios líquidos a pH constante, para este fin se utilizó una solución de Ácido Tartárico al 10% (w/v) y una solución Stock de NaOH 2 N para llevar a cabo el ajuste de pH (3.5 ó 5.75 según sea el caso). Los medios utilizados en este ensayo fueron: NH25 pH 5.75, NH12.5 pH 3.5, NO25 pH 3.5 y 5.75, NO12.5 pH 3.5 y 5.75. cada uno de los medios fue inoculado ya sea con esporas o micelio de acuerdo al siguiente esquema:

a) conidias: para cada uno de los medios previamente ajustados en su pH se inocularon 1×10^6 conidias. Una vez inoculados, se incubaron de acuerdo al procedimiento estandar y se monitoreo el pH cada 12h hasta las 84h manteniendo el pH inicial a través de la adición de ácido tartárico 10% o NaOH 2N según corresponda.

b) micelio: El micelio utilizado como inóculo para éste ensayo se preparó a partir de la siembra de conidias de cada una de las cepas utilizadas (TVK1 y 29.8) en VMG utilizando como fuente de N: NH_4NO_3 25 mM. Después de 36h de incubación se colectó el micelio por filtración al vacío sobre papel filtro estéril, el micelio así obtenido se fraccionó las porciones necesarias con ayuda de un bisturí

estéril. Cada una de las porciones sirvió como inóculo para los medios previamente preparados para continuar con su incubación bajo las mismas condiciones de T° (28°C) y de rotación (150 rpm). El monitoreo de pH se realizó cada 12 h y hasta las 84h a través de una alícuota de 1ml de medio y realizando el ajuste correspondiente de pH a 3.5 o 5.75 con las soluciones de ácido tartárico 10% o NaOH 2N.

4.12 Estadística

Respecto a las estadísticas reportadas cabe destacar que los ensayos de monitoreo de pH, biomasa y cinética de crecimiento (peso seco) se realizaron dos veces, cada una por duplicado. De cada uno de los ensayos por duplicado se obtuvo una media (La media, que nos devuelve la media de la porción interior de un conjunto de datos) para rangos de pH la obtuvimos sumando los dos valores de los medios duplicados y dividiendo el resultado entre dos. Para la cinética de crecimiento, sumamos los pesos secos de los duplicados de la misma concentración (misma utilizada para pH) y dividiendo el resultado final en dos. Finalmente se promedió con la media de la segunda repetición. De ésta manera se obtuvieron resultados reproducibles y confiables con un margen de error mínimo. Se calculó también la desviación estándar, indicada en las curvas reportadas, para cada uno de los datos. La desviación estándar es una medida (cuadrática) que informa de la media de distancias que tienen los datos respecto de su media aritmética, expresada en las mismas unidades que la variable. Ésta se calcula en una hoja de cálculo convencional Excel insertando los datos correspondientes.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Efecto de la fuente de C sobre el crecimiento y conidiación de *Trichoderma virens* TVK1

Con el fin de estudiar la influencia de la fuente de C sobre la conidiación en cultivo sumergido de la cepa TVK1, se montaron cultivos en MM utilizando ya sea dextrosa (DEX), sacarosa (SAC) y citrato (CIT) como única fuente de C. El medio contenía 25mM de NH_4NO_3 como fuente de N (concentración reportada para el Medio Vogel). Bajo estas condiciones no pudo observarse el fenotipo de conidiación, independientemente del tipo de fuente de C utilizada. Con base en estos resultados, se procedió a variar la fuente de N en concentraciones decrecientes manteniendo la fuente de C en su concentración original. Cuando la concentración de la fuente de N fue de 18.5 y 12.5mM, se observó claramente la formación de conidias como habían sido originalmente reportada (**Figura 4 C, NN18.5, NN12.5**). Esta respuesta solo se obtuvo cuando dextrosa y sacarosa fueron utilizadas como fuente de C. Con el fin de establecer un comparativo respecto a la respuesta, se cuantificó el número de conidias producidas en cada condición a las 96h de cultivo. En el medio NN12.5-DEX se obtuvo el mayor número de conidias (130×10^6 conidias/ml) mientras que para NN12.5-SAC la concentración obtenida fue de 106×10^6 conidias/ml. Para la concentración de 18.75mM y dextrosa permite una producción de conidias mayor que la obtenida con sacarosa. Cuando se utilizó citrato como fuente de C, no se observó la formación de conidias independientemente de la concentración de la fuente de N y del tiempo establecido para ello (**Figura 3**).

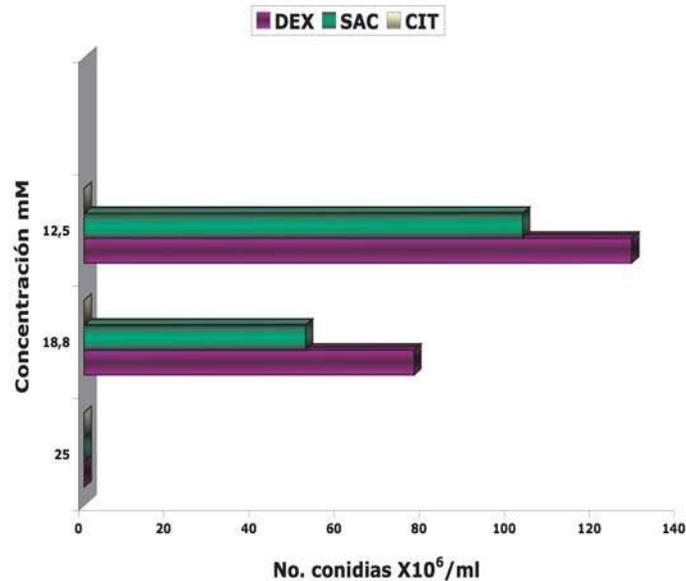


Figura 3. Determinación de la producción de conidias de la cepa *Trichoderma virens* TVK1. El número de conidias fue cuantificado a partir de cultivos de 96h de la mutante TVK1 crecida en MM con diferentes fuentes de C (DEX, SAC Y CIT) y diferentes concentraciones de NH_4NO_3 (NN25, NN18.75 y NN12.5).

De manera clara, la conidiación pudo detectarse a simple vista por la coloración verde característica de las conidias presentes en el cultivo (**Figura 4C**). En los cultivos NN-CIT, no sólo se observó la inhibición de la conidiación de la cepa TVK1, sino de alguna manera se inhibió también el crecimiento sin importar la concentración de la fuente de N utilizada. Respecto a la biomasa, las cinéticas de crecimiento que se muestran en la figura 4A, ponen en evidencia que la cepa TVK1 crece mejor en aquellos cultivos donde se utilizó dextrosa como fuente de C, alcanzando una biomasa correspondiente a 9 g/l en el cultivo NN25, siguiéndole muy de cerca aquel cultivo donde se empleó sacarosa con la misma concentración de N con una biomasa de 7 g/l. Por otra parte y respecto al monitoreo del pH en el medio, en aquellos cultivos que contenían citrato y las tres diferentes concentraciones utilizadas de nuestra fuente de N, el patrón es muy similar, incrementando el pH de un valor inicial de 6.8 hasta un pH próximo a 9 en el cultivo NN25 y de 8.0 en NN12.5 al final del cultivo (**Figura 4B**). Las cinéticas de pH para los cultivos donde se utilizó dextrosa y sacarosa, los cultivos con las

concentraciones de 18.75 mM y 12.5 mM siguieron un curso donde el pH aumenta del inicial hasta un punto máximo de 6.2 en el cultivo NN18.75-DEX y de 6.5 para NN18.75-SAC al final del cultivo. La cinética de pH para los medios NN12.5 adicionados con dextrosa y sacarosa alcanzaron su punto máximo de pH correspondiente, para ambos casos, de 7.5 a las 72 h. Sin embargo, los resultados para los cultivos NN25 con dextrosa y sacarosa mostraron lo contrario de las cinéticas anteriores, esto es, un decremento significativo en el pH inicial hasta 3.5 final en ambos casos (**Figura 4, B**).

