



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO DE CEPAS  
SILVESTRES DE *Trichoderma* spp. HACIA MICROORGANISMOS  
FITOPATÓGENOS**

**TESIS  
QUE PRESENTA**

**M.V.Z. Simón Morales-Gallardo**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA**

**Director de Tesis:**

**D. C. Gerardo Vázquez-Marrufo**

**Morelia, Michoacán, Agosto 2016**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veeterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D. C. Gerardo Vázquez-Marrufo. El presente trabajo recibió apoyo otorgado por CONACyT mediante la beca con registro No. 326428 para la realización de estudios de posgrado. Se agradece también el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH), mediante se programa 2016.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**.

Al **D. C. Gerardo Vázquez-Marrufo** por sus consejos, paciencia, conocimiento y apoyo.

A mi comité sinodal: **D. C. Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas, D. C. Joel Edmundo López-Meza, D. C. Alejandra Ochoa-Zarzosa, D. C. Horacio Cano-Camacho**, por sus valiosas aportaciones a ésta tesis.

Agradezco a mis compañeros **Mina, Erick, Heidi, Andrei, Irum y Miriam**.

A **Saila Viridiana Cázares-García** por sus conocimientos, apoyo y gran amistad.

## DEDICATORIAS

A mis padres **Rosalinda y Simón** por su apoyo incondicional y por ser el principal cimiento de mi vida profesional.

A mis hermanos **Zuli, Ivía e Israel**, porque siempre están presentes cuando los necesito.

A mi amiga **Adrea** por su apoyo y cariño incondicional.

**ÍNDICE**

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	x
<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
1.1 Clasificación del género <i>Trichoderma</i>	3
1.2 Aspectos biológicos y ecológicos generales del género <i>Trichoderma</i>	4
1.3 Ciclo de vida de <i>Trichoderma</i> spp.	5
1.4 Aplicaciones biotecnológicas de <i>Trichoderma</i> spp.	5
1.4.1 Producción de enzimas	5
1.4.2 Producción de sustancias con actividad biológica	9
1.4.3 Biocontrol	11
a) Micoparasitismo	12
b) Antibiosis	12
c) Competencia	13
d) Inducción de resistencia en plantas	14
1.5 Selección de cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. para procesos de biocontrol	15
<b>II. HIPÓTESIS</b>	27
<b>III. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo general	27
3.2 Objetivos particulares	27
<b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1 CAPÍTULO 1. Análisis de la capacidad antagónica <i>in vitro</i> de cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp. contra microorganismos fitopatógenos.	29

---

4.2 CAPÍTULO 2. Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	53
4.3 CAPÍTULO 3. Diversidad genética de cepas silvestres de <i>Trichoderma harzianum</i> .	76
4.4 CAPÍTULO 4. Diversidad metabólica y patrones de conidiación en cepas silvestres de <i>Trichoderma harzianum</i> .	100
<b>V. DISCUSIÓN GENERAL</b>	126
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	
6.1 Parciales	136
6.2 Generales	137

**ABREVIATURAS**

°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
AEM	Agar extracto de malta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CMU	Cepario Michoacano Universitario
FCA	Fuente de carbono asimilada
g/L	Gramos por litro
IIAF	Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales
lbf/in <sup>2</sup>	Libra fuerza por pulgada cuadrada
I <sub>2</sub> /KI	Iodo / ioduro de potasio
kb	Kilobase
M	Marcador de peso molecular
MBX	Medio basal xilanólisis
Mg	Miligramos
MFs	Microarreglos fenotípicos
mL	Mililitros
mM	Milimoles
MMV	Medio Mínimo Vogel
nm	nanómetros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
V	Volts

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Página
<b>4.1. CAPÍTULO 1</b>		
1	Ensayos de confrontación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra hongos y oomicetes fitopatógenos.	40
2	Ensayos de inhibición de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra hongos y oomicetes fitopatógenos.	42
<b>4.2. CAPÍTULO 2</b>		
1	Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	64
<b>4.3. CAPÍTULO 3</b>		
1	Patrones de amplificación de las cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> con distintos iniciadores ISSR.	86
2	Patrones de amplificación de las cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> con iniciadores para elementos repetitivos (rep-PCR).	87
3	Dendogramas generados con los resultados de amplificación de los iniciadores ISSR en las cepas de <i>T. harzianum</i> .	88
4	Dendogramas generados con los resultados de amplificación obtenidos con iniciadores para distintos elementos repetitivos en las cepas de <i>T. harzianum</i> .	89
<b>4.4. CAPÍTULO 4</b>		
1	Mapa de calor de asimilación de fuentes de carbono en las cepas de <i>T. harzianum</i> de estudio.	110
2	Perfiles de asimilación de sustratos.	111
3	Dendograma de asimilación de fuentes de carbono.	112

- |   |  |     |
|---|--|-----|
| 4 | Patrones de conidiación de las cepas de <i>T. harzianum</i> en distintas fuentes de carbono. | 113 |
| 5 | Fuentes de carbono en las que más y menos conidiación se presentó en las cepas de estudio.   | 114 |

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

- |   |  |     |
|---|--|-----|
| 1 | Conexiones através de los niveles de organización biológica. | 132 |
|---|--|-----|

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>No.</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>		
1	Clasificación del género <i>Trichoderma</i> .	3
<b>4.1. CAPÍTULO 1</b>		
1	Datos de las cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp.	36
2	Datos de los aislados silvestres de microorganismos fitopatógenos.	36
3	Nivel de antagonismo de cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> contra microorganismos fitopatógenos.	41
4	Inhibición de crecimiento de microorganismos fitopatógenos por parte de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	43
<b>4.2. CAPÍTULO 2</b>		
1	Niveles de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	65
<b>4.3. CAPÍTULO 3</b>		
1	Oligonucleótidos utilizados para el análisis de diversidad genética en <i>T. harzianum</i> .	85
<b>4.4. CAPÍTULO 4</b>		
1	Patrones de conidiación de las cepas de <i>T. harzianum</i> en las placas Biolog.	114

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron características fisiológicas, bioquímicas y genéticas de 23 cepas silvestres de *Trichoderma* spp., relacionadas con su capacidad para antagonizar *in vitro* a microorganismos fitopatógenos. Los ensayos de confrontación en cultivos duales y las pruebas de inhibición evidenciaron a la cepa CMU-8 de *T. atroviride* como la mejor antagonista contra los microorganismos fitopatógenos de prueba, los cuales fueron los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. coccodes*, *Fusarium pseudocircinatum* y *F. mexicanum*, y los oomicetes *Phytophthora cinnamomi* y *P. capsici*. La cepa CMU-218 de *T. viride* fue la mejor productora de enzimas hidrolíticas extracelulares (celulasas, quitinasas, proteasas y xilanasas) asociadas al micoparasitismo. Los patrones de amplificación obtenidos para las cepas del complejo *T. harzianum* con iniciadores dirigidos a secuencias repetitivas simples (ISSR) y para la amplificación de elementos repetitivos (rep-PCR), mostraron de tres a cinco genotipos. Los dendrogramas generados indican que existe flujo genético entre las localidades de procedencia de las cepas, o bien posiblemente estén separando a las especies crípticas del complejo *T. harzianum*. Se seleccionaron nueve cepas de genotipos distintos de *T. harzianum* para evaluar la variación en la capacidad metabólica y de conidiación empleando el ensayo de microarreglos fenotípicos (MFs) con placas Biolog. La cepa que mostró la mayor versatilidad metabólica fue la cepa CMU-183 (n=80), mientras que aquella que mostró una menor capacidad en la utilización de sustratos fue la CMU-51 (n=30). Los sustratos en los que se observó mayor conidiación fueron D-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, D-gentobiosa y D-trealosa. La cepa que produjo conidas maduras en la mayor cantidad de fuentes de carbono fue la CMU-25 (n=23) y la que lo hizo en menos fuentes de carbono fue la CMU-43 (n= 9). Los resultados sugieren que entre las cepas de estudio se presenta micoparasitismo, antibiosis y competencia por nutrientes como estrategias antagónicas contra microorganismos fitopatógenos. La estrategia de caracterización de cepas de *Trichoderma* spp. empleada en el presente trabajo permite la generación de información sobre la biología básica de especies/cepas del género, al mismo tiempo que constituye una herramienta para la selección de cepas para el desarrollo de productos de biocontrol.

## SUMMARY

This work aimed at evaluating the physiological, biochemical, and genetic characteristics associated to the capacity of species and strains of the genus *Trichoderma* for antagonizing phytopathogenic microorganisms *in vitro*. The results from assays in dual culture and inhibition tests showed that the best antagonistic strain against the tested phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. coccodes*, *Fusarium pseudocircinatum*, and *F. mexicanum*, and the oomycetes *Phytophthora cinnamomi* and *P. capsici* was *T. atroviride* CMU-8. *Trichoderma viride* CMU-218 was the strain that produced more hydrolytic extracellular enzymes associated to mycoparasitism (cellulases, chitinases, proteases, and xylanases). Patterns of DNA amplification targeted at inter simple sequence repeats (ISSR) and repetitive elements (rep-PCR) revealed three to five genotypes in the *T. harzianum* complex, the corresponding dendrograms suggesting either that gene flow occurs between the provenance localities of strains, or that the cryptic species of the complex are being separately grouped. Nine strains from different genotypes of *T. harzianum* were selected for assessment of variations in metabolic capacity and conidiation by means of Biolog Phenotype MicroArrays (PM). Strain CMU-183 ( $n=80$ ) showed the highest metabolic versatility and strain CMU-51 ( $n=30$ ) was the least capable for substrate utilization. The substrates observed to better promote conidiation were D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, and D-trehalose. Strain CMU-25 ( $n=23$ ) was the strain that formed mature conidia in the larger number of carbon sources, while strain CMU-43 ( $n=9$ ) did it in the lower number of substrates. The results suggest that the studied strains display mycoparasitism, antibiosis, and competition for nutrients as antagonistic strategies against phytopathogenic microorganisms. The approach applied in this work for characterizing strains of the genus *Trichoderma* allows for generating information about the biology of its species and strains, and is a tool for selecting strains for development of biocontrol products.

PALABRAS CLAVE: Confrontación, Inhibición, Enzimas, Diversidad, Trichoderma.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Clasificación del género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez en 1794 por Persoon (Samuels 2006) y en la actualidad se reconocen dentro de dicho grupo taxonómico a 254 especies y dos variedades (Bissett *et al.*, 2015). Hasta recientemente se consideraba que *Trichoderma* era el estado asexual de formas sexuales dentro del género *Hypocrea*, sin embargo, se ha encontrado que en varios casos, especímenes de *Hypocrea* y *Trichoderma* que se consideraban como pares de anamorfo/teleomorfo consisten de especies separadas; el ejemplo más representativo en ese sentido lo constituye *H. lixii* y *T. lixii*, que actualmente se consideran especies diferentes (Chaverri *et al.* 2015). Debido a esto, y a la aportación de estudios sistemáticos y taxonómicos del análisis filogenético proporcionado por las técnicas de biología molecular, se ha establecido la regla de nombrar tanto al estado asexual y sexual como *Trichoderma*, aunque el nombre de *Hypocrea* debe de incluirse cuando se habla por primera vez de alguna especie dentro del género (Bissett *et al.*, 2015).

De acuerdo a revisiones recientes sobre los grupos y subgrupos taxonómicos dentro de los hongos, y del propio género, la clasificación completa del género *Trichoderma* sería (Tabla 1): Reino Fungi, Subreino Dikarya, Phylum Ascomycota, Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales y familia Hypocreaceae (Hibbett *et al.*, 2007; Kubicek y Druzhinina, 2014; Rossman *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** Clasificación del género *Trichoderma*.

<b>Reino</b>	Fungi
<b>Subreino</b>	Dikarya
<b>Phylum</b>	Ascomycota
<b>Subdivisión</b>	Pezizomycotina
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Subclase</b>	Hypocreomycetidae
<b>Orden</b>	Hypocreales
<b>Familia</b>	Hypocreaceae
<b>Género</b>	<i>Trichoderma</i>

### **Aspectos biológicos y ecológicos generales del género *Trichoderma***

Algunas especies del género *Trichoderma* se consideran oportunistas exitosos pudiendo colonizar una gran variedad de hábitats (Kubicek y Druzhinina, 2014). Estas especies pueden ser encontradas en ambientes acuáticos, en el suelo de ecosistemas terrestres, y como parte de la microbiota de restos vegetales, incluidos madera y mantillo (Atanasova, 2014; Kubicek y Druzhinina, 2014). Las especies del género *Trichoderma* presentan una gran versatilidad de estilos de vida en estos ambientes, los cuales se basan en dos modos principales de nutrición, que son el saprotrofismo y la biotrofia (Atanasova, 2014). El modo de vida saprofitico de algunas especies del género se debe en buena medida a su capacidad para producir una gran diversidad de enzimas hidrolíticas extracelulares, varias de ellas relacionadas con la degradación de polisacáridos de la pared celular vegetal (Strakowska *et al.*, 2014). Las interacciones biotróficas de las especies del género se presentan con una amplia gama de grupos biológicos, y una de las más ampliamente documentadas es el micoparasitismo. En sus interacciones con otros hongos, *Trichoderma* spp. puede colonizar superficialmente tejidos y colonias de otras especies fúngicas, o atacar la pared celular degradándola para invadir a su contraparte, de tal forma que su comportamiento ecológico en ese sentido oscila entre el micotrofia, en la que no mata a su hospedero, hasta el hiperparasitismo necrotrófico, en el que acaba matando al hospedero (Druzhinina *et al.*, 2011). Otra relación biótica que ha cobrado gran relevancia en los últimos años es la capacidad de especies de *Trichoderma* para establecerse como endófitos de plantas, no solo de la raíz (Singh *et al.*, 2014), sino también de las partes aéreas de la planta (Larran *et al.*, 2007; Bailey *et al.*, 2008; Hosseyni-Moghaddam y Soltani, 2014). La presencia de *Trichoderma* spp. en la rizósfera, y su interacción como endófito de raíz, induce en la planta la respuesta de defensa contra fitopatógenos y promueve su crecimiento (Harman *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2014; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014); otro efecto importante de la interacción es la disminución del estrés abiótico y la optimización en la incorporación de nutrientes del suelo y el uso eficiente del N por parte de la planta (Shoresh *et al.*, 2010).

Aunque el saprofitismo y las interacciones bióticas con hongos y plantas son

quizá los aspectos ecológicos más evaluados en *Trichoderma* spp., las especies del género mantienen relaciones con una gama más amplia de grupos biológicos, incluido el parasitismo hacia nematodos (Mukherjee *et al.*, 2013) y seres humanos (Sandoval-Denis *et al.*, 2014).

### **Ciclo de vida de *Trichoderma* spp.**

El crecimiento del micelio de *Trichoderma* sobre un sustrato eventualmente lleva a la producción de esporas asexuales, proceso que es dependiente de la fuente de carbono (Friedl *et al.*, 2008) y es regulado por diversos factores que incluyen ciclos endógenos de la hifa y factores ambientales como la iluminación, el pH, la tensión de oxígeno e inclusive el daño mecánico (Steyaert *et al.*, 2010). En la fase sexual del ciclo de vida de *Trichoderma* spp., la evidencia genómica y experimental en algunas especies del género ha mostrado que éstas presentan heterotalismo bipolar (Seidl *et al.* 2009), es decir, la plasmogamia de entrecruzamiento sexual solo se puede presentar entre hifas de individuos que contienen genes determinantes de cruce sexual diferentes y complementarios, denominados *mat1-1* y *mat1-2*, los cuales se encuentran en el mismo locus pero no presentan similitud en su secuencia. Dicho patrón de cruzamiento sexual ha sido caracterizado experimentalmente únicamente en *T. reesei* (Seidl *et al.* 2008) y mediante evidencia genómica en *T. virens* y *T. atroviride*, en cuyos genomas solo se ha encontrado uno de los dos genes de tipos de apareamiento (Schmoll *et al.*, 2016). El análisis genómico de *T. reesei*, *T. virens* y *T. atroviride* también ha permitido describir el sistema de feromonas peptídicas y de receptores de dichas feromonas, gracias a su homología con especies de ascomicetes bien caracterizadas en ese sentido (Schmoll *et al.*, 2016).

### **Aplicaciones biotecnológicas de *Trichoderma* spp.**

#### *Producción de enzimas*

Sin duda alguna la especie más importante en la producción de enzimas de utilidad industrial ha sido *T. reesei*, de la cual se identificó inmediatamente su poder celulolítico (Schuster y Schmoll, 2010). Al paso del tiempo se han probado diversos sustratos para la producción de la actividad celulolítica al mismo tiempo que se han

aplicado estrategias de genética molecular para la obtención de cepas sobreproductoras. Después de los resultados obtenidos con *T. reesei*, se incrementó el interés en la búsqueda de actividad celulolítica en otras especies del género, de tal forma que a la fecha se han detectado genes y actividades de exo- $\beta$ -1,4-glucanasas, endo- $\beta$ -1,4-glucanasas,  $\beta$ -Glucosidasas en varias especies de *Trichoderma* spp. (Strakowska *et al.*, 2014). El análisis genómico comparativo de *T. reesei*, *T. virens* y *T. atroviride* ha mostrado que el número de genes de celulasas y xilanasas no es muy distinto entre las tres especies, y de hecho estas últimas producen un número mayor de celulasas que la primera, no obstante que *T. reesei* es considerada saprofítica y las otras dos como micoparasíticas (Schmoll *et al.*, 2016). Aún más, *T. reesei* produce una cantidad más baja de celulasas en comparación con otras especies de hongos ascomicetes, no obstante, su éxito industrial como hongo celulolítico se debe a que las pocas celulasas que expresa, las secreta en gran cantidad, constituyendo en conjunto entre el 70 y el 80% de la proteína secretada por dicha especie (Schmoll *et al.*, 2016).

En años más recientes se ha utilizado el análisis proteómico en *Trichoderma* spp. para evaluar la producción de *CAZimas*, posible castellanización de *CAZyme*, *Carbohydrate Active Enzymes*, como se les ha denominado en inglés, o el *CAZoma*, posible castellanización de *CAZome*, término análogo al empleo del sufijo *omica* en transcriptómica, genómica, proteómica, etc., usado para designar el análisis masivo de datos en distintos procesos biológicos. En particular, ha sido de especial interés en análisis de secretoma, es decir, las proteínas que son secretadas al medio de cultivo, esto debido al creciente interés por la producción de bioetanol y carbohidratos de bajo peso molecular a partir de residuos vegetales (Singhania *et al.*, 20013; Bischof *et al.*, 2016). Así, se ha realizado el estudio del secretoma de *T. reesei* para encontrar una combinación óptima de enzimas que permita el tratamiento de biomasa vegetal para la obtención de biocombustibles (Adev *et al.*, 2012). No obstante, el análisis comparativo del secretoma de la cepa Rut C30 de *T. reesei*, con el de la cepa S4F8 de *T. asperellum*, muestra que esta última produce un conjunto de enzimas lignocelulolíticas más completo que el de la primera, con un mayor potencial para la hidrólisis de hemicelulosa y celobiosa (Marx *et al.*, 2013). El mismo

tipo de análisis proteómico en presencia de celulosa o residuos vegetales se ha realizado en *T. harzianum* (Do Vale *et al.*, 2012; Gómez-Mendoza *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2016).

Las xilanasas son enzimas que también participan en la degradación de la pared celular vegetal. Dentro de esta actividad enzimática se agrupa comúnmente a endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas, las cuales son enzimas importantes en la hidrólisis de la xilana, el componente mayoritario de la hemicelulosa. Las endoxilanasas se encargan en primer término de hidrolizar el homopolímero de 1-4,  $\beta$ -D-xilopiranososa generando xilo-oligómeros (Ahmed *et al.*, 2009), los cuales son procesados por las  $\beta$ -xilosidasas para generar monómeros de xilosa (Knob *et al.*, 2010). En el genoma de *T. reesei* se han encontrado cuatro genes que codifican para xilanasas y uno para xilosidasa (Martínez *et al.*, 2008), por lo que se considera que en el género la producción de dichas enzimas es limitada en comparación con otras especies de hongos. Como era de esperarse, los genes relacionados con la síntesis de xilanasas en *T. reesei* aumentan su transcripción significativamente cuando el hongo se cultiva en presencia de rastrojo de trigo (Schmoll *et al.*, 2016). El análisis del secretoma de *T. harzianum* en presencia de celulosa muestra la presencia de dichas enzimas (Do Vale *et al.*, 2012). Además, se ha encontrado que algunos genes de xilanasas, junto con otros miembros de CAZoma, aumentan su transcripción en procesos de diferenciación celular, como la conidiación en *T. reesei* (Schmoll *et al.*, 2016), aunque el papel de dichas actividades enzimáticas en este proceso no está claro.

Las aplicaciones industriales de las xilanasas secretadas por hongos, incluidas especies del género *Trichoderma*, abarcan la producción de sustancias químicas como el xilitol, el tratamiento de alimento para animales de granja, el bioblanqueo de pulpa para la elaboración de papel, como aditivos en la industria de los alimentos, o como componentes de fórmulas detergentes, entre otras (Juturu y Wu, 2012).

Otro grupo de enzimas hidrolíticas extracelulares de relevancia producidas por *Trichoderma* spp. son las quitinasas, las cuales degradan a la quitina, un polímero estructural en la pared celular de hongos y en el exoesqueleto de insectos. Por lo anterior, dicha actividad enzimática ha sido relacionadas con la actividad entomopatógena y micoparasítica de hongos (Chavan y Deshpande, 2013), y

particularmente en *Trichoderma* spp. (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). La actividad quitinolítica se induce generalmente como un complejo multi-enzimático que incluye por lo menos a endo-quitinasas y N- acetil hexosaminidasas, aunque la quitina también puede ser atacada por desacetilasas (Chavan y Deshpande, 2013; Hartl y Seidl-Seiboth, 2012). Las glucanasas y las quitosanasas colaboran con las quitinasas en el proceso de degradación de la pared celular fúngica, ya que las glucanas y la quitosana constituyen otros de los polímeros importantes en la estructura de la pared celular de los hongos (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). El análisis genómico comparativo ha mostrado que el género *Trichoderma* ha sufrido una expansión en el número de genes que codifican para quitinasas y quitosanasas en relación a otras especies fúngicas de ascomicetes y basidiomicetes; en particular, las especies micoparasíticas *T. atroviride* y *T. virens* tienen un mayor número de dichos genes que el saprófito *T. reesei* (Kubicek *et al.*, 2011). El número de genes de glucanasas también es mayor en las especies micoparasíticas que en *T. reesei*, pero la función de la mayoría de dichos genes no ha sido elucidada (Schmoll *et al.*, 2016).