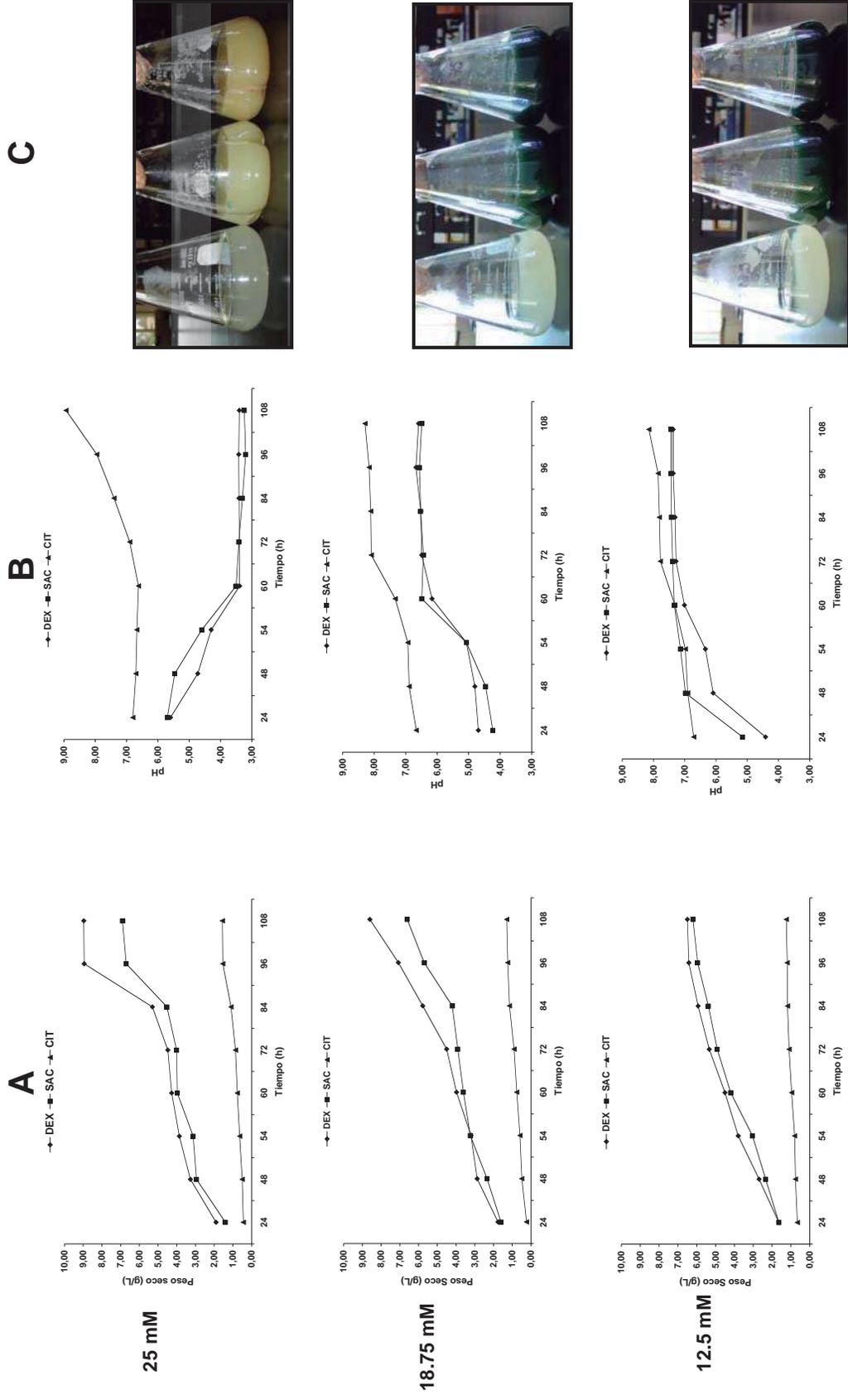


Figura 4. Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa *T. virens* TVK1 por efecto de la fuente de N. A) cinética de crecimiento estimada por peso seco; B) cinética de pH en el medio de cultivo; C) documentación fotográfica del fenotipo de conidiación en cultivos de 96h.

5.2 Efecto de la utilización de NH_4Cl como fuente de N sobre el crecimiento y conidiación de *Trichoderma virens* TVK1

Para poder determinar si alguna de las dos sales de nitrógeno de las que se compone la fuente de N inicial utilizada (NH_4NO_3) producía efectos particulares sobre el fenotipo de conidiación, crecimiento y metabolismo de *T. virens* TVK1, se prepararon inicialmente medios VMG utilizando NH_4Cl como fuente de N (ver medios de cultivo). Se llevó a cabo el monitoreo de biomasa, pH y documentación fotográfica de la formación de conidias. El ensayo consistió en hacer crecer conidias de la cepa *T. virens* 29.8 y la mutante TVK1 en medios conteniendo diferentes concentraciones de la fuente de N y utilizando Glucosa como fuente de C. La conidiación de TVK1 en el cultivo NH fue observada con claridad a la concentración de 12.5 mM no así cuando se utilizó 25 mM de la misma fuente. Por otra parte, la cepa silvestre 29.8 no presentó cambio alguno en su patrón de crecimiento, permaneciendo de forma micelial independientemente de la concentración de N utilizada (**Figura 5C**). La cuantificación de conidias se realizó solo en los medios de cultivo de TVK1 a las 60h. Para el cultivo NH12.5 la concentración obtenida fue de 85×10^6 conidias/ml (**Figura 5**).

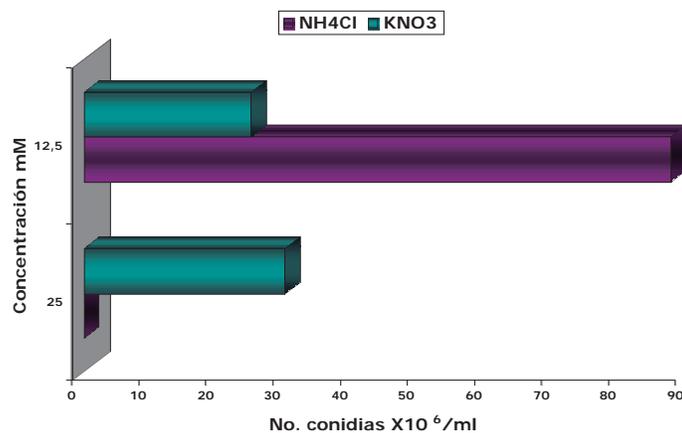


Figura 5. Determinación de la producción de conidias en la cepa *Trichoderma virens* TVK1. El número de conidias fue cuantificado a partir de cultivos de 60h de la mutante TVK1 crecida en los medios NH25, NH12.5, NO25 y NO12.5.

Las cinéticas de crecimiento para TVK1 mostraron una producción de biomasa en el cultivo NH25 de 5.3 g/L y de 3 g/L para el cultivo NH12.5 (**Figura 7A**). Por otra parte, nuestro control, la cepa silvestre 29.8 presentó una mayor biomasa también en el cultivo NH25 de 5.8 g/L y de 3.8 g/L en el cultivo NH12.5 (**Figura 6A**). Por otra parte, el seguimiento del pH, resultado del metabolismo propio de cada una de las cepas, mostraron una reducción de este parámetro de 5.8 a 3 para TVK1 (**Figura 7B**) en la concentración de 25 mM a las 60h de cultivo y de 5.8 a 3.5 para la cepa 29.8 (**Figura 6B**). El pH en el medio NH12.5 también se redujo del inicial para la cepa silvestre (29.8) alcanzando un pH de 4.75 al final del cultivo. De manera notoria el pH de TVK1 bajo estas mismas condiciones, tuvo un descenso inicial de pH a 4.8 a las 48h pero posteriormente se elevó hasta 5.5 hacia el final de la cinética (**Figuras 6C y 7C**).

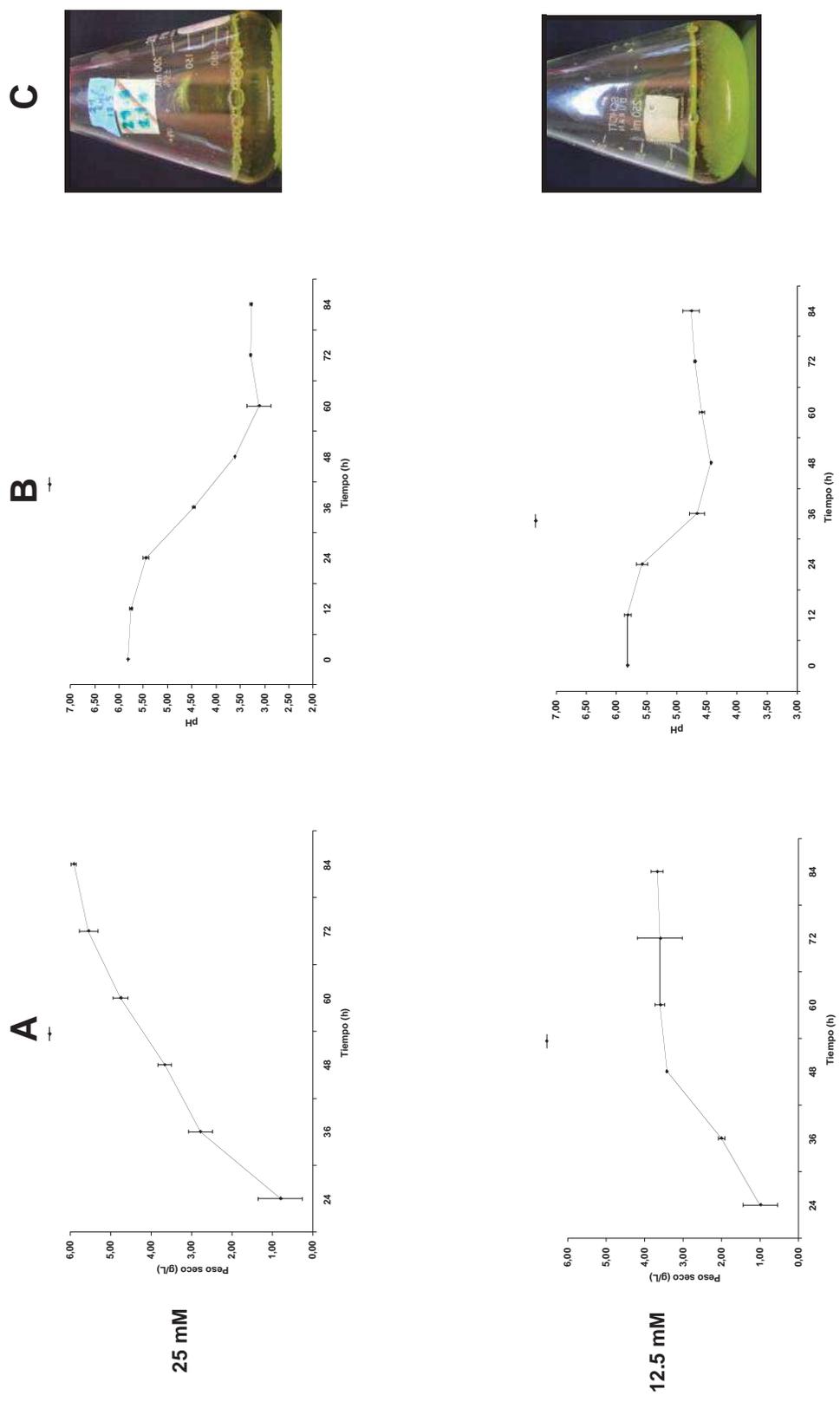


Figura 6. Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa *T. virens* 29.8 por efecto de la concentración de NH_4Cl como fuente. A) cinética de crecimiento estimada por peso seco; B) cinética de pH en el medio de cultivo; C) documentación fotográfica del fenotipo de conidiación en cultivos de 60h.

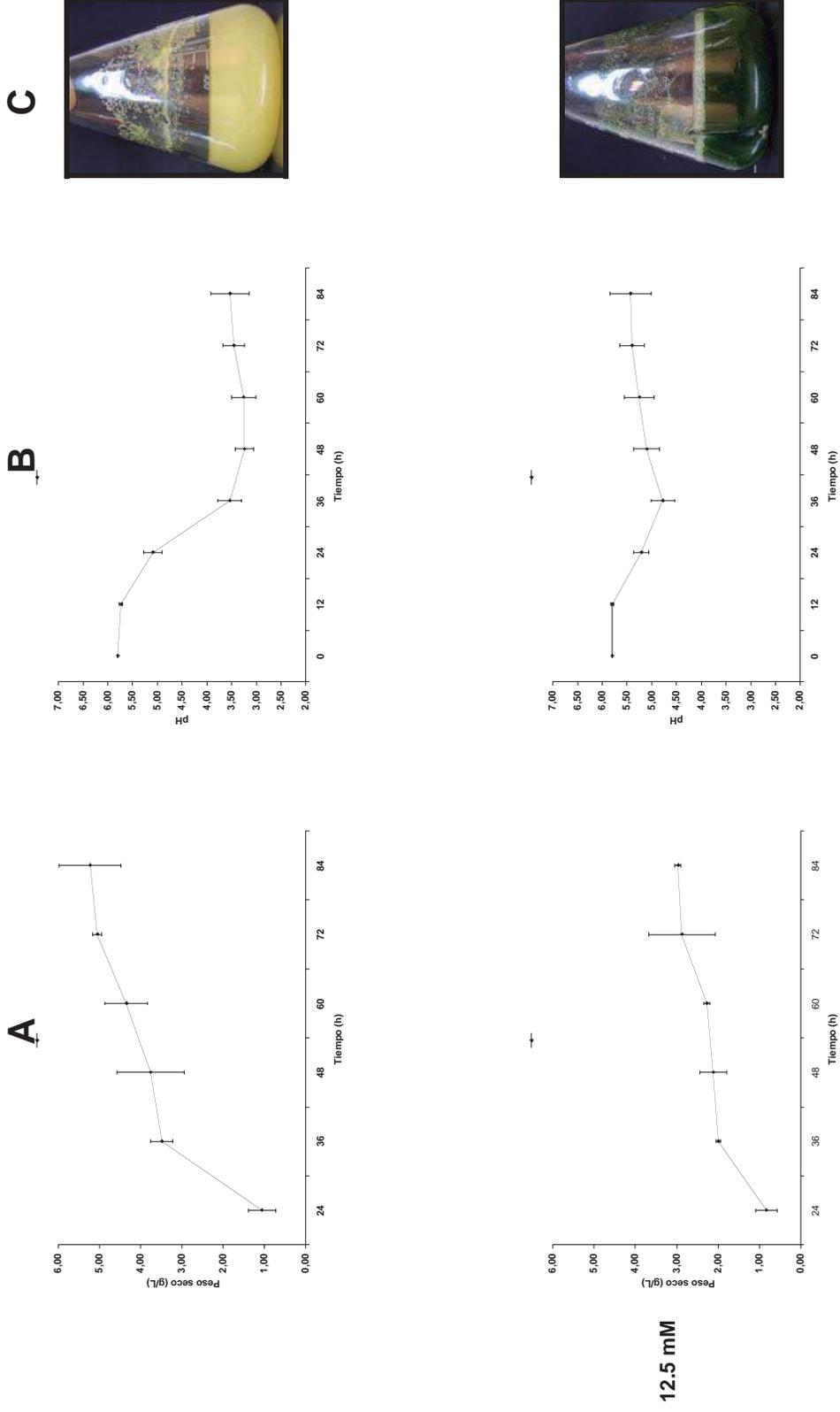


Figura 7. Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa *T. virens* TVK1 por efecto de la concentración de NH₄Cl como fuente. A) cinética de crecimiento estimada por peso seco; B) cinética de pH en el medio de cultivo; C) documentación fotográfica del fenotipo de conidiación en cultivos de 60h.

5.3 Efecto de la utilización de KNO_3 como fuente de N sobre el crecimiento y conidiación de *Trichoderma virens* TVK1

Se prepararon los medios NO25 y NO12.5 (ver materiales y metodos) en los que se crecieron conidias de la cepa TVK1 y 29.8 (control) y de ésta manera observar la influencia en función de utilizar KNO_3 como fuente de N. El fenotipo de conidiación no se presentó en ninguno de los cultivos de 29.8 (**Figura 8C**). TVK1, por otra parte, no tuvo problemas en la diferenciación de su crecimiento y así desarrollar las estructuras especializadas denominadas conidióforos (**Apéndice, figura 13**) produciendo una cantidad considerable de conidias apreciadas a simple vista en el medio por su coloración verde intenso característica propia de éstas (**Figura 9C**). La determinación de la producción de conidias en los cultivos de TVK1 reportada a las 60 h fue de 32×10^6 y de 28×10^6 conidias/ml para los cultivos NO25 y NO12.5 respectivamente (**Figura 5**).