Además de sus funciones asociadas a la capacidad micoparasítica y nematocida de *Trichoderma* spp., las quitinasas son útiles en la producción de quitooligosacáridos, glucosamina y N- acetil glucosamina a partir de quitina, sustancias con actividad farmacológica, incluida la actividad antitumoral; el uso de estas enzimas como aditivos en cremas antifúngicas y en medicamentos oftálmicos también ha sido considerado (Dahiya *et al.*, 2006; Nagpure *et al.*, 2014). La producción de protoplastos fúngicos es otra de las aplicaciones de dicha actividad enzimática.

Las proteasas extracelulares también han sido estudiadas en *Trichoderma* spp. en relación a su participación en el micoparasitismo y a algunas aplicaciones industriales. En el caso de esta actividad enzimática, el análisis comparativo del secretoma predicho mediante herramientas bioinformáticas de *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei* indica la secreción de 81, 63 y 61 proteasas, respectivamente; principalmente de los grupos aspartil y serin proteasas, proteasas parecidas a subtilisina (subtilisin-like), dipeptidil y tripeptidil peptidasas (Druzhinina *et al.*, 2012). Esta gran cantidad y variedad de proteasas extracelulares ha sido asociada al

proceso de micoparasitismo y al ataque a nematodos. Así, evidencia experimental muestra la activación de la transcripción de genes de proteasas extracelulares de las tres especies antes mencionadas cuando se confrontan con *Rhizoctonia solani* (Seidl *et al.*, 2009). Una cepa de *T. cf. harzianum* sobreexpresante de una proteasa alcalina muestra una mejora en la actividad nematocida que la cepa silvestre (Sharon *et al.*, 2001), mientras que una serin proteasa de *T. pseudokoningii* posee actividad nematocida contra el parásito de plantas *Meloidogyne incognita* (Chen *et al.*, 2009).

Además de las enzimas extracelulares descritas con anterioridad, las especies del género *Trichoderma* secretan otras enzimas de relevancia biotecnológica como las amilasas (Noguchi *et al.*, 2008; Juwon y Emmanuel, 2012), lipasas (Coradi *et al.*, 2013; Toscano *et al.*, 2013) y cutinasas (Roussel *et al.*, 2014), a las cuales en general se les ha prestado poca atención, ya que no existe la misma cantidad de estudios sobre genes, proteínas y aplicaciones al respecto, en comparación con las enzimas anteriormente descritas. Adicionalmente, en el secretoma de diversas especies de *Trichoderma* spp. obtenido en diferentes condiciones de cultivo hay proteínas cuya función permanece desconocida (De Lima *et al.*, 2016; Marx *et al.*, 2013; Do Vale *et al.*, 2012). Lo anterior indica que el potencial biotecnológico derivado de las proteínas y enzimas secretadas por las especies del género *Trichoderma* se incrementará de manera significativa en el futuro, conforme se tenga una mejor descripción de la gran diversidad de enzimas que puede producir dicho grupo taxonómico.

### ***Producción de sustancias con actividad biológica***

Las especies del género *Trichoderma* producen una gran diversidad de metabolitos secundarios con distintos tipos de actividad biológica (Hermosa *et al.*, 2012; Zeilinger *et al.*, 2016). Entre estos, han sido particularmente estudiados los peptaiboles (Hermosa *et al.*, 2012) o peptaibióticos (Zeilinger *et al.*, 2016), un grupo de péptidos no ribosomales comúnmente lineales, aunque algunos son cíclicos, con una longitud de 4 a 12 residuos de aminoácidos y pesos moleculares entre los 500 y 2100 Da. Algunas características estructurales de dichos péptidos es el alto contenido de ácido 2- amino-isobutírico, la presencia de ácido hidroxil- amino en el extremo C- terminal y

un aminoácido alquilo N-terminal, aunque esta última característica no se presenta en todos los casos (Hermosa *et al.*, 2012).

En la actualidad se tienen registradas aproximadamente 317 estructuras de peptaiboles, de las cuales alrededor del 80% provienen del género *Trichoderma*, particularmente de las especies *T. viride*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. brevicompactum* y *T. parceramosum/ T. ghanense* (Hermosa *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016). La síntesis de este tipo de péptidos es realizada por sintetasas de péptidos no ribosomales conformadas por dominios funcionales, cada uno de los cuales llevan a cabo pasos específicos del proceso de síntesis como adenilación, tiolación y condensación (Zeilinger *et al.*, 2016). Los peptaiboles producidos por *Trichoderma* spp. se han subdividido en cuatro subfamilias, atendiendo tanto a la longitud como a la presencia de ciertos aminoácidos en determinadas posiciones de la secuencia (Hermosa *et al.*, 2014). Peptaiboles denominados tricoconias obtenidos de *T. koningii* tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro, inhibiendo *in vitro* el crecimiento de bacterias Gram positivas y hongos (Xiao-Yan *et al.*, 2006). Este tipo de peptaiboles inducen la apoptosis en *F. oxysporum* (Shi *et al.*, 2012).

En el caso de las llamadas tricofuminas, obtenidas de una especie de *Trichoderma* no identificada, se ha encontrado actividad morfogénica en hongos fitopatógenos y propiedades neurolépticas en ratones de laboratorio (Berg *et al.*, 2003). Peptaiboles producidos por *T. harzianum* tienen actividad contra larvas de insectos (Shakeri y Foster, 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que los peptaiboles producidos por *T. virens* participan en la inducción de la resistencia sistémica en pepino contra la infección del tejido foliar de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Viterbo *et al.*, 2007). Por último, otro grupo de peptaiboles se ha relacionado con funciones auto-regulatorias en *Trichoderma* spp., participando en la regulación de procesos como la germinación de conidias, el desarrollo del micelio y la reproducción sexual y asexual (Hermosa *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016).

Otro tipo de metabolitos secundarios identificados en *Trichoderma* spp. incluyen a los epipolítiodioxopiperazinas, los policétidos, sideróforos, terpenoides y la 6-pentil pirona (Hermosa *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016). Algunos de estos

compuestos son importantes en el proceso de micoparasitismo que se describe párrafos adelante. Todas estas sustancias incrementan de manera significativa el potencial biotecnológico de cepas del género y constituyen un argumento adicional para el análisis de cepas silvestres.

### *Biocontrol*

Como en cualquier otra área de las ciencias, y particularmente de la biotecnología, los términos y conceptos relacionados con el control y manejo biológico de enfermedades de plantas de relevancia agropecuaria han ido modificándose con el tiempo de acuerdo con el entendimiento de los procesos de interacción entre microorganismos, y entre estos y la planta. Así, el término “control biológico” o “biocontrol” en un sentido muy amplio puede ser definido como el control de “un organismo por parte de otro” (Narayanasamy, 2013). Aunque el término también ha sido empleado en un sentido más amplio para designar “el uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir los efectos de organismos no deseados (patógenos) y favorecer organismos deseables como cultivos, árboles, animales, insectos y microorganismos benéficos” (Narayanasamy, 2013). El desarrollo de un microorganismo que controla a otro depende de diversos factores que favorecen una actividad antagónica, como se explicará más adelante para el caso de *Trichoderma* spp. Aún más, algunos microorganismos, como es el caso del grupo taxonómico analizado en el presente trabajo, actúan protegiendo a la planta de interés tanto de manera directa inhibiendo el desarrollo del patógeno, como de manera indirecta incrementando el nivel de resistencia de la planta contra el patógeno (Narayanasamy, 2013).

Se han descrito tres mecanismos por medio de los cuales las especies del género *Trichoderma* interaccionan con el fitopatógeno, los cuales incluyen la liberación de metabolitos con actividad antifúngica, la competencia directa por los nutrientes y el espacio disponibles, y el micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). Estos mecanismos no actúan de manera aislada, sino que interaccionan de manera sinérgica obteniendo como resultado una mayor eficacia en la eliminación del agente infeccioso. Además de la capacidad de

*Trichoderma* spp. para atacar o inhibir directamente el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, también pueden inducir la resistencia en plantas, tanto sistémica como localmente, contra un amplio número de enfermedades que son causadas por bacterias, hongos y virus (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). A continuación se describen brevemente las características de cada uno de los mecanismos involucrados en el antagonismo.

#### a) Micoparasitismo

Las relaciones antagónicas entre microorganismos se han clasificado en dos grupos principales atendiendo el nivel de agresividad hacia el hospedero. En el primer grupo se encuentran las interacciones de tipo biotrófico, en las cuales el micoparásito se alimenta del hongo blanco sin matarlo. En el segundo grupo se encuentran las interacciones necrotóficas, en las cuales el hongo micoparasítico ataca a su presa, primero detectándola y después orientando el crecimiento en dicha dirección; una vez producido el contacto, *Trichoderma* spp. se adhiere a su huésped enrollándose alrededor de éste y formando apresorios, culminando la interacción con la lisis de la pared celular y la digestión de los contenidos celulares del hospedero, causando su muerte (Leeder *et al.*, 2011). Como ya se comentó previamente, algunas de las enzimas secretadas por el micoparásito juegan un papel muy importante en la eliminación del hongo patógeno. No existe evidencia contundente sobre el tipo de señal que es detectada por *Trichoderma* spp. para percibir a un hongo hospedero, aunque se piensa que la acción de enzimas hidrolíticas del propio micoparásito permiten la liberación de moléculas señalizadoras liberadas de la pared celular de la presa (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que las lectinas juegan un papel importante en el enrollamiento de *Trichoderma* spp. alrededor de la hifa del fitopatógeno (Leeder *et al.*, 2011; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

#### b) Antibiosis

Como se mencionó líneas arriba, las especies de *Trichoderma* spp. producen metabolitos tóxicos, volátiles y no volátiles, que impiden el desarrollo de

microorganismos fitopatógenos. Entre esos metabolitos se encuentran pironas, terpenoides, esteroides y policétidos (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). En el caso específico de compuestos volátiles, se ha documentado la producción de alcoholes, cetonas, alcanos, furanos, mono- y sesquiterpenos, así como pironas. A este arsenal de sustancias hidrosolubles y volátiles, hay que agregar a los péptidos no ribosomales descritos con anterioridad, entre los que destacan los peptaiboles (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). La secreción de estas sustancias se ha visto claramente correlacionada con la capacidad de biocontrol, ya que la purificación y aplicación de antibiótico tienen los mismos resultados sobre el fitopatógeno que si se aplica todo el hongo. El modo de acción de la mayoría de los antibióticos identificados se desconoce.

#### c) Competencia

En comparación con otras especies fúngicas, las especies del género *Trichoderma* poseen una gran versatilidad fisiológica que les permite utilizar una gran variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos del suelo. Esta característica hace de *Trichoderma* spp. excelentes competidores por espacio y nicho en distintos ambientes, particularmente en el suelo. Además de la gran variedad de enzimas extracelulares descritas anteriormente, que le permiten degradar diferentes tipos de polímeros, la capacidad para capturar nutrientes en baja concentración en el entorno y transportarlos al interior celular son cualidades del género que contribuyen a su éxito como colonizador. Por ejemplo, el hierro en suelo se encuentra comunmente en formas insolubles, poco biodisponibles, lo que lo hace escaso para los microorganismos. Algunas cepas de *Trichoderma* spp. sintetizan y secretan sideróforos y péptidos capaces de quelar dicho metal y transportarlo al interior de la célula. Se ha propuesto que la competencia por hierro es un mecanismo por el cual *Trichoderma* spp. puede suprimir el crecimiento de *Fusarium* spp., aunque dicho mecanismo no parece ser igual de eficiente para suprimir otros fitopatógenos (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

En el caso de nutrientes orgánicos, se ha propuesto que *Trichoderma* spp., particularmente *T. harzianum*, es capaz de competir en ambientes de baja

concentración de glucosa por su capacidad para transportar al interior celular eficientemente dicho monosacárido. En esta especie se ha descrito un transportador con alta afinidad para la glucosa, denominado Gtt1, que se expresa solamente en ambientes donde la glucosa está presente en muy baja concentración (Benitez *et al.*, 2004).

Una característica adicional relacionada con el éxito de *Trichoderma* spp. como competidor en suelo es su capacidad para sensar y responder a cambios de pH en el entorno. Mutantes de *T. virens* con un regulador transcripcional clave para la respuesta a modificaciones de pH, crecen más lentamente a pH arriba de 7 y muestran una capacidad disminuida para sobrecrecer a *Rhizotconia solani* y *Sclerotium rolfsii*, aun en medio ácido (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

#### d) Inducción de resistencia en plantas

La inducción de resistencia en plantas por parte de *Trichoderma* ha sido menos estudiada en comparación con las respuestas inducidas por rizobacterias, ya que la mayor parte de trabajos se han enfocado en la protección contra infecciones mediante los mecanismos de ataque directo al fitopatógeno anteriormente descritos. En un primer mecanismo denominado resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés), se ha documentado que la inducción de resistencia sistémica en plantas por parte de *Trichoderma* spp. está mediada por las fitohormonas ácido jasmónico y etileno, con las cuales la planta reconoce al hongo (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). En un segundo mecanismo denominado resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) y mediado por ácido salicílico, *Trichoderma* spp. induce en la planta la expresión de genes relacionados con patogénesis. La inducción de resistencia contra fitopatógenos ha sido probada experimentalmente en diversos sistemas planta-patógeno que incluyen *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol, *Alternaria solani* en tomate, *Phytophthora parasítica* en tabaco, tanto mediante la aplicación de inóculos como de extractos de *Trichoderma* spp. (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

### **Selección de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. para procesos de biocontrol**

La selección de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. de distintas regiones del mundo con fines biotecnológicos, y en particular en la búsqueda de candidatos para el desarrollo de productos de biocontrol, se ha llevado a cabo por más de tres décadas. La literatura generada en ese sentido ha mostrado una gran variabilidad intra e interespecífica en la capacidad para antagonizar a especies de hongos y oomicetes fitopatógenos por parte de las cepas/especies analizadas (Anees *et al.*, 2010; Consolo *et al.*, 2012; El-Komy *et al.*, 2015; Hirpara *et al.*, 2016). Así, la evidencia muestra que no es posible basarse en estudios previos para predecir qué especie del género *Trichoderma* de una colección en particular resultará mejor antagonista contra determinadas especies/cepas de microorganismos fitopatógenos. Dependiendo del origen de las cepas analizadas y de las especies de fitopatógenos contra las que se confrontan, en algunos casos se ha documentado que cepas de *T. virens* y *T. koningii* son mejores antagonistas que otras de las especies evaluadas de manera simultánea, mientras que en otros estudios se reportan cepas de *T. harzianum* como las más eficientes, y en otros casos cepas de *T. gamsii*.

En algunos de los trabajos realizados para la selección de cepas de *Trichoderma* spp. con fines de biocontrol se ha intentado establecer correlación entre la capacidad antagónica *in vitro* y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares o de metabolitos hidrosolubles, encontrando resultados contrastantes dependiendo de la referencia consultada (Consolo *et al.*, 2012; El-Komy *et al.*, 2015; Nath *et al.*, 2014). También se ha realizado análisis de agrupamiento empleando distintos marcadores genéticos para evaluar la correlación entre los genotipos encontrados y las características fenotípicas de las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas. En este caso tampoco coinciden diversos de los estudios realizados, ya que mientras que en algunos casos se documenta dicha correlación, en otros no se encuentra (Consolo *et al.*, 2012; Hirpara *et al.*, 2016).

No existe uniformidad en la estrategia empleada para la selección de cepas, aunque en la mayoría de los casos la confrontación en cultivos duales entre cepas de *Trichoderma* spp. de interés y los fitopatógenos de prueba prevalece como el ensayo inicial importante. A partir de ahí algunos análisis consideran complementar con los

ensayos de inhibición de crecimiento por metabolitos hidrosolubles o volátiles (Nath *et al.*, 2014). En otros casos se analiza la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de manera cualitativa o cuantitativa (Consolo *et al.*, 2012; dos Reis Almeida *et al.*, 2007), mientras que ciertos autores realizan ensayos de biocontrol *in planta* (Alamri *et al.*, 2012) y en campo (Avila-Miranda *et al.*, 2006). Sin embargo, son pocos los casos en los que se combina el análisis de antagonismo con pruebas bioquímicas, metabólicas y genéticas (Consolo *et al.*, 2012; Hirpara *et al.*, 2016; Nath *et al.*, 2014).

Por todo lo anterior, la selección de cepas del género *Trichoderma* con fines de biocontrol no puede considerarse un asunto concluido, particularmente en regiones en las que no se han colectado cepas y que tienen relevancia agronómica, con cultivos que son atacados por especies o variedades de microorganismos fitopatógenos de difícil contención y que causan pérdidas económicas. En el estado de Michoacán se han aislado cepas de especies de hongos fitopatógenos de cultivos de relevancia agronómica, como es el caso de *Fusarium mexicanum* que infecta al mango, o de *Colletotrichum coccodes*, que ataca a plantas de jitomate (S. P. Fernández- Pavía y G. Rodríguez-Alvarado, comunicación personal). A la fecha, no se ha probado experimentalmente la capacidad de *Trichoderma* spp. para antagonizar a dichas especies. En ésta entidad también se han obtenido variantes geográficas de oomicetes fitopatógenos como *Phytophthora cinnamomi*, que infecta árboles de aguacate, un cultivo de gran relevancia socioeconómica para Michoacán. La presencia de éstos y otros microorganismos fitopatógenos en la entidad hace necesaria la búsqueda de estrategias de control, que incluyan alternativas al uso de plaguicidas y pesticidas químicos, como lo es el biocontrol. Sin embargo, a la fecha no se ha probado la eficiencia de cepas de *Trichoderma* spp. nativas del estado de Michoacán contra las especies de fitopatógenos anteriormente mencionadas.

Diversos trabajos han documentado que el aislamiento y caracterización de cepas de *Trichoderma* spp. de nuevas regiones geográficas o de nichos particulares aportan nuevas especies al género o cepas de especies previamente descritas, pero con características fisiológicas particulares (Kullnig *et al.*, 2000; Hoyos-Carbajal *et al.*, 2009; Migheli *et al.*, 2009; Zachow *et al.*, 2009; Belayneh-Mulaw *et al.*, 2010; Gal-

Hemed *et al.*, 2011). En algunos casos se ha documentado que los *taxa* de cierto nicho/región, exhiben actividad antagonista contra especies de hongos fitopatógenos de la misma región/nicho de donde fueron aisladas las cepas de *Trichoderma* spp. (Belayneh-Mulaw *et al.*, 2010; Gal-Hemed *et al.*, 2011), algo que no siempre es el caso, como lo muestra la amplia variación en las características antagónicas, fisiológicas y bioquímicas de cepas de *Trichoderma* spp. de los estudios citados párrafos arriba.

En el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se ha establecido un cepario de especies silvestres del estado Michoacán (Arredondo-Santoyo, 2009) con fines de conservación del germoplasma y de evaluación del potencial biotecnológico de la diversidad de hongos de la entidad. Entre las cepas de dicha colección se han identificado 23 cepas pertenecientes al género *Trichoderma* de las especies *T. harzianum* (n=14), *T. olivascens* (n=1), *T. trixiae* (n=1), *T. viridialbum* (n=1), *T. tomentosum* (n=2), *T. koningii* (n=1), *T. atroviride* (n=1), *T. viride* (n=1) y *T. gamsii* (n=1) (Cázares-García *et al.*, 2016). Se desconoce la capacidad antagónica contra microorganismos fitopatógenos de dichas cepas, y en el caso de las cepas de *T. harzianum*, que constituyen el grupo más numeroso, se desconoce la variabilidad genética y cualquier característica fisiológica o metabólica que pueda estar asociada a su potencial como agente de biocontrol. Por lo anterior, la caracterización de esta colección de cepas de *Trichoderma*, particularmente en relación a su potencial para el biocontrol de microorganismos fitopatógenos, es el principal objetivo del presente trabajo.

## Referencias bibliográficas

- [1] Adiv, S. S., Chao, L. T., Sze, S. K. (2012). Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular & Cellular Proteomics*. 11(7): 1493-1504.
- [2] Ahmed, S., Riaz, S., Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(1): 19-35.
- [3] Alamri, S., Hashem, M., Mostafa, Y. S. (2012). In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*. 17(4): 155-167.
- [4] Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*. 114(9): 691-701.
- [5] Arredondo-Santoyo M. 2009. Establecimiento de un cepario de hongos micromicetos silvestres del estado de Michoacán. Facultad de Químico Farmacobiología. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 27 de Febrero del 2009.
- [6] Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina. M. G. Tuohy (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Heidelberg, Elsevier. pp. 25-40.
- [7] Avila-Miranda, M., Herrera-Estrella, A., Peña-Cabriales, J. J. (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(7): 1823-1830.
- [8] Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., Vinyard, B. T., Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 46(1): 24-35.
- [9] Belayneh-Mulaw, T., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2010). The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. *Diversity*. 2(4): 527-549.

- [10] Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 74(4): 249-260.
- [11] Berg, A., Grigoriev, P. A., Degenkolb, T., Neuhofer, T., Härtl, A., Schlegel, B., Gräfe, U. (2003). Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276. *Journal of Peptide Science*. 9(11-12): 810-816.
- [12] Bischof, R. H., Ramoni, J., Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*. 15(1): 1.
- [13] Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*. 6(2): 263-295.
- [14] Cázares-García, S. V., Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Garcidueñas, M., Robinson-Fuentes, V. A., Gómez-Reyes, V. M., & Vázquez-Marrufo, G. (2016). Typing and selection of wild strains of *Trichoderma* spp. producers of extracellular laccase. *Biotechnology Progress*. 32(3): 787-798.
- [15] Chavan, S. B., Deshpande, M. V. (2013). Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnology Progress*. 29(4): 833-846.
- [16] Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Degenkolb, T., Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex including the identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- [17] Chen, L. L., Liu, L. J., Shi, M., Song, X. Y., Zheng, C. Y., Chen, X. L., Zhang, Y. Z. (2009). Characterization and gene cloning of a novel serine protease with nematocidal activity from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2. *FEMS microbiology letters*. 299(2): 135-142.
- [18] Consolo, V. F., Mónaco, C. I., Cordo, C. A., Salerno, G. L. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4): 1389-1398.
- [19] Coradi, G. V., Da Visitação, V. L., De Lima, E. A., Saito, L. Y. T., Palmieri, D. A., Takita, M. A., De Oliva P. N., De Lima, V. M. G. (2013). Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and

- characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology*. 63(2): 533-540.
- [20] Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(6): 773-782.
- [21] De Lima, F. B., Félix, C., Osório, N., Alves, A., Vitorino, R., Domingues, P., Correia, A., da Silva Ribeiro R. T., Esteves, A. C. (2016). Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa*. *Biological Control*. 99: 38-46.
- [22] Do Vale, L. H., Gómez-Mendoza, D. P., Kim, M. S., Pandey, A., Ricart, C. A., Edivaldo Filho, X. F., Sousa, M. V. (2012). Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*. 12(17): 2716-2728.
- [23] dos Reis Almeida, F. B., Cerqueira, F. M., do Nascimento Silva, R., Ulhoa, C. J., Lima, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 29(8): 1189-1193.
- [24] Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., Kubicek, C. P., (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*. 9(10): 749–759.
- [25] Druzhinina, I. S., Shelest, E., Kubicek, C. P. (2012). Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters*. 337(1): 1-9.
- [26] El-Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A., Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The Plant Pathology Journal*. 31(1): 50-60.
- [27] Friedl, M. A., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2008). Carbon source dependence of conidiation and its photostimulation in *Hypocrea atroviridis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(1): 245-250.
- [28] Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., Viterbo, A., Yarden, O. (2011). Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential

- halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(15): 5100-5109.
- [29] Gómez-Mendoza, D. P., Junqueira, M., do Vale, L. H. F., Domont, G. B., Ferreira Filho, E. X., Sousa, M. V. D., Ricart, C. A. O. (2014). Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. *Journal of Proteome Research*. 13(4): 1810-1822.
- [30] Gruber, S., Seidl-Seiboth, V. (2012). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*. 158(1): 26-34.
- [31] Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2(1): 43-56.
- [32] Hartl, L., Zach, S., Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(2): 533-543.
- [33] Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158(1):17-25.
- [34] Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., Monte, E. 2014. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. G. Tuohy (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Waltham, MA, USA, Elsevier B.V. pp. 125-136.
- [35] Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509-547.
- [36] Hirpara, D. G., Gajera, H. P., Bhimani, R. D., Golakiya, B. A. (2016). The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Scc. *Current Genetics*. 62(3): 619-641.
- [37] Hosseyni-Moghaddam, M. S., Soltani, J. (2014). Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. *Annals of Microbiology*. 64(2): 753-761.

- [38] Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*. 46(9): 615-631.
- [39] Juturu, V., Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30(6): 1219-1227.
- [40] Juwon, A. D., Emmanuel, O. F. (2012). Experimental investigations on the effects of carbon and nitrogen sources on concomitant amylase and polygalacturonase production by *Trichoderma viride* BITRS-1001 in submerged fermentation. *Biotechnology Research International*. vol. 2012, pp. 1-8.
- [41] Knob, A., Terrasan, C., Carmona, E. (2010).  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(3): 389-407.
- [42] Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M. *et al.* (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*. 12(4): 1.
- [43] Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2014). *Trichoderma*: genomic aspects of mycoparasitism and biomass degradation. In B. A. Horwitz *et al.* (eds.), *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*, *Soil Biology* 36. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 127-156.
- [44] Kullnig, C., Szakacs, G., Kubicek, C.P. (2000). Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*. 104(09): 1117-1125.
- [45] Larran, S., Perelló, A., Simón, M. R. (2007). The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(4): 565-572.
- [46] Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L. (2011). The social network: deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*. 9(6): 440-451.
- [47] Martínez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus

- Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*. 26(5): 553-560.
- [48] Marx, I. J., Van Wyk, N., Smit, S., Jacobson, D., Viljoen-Bloom, M., Volschenk, H. (2013). Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*. 6(1): 1.
- [49] Migheli, Q., Balmas, V., Komoń-Zelazowska, M., Scherm, B., Caria, R., Kopchinskiy, A., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2009). Soils of a Mediterranean hotspot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European and likely invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*. 11(1): 35-46.
- [50] Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*. 51: 105-129.
- [51] Nagpure, A., Choudhary, B., Gupta, R. K. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology*. 34(3): 215-232.
- [52] Narayanasamy, P. (2013). *Biological Management of Diseases of Crops*, Vol. 1: *Characteristics of Biological Control Agents*. Progress in Biological Control Vol. 15. 673 pp.
- [53] Nath, V. S., John, N. S., Anjanadevi, I. P., Hegde, V. M., Jeeva, M. L., Misra, R. S., Veena, S. S. (2014). Characterization of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Phytophthora colocasiae* associated with leaf blight of taro. *Annals of Microbiology*. 64(4): 1513-1522.
- [54] Noguchi, A., Inohara-Ochiai, M., Ishibashi, N., Fukami, H., Nakayama, T., Nakao, M. (2008). A novel glucosylation enzyme: molecular cloning, expression, and characterization of *Trichoderma viride* JCM22452  $\alpha$ -amylase and enzymatic synthesis of some flavonoid monoglucosides and oligoglucosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(24): 12016-12024.
- [55] Olmedo-Monfil V, Casas-Flores S. (2014). Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In V. K. Gupta., M. Schmoll., A. Herrera-Estrella., R. S. Upadhyay., I. Druzhinina., M. G. Tuohy

- (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Heidelberg, Elsevier. pp. 429-453.
- [56] Rocha, V. A. L., Maeda, R. N., Pereira, N., Kern, M. F., Elias, L., Simister, R., Steele-King, C., Gómez, L. D., McQueen-Mason, S. J. (2016). Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. *Biotechnology Progress*. 32(2): 327-336.
- [57] Rossman, A. Y., Seifert, K. A., Samuels, G. J., Minnis, A. M., Schroers, H-J. [and 11 others]. (2013). Genera in *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae*, and *Nectriaceae* (*Hypocreales*) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus*. 4(1): 41-51.
- [58] Roussel, A., Amara, S., Nyssölä, A., Mateos-Diaz, E., Blangy, S., Kontkanen, H., Cambillau, C. (2014). A cutinase from *Trichoderma reesei* with a lid-covered active site and kinetic properties of true lipases. *Journal of Molecular Biology*. 426(22): 3757-3772.
- [59] Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96(2): 195-206.
- [60] Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Gené, J., Fothergill, A. W., Wiederhold, N. P., Guarro, J. (2014). Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(6): 2112-2125.
- [61] Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M., Baker, S., Brown, C., Cervantes-Badillo, M., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E., Frischmann, A., Gallardo-Negrete, J. J., García-Esquivel, M., Gomez-Rodriguez, E., Greenwood, D., Hernández-Oñate, M., Kruszewska, J., Lawry, R., Mora-Montes, H., Muñoz-Centeno, T., Nieto-Jacobo, M., Nogueira, L. G., Olmedo-Monfil, V., Osorio-Concepcion, M., Pilsyk, S., Pomraning, K., Rodriguez-Iglesias, A., Rosales-Saavedra, M., Sánchez-Arreguín, J., Seidl-Seiboth, V., Stewart, A., Uresti-Rivera, E., Wang, C., Wang, T., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Herrera-Estrella, A. (2016). The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of

- three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1): 205-327.
- [62] Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3): 787-799.
- [63] Shakeri, J., Foster, H. A. (2007). Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme and Microbial Technology*. 40(4): 961-968.
- [64] Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., Spiegel, Y. (2001). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 91(7): 687-693.
- [65] Seidl, V., Gamauf, C., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., Hartl, L., Kubicek, C. P. (2008). The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics*. 9(1):327.
- [66] Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martinez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S.E., Kubicek, C.P. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the close presence of a fungal prey. *BMC Genomics*. 10(1): 567.
- [67] Shi, M., Chen, L., Wang, X. W., Zhang, T., Zhao, P. B., Song, X. Y., Zhang, Y. Z. (2012). Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology*. 158(1): 166-175.
- [68] Shores, M., Harman, G. E., Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 21-43.
- [69] Singh, A., Sarma, B. K., Singh, H. B., Upadhyay, R. S. (2014). *Trichoderma*: a silent worker of plant rhizosphere. In V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. G. Tuohy (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Heidelberg, Elsevier. pp. 533-542.

- [70]Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 127: 500-507.
- [71]Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*. 156(10): 2887-2900.
- [72]Strakowska, J., Błaszczyk, L., Chełkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *Journal of Basic Microbiology*. 54(1): 2-13.
- [73]Toscano, L., Montero, G., Cervantes, L., Stoytcheva, M., Gochev, V., Beltrán, M. (2013). Production and partial characterization of extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* by solid-state fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 27(3): 3776-3781.
- [74]Viterbo, A. D. A., Wiest, A. R. I. C., Brotman, Y., Chet, I. L. A. N., Kenerley, C. (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defense responses. *Molecular Plant Pathology*. 8(6): 737-746.
- [75]Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z. (2006). Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*. 260(1): 119-125.
- [76]Zachow, C., Berg, C., Müller, H., Meincke, R., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Berg, G. (2009). Fungal biodiversity in the soils/rhizospheres of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *ISME J*. 3(1): 79-92.
- [77]Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*-chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30(2):74-90.

## HIPÓTESIS

Las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de distintos ecosistemas del estado de Michoacán, son antagonistas de microorganismos fitopatógenos provenientes de la misma entidad, pero presentan diversidad en las características fisiológicas y genéticas asociadas a dicho proceso.

## OBJETIVOS

### General

Evaluar características fenotípicas y genotípicas en cepas silvestres de *Trichoderma* spp. de relevancia en el antagonismo contra microorganismos fitopatógenos.

### Particulares

- I. Determinar la capacidad de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. para antagonizar *in vitro* a microorganismos fitopatógenos.
- II. Analizar cualitativamente la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en las cepas de interés.
- III. Evaluar la diversidad genética en cepas de *Trichoderma harzianum*.
- IV. Determinar la diversidad metabólica en cepas de *Trichoderma harzianum*.

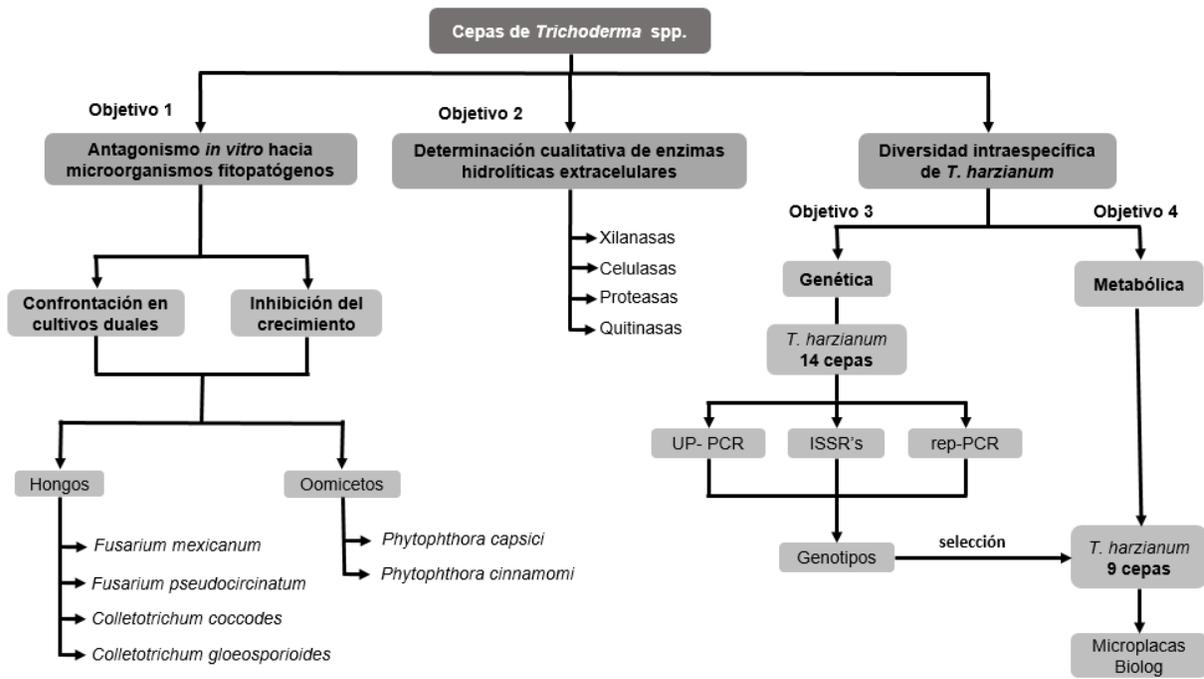


Figura 1. Estrategia general

## CAPÍTULO 1

### ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE CEPAS SILVESTRES DE *Trichoderma* spp. CONTRA MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS

#### RESUMEN

Se evaluó la capacidad de 23 cepas silvestres de *Trichoderma* spp. colectadas en el estado de Michoacán para antagonizar microorganismos fitopatógenos. Se realizaron ensayos de confrontación en cultivos duales y pruebas de inhibición en cajas de Petri de 95 mm de diámetro con medio Vogel. Todas las cepas de *Trichoderma* evaluadas mostraron el nivel más alto de antagonismo (clase 1) contra los oomicetes *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora capsici*, creciendo sobre ellos y evitando el desarrollo de micelio. El 87% (20/23) de las cepas evaluadas mostró el máximo nivel de antagonismo contra los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes* y *Fusarium pseudocircinatum*. Contra *Fusarium mexicanum* solo tres cepas de *T. harzianum* (CMU-14, CMU-16, CMU-90), así como *T. viride* (CMU-218) y *T. atroviride* (CMU-8) mostraron el nivel más alto de antagonismo. En los ensayos de inhibición, los fitopatógenos se inocularon en medio en el cual previamente habían crecido las cepas de *Trichoderma* spp. El 91% (21/23) de las cepas inhibieron completamente el crecimiento de *P. cinnamomi* y *P. capsici*. Para *C. gloeosporioides* y *C. coccodes*, solo dos y ocho cepas de *Trichoderma* spp., respectivamente, lograron inhibir completamente el crecimiento. Contra *F. pseudocircinatum* solo tres de las cepas de estudio mostraron inhibición total y para *F. mexicanum* ninguna cepa logró dicho nivel. Los resultados muestran que las cepas de estudio tienen un alto potencial para su aplicación en procesos de biocontrol, destacándose la cepa de *T. atroviride* (CMU-8). Es la primera vez que se prueba el antagonismo de las especies *T. trixiae*, *T. olivascens* y *T. viridialbum* contra microorganismos fitopatógenos, y en la que se analiza el antagonismo de cualquier especie de *Trichoderma* contra *F. mexicanum*, especie que mostró gran resistencia al ataque de cepas biocontroladoras.

## INTRODUCCIÓN

A partir del conocimiento de que *Trichoderma* spp. podía antagonizar contra microorganismos fitopatógenos, en la década de 1980-1990 se iniciaron los estudios para la evaluación de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. contra microorganismos fitopatógenos de diversas plantas de relevancia agronómica. Desde los primeros reportes en ese sentido se documentó tanto la variación inter e intraespecífica de *Trichoderma* spp. en su capacidad de antagonizar *in vitro* contra organismos fitopatógenos, como diferencias en la eficacia del antagonismo de una misma cepa contra distintas especies de fitopatógenos (Bell *et al.*, 1982; Köhl y Schlösser, 1989; Jackson *et al.*, 1991; Worasatit *et al.*, 1994). Estudios más recientes en diversas regiones geográficas y ecosistemas han confirmado esta gran variación intra e interespecífica en la efectividad de cepas de *Trichoderma* spp. para antagonizar contra diferentes microorganismos fitopatógenos. Esto muestra la necesidad de seguir aislando y caracterizando cepas antagonistas de distintas regiones, particularmente cercanas geográfica y ecológicamente a las cepas de fitopatógenos que se desea controlar. A continuación se presentan antecedentes recientes de los resultados de estudios de selección de cepas en distintas partes del mundo.

Algunos estudios de selección han iniciado a partir de cepas de diferentes especies, de tal forma que se ha seleccionado por especie y por cepa la capacidad antagonista. Por ejemplo, al analizar la capacidad antagonista contra *Sclerotium rolfsii* de 11 cepas de las especies *T. harzianum* (n=4), *T. viride* (n=2), *T. virens* (n=1), *T. hamantum* (n=1), *T. koningii* (n=1), *T. pseudokoningii* (1) y una cepa no identificada, las únicas cepas analizadas de *T. virens* y *T. koningii* mostraron los mejores niveles de inhibición del fitopatógeno, seguidas de cepas de *T. viride* y *T. harzianum* (Hirpara *et al.*, 2016). Mientras que la mejor cepa mostró un modo de acción micoparasítico enrollándose sobre el fitopatógeno, el segundo mejor antagonista y otras de las cepas mostraron la antibiosis como estrategia principal. Los dos mejores antagonistas *T. virens* y *T. koningii*, inhibieron la peroxidación de lípidos del fitopatógeno, proceso esencial en la formación de esclerocios los cuales son estructuras de resistencia y propagación. En estas mismas cepas de *Trichoderma* se mostró la producción de una gran variedad de metabolitos bioactivos contra el

patógeno cuando se crecieron en presencia de paredes celulares de éste. Al realizar un análisis de agrupamiento utilizando marcadores tipo SRAP (*Sequence Related Amplified Polymorphism*), las cepas no se agruparon por especies, y el agrupamiento por capacidad antagónica mencionado por los autores no fue significativo (Hirpara *et al.*, 2016). Este estudio muestra como una buena capacidad antagónica en cepas de *Trichoderma* de distintas especies se basa en estrategias diferentes, en este caso micoparasitismo por sobrecrecimiento del fitopatógeno (*T. virens*) y antibiosis (*T. koningii*).

En otro estudio similar se evaluaron 16 cepas de las especies *T. velutinum*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. tomentosum* y *T. gamsii*, resultando los mejores antagonistas contra *R. solani* en cultivos duales cepas de esta última especie. Los niveles de inhibición de crecimiento en cultivos duales oscilaron entre 2 y 46% con variaciones inter e intraespecíficas significativas (Anees *et al.*, 2010). Al igual que en el estudio anteriormente citado, también se encontró variación en el mecanismo de antagonismo entre las cepas analizadas; mientras que las cepas que mejor inhibieron el crecimiento lo hicieron antes de entrar en contacto con el fitopatógeno (sin enrollarse), otras cepas entraron en contacto con el micelio de *R. solani* enrollándose e inhibiendo su crecimiento. De manera interesante, algunas de las cepas no inhibieron el crecimiento de *R. solani*, no obstante que fueron capaces de enrollarse alrededor de sus hifas. En concordancia con los resultados de inhibición obtenidos en cultivos duales, la mayoría de las cepas más efectivas fueron las que presentaron resultados positivos en la producción de moléculas hidrosolubles como mecanismo de inhibición. Dichas moléculas pueden ser sustancias con actividad antibiótica o enzimas hidrolíticas (Narayanasamy, 2013). Aunque se presentó evidencia de inhibición del crecimiento de *R. solani* por producción de sustancias volátiles, el porcentaje de inhibición del fitopatógeno fue muy bajo, inferior al 33% (Anees *et al.*, 2010). Las cepas de *T. gamsii* que antagonizaron mejor *in vitro*, fueron capaces de antagonizar al patógeno en suelo y reducir significativamente la infección de este en plántulas de zanahoria, mediante la inducción de resistencia. Estos resultados muestran que los ensayos *in vitro* son efectivos para seleccionar cepas eficientes para su aplicación *in vivo*. Nath *et al.* (2014) analizaron 18 cepas de

*Trichoderma* spp., de las cuales nueve mostraron máxima capacidad antagónica contra *Phytophthora colocasiae*; dichas cepas fueron identificadas por filogenia molecular como *T. asperellum* (n=7), *T. longibrachiatum* (n=1) y *T. harzianum* (n=1), siendo esta última la que presentó el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento del fitopatógeno en cultivos duales, así como la mejor inhibición por producción de metabolitos difusibles y por compuestos volátiles. Dicha cepa también presentó la máxima actividad de  $\beta$ -1-3 glucanasa de las cepas evaluadas, pero no de quitinasa, aunque los niveles de actividad de esta última fueron altos. El dendrograma generado empleando marcadores AFLP separó a la única cepa de *T. harzianum* de las siete cepas de *T. asperellum*, pero en estas últimas no se observó agrupamiento relacionado con la capacidad antagónica o el área geográfica de procedencia de las cepas (Nath *et al.*, 2014).

El análisis de 33 cepas de las especies *T. harzianum* (n=20), *T. virens* (n=11) y *T. koningii* (n=2) contra los hongos fitopatógenos *Alternaria* sp., *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *F. solani* y *Pyricularia oryzae*, mostró una amplia variación intra e interespecifica de la capacidad antagonista *in vitro*, siendo cepas de la primera especie las que mejores resultados de inhibición presentaron (Consolo *et al.*, 2012). Además, las tres cepas más efectivas para la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos evaluados también presentaron las actividades hidrolíticas más altas de  $\beta$ -1-3 glucanasa, quitinasa y proteinasa, aunque la correlación entre actividad hidrolítica y antagonismo varió dependiendo de la cepa de *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno de prueba.

Como se mencionó anteriormente, a diferencia de los ejemplos anteriores en los que se partió de cepas de distintas especies de *Trichoderma*, en otros trabajos se han analizado cepas de la misma especie para seleccionar aquella con los mejores resultados en las confrontaciones duales *in vitro*. En algunos de estos trabajos también se ha intentado correlacionar la capacidad antagónica con la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, o con la producción de metabolitos hidrosolubles. Adicionalmente, en algunos de los reportes aquí documentados se ha evaluado la diversidad genética empleando distintos marcadores, intentando encontrar patrones de agrupamiento que correlacionen las características fenotípicas de las cepas

evaluadas. Por ejemplo, al analizar la capacidad micoparasítica de 15 cepas de *T. harzianum* en cultivos duales contra *Rhizoctonia solani*, se encontró que el micelio de todas producía enrollamientos sobre el micelio del fitopatógeno, aunque algunas cepas lo hacían con mayor frecuencia (dos Reis Almeida *et al.*, 2007). No se encontró correlación entre la capacidad de las cepas para producir los enrollamientos y las actividades hidrolíticas extracelulares relacionadas con la degradación de la pared celular fúngica, incluyendo quitinasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y  $\beta$ -1-3 glucanasa. De manera interesante, las cepas analizadas presentaron una gran variabilidad tanto en la capacidad de enrollamiento como en las actividades enzimáticas evaluadas (dos Reis Almeida *et al.*, 2007). En contraste, un estudio más reciente en el que se analizan cinco cepas de *T. harzianum*, las dos que mostraron los mejores niveles de antagonismo contra *Fusarium oxysporum* fueron también las que mostraron los mayores niveles de actividad enzimática de  $\beta$ -1-3 glucanasa, quitinasa y N-acetilglucosaminidasa (López-Mondéjar *et al.*, 2011).