La generación de biomasa como se muestra en las cinéticas de crecimiento de la figura 9 sección A, presenta el crecimiento obtenido para TVK1 en el cultivo NO12.5 de 3.8 g/L y para el cultivo NO25 de 3.2 g/L. Por otra parte, la biomasa de 29.8 en el cultivo NO12.5 alcanzó una producción de 3.1 g/L y de 3.0 g/L para NO25 y NO12.5 respectivamente (**Figura 8A**). Los resultados del seguimiento del pH en el medio en nuestro control mostró un incremento del pH inicial de 5.8 a 6.2 en el cultivo NO12.5 y a 6.6 en NO25 (**Figura 8B**). Por otra parte y para la cepa TVK1, el aumento en el pH es de 1.8 puntos en el cultivo NO12.5 y de 1.95 para el cultivo NO25 respecto al inicial que fue de 5.8 (**Figura 9B**).

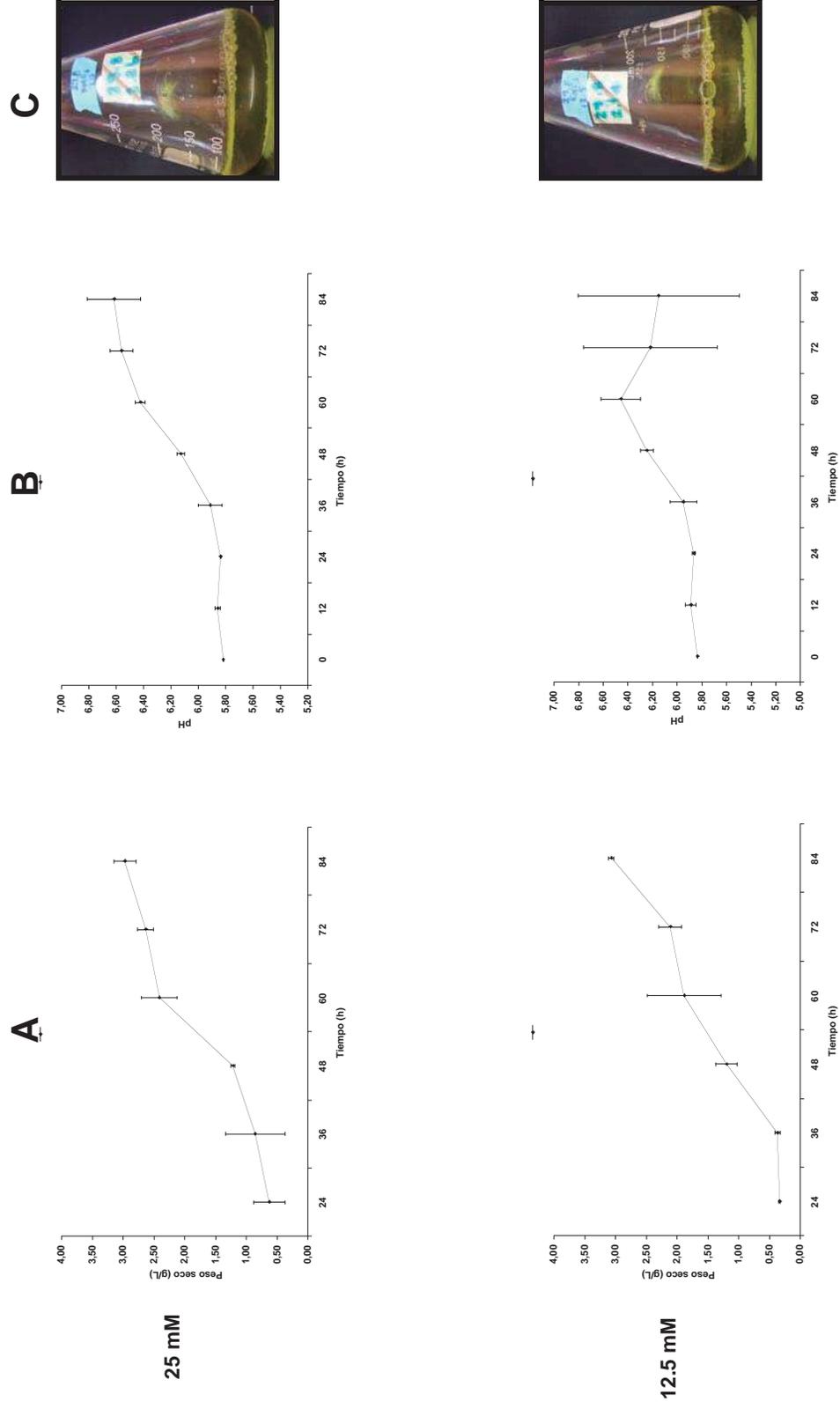


Figura 8. Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa *T. virens* 29.8 por efecto de la concentración de KNO_3 como fuente. A) cinética de crecimiento estimada por peso seco; B) cinética de pH en el medio de cultivo; C) documentación fotográfica del fenotipo de conidiación en cultivos de 60h.

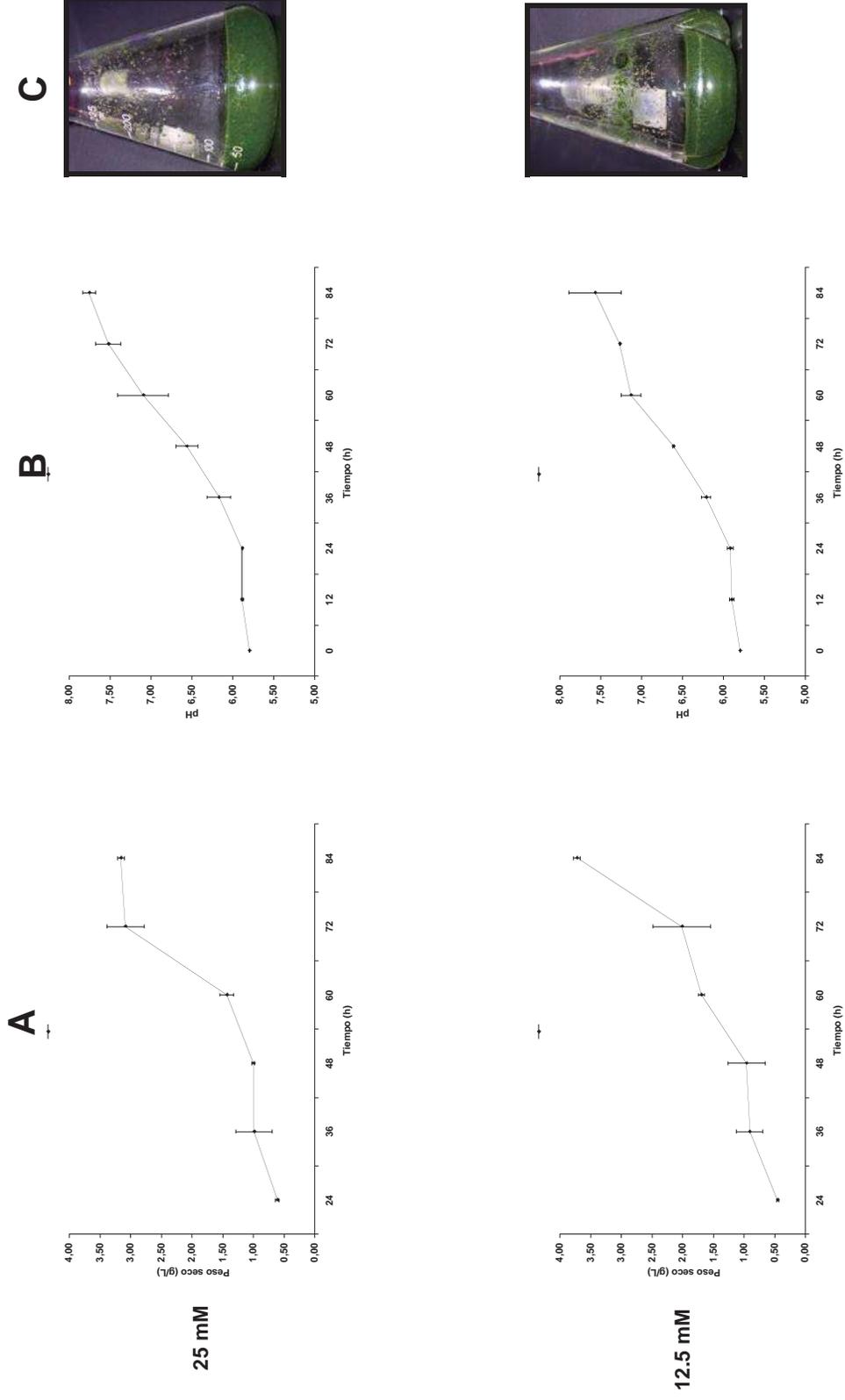


Figura 9. Evaluación del crecimiento y conidiación de la cepa *T. virens* TVK1 por efecto de la concentración de KNO_3 como fuente. A) cinética de crecimiento estimada por peso seco; B) cinética de pH en el medio de cultivo; C) documentación fotográfica del fenotipo de conidiación en cultivos de 60h.