Esta misma correlación entre la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y la efectividad del antagonismo *in vitro* documentada en el estudio anterior en *T. harzianum* también ha sido observada en otras especies de *Trichoderma*. Por ejemplo, al evaluar el antagonismo de 30 cepas de *T. asperellum* en cultivos duales con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se encontró un rango de inhibición de crecimiento del fitopatógeno que osciló entre el 32 y el 71% (El-Komy *et al.*, 2015). Las actividades de quitinasa y  $\beta$ -1-3 glucanasa también mostraron una amplia variación entre las cepas analizadas, presentándose una correlación positiva entre la capacidad de producción de ambas hidrolasas con la capacidad antagónica contra *F. oxysporum*, es decir, las cepas con mayor actividad fueron también las mejores antagonistas. El patrón de agrupamiento generado empleando marcadores RAPD mostró una gran variación genética entre las cepas de estudio, pero no hubo correlación entre los grupos genéticos formados con la capacidad antagónica o la producción de enzimas hidrolíticas (El-Komy *et al.*, 2015).

Además de las variaciones intra e interespecíficas observadas en los experimentos *in vitro* e *in vivo*, pruebas complementarias de invernadero y en campo también han mostrado diversidad en la capacidad de sobrevivencia y antagonismo

de *T. harzianum*. Así, el análisis microscópico de cultivos duales de una cepa silvestre de *T. harzianum* mostró una interacción micoparasítica de este contra distintos microorganismos fitopatógenos, incluidos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium ultimum* y *Exserohilum rostratum* (Alamri *et al.*, 2012). Al emplear paredes celulares de hongos fitopatógenos como fuente de carbono en cultivos líquidos, la cepa mostró altos niveles de actividad enzimática de  $\alpha$ -1-3 glucanasa,  $\beta$ -1-3 glucanasa y quitinasa, pero no presentó actividad de proteasa. Además, no obstante que el filtrado extracelular en las mismas condiciones de cultivo mostró la producción de distinto tipo de fenoles por parte de *T. harzianum*, dicho filtrado no inhibió el crecimiento de los fitopatógenos *in vitro*. No obstante, la aplicación en invernadero de la cepa analizada, sola o en conjunto con una cepa de *Bacillus subtilis*, protegió a semillas y plantas de tomate, lechuga y pepino contra los fitopatógenos ensayados, principalmente contra *F. oxysporum* (Alamri *et al.*, 2012).

Otro estudio realizado en cinco cepas de la misma especie biocontroladora, mostró diferencias significativas en la capacidad endorrícica y de colonización de la rizósfera, así como en el control de la pudrición blanca provocada por *Sclerotium cepivorum* en campos de cultivo de ajo, en un periodo de dos años (Avila-Miranda *et al.*, 2006). Las cepas recuperadas del suelo por aislamiento en cultivo durante los dos años de estudio se analizaron mediante patrones AFLP, los cuales concordaron con las cepas inicialmente inoculadas y las diferenciaron de las cepas nativas.

Todos los antecedentes expuestos con anterioridad muestran que es difícil predecir con seguridad, basándose en estudios previos, qué especie de *Trichoderma* será más efectiva como antagonista *in vitro* contra una especie de fitopatógeno en particular. Mientras que en algunos estudios cepas de *T. virens* y *T. koningii* han resultado mejores antagonistas, en otros más han sido cepas de *T. harzianum*, y aún en otro han sido cepas de *T. gamsii*, dependiendo de la especie o grupo de especies de fitopatógenos evaluados. Otro aspecto importante ha sido la gran variabilidad intraespecífica que reportan estos estudios, ya comentada previamente. Además, también es importante destacar que mientras algunos trabajos encuentran correlación entre la capacidad antagónica *in vitro* y la producción de enzimas

hidrolíticas extracelulares o de metabolitos hidrosolubles, en la mayoría de los casos no se presenta dicha correlación. Por último, cuando se ha realizado análisis de agrupamiento, en general, no se ha encontrado correlación entre los grupos genéticos formados y las características fenotípicas de las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas.

Por todo lo anterior, en este apartado del trabajo se estableció el objetivo de evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de las cepas de estudio de *Trichoderma* spp. con las que se contaba en el cepario (ver introducción general). Con los resultados de este apartado, se buscaron correlaciones bioquímicas y genéticas, lo cual se expone y discute en los capítulos siguientes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cepas de estudio**

Se analizaron un total de 23 aislados silvestres los cuales forman parte del Cepario Michoacano Universitario (CMU), perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Michoacán, México). Las cepas de *Trichoderma* estudiadas se obtuvieron de distintos ecosistemas de bosque templado del estado de Michoacán (Tabla 1), y previamente se les asignó una clave de identificación que consiste en las siglas del nombre del cepario seguido del número que hace referencia a su localización (Arredondo-Santoyo, 2009). La identificación genético molecular de las cepas fue realizada por Cázares-García *et al.* (2016). Se utilizó además como cepa de referencia la cepa IMI206040 de *T. atroviride* proporcionada por el Dr. Alfredo Herrera-Estrella del LANGEBIO- CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Las cepas de los microorganismos fitopatógenos fueron donadas por la Dra. Sylvia Fernández Pavia y el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Tabla 2). Incluyen cuatro especies de hongos y dos especies de oomicetos del género *Phytophthora*.

**Tabla 1.** Datos de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. (Cázares-García *et al.* 2016).

Clave CMU	Especie	Localidad de colecta	Tipo de vegetación
CMU-1	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-14	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Parque Nacional "José Ma. Morelos", Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-16	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Parque Nacional "José Ma. Morelos", Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-18	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Parque Nacional "José Ma. Morelos", Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-19	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Parque Nacional "José Ma. Morelos", Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-23	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-25	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-34	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Parque Nacional "José Ma. Morelos", Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-43	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Cuto de la Esperanza	Pastizal
CMU-44	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-51	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Pátzcuaro	Bosque Pino-Encino
CMU-90	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-181	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-183	<i>H. lixii/T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-8	<i>H. atroviridis/T. atroviride</i>	Parque Nacional "José Ma. Morelos", Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-21	<i>T. gamsii</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-66	<i>H. olivascens/T. olivascens</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-231	<i>T. trixiae</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-236	<i>T. viridialbum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-218	<i>H. rufa/T. viride</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-221	<i>T. tomentosum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-222	<i>T. tomentosum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-234	<i>H. koningii/T. koningii</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino

## Medios de cultivo

Se empleó el medio mínimo Vogel (MMV) para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo de los aislados de *Trichoderma* spp., así como para la generación de inóculos. La solución stock (50X) del MMV está compuesta por (g/L): Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O, 150; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5; biotina (5 mg/100 mL etanol al 50%), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL.

**Tabla 2.** Datos de los aislados silvestres de microorganismos fitopatógenos.

Clave	Especie	Cultivo/planta que infecta	Localidad de Procedencia
COLMM7	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	Caoba ( <i>Swietenia</i> sp.)	Tecomán, Col.
MICMM21	<i>Fusarium mexicanum</i>	Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	Buenavista Tomatlán, Mich.
CCJT-1	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Morelia, Mich.
-	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Formio ( <i>Phormium tenax</i> )	Morelia, Mich.
-	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Aguacate ( <i>Persea americana</i> )	Atécuaro, Mich.
CH-11	<i>Phytophthora capsici</i>	Chile ( <i>Capsicum annum</i> )	Cuitzillo, Mich.

La solución de oligoelementos contiene (g/L): ácido cítrico·2H<sub>2</sub>O, 5; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 5; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.072; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.05. Para la siembra de las cepas, el stock se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final 1X y se adicionó 1.5% de glucosa y agar bacteriológico (15 g/L). Los medios se esterilizaron a 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 minutos.

### **Ensayos de antagonismo**

Para evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990), la cual se describe brevemente a continuación. Para cada experimento se inoculó en un extremo de cajas Petri de 9.0 cm de diámetro con MMV un disco de 6 mm de diámetro con micelio en crecimiento activo de las distintas especies de hongos fitopatógenos, permitiendo el desarrollo de la colonia a 28 °C durante 3 a 5 días. Esto se hizo para permitir que la colonia del fitopatógeno alcanzara un tamaño adecuado debido a su lento crecimiento. Posteriormente, en el otro extremo de la caja se inoculó un disco de 6 mm de diámetro tomado del borde de colonias en crecimiento activo de los distintos aislados de *Trichoderma* spp. Las cepas se inocularon a una distancia de 6 cm y se incubaron a 28 °C, en obscuridad. A los 15 días de la confrontación se clasificó el tipo de antagonismo según Bell *et al.* (1982), mediante la escala: 1 = *Trichoderma* sobrecrece completamente al fitopatógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2 = *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, 3 = *Trichoderma* y el fitopatógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las cepas de *Trichoderma*, confrontada con cada una de las cepas de microorganismos fitopatógenos.

### **Ensayos de inhibición**

Se utilizó el método del papel celofán (Dennis y Webster, 1971), que consistió en cortar papel celofán en círculos de 9.0 cm de diámetro, los cuales se lavaron con agua destilada y se esterilizaron a 121 °C (15 lbs/in<sup>2</sup>) por 15 min. Los círculos de

papel celofán así preparados se colocaron en condiciones asépticas en campana de flujo laminar sobre cajas de Petri con MMV solidificado. En el centro de la placa de Petri, sobre el papel celofán depositado en el medio MMV, se colocaron inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro tomados del borde de colonias en crecimiento activo de los distintos aislados de *Trichoderma* spp., incubándose a 28 °C. Cuando el micelio cubrió  $\frac{3}{4}$  partes de la superficie del medio de cultivo, en campana de flujo laminar se retiró el papel celofán con la colonia fúngica adherida. En el mismo medio, en experimentos independientes se inoculó de la manera previamente descrita a cada una las especies de microorganismos fitopatógenos, incubándose a 28 °C y midiendo cada 24 h el diámetro del crecimiento radial. De la misma manera, en el mismo medio de cultivo se inoculó e incubó una caja control, en la que no había crecido previamente *Trichoderma* spp. El experimento finalizó cuando el micelio del microorganismo fitopatógeno del cultivo control llenó la caja de Petri. Los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos, se utilizó la siguiente fórmula: % de inhibición =  $[(D1 - D2)/D1 \times 100]$  (Worasatit *et al.*, 1994); donde: D1 = diámetro de la colonia del microorganismo fitopatógeno creciendo en cajas con MMV libre de inhibidores y D2 = diámetro de la colonia del mismo microorganismo creciendo en cajas con MMV, en la cual previamente creció *Trichoderma* spp. sobre el papel celofán. Se clasificó el tipo de inhibición según su nivel de actividad, donde: clase 1 = *Trichoderma* spp. inhibe del 67 al 100% del crecimiento del fitopatógeno, clase 2 = *Trichoderma* spp. inhibe del 34 al 66% del crecimiento del fitopatógeno, clase 3 = *Trichoderma* spp. inhibe del 1 al 33% del crecimiento del fitopatógeno.

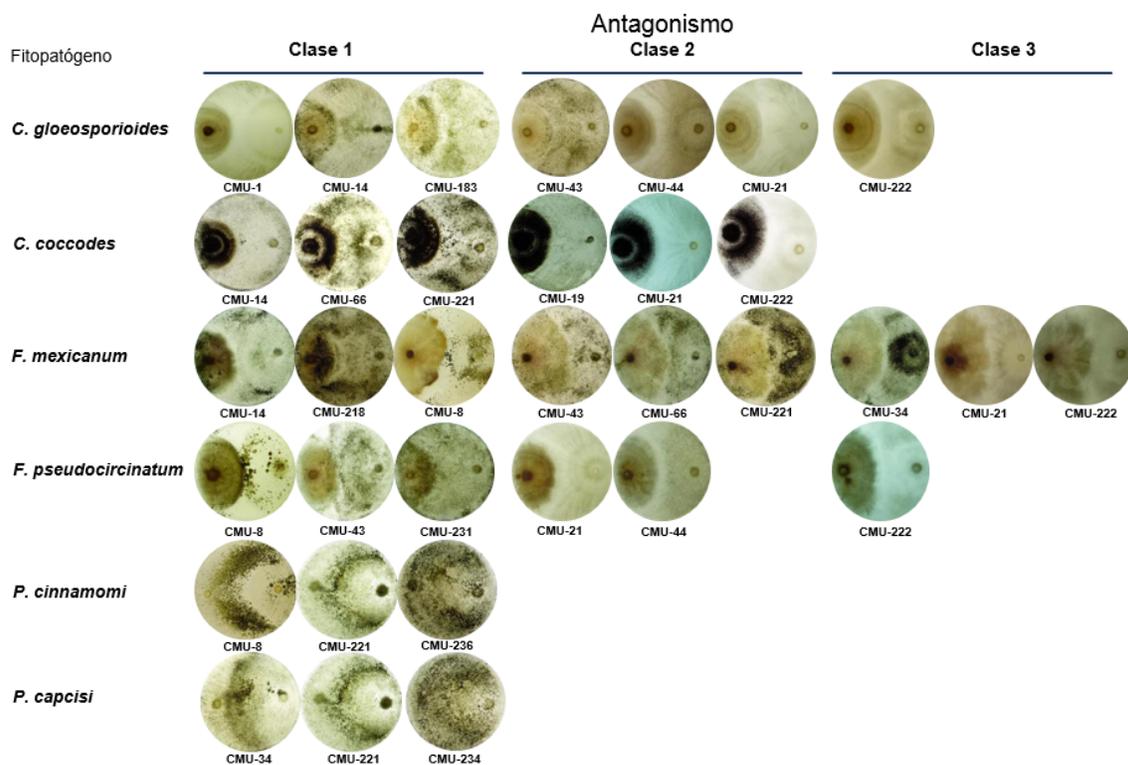
## RESULTADOS

### Ensayos de antagonismo

Los ensayos de antagonismo en cultivos duales de las 23 cepas de *Trichoderma* estudiadas contra los fitopatógenos evaluados mostraron resultados heterogéneos. El tipo de antagonismo observado según la clasificación de Bell *et al.*, (1982) descrita en la sección de Materiales y Métodos, contra *C. gloeosporioides* fue predominantemente clase 1 (79%), no obstante, también se observó antagonismo

clase 2 (17%) y clase 3 (4%) (Tabla 3). En esta confrontación las especies de *Trichoderma* que mostraron los niveles de antagonismo más altos fueron *T. harzianum* (CMU-1, CMU-14, CMU-16, CMU-18, CMU-23, CMU-25, CMU-34, CMU-51, CMU-90, CMU-181, CMU-183); *T. atroviride* (CMU-8); *T. olivascens* (CMU-66); *T. trixiae* (CMU-231); *T. viridialbum* (CMU-236); *T. viride* (CMU-218); *T. tomentosum* (CMU-221) y *T. koningii* (CMU-234). Los ensayos de antagonismo contra *C. coccodes*, evidenciaron antagonismo clase 1 (87%) y clase 2 (13%), siendo las especies de *T. harzianum* (CMU-1, CMU-14, CMU-16, CMU-18, CMU-23, CMU-25, CMU-34, CMU-43, CMU-44, CMU-51, CMU-90, CMU-181, CMU-183); *T. atroviride* (CMU-8); *T. olivascens* (CMU-66); *T. trixiae* (CMU-231); *T. viridialbum* (CMU-236); *T. viride* (CMU-218); *T. tomentosum* (CMU-221) y *T. koningii* (CMU-234) las que presentaron el nivel de antagonismo más alto (Tabla 3). El antagonismo contra *F. mexicanum* fue clase 1 (22%), clase 2 (61%) y clase 3 (17%) siendo el fitopatógeno más resistente al antagonismo contra las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas (Tabla 3). Para dicho fitopatógeno, la especie *T. harzianum* (CMU-14, CMU-16, CMU-90); *T. atroviride* (CMU-8); *T. viride* (CMU-218) mostraron los mejores resultados de antagonismo. Los ensayos de antagonismo contra *F. pseudocircinatum* fueron clase 1 (87%), clase 2 (9%) y clase 3 (4%), presentando la menor eficiencia en confrontación la especie *T. tomentosum* (CMU-222); seguida de *T. harzianum* (CMU-44) y *T. gamsii* (CMU-21).

El antagonismo contra los dos oomicetos evaluados, *P. cinnamomi* y *P. capsici* fue de clase 1 (100%), ya que todas las cepas de *Trichoderma* analizadas fueron capaces de sobrecrecer eficientemente a estos fitopatógenos (Tabla 3).



**Figura 1. Ensayos de confrontación de cepas de *Trichoderma* spp. contra hongos y oomicetes fitopatógenos.** En todos los ensayos la cepa de *Trichoderma* está inoculada en el lado derecho y el fitopatógeno en el lado izquierdo de la placa de Petri. El número de cepa de *Trichoderma* spp. aparece debajo de cada placa y los nombres de los fitopatógenos de prueba en cada línea aparecen a la izquierda. Se muestran resultados representativos de cada nivel de antagonismo encontrado en las cepas de *Trichoderma* spp. Los niveles de antagonismo del más fuerte al más débil son: clase 1 > clase 2 > clase 3.

### Pruebas de inhibición de crecimiento de fitopatógenos

En los ensayos de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos en medio de cultivo sólido, en el que previamente se había incubado a *Trichoderma* spp. se encontraron niveles de inhibición variables.

De acuerdo a la escala de actividad descrita previamente, los niveles de inhibición obtenidos para *C. gloeosporioides* fueron: clase 1 (9%), clase 2 (13%) y clase 3 (78%), dicho fitopatógeno fue inhibido totalmente en placas en las que se había precultivado a *T. atroviride* (CMU-8), mientras que la inhibición fue completamente nula en placas en donde habían crecido las cepas de *T. harzianum* (CMU-1, CMU-19, CMU-23, CMU-25), *T. gamsii* (CMU-21), *T. tomentosum* (CMU-222) y *T. koningii* (CMU-234). El resto de las cepas de *Trichoderma* mostraron un porcentaje de inhibición parcial que osciló entre 3.7 % - 76% (Tabla 4).

**Tabla 3.** Nivel de antagonismo de cepas silvestres de *Trichoderma* contra microorganismos fitopatógenos.

Especie/cepa	Fitopatógeno <sup>1</sup>					
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. coccodes</i>	<i>F. mexicanum</i>	<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. capsici</i>
<i>T. harzianum</i>						
CMU-1	1	1	2	1	1	1
CMU-14	1	1	1	1	1	1
CMU-16	1	1	1	1	1	1
CMU-18	1	1	2	1	1	1
CMU-19	2	2	2	1	1	1
CMU-23	1	1	2	1	1	1
CMU-25	1	1	2	1	1	1
CMU-34	1	1	3	1	1	1
CMU-43	2	1	2	1	1	1
CMU-44	2	1	3	2	1	1
CMU-51	1	1	2	1	1	1
CMU-90	1	1	1	1	1	1
CMU-181	1	1	2	1	1	1
CMU-183	1	1	2	1	1	1
<i>T. atroviride</i>						
CMU-8	1	1	1	1	1	1
<i>T. gamsii</i>						
CMU-21	2	2	3	2	1	1
<i>T. olivascens</i>						
CMU-66	1	1	2	1	1	1
<i>T. trixiae</i>						
CMU-231	1	1	2	1	1	1
<i>T. viridialbum</i>						
CMU-236	1	1	2	1	1	1
<i>T. viride</i>						
CMU-218	1	1	1	1	1	1
<i>T. tomentosum</i>						
CMU-221	1	1	2	1	1	1
CMU-222	3	2	3	3	1	1
<i>T. koningii</i>						
CMU-234	1	1	2	1	1	1
<i>T. atroviride</i>						
IM206040	1	1	2	2	1	1

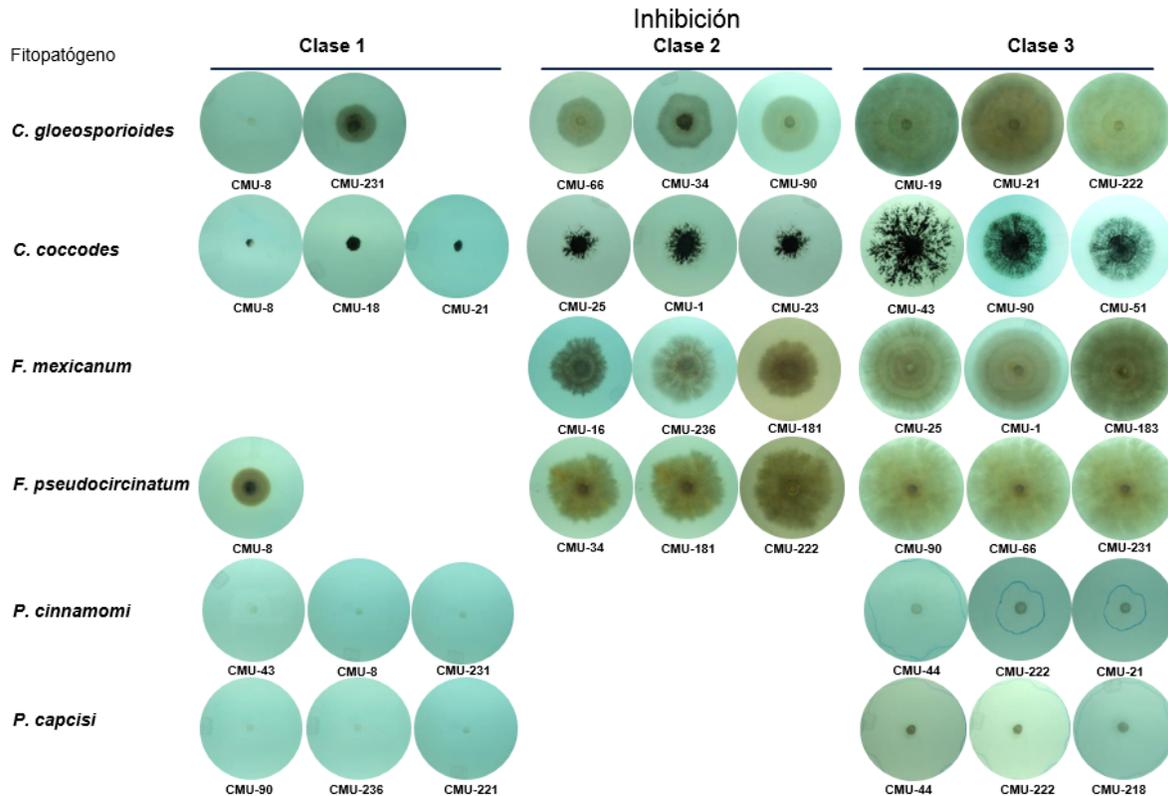
<sup>1</sup> Los niveles de antagonismo están indicados por número y color: clase: 1 (gris oscuro) *Trichoderma* sobrecrece completamente al fitopatógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2 (gris claro) *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, 3 (blanco) *Trichoderma* y el fitopatógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro.

En *C. coccodes* los niveles de inhibición obtenidos fueron clase 1 (35%), clase 2 (52%) y clase 3 (13%), siendo inhibido totalmente por *T. atroviride* (CMU-8), mientras que la inhibición fue baja para el caso de cepas de *T. harzianum* (CMU-43, CMU-51, CMU-90). El resto de las cepas de *Trichoderma* mostraron un porcentaje de inhibición parcial que mostró variaciones del 33.7 % – 93.5% (Tabla 4).

El crecimiento de *Fusarium mexicanum* de acuerdo a la escala de inhibición fue clase 2 (22%) y clase 3 (78%), siendo inhibido en un 50% por *T. harzianum* (CMU-16), mientras que el resto de las cepas de *Trichoderma* analizadas mostraron un porcentaje de inhibición parcial, menor a dicho porcentaje, variando entre 11.8% – 42.7% (Tabla 4).

En *Fusarium pseudocircinatum* se obtuvieron niveles de inhibición clase 1 (4%), clase 2 (13%) y clase 3 (83%). Este patógeno fue inhibido en un 80% por *T.*

*atroviride* (CMU-8), mientras las cepas que no presentaron inhibición fueron *T. harzianum* (CMU-1, CMU-90, CMU-183), *T. olivascens* (CMU-66), *T. tixiae* (CMU-231), y *T. viride* (CMU-218). El resto de las cepas analizadas de *Trichoderma* mostraron un porcentaje de inhibición parcial entre 4.5 % - 35.8% (Tabla 4).



**Figura 2. Ensayos de inhibición de cepas de *Trichoderma* spp. contra hongos y oomicetos fitopatógenos.** En todas las figuras se muestra el crecimiento de la colonia del hongo u oomiceto correspondiente en placas de Petri en las que previamente había crecido hasta fase logarítmica media la cepa de *Trichoderma* en ensayos independientes. El número de cepa de *Trichoderma* spp. aparece debajo de cada placa y los nombres de los fitopatógenos de prueba en cada línea aparecen a la izquierda. En el caso de los oomicetes se marcó tenuemente el borde de la colonia en los resultados del nivel de inhibición clase 3, debido a que por las características del micelio la colonia no es visible en la fotografía tomada. Se muestran solo algunos resultados representativos de cada clase.

La inhibición del crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* fue de clase 1 (87%) y clase 3 (13%), mostrando una inhibición del 100% las cepas de *T. harzianum* (CMU19, CMU-25, CMU-34, CMU-43, CMU-181, CMU-183), *T. atroviride* (CMU-8), *T. tixiae* (231), *T. viridialbum* (236). La cepa que no fue capaz de inhibir el crecimiento de este oomiceto fue *T. harzianum* (CMU-44). El resto de las cepas analizadas de

*Trichoderma* mostraron un porcentaje de inhibición parcial entre 31.8 % – 98.3% (Tabla 4).

**Tabla 4.** Inhibición de crecimiento de microorganismos fitopatógenos por parte de las cepas de *Trichoderma* spp.

Especie/cepa	Fitopatógeno <sup>1</sup>					
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. coccodes</i>	<i>F. mexicanum</i>	<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. capsici</i>
<i>T. harzianum</i>						
CMU-1	3 (1)	2 (62.9)	3 (16)	3 (0.8)	1 (96.4)	1 (100)
CMU-14	3 (3.7)	2 (60)	3 (16.4)	3 (14.1)	1 (95.2)	1 (85.4)
CMU-16	3 (33.1)	1 (74.1)	2 (55)	3 (33.5)	1 (98.1)	1 (100)
CMU-18	3 (10)	1 (93.5)	3 (21.8)	3 (30)	1 (77.2)	1 (100)
CMU-19	3 (0)	1 (83.1)	3 (18.5)	3 (11.6)	1 (100)	1 (100)
CMU-23	3 (0)	2 (62.5)	3 (17.2)	3 (9.1)	1 (97)	1 (100)
CMU-25	3 (0)	2 (65.2)	3 (11.8)	3 (6)	1 (100)	1 (100)
CMU-34	2 (43.5)	1 (70.8)	3 (26.2)	2 (35.8)	1 (100)	1 (100)
CMU-43	3 (4.3)	3 (16.2)	3 (17.9)	3 (4.5)	1 (100)	1 (96.4)
CMU-44	3 (9.1)	2 (36.4)	3 (32.9)	3 (21.6)	3 (0)	3 (0)
CMU-51	3 (21.8)	3 (33.3)	3 (24.1)	3 (22.7)	1 (94.1)	1 (81)
CMU-90	2 (34.7)	3 (30.8)	2 (34.3)	3 (0)	1 (88.7)	1 (100)
CMU-181	3 (21.2)	1 (73.7)	2 (41.4)	2 (34.5)	1 (100)	1 (100)
CMU-183	3 (3.9)	2 (38.1)	3 (16.4)	3 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>T. atroviride</i>						
CMU-8	1 (100)	1 (100)	3 (25)	1 (80.8)	1 (100)	1 (100)
<i>T. gamsii</i>						
CMU-21	3 (0)	1 (92.5)	3 (21.6)	3 (20.8)	3 (32.5)	1 (85.6)
<i>T. olivascens</i>						
CMU-66	2 (61)	2 (46.6)	3 (16.4)	3 (0)	1 (96.2)	1 (100)
<i>T. trixiae</i>						
CMU-231	1 (76)	2 (62)	3 (28.7)	3 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>T. viridialbum</i>						
CMU-236	3 (10)	2 (62)	2 (42.7)	3 (19.1)	1 (100)	1 (100)
<i>T. viride</i>						
CMU-218	3 (5.8)	2 (47.2)	3 (17.2)	3 (0)	1 (82.5)	3 (2)
<i>T. tomentosum</i>						
CMU-221	3 (15.8)	1 (68.9)	3 (19.1)	3 (28.3)	1 (98.3)	1 (100)
CMU-222	3 (0)	2 (37.5)	2 (35.4)	2 (33.9)	3 (31.8)	3 (0.4)
<i>T. koningii</i>						
CMU-234	3 (0)	2 (33.7)	3 (20)	3 (27.9)	1 (96)	1 (80.2)
<i>T. atroviride</i>						
IM206040	2 (65.4)	2 (39.5)	3 (29.1)	1 (69.1)	1 (100)	1 (100)

<sup>1</sup> Los distintos niveles de inhibición se muestran en color y con número, entre paréntesis aparece el porcentaje de inhibición con respecto al crecimiento de cada fitopatógeno en un medio control, en el que previamente no había crecido una cepa de *Trichoderma* spp. Clave: Inhibición clase 1 (cuadros gris oscuro), *Trichoderma* spp. inhibe del 67 al 100% el crecimiento del fitopatógeno; Inhibición clase 2 (cuadros gris claro), *Trichoderma* spp. inhibe del 34 al 66% del crecimiento del fitopatógeno; Inhibición clase 3 (cuadros blancos), *Trichoderma* spp. inhibe del 1 al 33% del crecimiento del fitopatógeno.

En *Phytophthora capsici* los niveles observados de la escala de inhibición fueron clase 1 (87%) y clase 2 (13%), siendo inhibido totalmente por las cepas de *T. harzianum* (CMU-1, CMU-16, CMU-18, CMU-19, CMU-23, CMU-25, CMU-34, CMU-90, CMU-181, CMU-183), *T. atroviride* (CMU-8), *T. olivascens* (CMU-66), *T. trixiae* (231), *T. viridialbum* (236) y *T. tomentosum* (CMU-221). Las cepas que no lograron inhibir a dicho fitopatógeno fueron *T. harzianum* (CMU-44), *T. viride* (CMU-218) y *T. tomentosum* (CMU-222). El resto de las cepas analizadas mostraron un porcentaje de inhibición parcial pero significativamente alto, que varió entre 80.2% – 96.4% (Tabla 4).

## DISCUSIÓN

En este apartado del trabajo se evaluó la capacidad de las 23 cepas de *Trichoderma* spp. de estudio contra distintos microorganismos fitopatógenos que atacan cultivos y especies vegetales del estado de Michoacán. En concordancia con estudios previos de evaluación de cepas silvestres, se encontró una gran variación intra e interespecífica en la capacidad para antagonizar e inhibir el crecimiento de fitopatógenos por parte de las cepas de estudio. Algunas de las especies de *Trichoderma* spp. analizadas en el presente trabajo han sido ampliamente documentadas como biocontroladoras de hongos y oomicetos fitopatógenos, mientras que otras especies no han sido descritas como antagonistas previamente. Además de aquellas especies que ya se han evaluado en estudios anteriores, en el presente trabajo se analizó su capacidad antagónica contra especies de microorganismos fitopatógenos con las que no se han reportado estudios con anterioridad. Por todo esto, el presente trabajo aporta nuevo conocimiento sobre *Trichoderma* spp. en relación a su capacidad antagónica.

Las especies *T. olivascens* (CMU-66), *T. viridialbum* (CMU-236) y *T. trixiae* (CMU-231) aquí analizadas son de reciente descripción (Jaklitsch *et al.*, 2013), y a la fecha no se ha realizado ningún estudio para comprobar su actividad antagónica *in vitro* contra microorganismos fitopatógenos. En el caso de las dos primeras especies, el material analizado para su descripción inicial incluyó muestras de México, mientras que en el caso de la última especie se ha registrado en Estados Unidos, además de que es muy posible que se encuentre en Sudamérica, probablemente Colombia, por lo que el reporte para México es congruente con la distribución geográfica de su descripción inicial (Jaklitsch *et al.*, 2013). Las cepas de referencia para la descripción de las especies de *T. olivascens*, *T. viridialbum* y *T. trixiae* se aislaron de madera muerta, además, las dos últimas se encuentran en suelo y la segunda especie en corteza de árboles (Jaklitsch *et al.*, 2013). El sustrato del que provienen las cepas aquí estudiadas de las tres especies es el cuerpo fructífero de especies de basidiomicetes no identificadas (Cázares-García *et al.*, 2016), lo que de alguna manera las relaciona como habitantes del suelo de los ecosistemas muestreados. No

obstante, es muy factible que al encontrarse en tejido de basidiocarpo, dichas especies estén relacionadas con el decaimiento de esta estructura, o bien, sean potencialmente micoparasíticas que atacan al basidiocarpo. De manera interesante, en el caso particular de *T. trixiae*, desde su descripción inicial se consideró la posibilidad de que fuera fungícola, lo que concuerda con el sustrato de procedencia de la cepa aquí analizada.

Las tres especies mencionadas en el párrafo anterior mostraron el mismo patrón de antagonismo en cultivos duales hacia los fitopatógenos de prueba, el valor de antagonismo más alto de la escala (clase 1) en cultivos duales con todos los fitopatógenos evaluados excepto *F. mexicanum*, con el cual presentaron un valor de clase 2, el siguiente más alto de la escala. En contraste, en los ensayos de inhibición de crecimiento por secreción de metabolitos hidrosolubles las tres cepas mostraron pobre o nula inhibición contra *F. pseudocircinatum*, y valores variables, aunque todos bajos, hacia *F. mexicanum*. Otra diferencia importante fue en la inhibición de crecimiento hacia *C. gleosporoides*, contra quien *T. viridialbum* (CMU-236) presentó un valor de inhibición del 10%, que contrasta con los valores superiores al 60% de *T. olivascens* y *T. trixiae*. Estos resultados sugieren que estas tres especies atacan a los ascomicetes fitopatógenos mediante el mecanismo de micoparasitismo empleando el ataque directo al micelio, mientras que contra oomicetos emplean tanto este mecanismo como la antibiosis. También, los resultados obtenidos muestran que estas nuevas especies de *Trichoderma* tienen potencial para su aplicación en productos de biocontrol en campo; no obstante, es necesario realizar pruebas en invernadero para evaluar si dichas cepas son competitivas como antagonistas de los fitopatógenos aquí empleados. Por último los datos aquí presentados refuerzan los hallazgos de estudios previos (Bae *et al.*, 2011) que muestran la importancia de seguir realizando la búsqueda de nuevas cepas y el estudio de nuevas especies del género *Trichoderma*, en términos del potencial antagónico y biocontrol contra fitopatógenos.

De las especies de *Trichoderma* aquí estudiadas, *T. harzianum* es una de las que más se ha analizado alrededor del mundo contra distintos microorganismos fitopatógenos. Como se documentó en la introducción de este capítulo, en años

recientes cepas de dicha especie se han confrontado *in vitro* con éxito contra cepas de las mismas especies o del mismo género de los fitopatógenos aquí evaluados, incluyendo a especies del género *Fusarium* como *F. graminearum*, *F. solani* (Consolo *et al.*, 2012), *F. oxysporum* (López-Mondéjar *et al.*, 2011; Alamri *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha demostrado el antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* contra *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* (Živković *et al.*, 2010). Cepas de esta misma especie también se han probado con éxito *in planta* contra la antracnosis de *Colletotrichum graminicola* en maíz (Harman *et al.*, 2004) y de *C. acutatum* en fresa (Freeman *et al.*, 2004). En el caso del género oomicete aquí estudiado, se ha demostrado el antagonismo *in vitro* y protección de plantas en invernadero y campo por parte de cepas de *T. harzianum* contra la infección por especies de *Phytophthora*, incluidas *P. cactorum* (Smith *et al.*, 1990; Porras *et al.*, 2007), *P. capsici* (Ahmed *et al.*, 1999; Ezziyani *et al.*, 2005), *P. erythroseptica* (Etebarian *et al.*, 2000) y *P. colocasiae* (Nath *et al.*, 2014). Sin embargo, a la fecha no existe ningún reporte anterior al presente trabajo que evalúe la capacidad de cepas de *T. harzianum* para antagonizar contra *F. mexicanum*, *F. pseudocircinatum*. Aunque existe un reporte de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *P. cinnamomi* (Chambers *et al.*, 1995) y la protección de *T. harzianum* de semillas de pino contra dicho patógeno (Kelley, 1976).

De todas las cepas evaluadas, la que mostró los mejores resultados en los dos ensayos fue *T. atroviride* (CMU-8). La gran variación observada en los mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra microorganismos fitopatógenos, principalmente hongos y oomicetes, puede explicarse en parte por diferencias en los mecanismos de regulación de la transcripción de genes relacionados con la competencia y el micoparasitismo. El análisis transcriptómico comparativo entre *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei* en presencia de *Rhizoctonia solani*, mostró que mientras el primero incrementaba la transcripción de genes relacionados con el metabolismo secundario,  $\beta$ -glucanasas de la familia GH16, proteasas y proteínas pequeñas secretadas ricas en cisteína; en el segundo sobresalió la expresión de genes de biosíntesis de gliotoxina y sus precursores, mientras que en el tercero se incrementó la transcripción de genes de celulasas,

hemicelulasas y transportadores de solutos (Atanasova *et al.*, 2013). Estos patrones de transcripción reflejan diferencias en las estrategias de micoparasitismo de *T. atroviride* y *T. virens*, y son coherentes con el estilo de vida primordialmente saprofítico de *T. reesei*. Así, mientras *T. atroviride* emplea una estrategia de antibiosis y de secreción de enzimas hidrolíticas para antagonizar el fitopatógeno, *T. virens* sigue una estrategia de “envenenamiento” con gliotoxina. La expresión de genes que codifican para enzimas hidrolíticas de polisacáridos de la pared celular vegetal de *T. reesei* es coherente con el estilo de vida saprófito en el modelo evolutivo que propone que dicha especie pasó de micoparásito a sapófito “siguiendo” a presas (basidiomicetes) ligninolíticas en su nicho (Seidl *et al.*, 2009; Druzhinina *et al.*, 2011). No obstante, dicho perfil transcriptómico también puede resultar en antagonismo contra fitopatógenos, ya que le permite a *T. reesei* competir por nutrientes con éste, inhibiendo su crecimiento por falta de nutrimentos (Atanasova *et al.*, 2013). Se ha propuesto que esta regulación transcripcional diferencial puede deberse a una mayor abundancia de reguladores de la transcripción de genes relacionados con micoparasitismo en *T. atroviride* y *T. virens*, en relación a *T. reesei*. También se ha planteado la posibilidad de que los genes relacionados con micoparasitismo se encuentren en regiones no sinténicas entre las especies micoparasíticas y entre éstas y la especie preferencialmente saprofítica, lo que ocasiona que dichos genes se encuentren en ambientes de regulación transcripcional distintos (Atanasova *et al.*, 2013). Estos estudios pueden explicar las diferencias interespecíficas encontradas en el presente trabajo en relación a la capacidad antagónica contra las especies de microorganismos fitopatógenos evaluadas.

Aunque el análisis transcriptómico anteriormente descrito compara especies distintas de *Trichoderma* spp., los resultados de los análisis de selección de cepas biocontroladoras en todo el mundo presentados con anterioridad, y los del presente trabajo, sugieren que es muy factible que mecanismos similares de regulación transcripcional diferencial estén operando a nivel intra-específico. Independientemente de la especie, cuando se analizan distintas cepas de regiones geográficas cercanas o distantes, se observa una gran variación en la eficiencia para

inhibir el crecimiento de distintas especies de microorganismos fitopatógenos en cultivos duales, para inhibir el crecimiento en experimentos de producción de moléculas hidrosolubles (enzimas y metabolitos) y en experimentos de inhibición por moléculas volátiles, así como para producir enzimas hidrolíticas extracelulares. No obstante, a la fecha no se ha realizado un estudio en el que se analicen las diferencias transcriptómicas intraespecíficas de *Trichoderma* spp. en presencia de algún fitopatógeno.

Por otra parte, se ha documentado desde hace tiempo el hecho de que la capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. es influenciada por condiciones de incubación no evaluadas en el presente trabajo. Entre los factores analizados en los primeros estudios de antagonismo se encontró que el medio de cultivo en donde se desarrollan los experimentos de confrontación constituye un factor determinante en los resultados del antagonismo (Whipps, 1987). Más recientemente se ha documentado que en *T. atroviride* factores como el pH, la actividad de agua (Daryaei *et al.*, 2016a), la temperatura y la luz (Daryaei *et al.*, 2016b), son importantes en la efectividad con la que dicha especie antagoniza contra *R. solani*. A futuro sería importante analizar dichas variables en el antagonismo de las cepas de estudio, con la finalidad de encontrar aquellas cepas que puede ser efectivas contra fitopatógenos en una amplia gama de condiciones ambientales.

### Referencias Bibliográficas

- [1] Ahmed, A. S., Pérez-Sánchez, C., Egea, C., Candela, M. E. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant pathology*. 48(1): 58-65.
- [2] Alamri, S., Hashem, M., Mostafa, Y. S. (2012). In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*. 17(4): 155-167.
- [3] Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*. 114(9): 691-701.

- [4] Arredondo-Santoyo M. 2009. Establecimiento de un cepario de hongos micromicetos silvestres del estado de Michoacán. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 27 de Febrero del 2009.
- [5] Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Culpier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics*. 14(1): 121.
- [6] Avila-Miranda, M., Herrera-Estrella, A., Peña-Cabriales, J. J. (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(7): 1823-1830.
- [7] Bae, H., Roberts, D. P., Lim, H. S., Strem, M. D., Park, S. C., Ryu, C. M., Melnick, R. L., Bailey, B. A. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24(3): 336-351.
- [8] Bell, D. K., Wells, H. D., Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72(4): 379-382.
- [9] Cázares-García, S. V., Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Garcidueñas, M., Robinson-Fuentes, V. A., Gómez-Reyes, V. M., & Vázquez-Marrufo, G. (2016). Typing and selection of wild strains of *Trichoderma* spp. producers of extracellular laccase. *Biotechnology Progress*. 32(3): 787–798.
- [10] Chambers, S. M., Scott, E. S. (1995). In vitro antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology*. 143(8): 471-477.
- [11] Cherif, S. S., Benhamou, C. S. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Phytopathology*. 80(12):1406-1414.
- [12] Consolo, V. F., Mónaco, C. I., Cordo, C. A., Salerno, G. L. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective

- biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4): 1389-1398.
- [13] Daryaei, A., Jones, E. E., Glare, T. R., Falloon, R. E. (2016a). pH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*. 92: 24-30.
- [14] Daryaei, A., Jones, E. E., Ghazalibiglar, H., Glare, T. R., Falloon, R. E. (2016b). Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. *Journal of Applied Microbiology*. 120(4): 999-1009.
- [15] Dennis, C., Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society*. 57(1):25-39.
- [16] dos Reis Almeida, F. B., Cerqueira, F. M., do Nascimento Silva, R., Ulhoa, C. J., Lima, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 29(8): 1189-1193.
- [17] Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella. A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*. 9(10):749-759.
- [18] El-Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A., Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The Plant Pathology Journal*. 31(1): 50.
- [19] Etebarian, H. R., Scott, E. S., Wicks, T. J. (2000). *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. *European Journal of Plant Pathology*. 106(4): 329-337.
- [20] Ezziyyani, M., Requena, M. E., Sánchez, C. P., Castillo, M. E. C. (2005). Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*. 27:119-126.