5.4 Evaluación del crecimiento y diferenciación en cultivo sumergido de TVK1 a un pH definido y constante

Después de los resultados obtenidos sobre la influencia del NH_4Cl sobre el fenotipo de conidiación en la mutante TVK1 y su relación con el pH, se procedió a evaluar el crecimiento de TVK1 en cultivo sumergido NH25 y NH12.5 a un pH constante y determinar la influencia directa de éste sobre el fenotipo. Cuando se evaluó la conidiación en el medio NH25, ésta no se observó cuando el pH no fue ajustado, como ya había sido observado (**Figura 10A**). Sin embargo, cuando se utilizó este mismo medio pero con un pH constante de 5.75 la formación de conidias se hizo evidente (**Figura 10A**). Por otro lado en el medio NH12.5 con ajuste a pH 3.5 la conidiación estuvo ausente durante todo el desarrollo del ensayo, siendo que en esta misma concentración se había demostrado el fenotipo típico de la mutante TVK1 pero sin el ajuste correspondiente de pH (**Figura 10B**).

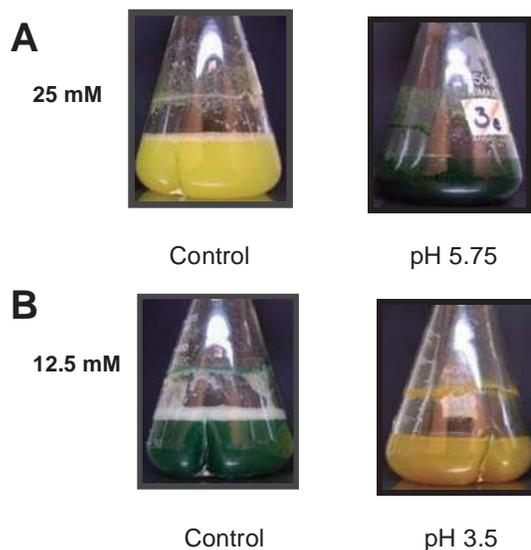


Figura 10. Evaluación del efecto de un pH constante sobre el fenotipo de conidiación en de *T. virens* TVK1. **A)** documentación fotográfica del fenotipo de conidiación obtenido en MM NH25 sin ajuste (izquierda) y con ajuste de pH (derecha). **B)** documentación fotográfica del fenotipo de conidiación obtenido en MM NH12.5. sin ajuste (izquierda) y con ajuste de pH (derecha).

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

Factores físicos y bióticos del ambiente tienen un impacto de permanencia y supervivencia en cada uno de los organismos. Para el caso particular de los hongos filamentosos y de algunas levaduras bajo un balance nutricional y condiciones ambientales favorables, el crecimiento es preferencialmente vegetativo. Sin embargo, las condiciones de crecimiento pueden cambiar y perder el balance por la deficiencia de nutrientes y/o por cambios críticos en los parámetros ambientales esenciales, en éste caso, el crecimiento vegetativo puede cambiar, dando como resultado para el caso de muchos hongos filamentosos la presencia de la morfología reproductiva *asexual* a través del desarrollo de estructuras bien diferenciadas y la consecuente formación de esporas.

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se reproducen de manera vegetativa a través de la formación de un micelio abundante blanco algodonoso compuesto de hifas hialinas septadas. Bajo algunas condiciones ambientales específicas (exposición a la luz, limitación en la concentración de fuentes de N y C y daño mecánico directo) las hifas de *Trichoderma* se diferencian en conidioforos no ramificados a partir de los cuales se forman conidias típicamente pigmentadas (color verde intenso) (Lewis y Papavizas, 1994). *Trichoderma virens* TVK1, una mutante nula en el gen *tvk1*, posee un fenotipo de conidiación en cultivo sumergido, característica que no presentan las cepas silvestres del género. Debido a que el fenómeno de diferenciación es estimulado por varios factores entre los que se cuenta aquel relacionado con nutrientes, se diseñó un primer ensayo para determinar el efecto de la fuente de C sobre la conidiación en cultivo sumergido de TVK1. Para ello se utilizaron: dextrosa -DEX- (monósacárido, incapaz de hidrolizarse en uno más simple y principal fuente de energía para la mayor parte de las células eucariotas), sacarosa -SAC- (disacárido que al hidrolizarse genera dos monosacáridos: glucosa y fructosa) y citrato -CIT- (intermediario mediato del ciclo de Krebs). El fenotipo de conidiación estuvo ausente utilizando cada una de las diferentes fuentes de C en el

medio de cultivo (**Figura 3C**). Estos resultados formularon la hipótesis de que el factor limitante podría ser la fuente de N, misma que fue NH_4NO_3 utilizada a una concentración de 25mM (Davis, R. L. y D. Deserres. 1970). Con esto en mente se procedió a crecer conidias de TVK1 en medios conteniendo diferentes concentraciones de la fuente de N y la utilización de las mismas fuentes de C con el fin de descartar la influencia total de éstas últimas sobre la expresión del fenotipo. Al término del ensayo, la conidiación fue evidenciada a través de la presencia de una coloración verde característica de las conidias. Esta característica del cultivo se hizo evidente en aquellos cultivos donde se utilizó una menor concentración de la fuente de N a la reportada para el medio Vogel (NN18.75, NN12.5) en combinación con DEX y SAC como fuente de C (**Figura 3C**). Respecto a la determinación de la concentración de conidias presentes en dichos cultivos se observó que en el medio NN12.5 se obtiene el doble de conidias respecto al medio NN18.75 (en ambas fuentes de C, DEX y SAC), habiendo una mayor producción en aquellos en los cuales se utilizó DEX como fuente de C (**Figura 2**). La evaluación del crecimiento a través de la producción de biomasa en los cultivos NN25 y NN18.5 utilizando DEX como fuente de C alcanzan el mismo nivel, esto es 9 g/L a las 108 h de incubación. Este comportamiento es similar para los cultivos en medio NN25 y NN18.75 utilizando SAC como fuente de C habiendo solo un ligero incremento de 0.2 g/L para el cultivo NN25 (7.0 en comparación con 6.8 g/L del medio NN12.5). Este resultado puede interpretarse de forma tal que la dextrosa es la fuente de C preferida para la mutante TVK1, no sólo para su crecimiento sino también para la producción y expresión del fenotipo de conidiación. Para el caso de la utilización de CIT como fuente de C, fue claro que independientemente de la concentración de la fuente de N utilizada, la cepa TVK1 no presentó el proceso de diferenciación hacia la producción de conidias. Debido a que el citrato es un intermediario mediato del ciclo de Krebs y funge como buffer manteniendo un pH constante en el cultivo, la variación del pH es mínima dando como resultado no solo la inhibición el fenotipo de conidiación sino la represión en gran medida el crecimiento del hongo. Por otra parte y respecto a los resultados sobre el seguimiento del pH en el medio, es de destacar una reducción del pH inicial (5.8) en los medios NN25 DEX y SAC hasta 3.2 puntos al final del

cultivo (108h) (**Fig. 4C**). En ambos casos este factor podría ser causa de la inhibición de la expresión del fenotipo característico de la mutante TVK1 independientemente de la fuente de C.