- [21] Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Dag, A. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*. 110(4): 361-370.
- [22] Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. (2004). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. 94(2): 147-153.
- [23] Hirpara, D. G., Gajera, H. P., Bhimani, R. D., Golakiya, B. A. (2016). The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Scc. *Current Genetics*. 62(3): 619-641.
- [24] Jackson, A. M., Whipps, J. M., Lynch, J. M. (1991). In vitro screening for the identification of potential biocontrol agents of *Allium* white rot. *Mycological Research*. 95(4): 430-434.
- [25] Jaklitsch, W. M., Samuels, G., Ismaiel, A., Voglmayr, H. (2013). Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 31(1): 112-146.
- [26] Kelley, W. D. (1976). Evaluation of *Trichoderma harzianum*-impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamomi* causing damping-off of pine seedlings [Biological control, *Pinus echinata*]. *Phytopathology*. 66: 1023-1027.
- [27] Köhl, J., Schlösser, E. (1989). Decay of sclerotia of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma* spp. at low temperatures. *Journal of Phytopathology*. 125(4): 320-326.
- [28] López-Mondéjar, R., Ros, M., Pascual, J. A. (2011). Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*. 56(1): 59-66.
- [29] Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of action of fungal biological control agents. In P Narayanasamy, editor, Biological management of diseases of crops, Volume 1: Characteristics of biological control agents. Progress in *Biological Control Series*, Vol. 15. Springer, Dordrecht. pp. 99-200.

- [30] Nath, V. S., John, N. S., Anjanadevi, I. P., Hegde, V. M., Jeeva, M. L., Misra, R. S., Veena, S. S. (2014). Characterization of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Phytophthora colocasiae* associated with leaf blight of taro. *Annals of Microbiology*. 64(4): 1513-1522.
- [31] Porras, M., Barrau, C., Arroyo, F. T., Santos, B., Blanco, C., Romero, F. (2007). Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. *Plant Disease*. 91(2): 142-146.
- [32] Seidl, V., Song, L. F., Lindquist, E. A., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martinez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S. E., Kubicek, C. P. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the close presence of a fungal prey. *BMC Genomics*. 10(1): 567.
- [33] Smith, V. L., Wilcox, W. F., Harman, G. E. (1990). Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*. 80(9): 880-885.
- [34] Whipps, J. M. (1987). Effect of Media on Growth and Interactions between a Range of Soil-Borne Glasshouse Pathogens and Antagonistic Fungi. *New Phytologist*. 107(1): 127-142.
- [35] Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Rowland, C. (1994). Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*. 98(12): 1357-1363.
- [36] Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T., Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*. 62(3): 611-623.

## CAPÍTULO 2

### PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES EN CEPAS SILVESTRES DE *Trichoderma* spp.

#### RESUMEN

Se estudió de manera semicuantitativa la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de 23 cepas silvestres de *Trichoderma* spp. Para la detección de celulasas y quitinasas se emplearon los sustratos celulosa-azure y quitina-azure, respectivamente; mientras que para la detección de proteasas se empleó gelatina, y para la de xilanasas el sustrato fue xilana revelando la actividad con una solución de Lugol (I<sub>2</sub>/KI). El 48% (11/23) de las cepas analizadas mostraron producción de celulasas, aunque en bajo nivel. En el caso de la actividad de quitinasa, el 17% (4/23) de las cepas mostraron niveles altos de producción, 48% (11/23) niveles intermedios y el resto no mostró dicha actividad. En contraste, 74% (17/23) y 56% (13/23) de las cepas mostraron alta producción de xilanasas y proteasa extracelular, respectivamente. La mejor cepa productora de enzimas hidrolíticas fue la cepa CMU-218 de *T. viride*, seguida de la cepa CMU-19 de *T. harzianum* y CMU-66 *T. olivascens*. Las 14 cepas de *T. harzianum* analizadas mostraron variabilidad en la producción de las cuatro actividades enzimáticas, destacándose la CMU-19 como la mejor. Las dos cepas de *T. tomentosum* también mostraron variabilidad en la producción de las actividades enzimáticas evaluadas. Los resultados obtenidos muestran una correlación parcial con los ensayos de antagonismo, ya que la cepa CMU-8 de *T. atroviride* que fue la mejor antagonista en los ensayos de confrontación y de inhibición (capítulo 1), no presentó actividad de proteasa, mostró niveles intermedios en la actividad de celulasa y quitinasa, y solo presentó el valor máximo de actividad de xilanasas. Sin embargo, la cepa CMU-218 de *T. viride*, que presentó los niveles más altos de antagonismo en cultivos duales pero no en ensayos de inhibición, fue la mejor productora de enzimas hidrolíticas. Estos resultados sugieren que la cepa CMU-8 utiliza como mecanismo de antagonismo principalmente la antibiosis, mientras que la cepa CMU-218 es micoparásita y competidora por nutrientes.

## INTRODUCCIÓN

Estudios previos han documentado la gran variabilidad existente entre especies y variantes geográficas de la misma especie de *Trichoderma* spp., en relación a la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares. En varios de estos trabajos se ha buscado establecer correlaciones entre la capacidad antagónica y la capacidad para producir enzimas hidrolíticas extracelulares, particularmente aquellas relacionadas con la degradación de la pared celular de microorganismos fitopatógenos. Los resultados obtenidos a la fecha no son consistentes, ya que en algunos casos se ha podido establecer la correlación entre dichas variables y en otros casos no se ha encontrado relación alguna. En los siguientes párrafos se presentan trabajos en los cuales se han obtenido resultados contradictorios a nivel inter e intraespecífico.

La falta de correlación entre la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y el potencial antagónico de *Trichoderma* spp. contra microorganismos fitopatógenos ha sido documentada desde los estudios iniciales de selección de cepas silvestres (Sreenivasaprasad y Manibhushanrao, 1990). Además, el análisis filogenético en combinación con el estudio bioquímico muestran que aunque existe correlación entre la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en ciertas especies del género *Trichoderma*, no existe correlación entre especie, capacidad de producción de enzimas y antagonismo contra fitopatógenos (Sanz *et al.*, 2004). Más recientemente, al analizar diversas cepas silvestres de *T. harzianum*, no se encontró correlación entre la frecuencia de formación de enrollamientos del micelio en las cepas de estudio sobre *Rhizoctonia solani* y la producción de quitinasa, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y  $\beta$ -1-3 glucanasas (dos Reis Almeida *et al.*, 2007). De manera similar, el análisis de cepas endofíticas y de rizósfera de *Trichoderma* spp. no mostró correlación entre la capacidad antagónica *in vitro* y en pruebas de invernadero contra *Fusarium oxysporum* que infecta plantas de plátano; de hecho, ninguna de las cepas, salvo una de especie no identificada, mostró dicha actividad enzimática en los ensayos cualitativos realizados (Thangavelu y Gopi, 2015). En el caso particular de ciertas especies, esta falta de correlación se ha documentado a nivel intraespecífico; por ejemplo, en cepas provenientes de la germinación de conidias individuales de *T. koningii*, no se encontró ninguna

correlación entre la producción extracelular de quitinasa, glucanasa, celulasa o xilanasa de las cepas analizadas con la capacidad micoparasítica *in vitro* contra *R. solani*, o la capacidad para proteger a plantas de trigo contra la pudrición de raíz ocasionada por dicho fitopatógeno (Worasatit *et al.*, 1994).

En resultados contrastantes con las referencias anteriormente citadas, el análisis de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. mostró que las tres cepas que presentaron los mayores valores de actividad extracelular de quitinasa,  $\beta$ -1-3 glucanasa y proteínasa, también fueron las que presentaron mejores niveles de antagonismo e inhibición del crecimiento de distintos hongos fitopatógenos (Islam *et al.*, 2016). Dichas cepas fueron identificadas como *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. virens*. Una cepa de *T. harzianum* seleccionada entre 336 aislados de hongos silvestres mostró niveles altos de actividad extracelular de  $\beta$ -1-3 y  $\beta$ -1-6 glucanasa y quitinasa (Alamri *et al.*, 2012). En concordancia con estos estudios, se documentó una correlación positiva entre aquellas cepas de *Trichoderma* que presentaron los mejores niveles de antagonismo contra *Sclerotium rolfsii*, y el nivel de actividad extracelular de exoquitinasa, aunque en el caso de  $\beta$ -1-3 glucanasa, dicha correlación fue débil (John *et al.*, 2015); la cepa que mostró los mejores niveles de la primera enzima y antagonismo fue identificada como *T. harzianum*. En contraste, Gajera y Vakharia (2010) reportan una correlación positiva entre la producción de las tres enzimas hidrolíticas quitinasa,  $\beta$ -1-3 glucanasa y proteasa, con la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp. de diferentes especies contra *Aspergillus niger*. Esta correlación entre capacidad para producir enzimas extracelulares hidrolíticas que degradan la pared celular fúngica y el antagonismo o biocontrol de hongos fitopatógenos también ha sido reportada a nivel intraespecífico, particularmente en el caso de *T. asperellum*, en el cual aquellas cepas con mayores niveles de actividad extracelular de quitinasa y glucanasa fueron las mejores antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (El-Komy *et al.*, 2015).

Recientemente, el estudio de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. mostró que las mejores productoras de N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa y  $\beta$ -1-3 glucanasa también mostraban mayor eficacia en campo para proteger al frijol común contra *Sclerotinia sclerotiorum*; el análisis de componentes principales en dicho estudio

indica que los ensayos *in vitro* tanto de éstas actividades enzimáticas como del micoparasitismo contra los esclerocios del fitopatógeno, son buenos predictores de cepas con potencial para el biocontrol (Geraldine *et al.*, 2013).

También se ha documentado la inducción de actividades enzimáticas hidrolíticas en cepas silvestres de *Trichoderma* spp. cuando se cultivan en presencia de paredes celulares de hongos fitopatógenos. Así, cepas de *T. harzianum*, *T. tomentosum*, *T. asperellum* y *T. ghanense* crecidas en presencia de paredes celulares de los fitopatógenos, mostraron actividades extracelulares de quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y proteasa (Qualhato *et al.*, 2013); el nivel de actividad varió entre las cepas analizadas, dependiendo de la pared celular en la que se cultivó. La producción de actividad extracelular de quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa de cepas de *T. hamatum* y *T. harzianum* en presencia de micelio inactivado de distintos fitopatógenos también ha sido reportada (Witkowska y Maj, 2002).

Tanto la construcción de transformantes como la purificación de enzimas o el uso de extractos enzimáticos crudos han contribuido a establecer relaciones entre las enzimas hidrolíticas extracelulares y el micoparasitismo. La construcción de transformantes de *T. virens* que sobre-expresan  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanasa muestra que, aunque se disminuye su capacidad de esporulación, no se afecta la capacidad de antagonismo *in vitro* contra microorganismos fitopatógenos y se incrementa el biocontrol de los mismos en plantas de algodón (Djonovic *et al.*, 2007). Un incremento en la actividad contra *R. solani* también se ha documentado para transformantes de *T. harzianum* (Limón *et al.*, 1999) y de *T. virens* (Pozo *et al.*, 2004) que sobre-expresan constitutivamente genes de quitinasa y proteasa, respectivamente, en relación a la cepa silvestre. En el caso del efecto de enzimas hidrolíticas sobre microorganismos fitopatógenos, se ha demostrado que una  $\alpha$ -glucanasa de *T. harzianum* posee actividad fungicida, siendo capaz de inhibir la germinación de conidias y el desarrollo del micelio de hongos fitopatógenos (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Además, evidencia experimental muestra que las enzimas hidrolíticas extracelulares producidas por *Trichoderma* spp., particularmente *T. harzianum*, son capaces de degradar la pared celular del oomiceto *Pythium ultimum*, del ascomicete *Fusarium equisetii*, y del basidiomicete *Rhizoctonia solani* (Inglis y

Kawchuk, 2002). También se ha documentado que extractos crudos con actividad de celulasa de una cepa silvestre de *T. asperellum* son capaces de causar daño celular al micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). En el caso de proteasas extracelulares de *Trichoderma* spp., éstas han mostrado tanto actividad nematocida (Suarez *et al.*, 2004) como antifúngica (Elad y Kapat, 1999), purificadas y en extractos crudos, respectivamente.

Más recientemente, las herramientas oómicas han incrementado el conocimiento de la relación entre la producción de enzimas hidrolíticas y la capacidad antagónica o de biocontrol de cepas de *Trichoderma* spp. Estudios realizados en una cepa silvestre de *T. harzianum* en confrontación con *S. sclerotiorum* muestran que algunos genes que codifican para quitinasas y glucanasas incrementan sus niveles de transcripción de manera significativa durante la interacción *T. harzianum*-fitopatógeno, sin embargo, en algunos de los genes analizados la respuesta transcripcional depende del tipo de célula con la que se esté confrontando la cepa micoparasítica, ya sea micelio, esclerocio o apotecio (Troian *et al.*, 2014). Dichas observaciones se han relacionado con el cambio cualitativo y cuantitativo que ocurre en la composición de polímeros de la pared celular fúngica, de acuerdo a los procesos de diferenciación celular (Troian *et al.*, 2014). Observaciones similares de incremento transcripcional en genes que codifican para enzimas que degradan la pared fúngica se han documentado en la interacción entre cepas silvestres de *T. asperellum* y *Phymatotrichopsis omnivora* (Guigón-López *et al.*, 2015). En concordancia con el análisis de transcripción, el análisis proteómico en cepas silvestres de *T. harzianum* muestra que en presencia de *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* sp. y *R. solani* se secretan al medio enzimas hidrolíticas como endoquitinasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -1,3-glucanasa, y proteasa, entre otras, las cuales son activas (Monteiro *et al.*, 2010).

Por otra parte, además del interés en relacionar la capacidad antagónica con la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, algunos trabajos que realizan la caracterización de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. se enfocan en la producción de enzimas hidrolíticas de relevancia para la degradación de la pared celular vegetal, tanto por razones ecológicas como por motivos biotecnológicos. El interés ecológico

por describir la capacidad de *Trichoderma* spp. para degradar la pared celular vegetal es guiado por la necesidad de describir con precisión el estilo de vida que las especies del género tienen en el ambiente del cual son originarias. A su vez, el interés biotecnológico se ha ido modificando con el tiempo, pasando de evaluar la posible utilidad de *Trichoderma* spp. en el composteo, a la producción de biocombustibles derivados de biomasa vegetal residual. Entre las especies estudiadas del género *Trichoderma*, *T. reesei* se ha destacado como buena degradadora de celulosa y hemicelulosa, los polisacáridos más abundantes de la pared celular (Gusakov, 2011; Kubicek, 2013).

El análisis de 119 cepas de 12 especies distintas de *Trichoderma* spp. aisladas de madera en descomposición mostró que todas ellas eran capaces de degradar celulosa y presentaron actividad extracelular de xilanasas (Błaszczyk *et al.*, 2015). No obstante, dicho estudio mostró variaciones inter e intra-específicas estadísticamente significativas en la producción de celulasa, pero no mostró diferencias en la actividad de xilanasas. De la misma forma, el análisis de 193 cepas de *Trichoderma* spp., mostró que éstas se acomodaban en 22 especies distintas y que cepas representativas de cada una de estas especies producía quitinasa, proteasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa extracelulares (Kamala *et al.*, 2015).

Los estudios previamente citados muestran que existe una gran variación intra e interespecífica en la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de *Trichoderma* spp. A la fecha, aún no está claro el origen de esta gran variabilidad en los distintos trabajos realizados. Aunque dicha variabilidad puede deberse en parte a diferencias en las condiciones de incubación y de determinación de las actividades enzimáticas de interés, es muy factible que también estén participando factores intrínsecos de las cepas de estudio, como la presencia de un número variable de genes de las actividades enzimáticas evaluadas o una regulación transcripcional distinta entre las especies/cepas estudiadas a cada caso. Dicha variabilidad genotípica y fenotípica estaría relacionada en principio con el estilo de vida y la localidad geográfica de las cepas analizadas en los distintos estudios.

En el análisis de cepas de *Trichoderma* spp. con fines de selección para biocontrol u otras aplicaciones biotecnológicas, en general, la caracterización inicial

de cepas silvestres se realiza en medio sólido suplementado con sustratos que al ser degradados originan un cambio de color en el medio de cultivo, o bien la hidrólisis del sustrato en cuestión se revela con algún reactivo. Estos estudios cualitativos son importantes debido a que permiten la selección de cepas para un análisis cuantitativo de actividad enzimática más detallado en medio líquido. En este trabajo en particular, fue de especial interés la detección cualitativa de quitinasa, proteasa, celulasa y xilanas extracelular de las cepas de estudio. Por esta razón, únicamente se comenta sobre la detección de dichas actividades enzimáticas en esta introducción.

La actividad celulolítica se ha evaluado empleando carboximetilcelulosa (CMC) seguida de un revelado posterior con rojo Congo, para visualizar la zona de hidrólisis (Cabero *et al.*, 2012). En algunos trabajos se han empleado tanto el ensayo con CMC como la capacidad de crecimiento en celulosa cristalina (Avicel) como fuente de carbono, con la finalidad de seleccionar cepas de *Trichoderma* spp. productoras de actividad celulolítica (Florencio *et al.*, 2012). Otra técnica para evaluar la producción de actividad celulolítica en *Trichoderma* spp. es el cultivo en medio con celulosa expandida (swollen-cellulose) en presencia de ácido fosfórico, en este caso se detecta un halo claro de hidrólisis, sin necesidad de revelar (Jiang *et al.*, 2011). Todos estos medios detectan actividad celulolítica en general, sin distinguir una actividad enzimática específica del conjunto de enzimas que se encargan de la hidrólisis de la celulosa. Para el caso de la detección específica de actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa, se emplea laminarina en el medio (Kamala *et al.*, 2015).

Para la identificación cualitativa de la producción de la actividad de proteasa extracelular en *Trichoderma* spp. se ha utilizado tanto gelatina (Consolo *et al.*, 2012) como leche descremada (Kamala *et al.*, 2015) en el medio de cultivo, revelándose la actividad como una zona clara de hidrólisis alrededor de la colonia. Para la detección de quitinasa se ha empleado medio suplementado con quitina coloidal (Kamala *et al.*, 2015).

La detección de actividad extracelular de xilanas en medio sólido se ha realizado empleando xilana comercial, comúnmente de abedul, y un revelado cubriendo la placa con solución de Lugol, considerando una reacción positiva la aparición de una coloración amarilla contra el fondo púrpura que adquiere el medio

en las zonas en las que la xilana no se ha degradado (Pointing, 1999; Torres y de la Cruz, 2013).

Un método empleado para la detección de actividad celulolítica en hongos emplea el sustrato celulosa –azur, en dicho método se coloca en tubos de vidrio una capa de medio basal sin sustrato, sobre dicho medio se coloca una capa del mismo medio pero con el sustrato; el hongo se inocula sobre la capa de medio con sustrato y la actividad positiva se revela por la migración del colorante azur hacia la capa de medio sin sustrato (Deacon *et al.*, 2006; Simonis *et al.*, 2008). El mismo método es empleado para detectar la actividad de quitinasa en hongos, pero en este caso el sustrato es quitina-azur (Deacon *et al.*, 2006; Simonis *et al.*, 2008). Aunque en algunos estudios empleando dichos métodos se han incluido cepas de *Trichoderma* spp. (Deacon *et al.*, 2006), durante el desarrollo de este trabajo no se encontró un antecedente en el que estos métodos se emplearan en una colección de cepas silvestres del género *Trichoderma*, como se realizó aquí.

Con base en lo anterior, es factible aseverar que los antecedentes sobre producción de enzimas y micoparasitismo contra fitopatógenos de *Trichoderma* spp. no permiten anticipar de manera precisa cual será el resultado al analizar nuevas variantes geográficas de la misma especie, aún de aquellas mejor estudiadas como *T. harzianum*. Por lo anterior, en el presente capítulo se decidió evaluar de manera semicuantitativa la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en las cepas de estudio de *Trichoderma* spp., principalmente aquellas actividades relacionadas con micoparasitismo y degradación de la biomasa vegetal. La producción de enzimas hidrolíticas extracelulares se realizó empleando métodos de detección en placa que han mostrado su utilidad para seleccionar cepas de relevancia biotecnológica a bajo costo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Detección de actividades enzimáticas hidrolíticas extracelulares**

#### *Protocolo para la detección de celulasas y quitinasas*

La detección de las actividades enzimáticas de celulasa y quitinasa se realizó en medio basal compuesto por (g/L): C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.5; extracto

de levadura, 0.1;  $\text{CaC}_{12}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.001, de acuerdo a Pointing (1999). Se agregaron 6 mL de medio basal a tubos de ensayo de 15 mL con una inclinación de  $45^\circ$ , una vez gelificado el medio basal se agregó una cubierta de 0.6 mL del medio compuesto por (g/L): extracto de levadura, 2; azure-celulosa (Sigma, USA) o azure-quitina (Sigma, USA), 4.38 de c/u en medios independientes y agar, 15. Ambos medios fueron previamente esterilizados a  $121^\circ\text{C}$  ( $15\text{ lbf/in}^2$ ) por 15 min. Una vez gelificado el medio de cobertura con el sustrato se colocaron inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro tomados del borde de colonias en crecimiento activo de los distintos aislados de *Trichoderma* spp., los tubos con medio así inoculados se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ . La presencia de cada actividad enzimática fue monitoreada durante 12 días, relacionando los cambios de color en el medio basal con el nivel de actividad enzimática de cada uno de los aislados de *Trichoderma*. Los ensayos de las dos enzimas se realizaron por triplicado. El fundamento de la técnica indica que cuando la cepa en estudio posee la actividad buscada, ésta libera al colorante (azure) del resto de la molécula, el cual difunde al medio basal cambiando su color. La escala de actividad que se utilizó fue: clase 1= actividad enzimática alta (color violeta); clase 2= actividad enzimática intermedia (color azul claro); clase 3= actividad enzimática baja (sin cambio de coloración).

#### *Protocolo para la detección de xilanasas*

Para la detección de ésta actividad enzimática se utilizó el método de Pointing (1999), el cual se describe brevemente a continuación. Los inóculos para este ensayo consistieron de cilindros de 6 mm de diámetro tomados del borde de colonias en crecimiento activo de los distintos aislados de *Trichoderma* spp. crecidos en Medio Basal Xilanólisis (MBX) compuesto por (g/L):  $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ , 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1; extracto de levadura, 0.1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.001; peptona, 0.1 y agar bacteriológico 1.6%, suplementado con 0.4 % de glucosa. Para la detección de xilanasas al MBX se le adicionó 4% de xilana (Sigma, USA) y 1.6% de agar. Ambos medios se esterilizaron a  $121^\circ\text{C}$  ( $15\text{ lbf/in}^2$ ) por 15 min. El medio así preparado se inoculó con los distintos aislados de *Trichoderma* spp. e incubó a  $28^\circ\text{C}$  en oscuridad, revelando las placas cuando el diámetro de la colonia alcanzó los 5 cm (2-

4 días, dependiendo de la cepa) para evidenciar la actividad enzimática. El revelado se realizó inundando las placas con solución de Lugol ( $I_2/KI$ ) durante 5 minutos y enjuagando posteriormente con agua destilada. La degradación de xilano alrededor de las colonias aparece como un área de color amarillo opaco contra un color azul púrpura/rojizo de xilano no degradado. Una reacción positiva indica la degradación del sustrato por endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas. Se clasificó la actividad enzimática por la intensidad de la coloración y el diámetro del halo, usando la siguiente escala: clase 1 = Alta actividad enzimática, diámetro del halo 4.1 – 5.5 cm, clase 2 = Actividad enzimática intermedia, diámetro del halo 2.1 – 4.0 cm, clase 3 = Actividad enzimática baja, diámetro del halo 0 - 2 cm.

#### *Protocolo para la detección de proteasas*

Para detectar la actividad proteolítica se utilizó el método de Hankin y Anagnostakis (1975) empleando gelatina de piel porcina (Sigma, USA) 0.4 % como sustrato de proteína y agar 1.6% a pH 6. El medio se esterilizó a 121 °C (15 lbf/in<sup>2</sup>) por 15 min y se dispensó en placas de Petri de 9 cm de diámetro, inoculándose en el centro de la placa con cilíndricos de 6 mm de diámetro tomados del borde de colonias en crecimiento activo de los distintos aislados de *Trichoderma* spp. cultivados en MMV (ver Capítulo 1). Se incubó a 28 °C durante 1 a 2 días, dependiendo de la cepa, hasta que la colonia alcanzó 30 mm de diámetro. Como agente revelador se utilizó una solución saturada de sulfato de amonio, la cual precipita la proteína no degradada opacando el medio de cultivo, observándose una zona clara alrededor de la colonia debida a la hidrólisis de proteína, en donde no hubo precipitación. Se clasificó la actividad enzimática por el diámetro del halo, de acuerdo a la siguiente escala: clase 1 = Alta actividad enzimática, diámetro del halo 2.1 – 3.0 cm, clase 2 = Actividad enzimática intermedia, diámetro del halo 1.1 – 2.0 cm, clase 3 = Actividad enzimática baja, diámetro del halo 0 - 1 cm.

## **RESULTADOS**

### **Detección de actividad de celulasa extracelular**

De acuerdo a la escala de actividad enzimática utilizada se evidenciaron cepas

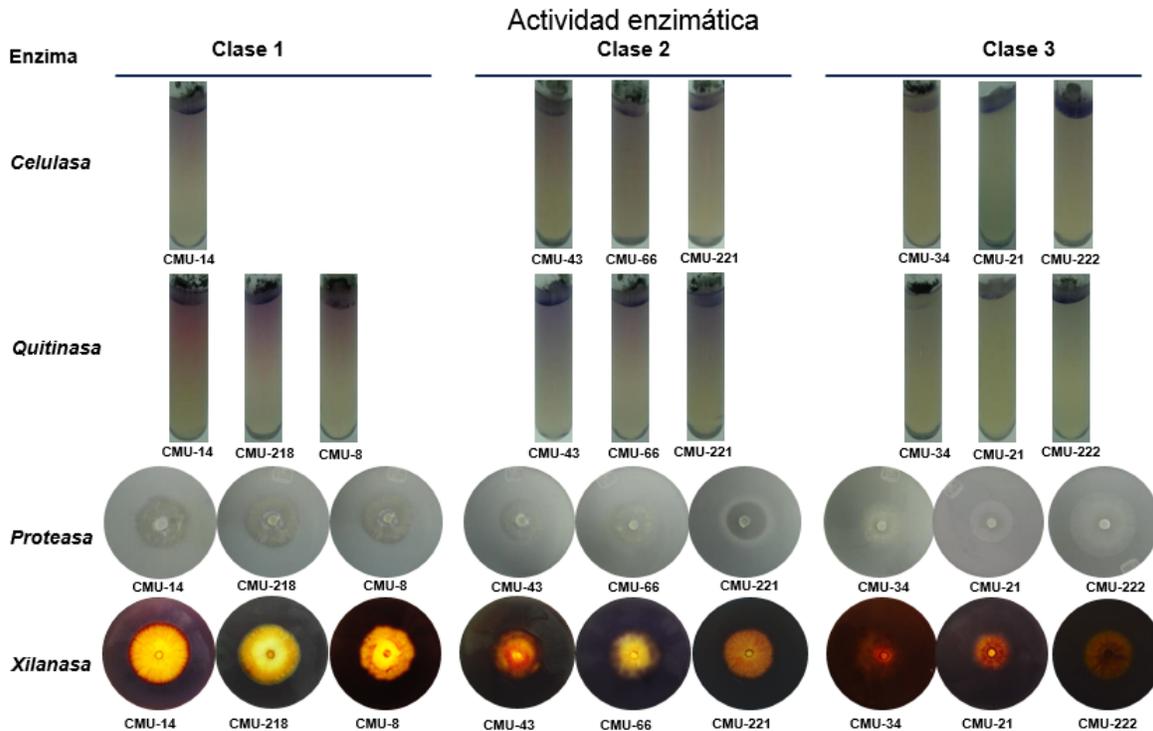
en clase 1 (4%), clase 2 (43%) y clase 3 (53%), de las 23 cepas silvestres analizadas (Tabla 1). En el caso de las cepas de *T. harzianum* se observó variabilidad intraespecífica, presentando 5 cepas (35.7%) actividad intermedia y el resto con actividad baja. Solo la especie *T. atroviride* (CMU-8) presentó el mayor nivel de actividad.

#### **Detección de quitinasa extracelular**

En los ensayos de detección de actividad enzimática de quitinasa extracelular 17% de las cepas presentaron el nivel 1, 48% el nivel 2 y un 35% el nivel 3 (Tabla 1). Para el caso de las cepas de *T. harzianum*, un 14.3% de éstas presentó el nivel más alto de producción enzimática, el 35.7% presentaron el nivel más bajo, y el resto (50%) el nivel intermedio.

#### **Detección de actividad de xilanasas extracelular**

Para esta actividad enzimática se encontró que un 74% de las 23 cepas analizadas mostraron el nivel 1, un 21.7% el nivel 2 y el 4.3 % el nivel 3 (Tabla 1). En este caso la mayoría (64.3%) de las cepas de *T. harzianum* mostraron altos niveles de producción enzimática, ubicándose en el nivel 1. Solo una de las cepas (CMU-51) mostró el nivel 3. Salvo esta cepa, todas las cepas del resto de especies evaluadas presentaron niveles intermedios y altos de producción de xilanasas, también se observaron niveles mayores de producción de esta enzima que la cepa de referencia IMI de *T. atroviride* por cepas de *T. harzianum* (CMU-14, CMU-18 y CMU-19).



**Figura 1. Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas de *Trichoderma* spp.** En el caso de los ensayos de celulasa y quitinasa se consideró la cantidad de colorante azul liberada al medio base. Para los ensayos de producción de proteasa se consideró el diámetro del halo blanco alrededor de la colonia. El indicio de actividad de xilanasa fue la presencia y extensión del halo amarillo en el medio de cultivo. En la parte inferior de cada imagen se muestra la clave de cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. y a la izquierda se especifica la actividad enzimática evaluada en cada línea. Se muestran solo algunos resultados representativos de cada actividad. Ver Materiales y Métodos para detalles.

### Detección de actividad de proteasa extracelular

En el caso de la actividad de proteasa extracelular, el 57% de las cepas mostraron el nivel 1, 13% el nivel 2 y 30% el nivel 3 (Tabla 1). Aproximadamente el 64.2% de las cepas de *T. harzianum* presentaron el mayor nivel de producción de proteasa, solo una de las cepas (CMU-90) presentó el nivel intermedio y el resto (28.6%) mostraron el nivel más bajo de producción. Las cepas de *T. atroviride*, *T. gamsii* y CMU-222 de *T. tomentosum* también presentaron niveles de actividad proteolítica baja.

**Tabla 1.** Niveles de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas de *Trichoderma* spp.

Especie/cepa	Actividad enzimática <sup>1</sup>			
	Celulasa	Quitinasa	Proteasa	Xilanasas
<i>T. harzianum</i>				
CMU-1	2	2	3 (0.0)	2 (3.8)
CMU-14	2	3	1 (2.4)	1 (4.5)
CMU-16	3	3	1 (2.3)	1 (5.0)
CMU-18	3	2	1 (2.8)	1 (5.0)
CMU-19	2	2	1 (2.8)	1 (5.2)
CMU-23	3	3	1 (2.6)	1 (4.3)
CMU-25	3	2	1 (2.7)	1 (4.2)
CMU-34	2	2	1 (2.7)	2 (4.0)
CMU-43	3	2	3 (0.8)	1 (4.3)
CMU-44	2	3	3 (0.0)	2 (3.2)
CMU-51	3	1	3 (0.0)	2 (2.2)
CMU-90	3	2	2 (2.0)	1 (4.9)
CMU-181	3	1	1 (2.3)	2 (4.0)
CMU-183	3	3	1 (2.9)	1 (4.2)
<i>T. atroviride</i>				
CMU-8	1	2	3 (0.0)	1 (5.0)
<i>T. gamsii</i>				
CMU-21	2	3	3 (0.0)	1 (4.8)
<i>T. olivascens</i>				
CMU-66	2	2	1 (2.8)	1 (4.3)
<i>T. trixiae</i>				
CMU-231	3	1	1 (2.5)	2 (4.0)
<i>T. viridialbum</i>				
CMU-236	2	2	2 (2.0)	1 (4.2)
<i>T. viride</i>				
CMU-218	2	1	1 (2.6)	1 (4.4)
<i>T. tomentosum</i>				
CMU-221	3	3	1 (2.9)	1 (4.6)
CMU-222	3	3	3 (0.0)	1 (4.1)
<i>T. koningii</i>				
CMU-234	2	2	2 (1.1)	1 (5.0)
Control	3	3	3 (0.0)	3 (0.0)

<sup>1</sup> Para las actividades de celulasa y quitinasa las clases se definieron por la intensidad de color liberada al medio basal en el tubo de prueba: clase 1, actividad enzimática alta, presentando color violeta en el tubo; clase 2, actividad enzimática intermedia, presentando color azul claro en el tubo; clase 3, actividad enzimática baja, sin cambio de coloración en el tubo. Para xilanasas las clases se determinaron por el diámetro del halo amarillo: clase 1, actividad enzimática alta, diámetro del halo 4.1-5.5 cm; clase 2, Actividad enzimática intermedia, diámetro del halo 2.1-4.0 cm; clase 3, actividad enzimática baja, diámetro del halo 0-2 cm. Para la actividad de proteasa las clases se definieron por el diámetro del halo (blanco) de hidrólisis de la gelatina: clase 1, actividad enzimática alta, diámetro del halo 2.1-3.0 cm; clase 2, actividad enzimática intermedia, diámetro del halo 1.1-2.0 cm; clase 3, actividad enzimática baja, diámetro del halo 0-1 cm. En la escala de color, actividades enzimáticas altas se muestran en recuadros color gris oscuro, actividad intermedia en cuadros color gris claro y baja actividad en cuadros color blanco. En los resultados de las actividades de proteasa y xilanasas aparece entre paréntesis el diámetro de los halos. Ver Figura 1 y Materiales y Métodos para detalles.

## DISCUSIÓN

En este apartado del trabajo se analizó la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares relacionadas con la degradación de polímeros de la pared celular de hongos y de plantas. En general, de acuerdo con trabajos realizados previamente en el análisis de cepas silvestres de diferentes especies de *Trichoderma* spp. de diversas regiones geográficas, los resultados mostraron una gran variación inter e intraespecífica en la producción de las actividades enzimáticas evaluadas.

En relación a la producción de celulasa, la mayoría de las cepas estudiadas mostraron bajo nivel de actividad en las condiciones de incubación y detección

utilizadas. La cepa que mostró el mayor nivel de actividad celulolítica ha sido identificada previamente como *T. atroviride* (CMU-8). Este resultado es congruente con la evidencia genómica que muestra que dicha especie produce, al igual que *T. virens*, más actividad celulolítica que *T. reesei*, a pesar de que este último es considerado saprófito y los dos primeros micoparásitos (Schmoll *et al.*, 2016). Esto no obstante que el número de genes de celulasa y xilanasa no es significativamente distinto entre las tres especies. La actividad evidenciada en el ensayo utilizado en el presente trabajo no es capaz de distinguir entre las distintas actividades enzimáticas asociadas a la degradación de celulosa, como exo- $\beta$ -1,4 glucanasas, endo- $\beta$ -1,4 glucanasas,  $\beta$ -Glucosidasas, entre otras, por lo que a futuro sería interesante explorar en mayor detalle la capacidad de la cepa CMU-8 para producir y secretar este tipo de enzimas en diferentes condiciones de cultivo.

No todos los estudios concuerdan con el resultado aquí obtenido, ya que previamente se ha descrito que cepas silvestres del complejo *T. viridescens*, que incluye entre otras a *T. atroviride*, *T. koningiopsis* y *T. viride*, son pobres productoras de celulasa extracelular; en contraste con cepas de *T. gamsii* y *T. longibrachiatum* que fueron las mejores productoras de dicha actividad enzimática, y de *T. koningii* y *T. citrinoviride* (del complejo *T. harzianum*), evaluadas como productoras moderadas (Błaszczuk *et al.*, 2015). Por otra parte, las cepas de *T. gamsii* (CMU-21) y *T. koningii* (CMU-234) mostraron un nivel intermedio o moderado de actividad celulolítica, concordando el resultado de esta última cepa con el análisis previamente citado, no así el de la primera. Por lo anterior, parece evidente que no todas las cepas silvestres de *T. atroviride* parecen coincidir con el análisis genómico de la cepa de referencia, en relación a la capacidad para producir actividad de celulasa.

En el caso de algunas de las especies aquí evaluadas, son escasos los antecedentes en la literatura para realizar comparaciones, debido en parte al hecho de que estas son de reciente descripción. Por ejemplo, las especies *T. trixiae* (CMU-231), *T. olivascens* (CMU-66) y *T. viridialbum* (CMU-236) fueron descritas recientemente como parte del complejo *T. viridescens* (Jaklitsch *et al.*, 2013). El único análisis previo de las especies del complejo en cuanto a la producción de celulasas describe a *T. trixiae*, y en general las especies del complejo *T. viridescens*,

como malas productoras de actividad de celulasa, en comparación con cepas silvestres de otras especies del género (Błaszczuk *et al.*, 2015). Estas tres especies han sido aisladas de madera y corteza en descomposición de distintas especies arbóreas, por lo que son consideradas de hábitos saprófitos, aunque se ha propuesto que *T. trixiae* puede ser fungícola (Jaklitsch *et al.*, 2013). Por lo anterior, parece contradictorio de acuerdo al hábitat identificado en las especies tipo, que dichas cepas tengan baja actividad celulolítica, lo que hace interesante evaluar las cepas de estas especies en otras condiciones de cultivo, con la finalidad de explorar la posibilidad de que produzcan actividad celulolítica.

Todavía es incipiente la cantidad de genomas cerrados con las que se cuenta dentro del género y, aun más, de genomas de la misma especie para comparaciones intra-específicas, por lo que el posible origen genético de dichas variaciones entre cepas de *T. atroviride*, y otras especies del género, esta por dilucidarse. Sin embargo, una aproximación genético-bioinformática que permite evaluar el potencial celulolítico de algunas de las especies aquí estudiadas es el número de genes que codifican para enzimas relacionadas con la hidrólisis de celulosa (incluidas endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glicosidasas) reportados en el Genbank. En ese sentido *T. viride* tiene el máximo de genes celulolíticos reportados, con 19, seguida de *T. harzianum* con 10 y de *T. koningii* con 4 (Strakowska *et al.*, 2014). Al igual que en el caso de las incongruencias entre estudios comentadas para *T. atroviride*, los resultados del presente trabajo no parecen correlacionar completamente con dicha abundancia de genes, ya que la cepa de *T. viride* (CMU-218) aquí analizada mostró un nivel intermedio de actividad de celulasa; no obstante, la cepa de *T. koningii* (CMU-234) mostró también un nivel intermedio de producción de celulasa, en congruencia con el bajo número de genes para dicha actividad reportados para esta especie en el Genbank.

En contraste con la actividad de celulasa, la mayoría de las cepas de estudio mostraron una alta actividad de xilanasa, siendo algunas cepas de *T. harzianum*, particularmente CMU-51, y la única cepa de *T. trixiae*, las peores productoras de dicha actividad. En general, estos resultados concuerdan con análisis previos que no muestran diferencias significativas en la actividad de xilanasa entre cepas de *T.*

*atroviride*, *T. gamsii*, *T. koningii* y *T. harzianum* (Błaszczuk *et al.*, 2015). Sin embargo, el presente trabajo muestra además variabilidad intraespecífica en el caso de la última especie.

La actividad extracelular de proteasa fue la que mayor variabilidad intra e interespecífica mostró entre las cepas analizadas. Así, mientras que algunas cepas de *T. harzianum* mostraron el mayor nivel de producción, otras mostraron el nivel más bajo. Cepas de *T. harzianum* de otras regiones geográficas han sido reportadas como buenas productoras de proteasas (Consolo *et al.*, 2012; Kamala *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2016) y la amplia variación en actividad proteolítica entre cepas silvestres de este taxón ha sido previamente observada (Consolo *et al.*, 2012; Islam *et al.*, 2016). Las cepas de las especies *T. viride* (CMU-219) y *T. tomentosum* (CMU-221) también mostraron alto nivel de proteasa. Análisis de otras cepas silvestres concuerda con el resultado de la primera, pero no de la segunda especie (Kamala *et al.*, 2015). Por otra parte, este es el primer reporte en el que se documenta que especies del complejo *T. viridescens*, como *T. trixiae* (CMU-231) y *T. olivascens* (CMU-66), pueden ser buenas productoras de actividad proteolítica extracelular.

Respecto a la actividad de quitinasa, cuatro cepas mostraron el nivel más alto de producción, dos de ellas de *T. harzianum* (CMU-51 y CMU-181), y las cepas de *T. trixiae* (CMU-231) y *T. viride* (CMU-218). Al igual que en los casos del resto de actividades enzimáticas estudiadas, las cepas de *T. harzianum* mostraron diversidad, ya que también hubo cepas con actividad intermedia y baja. Análisis previos de cepas silvestres también presentan a cepas de *T. harzianum* (Consolo *et al.*, 2012; John *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2016) como buenas productoras de actividad quitinolítica, junto con cepas de *T. viride/H. rufa* (Gajera y Vakharia, 2010; Kamala *et al.*, 2015). Como se comentó anteriormente para las otras actividades enzimáticas, todavía es escasa la información respecto a la capacidad de cepas de *T. trixiae* para producir enzimas hidrolíticas, incluida la actividad de proteasa. Por lo anterior, el presente estudio representa el primer reporte de este taxón en relación a su capacidad para producir proteasas extracelulares. Las dos cepas de *T. tomentosum* (CMU-221, CMU-222) evaluadas se mostraron como malas productoras de proteasas, en contraste con estudios previos que muestran cepas de esta especie

entre las mejores productoras de dicha actividad enzimática (Kamala *et al.*, 2015). No obstante, la producción media a mala de *T. koningii* (CMU-234) si es congruente con reportes previos (Kamala *et al.*, 2015), en algunos casos acompañada de alta variación intraespecífica en dicha especie (Worasatit *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que la gran variación intra e interespecífica en la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de *Trichoderma* spp. puede deberse por la complejidad de los sistemas regulatorios que participan en la expresión de genes relacionados con dichas actividades enzimáticas, los cuales aun en variantes geográficas de la misma especie pueden estar sujetos a diferentes velocidades de evolución y adaptación, debido a distintas condiciones de presión selectiva (Lopes *et al.*, 2012).

La relación entre la capacidad antagónica contra microorganismos fitopatógenos (ver capítulo 1) y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas en el presente trabajo, no es del todo clara. Por una parte, la cepa de *T. viride* (CMU-218) fue una de las mejores antagonistas y, salvo la actividad de celulasa, muestra el nivel más alto en la producción de enzimas hidrolíticas. Mientras que la cepa de *T. atroviride* (CMU-8), que presentó los mismos niveles de antagonismo que *T. viride*, es mala productora de proteasas y productora intermedia de quitinasas. Adicionalmente, las cepas de *T. harzianum* que presentaron los mejores niveles de antagonismo (CMU-14, CMU-16 y CMU-90), mostraron alta actividad de xilanasas y proteasas, pero no de las otras dos enzimas hidrolíticas. Por último, aunque *T. trixiae* (CMU-231) no mostró el nivel más alto de antagonismo contra *F. mexicanum*, si presentó el nivel más alto contra el resto de fitopatógenos, así como el nivel más alto de actividad de proteasas y quitinasas.

Por todo lo anterior, puede afirmarse que el presente trabajo es congruente con estudios previos en los que se muestra alta variación intra e interespecífica en la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, y que dicha capacidad es más dependiente de la cepa que de la especie de *Trichoderma*. Lo mismo puede afirmarse para la correlación entre actividad de enzimas hidrolíticas extracelulares y antagonismo contra fitopatógenos. Estos resultados resaltan la importancia de seguir

analizando cepas silvestres de distintas especies de *Trichoderma* provenientes de diferentes sustratos y regiones geográficas, dado que cada colección de cepas analizadas no necesariamente responde con los resultados de estudios previos.

Por último, las cepas CMU-8 de *T. atroviride* y CMU-218 de *T. viride* se perfilan como candidatos ideales para continuar los estudios que lleven a la generación de un producto para su uso agrícola en el estado de Michoacán, como herramienta de biocontrol. Esto debido a su capacidad antagónica y de inhibición de distintos fitopatógenos (ver Capítulo 1) y a la producción de algunas de las enzimas hidrolíticas extracelulares evaluadas.