El N es un elemento básico para la vida, ya que forma parte de dos tipos de macromoléculas: proteínas y ácidos nucleicos. Es importante también mencionar que las interconversiones de las distintas especies de N conforman el ciclo bioquímico de dicho elemento, en el que participan organismos procariontas y eucariontas, destacando las bacterias (Richardson *et al.*, 1999). Con los datos obtenidos del primer ensayo como resultado de la utilización de NH_4NO_3 como fuente de N, y relacionando las condiciones nutricionales que de alguna manera bloquean el fenotipo de conidiación de la cepa TVK1, se procedió a utilizar dos fuentes de N: a) NH_4Cl , una fuente primaria de N, y b) KNO_3 una fuente considerada como secundaria por el hecho de requerir un proceso de reducción antes de ser utilizada como sustrato. La separación de la fuente de N inicial utilizada se llevó a cabo con el fin de poder observar su influencia como sustrato sobre el fenotipo de conidiación y su incidencia sobre el metabolismo del hongo que conlleva al cambio del pH en el medio. En este planteamiento experimental se utilizó glucosa como fuente de C, el monosacárido con el papel principal del metabolismo de plantas, animales y muchos de los microorganismos (Nelson y Cox, 2005).

El fenotipo de conidiación de la cepa TVK1 se presentó en los cultivos NO25, NO12.5 y NH12.5, inhibiéndose sólo en el cultivo NH25 el cual alcanza un pH ácido de hasta 3 en comparación con los demás cultivos. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos por Benítez y col. (2004), quienes reportaron una acidificación asociada al consumo de amonio en *T. harzianum* independientemente de la concentración de glucosa utilizada. Esta acidificación no resulta de la liberación de ácidos orgánicos sino posiblemente de H^+ , como ocurre durante la fermentación de *S. cerevisiae* (Benítez y col., 2004). Cuando es amonio la fuente de N se produce un grado de acidificación que no tiene lugar cuando la levadura crece con urea o con otras fuentes alternativas de nitrógeno. Con esto, se podría pensar que la acidificación observada en los ensayos con *T. virens* TVK1 es mucho mayor a concentraciones mayores de amonio y una aproximación a la neutralidad en los

cultivos donde se utilizó nitrato. Esto es, si el amonio está relacionado al transporte extracelular de H^+ y la consecutiva acidificación del medio de cultivo donde crece el hongo, el nitrato está asociado entonces al cotransporte intracelular de los mismos produciendo la alcalinización del cultivo y así las condiciones de pH óptimo para la expresión del fenotipo de conidiación en la cepa mutante TVK1. Así como *S. cerevisiae* y *T. harzianum* son hongos acidófilos moderados, que bajan el pH por debajo de 2.0 cuando crecen activamente en medios con glucosa y amonio, el cultivo de TVK1 en NH25 presenta también una acidificación marcada (3.2). La respuesta a condiciones de acidez o de basicidad en hongos ha sido descrita a nivel molecular. Factores de transcripción como PacC en *T. harzianum* y otros hongos filamentosos, así como RIM101 en *S. cerevisiae* y otras levaduras controlan la expresión de numerosos genes, entre los cuales se cuentan aquellos que codifican para hidrolasas, transportadores de azúcares, proteínas integrales de la pared celular, entre otros (Benítez y col., 2004). En TVK1, la ruta relacionada a la expresión del fenotipo de conidiación en cultivo sumergido corresponde a la ruta de las MAP cinasas, de ahí, y con los resultados hasta ahora obtenidos, se puede sospechar de la presencia de una ruta alterna relacionada indirectamente con la ruta de las MAP cinasas pero regulada por factores ambientales de pH con un efecto directo sobre la expresión de aquellos genes responsables de la diferenciación del hongo en su fase de reproducción asexual. Respecto a la producción en biomasa de TVK1 en los cultivos NH25 y NH12.5 se puede deducir que el NH_4Cl es un buen sustrato como fuente de N al haber una producción de 5.2 g/L en el cultivo NH25 y de 3.0 g/L en el cultivo NH12.5 habiendo una relación directa entre concentración del ión NH_4^+ y la producción de biomasa (**Figura 7**). Por otra parte, el KNO_3 como fuente de N es difícil de utilizar por parte de *Trichoderma*, aunque la expresión del fenotipo se hizo presente en ambas condiciones de cultivo (**Figura 9C**), una producción en biomasa equivalente a 3.0 g/L en el cultivo NO25 y de 3.6 g/L en el cultivo NO12.5 indican que el suministro de una concentración hipotéticamente elevada de KNO_3 tiende a saturar el sistema de transporte inhibiendo el crecimiento del hongo (**Figura 9A**).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se deduce que el fenotipo de conidiación de la cepa mutante TVK1, el cual se presenta por la delección del gen

tvk1, y el cual no presenta la cepa silvestre 29.8, es inhibido por una concentración de 25 mM de una fuente de N que contenga NH_4^+ como fuente primaria. Apoyando la existencia de una ruta extra pero directamente relacionada con la ruta de las MAP cinasas, asociada con la transducción de señales que dirigen el proceso de diferenciación y crecimiento celular. La existencia de otra posible ruta con relación directa sobre el fenotipo de conidiación y la ruta de las MAP cinasas influenciada directamente por los valores de pH del cultivo, se apoya por los resultados obtenidos del crecimiento de la cepa silvestre 29.8 en las mismas condiciones. La cepa silvestre 29.8 no presentó el fenotipo de conidiación aún cuando se cultivó en medios con concentraciones de la fuente de N permisibles para la diferenciación celular **(Figura 6C; Figura 8C)**.

La concentración de conidias producida en los diferentes cultivos en los que se presentó el fenotipo, fue mayor en el cultivo NH12.5 (88×10^6 conidias/ml de medio) incluso más que la suma conjunta de las conidias presentes en los cultivos NO25 y NO12.5 (32 y 26×10^6 conidias/ml de medio respectivamente) demostrando que aunque la utilización de NH_4^+ a una concentración de 25 mM inhibe la conidiación, una concentración de 12.5 mM es la concentración óptima para una producción de conidias (Figura 5).

De acuerdo con Caracuel y col. (2003) el pH extracelular actúa como una señal para el desarrollo de los programas de crecimiento, diferenciación y virulencia de hongos patógenos sobre humanos, plantas e insectos. La expresión de genes en respuesta a ambientes con valores diferentes de pH diferentes es regulada a través de una cascada de señalización conservada integrada, por lo menos, de los productos de 6 pares de genes y cuyo componente terminal es el factor de transcripción PacC/Rim1p.

El valor de pH óptimo para el crecimiento de los hongos, puede variar entre cepas y especies como resultado de que el medio de cultivo donde crece un hongo es directamente influenciado por el potencial de hidrógeno incidiendo sobre el carácter iónico del medio y sobre las proteínas de la membrana y la actividad de las enzimas directamente ligadas a la pared celular. El pH del medio es a tal grado importante que aunque las condiciones de temperatura y nutrientes sean óptimos, si

el pH del medio donde crece un hongo no es el adecuado, el crecimiento se verá afectado. Por otra parte, el valor de pH del medio se ve afectado por el crecimiento del hongo mismo, por ejemplo, Rajarathnam y Bano (1998) comentan que las fuentes de nitrógeno producen cambios importantes en el valor de pH del medio, de tal manera que las sales de amonio ocasionan que el medio en el que crece una cepa de *Pleurotus* se acidifique y que las sales de nitrato lo vuelvan alcalino. (Sánchez, 19).

De acuerdo a los valores de pH obtenidos en los ensayos previamente descritos, y la posible relación que se le adjudica a la ruta hipotética independiente de la ruta de las MAP cinasas, se realizó el último ensayo donde se mantuvieron los cultivos a pH constante (3.5 y 5.75) bajo condiciones permisivas y no permisivas del fenotipo de conidiación de TVK1 respecto a la fuente de N (NH_{12.5} y NH₂₅ respectivamente). El ensayo se llevó a cabo para ambas cepas, 29.8 y su mutante TVK1, con el fin de confirmar la relación de esta posible ruta respecto a la ruta de las MAP cinasas, siendo esta última inoperante en la cepa mutante. Si al hacer el ajuste de pH y si dicha ruta no estuviera relacionada con la ruta de las MAP cinasas, la cepa silvestre 29.8 debiera conidiar. Sin embargo, el fenotipo en la cepa silvestre se mantuvo sin cambio confirmando la relación propuesta. Los resultados obtenidos para TVK1 fueron a la inversa y de acuerdo a lo esperado. Esto es, el cultivo donde la concentración de N era permisiva (NH_{12.5}) para el fenotipo de conidiación y el pH se mantuvo ácido (3.5), el desarrollo de estructuras reproductivas se inhibió. Por el contrario, cuando el medio era no permisivo (NH₂₅) pero esta vez con un pH constante de 5.75 la conidiación de TVK1 fue abundante. Con estos resultados se demuestra la existencia de una ruta alternativa que regula la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular, la cual es controlada negativamente por la MAP cinasa denominada Tvk1 en *T. virens* (**Figura 11**). Así mismo, resulta clara la influencia de la concentración del ión NH₄⁺ en la acidificación del medio, probablemente a través de un transporte (antiporte) acoplado a H⁺. En hongos se han descrito varios transportadores del ión NH₄⁺ y el funcionamiento de los mismos esta ligado a elementos en la transducción de señales (Figura 11).

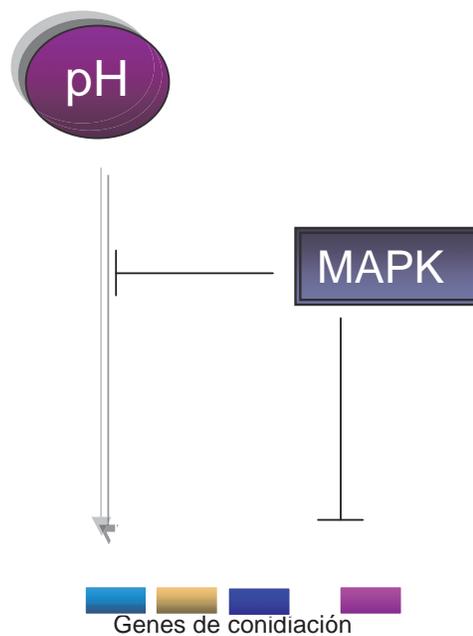


Figura 11. Mecanismo propuesto de la interrelación del pH sobre la expresión del fenotipo de conidiación de *Trichoderma virens* TVK1.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

- El fenotipo de conidiación que caracteriza a la cepa mutante TVK1 de *Trichoderma virens* esta directamente regulado por la concentración de NH_4^+ en el medio.
- El transporte de NH_4^+ en *T. virens* esta acoplado a la expulsión de H^+ , por lo que la acidez resultado de este fenómeno es la condición que permite la diferenciación hacia la conidiación en cultivo sumergido de TVK1.
- La utilización de NO_3 como fuente de N está asociado al cotransporte de H^+ lo que genera un pH alcalino en el cultivo y consecuentemente la expresión del programa de desarrollo asexual.
- El amonio es una fuente de N preferida sobre el nitrato generando una mayor producción de biomasa.

BIBLIOGRAFÍA

Benítez, T., Moreno-Mateos, M. A., Rincón, A. M. and Codón, A. A. 2008. **Características de levaduras y hongos filamentosos de interés en agroalimentación. ¿Adaptación al ambiente?** Universidad de Sevilla

Caracuel Z., Casanova C., Roncero M. I., Di Pietro A., and Ramos J. 2003. **pH Response Transcription Factor PacC Controls Salt Strees Tolerante and Expresión of the P-Type Na⁺-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*.** EUKARYOTIC CELL, Dec. 2003, p.1246-1252

Caracuel Z., Roncero M. I. G., Espeso E. A., González V. C. I., García M. F. I. and Di Pietro A. 2003. **Signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*.** Molecular Microbiology,765-779

Cole, G. T. y Bryce K. 1981. **Biology of conidial Fungi. Vol II.** 1a. Edición. Academia Press ed. 143-153, 329-351 pp.

Cortés P. C., Olmedo M. V. Herrera-Estrella A. 2007. The nature of fungal mycoparasitic biocontrol agents. En: Chincholkar S. B. and Mukerji K. G. (Ed). **Biological control of plant diseases.** The Haworth Press, Inc. NY. Pp.327-353.

Dabas N. and Morshhäuser J. 2007. **Control of Ammonium Permease Expression and Filamentous Growth by the GATA Transcription Factors *GLN3* and *GAT1* in *Candida albicans*.** EUKARYOTIC CELL, May 2007, p.875-888

Gallegos-Vázquez, C., Olivares-Sáenz, E., Vázquez-Alvarado, R. and Zavala-García. F. 2000. **Absorción de nitrato y amonio por plantas de nopal en hidroponía.** Terra. 18(2): 133-139.

González H. J. C. y Peña A. 2002. **Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halofila)**

Hiten D. Madhani, Cora A. Styles, and Gerald R. Fink. 1997. MAP Kinases with Distinct Inhibitory Functions Impart Signaling Specificity during Yeast Differentiation. *Cell*, Vol. 91, 673-684.

Jing R. X. 2000. **MAP Kinases in Fungal Pathogens**. *Fungal Genetics and Biology* 31, 137-152

Kawasaky L., Sánchez O., Shiozaki K. and Aguirre J. **SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans***. *Molecular microbiology* (2002) 45(4), 1153-1163.

Kingsbury, J. M., Goldstein A. L. y McCusker J. H. 2006 **Role of nitrogen and carbon transport, regulation, and metabolism genes for *Saccharomyces cerevisiae* survival in vivo**. *Eukariotic cell*. 5 (5): 816-824.

Kersten M. A.S.H., Arninkho M. J. C. f, Op den Camp H. J.M., Van Griensven L. J.L.D. and van der Drift Ch.. 1999. **Transport of amino acids and ammonium in mycelium of *Agaricus bisporus***. ELSEVIER. *Biochimic et Biophysica Acta* 1428 (1999) 260-272.

Kraimer-Haimovich H., Servi E., Katan T., Rollins J., Okon Y. and Prusky D. **Effect of ammonium by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity**. *Applied and environmental microbiology*, feb. 2006, p. 1034-1039

Lorenz M. C. and Heitman J., 1998. **The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae***. *The EMBO Journal* Vol.17 No.5 pp.1236-1247

Mah, J. H. and Yu, J. H. 2006. **Upstream and Downstream Regulation of Asexual Development in *Aspergillus fumigatus***. Eukaryotic Cell. 5 (10): 1585-1595.

Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S. and Andre, B. 1997. **A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae***. Molecular and Cellular Biology. 17(8): 4282-4293.

Mendoza-Mendoza A. 2004. **Transducción de señales extracelulares asociadas al proceso de micoparasitismo de *Trichoderma*: papel de las MAP cinasas**. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Gto. 16-88 pp.

Mendoza-Mendoza, A., Pozo, M. J., Grzegorski, M., Martínez, P., García, J. M., Olmedo-Monfil, V., Cortés, C., Kenerley, C. and Herrera-Estrella, A. 2003. **Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase**. Proc. Natl. Acad. Sci. P. 15965-15970.

Mendoza-Mendoza, A., Rosales-Saavedra, T., Cortés, T., Castellanos-Juárez, V., Martínez, P. and Herrera-Estrella, A. 2007. **The MAP kinase TVK1 regulates conidiation, hydrophobicity and the expresión of genes encoding cell wall proteins in the fungus *Trichoderma virens***. Microbiology. 153: 2137-2147.

Mukherjee P. K., Latha J, Hadar R.r, and Horwitz B. A., 2003. **TmkA, a Mitogen-Activated Protein Kinase of *Trichoderma virens*, Is Involved in Biocontrol Properties and Repression of Conidiation in the Dark**. EUKARYOTIC CELL, June 2003, p. 446–455.

Murray, L. E., Rowley, N., Dawes, I. W., Johnston, G. C. and Singer, A. 1998. **A yeast glutamine tRNA signals nitrogen status for regulation of dimorphic growth and sporulation**. Cell Biology. 95: 8619-8624.

Orejas M., Espeso E. A., Tilburn J., Sarkar S., Arst H. N. Jr., and Peñalva M. A.. 2007. **Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety.** *Genes and development* 9: 1622-1632

Peñalva M. A. and Arst H. N., Jr. 2002. **Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeast.** *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, Sept. 2002, p. 426-446

Rocha R. V., Omero C., Chet I., Horwitz B. A., and Herrera E. A. 2002. ***Trichoderma atroviride* G-Proteine α -Subunit Gene *tga1* Is Involved in Mycoparasitic Coiling and Conidiation.** *EUKARYOTIC CELL*, Aug. 2002, p. 594-605

Sánchez José E., **Crecimiento y fructificación.**

Saucedo G. M. y Gavilanes R. M.. 2005. **Las MAP cinasas: elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos.** *REB* 24 (1): 4-11, 2005. UNAM.

Skromne I., Sánchez O. and Aguirre J. 1995. **Starvation stress modulates the expresión of the *Aspergillus nidulans* *brl* regulatory gene.** *Microbiology*. (1995) 141, 21-28.

Smith, J. E. y Berry D. R. 1976. **Biochemistry of fungal Development.** 1a. Edición. London, New York. Academic Press ed. 182-207 pp.

Unklest S. E. Wang R., Wang Y., Glass A. D. M., Crowfords N. M., and Kinghorn J. R. **Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cell.** *The journal of biological chemistry*. Vol. 279, No. 27, July 2, pp. 28182-28186

Velázquez R. 2004. **Papel de una MAPKK cinasa en la respuesta micoparasítica de *Trichoderma atroviride***. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Gto. 11-75 pp.

Viterbo, A., Harel, M., Horwitz, B. A., Chet, L. and Mukherjee, P. K. 2005. ***Trichoderma* Mitogen-Activated proteine kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance**. Applied and Enviromental Microbiology. 71(10): 6241-6246.

Vizcaino J. A., Cardoza R. E., Hauser M., Hermosa R., Rey M., Llobell A., Becker J. M., Gutiérrez S. , Monte E. ***ThPTR2*, a di/tri-peptide transporter gene from *Trichoderma harzianum***. ELSEIVIER. Fungal genetics and biology 43 (2006) 234-246.

Xue T., Nguyen K. C., Romana A., and May S. G. 2004. **A mitogen-activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial Germination and grogwth in *Aspergillus fumigtus***. Eukaryotic cell., Apr. 2004. P. 557-560

Harman G. E. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.html> (Accesada en diciembre de 2007)

Harman G. E. Departamentos de la ciencia hortícola y de la patología de la planta. Universidad NYSAES de Cornell Ginebra, NY 14456 <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/MIE/CBiologico1.htm> (Accesada en junio de 2007)

Harman, G. E. Cornell University, Ginebra, NY 14456 <http://www.nysaes.cornell.edu/biocontrol/pathogens/trichoderma.html> (Accesada en septiembre de 2007)

Kubicek C. P. <http://www.isth.info/phylogeny/projets.php> (Accesada en agosto de 2007)

Hoffmann, M. P. and Frodsham, A. C. (1993) Natural Enemies of Vegetable insect Pest. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY, 63 pp.
<http://nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens> (Accesada en noviembre de 2007)

APÉNDICE

Evaluación del crecimiento en cultivo sumergido de la cepa *T. virens* 29.8 a pH constante

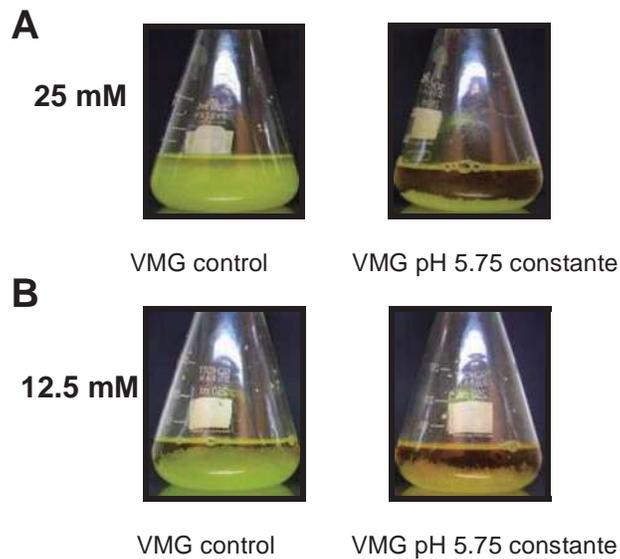


Figura 12. Evaluación del efecto de un pH constante sobre el fenotipo de conidiación en cultivo sumergido de *T. virens* 29.8. **A)** documentación fotográfica del fenotipo de conidiación obtenido en MM NH25 sin ajuste (izquierda) y con ajuste de pH (derecha). **B)** documentación fotográfica del fenotipo de conidiación obtenido en MM NH12.5. sin ajuste (izquierda) y con ajuste de pH (derecha).

Análisis microscópico de la las estructuras reproductivas obtenidas en cultivo sumergido de TVK1.

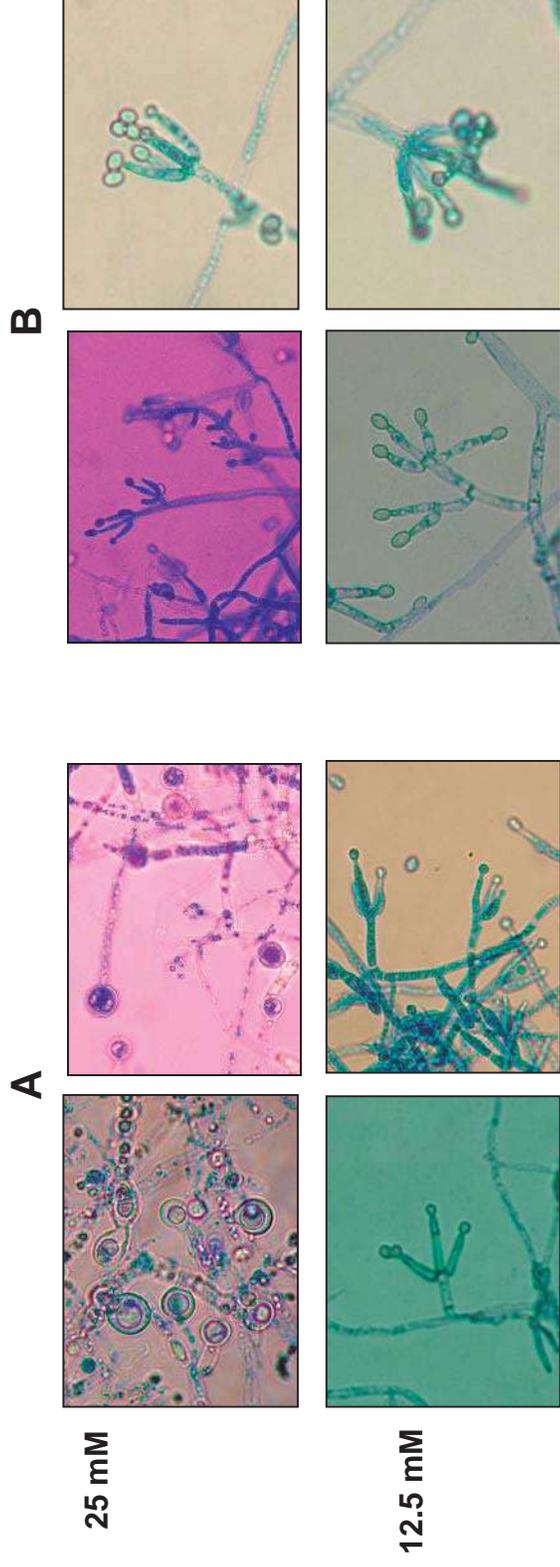


Figura 13. Documentación fotográfica del fenotipo de conidiación de la cepa *Trichoderma virens* TVK1 en cultivo sumergido. **A)** Medio VMG con NH_4Cl como fuente de N. **B)** Medio VMG y KNO_3 como fuente de N.

Relación del efecto de la fuente de N y pH sobre el crecimiento y conidiación de *T. virens* 29.8 y *Trichoderma virens* TVK1 en cultivo sumergido

Tabla V . Cinética de crecimiento, monitoreo de pH y efecto en la conidiación de *T. virens* TVK1 y *T. virens* 29.8 en cultivo sumergido VMG con un tiempo de incubación de 84h.

| Condición | Cepa | Crecimiento (g/L) | pH | Conidiación |
|----------------------------|------|----------------------|------|-------------|
| NH ₄ Cl 25 mM | 29.8 | 5.92 | 3.28 | No |
| | TVK1 | 5.24 | 3.53 | Si |
| NH ₄ Cl 12.5 mM | 29.8 | 3.67 | 4.76 | No |
| | TVK1 | 2.97 | 5.43 | No |
| KNO ₃ 25 mM | 29.8 | 2.98 | 6.62 | No |
| | TVK1 | 3.16 | 7.76 | Si |
| KNO ₃ 12.5 mM | 29.8 | 3.07 | 6.15 | No |
| | TVK1 | 3.73 | 7.57 | Si |