## Referencias Bibliográficas

- [1] Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E., Llobell, A. (2001). An antifungal exo- $\alpha$ -1, 3-glucanase (AGN13. 1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12): 5833-5839.
- [2] Alamri, S., Hashem, M., Mostafa, Y. S. (2012). In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*. 17(4): 155-167.
- [3] Błaszczyk, L., Strakowska, J., Chełkowski, J., Gąbka-Buszek, A., Kaczmarek, J. (2015). *Trichoderma* species occurring on wood with decay symptoms in mountain forests in Central Europe: genetic and enzymatic characterization. *Journal of Applied Genetics*. 53(3): 397-407.
- [4] Cabero, K., Pozzo, T., Lidén, G., Karlsson, E. N. (2012). A cellulolytic *Hypocrea* strain isolated from South American brave straw produces a modular xylanase. *Carbohydrate Research*. 356: 215-223.
- [5] Consolo, V. F., Mónaco, C. I., Cordo, C. A., Salerno, G. L. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4): 1389-1398.
- [6] Deacon, L. J., Pryce-Miller, E. J., Frankland, J. C., Bainbridge, B. W., Moore, P. D., Robinson, C. H. (2006). Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(1): 7-20.
- [7] de los Santos-Villalobos, S., Guzmán-Ortiz, D. A., Gómez-Lim, M. A., Délano-Frier, J. P., de-Folter, S., Sánchez-García, P., Peña-Cabriales, J. J. (2013). Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control*. 64(1): 37-44.
- [8] Djonović, S., Vittone, G., Mendoza-Herrera, A., Kenerley, C. M. (2007). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6-glucanase genes. *Molecular Plant Pathology*. 8(4): 469-480.

- [9] dos Reis Almeida, F. B., Cerqueira, F. M., do Nascimento Silva, R., Ulhoa, C. J., Lima, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 29(8): 1189-1193.
- [10] Elad, Y., Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 105(2): 177-189.
- [11] El-Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A., Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathology Journal*. 31(1): 50-60.
- [12] Florencio, C., Couri, S., Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*. 1-7.
- [13] Gajera, H. P., Vakharia, D. N. (2010). Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74(3): 274-282.
- [14] Geraldine, A. M., Lopes, F. A. C., Carvalho, D. D. C., Barbosa, E. T., Rodrigues, A. R., Brandão, R. S., Ulhoa, C. J., Junior, M. L. (2013). Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*. 67(3): 308-316.
- [15] Guigón-López, C., Vargas-Albores, F., Guerrero-Prieto, V., Ruocco, M., Lorito, M. (2015). Changes in *Trichoderma asperellum* enzyme expression during parasitism of the cotton root rot pathogen *Phymatotrichopsis omnivora*. *Fungal Biology*. 119(4): 264-273.
- [16] Gusakov, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol*. 29(9): 419-425.
- [17] Hankin, L., Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*. 67(3): 597-607.
- [18] Inglis, G. D., Kawchuk, L. M. (2002). Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 48(1): 60-70.

- [19] Islam, M. M., Hossain, D. M., Rahman, M. M. E., Suzuki, K., Narisawa, T., Hossain, I., Meah, M. B., Nonaka, M., Harada, N. (2016). Native *Trichoderma* strains isolated from Bangladesh with broad spectrum antifungal action against fungal phytopathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 49(1-4): 75-93.
- [20] Jaklitsch, W. M., Samuels, G., Ismaiel, A., Voglmayr, H. (2013). Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 31(1): 112-146.
- [21] Jiang, X., Geng, A., He, N., Li, Q. (2011). New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111(2): 121-127.
- [22] John, N. S., Anjanadevi, I. P., Nath, V. S., Sankar, S. A., Jeeva, M. L., John, K. S., Misra, R. S. (2015). Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus*—A polyphasic approach. *Biological Control*. 90: 164-172.
- [23] Kamala, T., Devi, S. I., Sharma, K. C., Kennedy, K. (2015). Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. *BioMed Research International*. 1-21.
- [24] Kubicek, C. P. (2013). Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Journal of biotechnology* 163(2): 133-142.
- [25] Limón, M. C., Pintor-Toro, J. A., Benítez, T. (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology*. 89(3): 254-261.
- [26] Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandão, R. S., Monteiro, V. N., Júnior, M. L., Coelho A. S. G., Ulhoa C. J., Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*. 116(7): 815-824.

- [27] Monteiro, V. N., do Nascimento Silva, R., Steindorff, A. S., Costa, F. T., Noronha, E. F., Ricart, C. A. O., de Sousa, M. V., Vainstein M. H., Ulhoa, C. J. (2010). New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current Microbiology*. 61(4): 298-305.
- [28] Pointing, S. B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*. 2: 17-33.
- [29] Pozo, M. J., Baek, J. M., Garcia, J. M., Kenerley, C. M. (2004). Functional analysis of tvsp1, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics and Biology*. 41(3): 336-348.
- [30] Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandao, R. S., Jesuino, R. S. A., Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 35(9): 1461-1468.
- [31] Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., Hermosa, R., Monte, E. (2004). Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current Genetics*. 46(5): 277-286.
- [32] Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villasenor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Aleman, M. I., Baker, S. E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M. G., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G. R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E. U., Frischmann, A., Gallardo-Negrete J. J., Garcia-Esquivel, M., Gomez-Rodriguez, E. Y., Greenwood, D. R., Hernandez-Onate, M., Kruszewska, J. S., Lawry, R., Mora-Montes, H. M., Munoz-Centeno, T., Nieto-Jacobo, M. F., Nogueira Lopez, G., Olmedo-Monfil, V., Osorio-Concepcion, M., Pilsyk, S., Pomraning, K. R., Rodriguez-Iglesias, A., Rosales-Saavedra, M. T., Sanchez-Arreguin, J. A., Seidl-Seiboth, V., Stewart, A., Uresti-Rivera, E. E., Wang, C. L., Wang, T. F., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Herrera-Estrella, A. (2016). The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1): 205-327.

- [33] Simonis, J. L., Raja, H. A., Shearer, C. A. (2008). Extracellular enzymes and soft rot decay: Are ascomycetes important degraders in fresh water. *Fungal Diversity*. 31(1): 135-146.
- [34] Sreenivasaprasad, S., Manibhushanrao, K. (1990). Antagonistic potential of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* to phytopathogenic fungi. *Mycopathologia*. 109(1): 19-26.
- [35] Strakowska, J., Błaszczyk, L., Chełkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *Journal of Basic Microbiology*. 54(1): 2-13.
- [36] Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65(1): 46-55.
- [37] Thangavelu, R., Gopi, M. (2015). Combined application of native *Trichoderma* isolates possessing multiple functions for the control of *Fusarium* wilt disease in banana cv. Grand Naine. *Biocontrol Science and Technology*. 25(10): 1147-1164.
- [38] Torres, J. M. O., de la Cruz, T. E. E. (2013). Production of xylanases by mangrove fungi from the Philippines and their application in enzymatic pretreatment of recycled paper pulps. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(4): 645-655.
- [39] Troian, R. F., Steindorff, A. S., Ramada, M. H. S., Arruda, W., Ulhoa, C. J. (2014). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*. 36(10): 2095-2101.
- [40] Witkowska, D., Maj, A. (2002). Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica*. 47(3): 279-282.
- [41] Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Rowland, C. (1994). Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*. 98(12): 1357-1363.

### CAPÍTULO 3

#### DIVERSIDAD GENÉTICA EN CEPAS SILVESTRES DE *Trichoderma harzianum*

##### RESUMEN

Se evaluó la diversidad genética de 14 cepas de *T. harzianum* empleando seis iniciadores para la amplificación de regiones de ADN comprendidas entre secuencias repetitivas simples (*inter simple sequence repeat*, ISSR), dos universales para la generación de huellas genéticas (*universal primers*, UP-PCR) y tres para la amplificación de elementos repetitivos (rep-PCR). Los iniciadores UP-PCR no generaron productos de amplificación en todas las cepas, por lo que no se utilizaron en el análisis. Cuatro de los iniciadores ISSR y los tres de rep-PCR generaron patrones de bandeo complejos en todas las cepas analizadas. Dichos iniciadores mostraron polimorfismos entre las cepas de estudio y permitieron la construcción de dendrogramas, los cuales en todos los casos generaron cuatro genotipos principales, apareciendo genéticamente distinta la cepa CMU-1 aislada de Atécuaro, la cual no se agrupó con otras cepas del mismo sitio de procedencia. Las cepas CMU-90 (Atécuaro), CMU-51 (Pátzcuaro), se agruparon en la mayoría de los dendrogramas junto con CMU-14 (Charo) y CMU-16 (Charo). Las cepas CMU-181 y CMU-183 de Atécuaro, permanecieron agrupadas en la mayoría de los dendrogramas; al igual que las cepas CMU-23 y CMU-25 de Ciudad Hidalgo. Los resultados indican que existe flujo genético de cepas del complejo *T. harzianum* entre las localidades de procedencia. Las causas de la variación genética de las cepas analizadas se desconocen, pero es posible que los marcadores utilizados estén separando a las cepas de estudio entre especies crípticas del complejo *T. harzianum*. Los marcadores empleados son útiles en para la diferenciación genética de *T. harzianum*, pero deben de incluirse más cepas de cada uno de los sitios de muestreo, con la finalidad de establecer de manera más precisa la estructura de la población y encontrar marcadores asociados a potencial para el biocontrol.

## INTRODUCCIÓN

La tipificación se define como el análisis fenotípico o genotípico de aislados por debajo del nivel taxonómico de especie, el cual se realiza con la finalidad de generar conjuntos de datos o huellas (*fingerprint*) específicas de una cepa o clona (van Belkum *et al.*, 2007). La tipificación de una cepa fúngica también ha sido establecida como la habilidad para identificar a dicha cepa a nivel de especie y de discriminarla entre individuos dentro de una misma especie (Taylor *et al.*, 1999). Los métodos de tipificación pueden basarse en características fenotípicas o genotípicas, siendo en este último caso denominada genotipificación o tipificación genética. Para los fines de este apartado del trabajo, las técnicas de tipificación fenotípica no serán abordadas.

La diversidad genética entre cepas de *T. harzianum* mediante técnicas moleculares se ha determinado empleando diferentes marcadores y con diferentes fines. Los primeros marcadores de tipificación molecular aplicados para el estudio de diversidad genética intraespecífica en hongos fueron los patrones de aloenzimas, análisis denominado MLEE (*MultiLocus Enzyme Electrophoresis*) (Taylor *et al.*, 1999; Schlötterer, 2004; Gil-Lamaignere *et al.*, 2003). El principio básico de dicha técnica es que se pueden distinguir variantes (alelos) de enzimas mediante electroforesis en geles nativos debido a las diferencias en tamaño y carga ocasionadas por sustituciones de aminoácidos; diferentes actividades enzimáticas son reveladas mediante tinciones específicas en el gel (Taylor *et al.*, 1999). Esta técnica ha sido empleada principalmente para diferenciar entre especies de *Trichoderma* (Stasz *et al.*, 1988; Siddiquee *et al.*, 2007; Kredics *et al.*, 2012) y para evaluar la diversidad de cepas de *T. harzianum* (Zamir *et al.*, 1985; Siddiquee *et al.*, 2007; Kredics *et al.*, 2012). En particular, la técnica ha tenido relevancia para la identificación de cepas de *Trichoderma* de interés clínico, relacionadas con infecciones en humanos (Szekeres *et al.*, 2006).

Uno de los primeros métodos de diferenciación entre cepas fúngicas mediante el análisis del ADN fue el establecimiento de cariotipos mediante la separación de cromosomas en electroforesis de campos pulsados (PFGE, *Pulse Field Gel Electrophoresis*) (Taylor *et al.*, 1999; Gil-Lamaignere *et al.*, 2003). En esta técnica,

los cromosomas de las cepas de estudio se separan en geles de agarosa sobre lo que se cambia cada determinado tiempo la orientación del campo eléctrico aplicado, y los patrones revelan tanto el número de cromosomas de cada cepa como las diferencias en los tamaños de estos. En el caso de *Trichoderma* spp., la técnica se aplicó en la década de 1990-2000 para localizar genes en cromosomas específicos (Carter *et al.*, 1993; Herrera-Estrella *et al.*, 1993). En términos de tipificación, se utilizó para diferenciar entre especies y establecer hipótesis evolutivas (Herrera-Estrella *et al.*, 1993), así como para diferenciar cepas en *T. reesei* (Mäntylä *et al.*, 1992) y *T. harzianum* (Gómez *et al.*, 1997).

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) fue también de los primeros métodos genético-moleculares utilizados para evaluar diferencias inter e intraespecíficas en hongos (Taylor *et al.*, 1999; Gil-Lamaignere *et al.*, 2003), en un inicio realizando la restricción directa del ADN de las cepas y la posterior identificación de variantes mediante una sonda de prueba en ensayos de hibridación Southern; posteriormente las variantes fueron analizadas a partir de la restricción de productos de amplificación obtenidos mediante PCR. En *Trichoderma* spp., la primera variante de este ensayo se utilizó para resolver conflictos en la diferenciación entre especies (Meyer *et al.*, 1992; Bowen *et al.*, 1996) y para diferenciar entre genotipos de una misma especie, incluidas cepas de *T. harzianum* (Muthumeenaksh *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 1996). La aproximación RFLP mediante PCR (RFLP-PCR) ha sido empleada desde hace varios años principalmente para distinguir entre especies de *Trichoderma* (Hermosa *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2005; Latha *et al.*, 2002; Lieckfeldt *et al.*, 2009), más que para analizar variación intraespecífica.

Además de la técnica de RFLP-PCR anteriormente mencionada, la introducción del ensayo de PCR permitió el uso de una gran variedad de técnicas de tipificación y diferenciación genética inter e intraespecífica en hongos. Entre las técnicas basadas en PCR que se han utilizado por muchos años se encuentran la amplificación al azar de regiones polimórficas de ADN, la cual ha recibido distintos nombres, siendo los más comunes el ensayo RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) y el AP (*Arbitrary Primer-PCR*) (Welsh y McClelland, 1990;

Williams *et al.*, 1990). Una variante de este ensayo es la UP-PCR (*Universally Primed-PCR*), en la cual se utilizan iniciadores de mayor longitud que la de los ensayos RAPD y temperaturas de alineamiento más altas (Bulat *et al.*, 1998). El ensayo RAPD se puede agrupar con otras técnicas para el análisis de variación genética intraespecífica en hongos que se basan en la PCR y generan múltiples productos de amplificación, los cuales pueden ser analizados en geles de agarosa. Estas otras técnicas incluyen la amplificación de regiones delimitadas por elementos repetitivos simples tipo microsatélites (ISSRs, *Inter-Simple Sequence- Repeats*) (Zietkiewicz, 1994), la detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLPs, *Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Vos *et al.*, 1995) y la amplificación de elementos repetitivos rep-PCR (BOX, REP y ERIC), esta última originalmente diseñada para bacterias (Versalovic *et al.*, 1994).

La amplificación de regiones al azar, ya sea mediante RAPD o AP, ha sido utilizada para distinguir cepas de *T. harzianum* de otras especies del género (Maymon *et al.*, 2004; Shanmugam *et al.*, 2008; López-Mondéjar *et al.*, 2011) y evaluar diversidad genética intraespecífica (Sharma *et al.*, 2009; López-Mondéjar *et al.*, 2011). El análisis RAPD también mostró que distintos genotipos de *T. harzianum* pueden coexistir en un mismo hábitat, revelando la gran variación genética de la especie dentro de una misma población (Wuczowski *et al.*, 2003). Los marcadores RAPD se han usado en combinación con cariotipos para diferenciar genotipos entre cepas de *T. harzianum sensu lato* (Gómez *et al.*, 1997). Además de su empleo en estudios de diversidad y diferenciación de cepas de *Trichoderma* spp., la técnica RAPD se conserva como una herramienta para la generación de SCARs (*sequence-characterized amplified region*) que permiten el diseño de iniciadores específicos de cepa dentro de *T. harzianum*, los cuales pueden ser empleados para la identificación de aislados de la cepa, o para el seguimiento de estos en campo (Chen *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2005; Naeimi *et al.*, 2011). Este tipo de estudios es importante para evaluar la persistencia de una cepa biocontroladora en suelo una vez que se aplica, y por lo tanto la necesidad de volver a aplicar o no el producto. En el caso de cepas de *T. harzianum* que atacan cultivos de champiñón (*Agaricus bisporus*), la generación de SCARs permite distinguir biotipos particularmente agresivos y difíciles de

erradicar (Chen *et al.*, 1999). La amplificación mediante UP-PCR ha sido utilizada como herramienta para ayudar a resolver conflictos taxonómicos en el género *Trichoderma* (Bulat *et al.*, 1998), identificar cepas dentro del género (Lübeck *et al.*, 2000; Cumagun *et al.*, 2000) y diferenciar genotipos dentro de *T. harzianum* (Lübeck *et al.*, 1999; Cumagun *et al.*, 2000).

Las técnicas de tipificación mediante AFLP y rep-PCR han sido utilizadas en diferentes especies de hongos (Toda *et al.*, 1999; Vanhee *et al.*, 2010), particularmente patógenos de humanos y de plantas, sin embargo, no han sido utilizadas ampliamente en especies del género *Trichoderma*. Patrones de agrupamiento obtenidos mediante AFLPs permiten evaluar la diversidad genética intraespecífica de distintas especies de *Trichoderma* (de Souza *et al.*, 2006; John *et al.*, 2015) y para diferenciar cepas de *T. harzianum* de otras especies del género (Buhariwalla *et al.*, 2005; Vahabi *et al.*, 2009; Nath *et al.*, 2014; John *et al.*, 2015). Este marcador de tipificación ha permitido identificar cepas de *T. harzianum* aplicadas en campo para biocontrol y diferenciarlas de las cepas nativas; las cepas biocontroladoras aplicadas son recuperadas por aislamiento y cultivo para conocer su tiempo de permanencia en suelo (Avila-Miranda *et al.*, 2006). En cuanto a la técnica de tipificación por rep-PCR, el ensayo BOX ha sido útil para diferenciar entre cepas de *T. viride* y *T. reesei* (Grosch *et al.*, 2006) y diversidad intraespecífica en *T. harzianum* (Hassan *et al.*, 2014), en esta última especie también se ha comprobado la utilidad de los ensayos REP y ERIC como método de tipificación (Hassan *et al.*, 2014).

Los marcadores ISSR son capaces de separar y agrupar cepas de *T. harzianum* de cepas de otras especies del género (Consolo *et al.*, 2012) y de revelar la diversidad intraespecífica de *T. harzianum* (Hassan *et al.*, 2014; Stocco *et al.*, 2016). El ensayo ISSR ha sido también aplicado para evaluar la estabilidad genética de cepas de *T. harzianum* y de otras especies del género durante el proceso de criopreservación (Broughton *et al.*, 2012). Una de las características del ensayo PCR, es una mayor reproducibilidad que los ensayos RAPD, debido a las temperaturas de alineamiento más altas (Nybom *et al.*, 2014), algo que comparte con los ensayos rep-PCR.

El análisis de microsatélites o secuencias repetitivas simples (*SSR, Simple Sequence Repeats*) se ha introducido en la última década como una herramienta importante para la diferenciación entre cepas y el análisis poblacional de hongos (Araujo, 2014; Dutech *et al.*, 2007). Los microsatélites son repeticiones de secuencias cortas de entre 2 a 6 nucleótidos en longitud, que se encuentran a lo largo del genoma eucariótico (Li *et al.*, 2002). En esta técnica, a diferencia de todas las anteriormente mencionadas, es necesario conocer *a priori* las características de las regiones genéticas que se desean amplificar, lo cual es esencial para el diseño de iniciadores (Dutech *et al.*, 2007). Otra de las características de los marcadores SSR es que son co-dominantes, es decir los alelos alternativos se pueden analizar en cada individuo y población, debido a las diferencias en el tamaño de los amplicones entre los individuos analizados. Esto contrasta con los marcadores mencionados anteriormente, salvo MLEE y cariotipo, lo cuales son marcadores dominantes, ya que solo se puede diferenciar entre ausencia y presencia de bandas, sin que la ausencia sea un alelo real. En el caso de los AFLPs, se han desarrollado métodos de análisis para trabajarlos como marcadores co-dominantes en el análisis poblacional. Esto porque se pueden analizar en electroferogramas los productos e amplificación marcados con fluorescencia, algo que no es posible para el resto de marcadores mencionados con anterioridad.

De manera interesante, el análisis de SSR para tipificar o diferenciar entre cepas de *Trichoderma* spp. es incipiente. El primer estudio se realizó analizando el genoma de *T. atroviride* para diseñar iniciadores que fueron útiles para diferenciar cepas de diferentes regiones geográficas y para localizar variantes genéticas en la rizósfera (Geistlinger *et al.*, 2015). Un estudio reciente realizó minería de datos sobre los genomas de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. reesei*, y *T. virens* para analizar la abundancia, características y distribución de SSRs en dichas especies (Mahfooz *et al.*, 2016). El análisis permitió el diseño de iniciadores para la amplificación de SSR en las cinco especies y se evaluó su aplicación para el análisis poblacional en *T. atroviride* y *T. harzianum* (Mahfooz *et al.*, 2016). A la fecha, estos dos son los únicos trabajos empleando SSR para la tipificación de *Trichoderma* spp.

Con los avances recientes en secuenciación de genomas, las técnicas de tipificación han evolucionado de patrones de bandeo en geles, como las técnicas descritas en los párrafos anteriores, al análisis de secuencias genéticas y genómicas y se han incorporado también técnicas instrumentales avanzadas. En el análisis de genes se han evaluado diferencias de un solo nucleótido (*SNPs*, *Single Nucleotide Polymorphisms*) en uno o varios genes (*MLSA*, *Multi Locus Sequence Analysis*; *MLST*, *Multi Locus Sequence Typing*), o en genomas completos (Araujo *et al.*, 2014). El uso de hibridación con microarreglos también ha sido una tecnología empleada para la comparación genética entre cepas (Araujo *et al.*, 2014). Por último, en años recientes se ha incrementado la tipificación de hongos mediante una variante de espectrometría de masas con aplicación de láser sobre la muestra denominada MALDI-TOF, por sus siglas en inglés (*MALDI-TOF*, *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) (Araujo, 2014; Singhal *et al.*, 2015), la cual ha sido empleada para discriminar entre especies y entre cepas de *Trichoderma* spp. (De Respinis *et al.*, 2010). La descripción detallada y sus aplicaciones en hongos de dichas técnicas están fuera de los alcances del presente trabajo.

A pesar del rápido avance en las técnicas de análisis genómico y la disponibilidad de marcadores co-dominantes (*SNPs* y microsatélites) derivadas de éste, el uso de marcadores dominantes continúa siendo una herramienta útil en el análisis genético poblacional debido a las ventajas que ofrece. La aplicación de dichos marcadores no necesita del conocimiento previo sobre el genoma de la especie a estudiar, y permite la detección de diferencias intraespecíficas a lo largo de todo el genoma de organismos con diferentes niveles de ploidía. Salvo las variantes técnicas de AFLPs que emplean marcaje con fluorescencia y se analizan mediante electroforesis capilar, las técnicas de *fingerprint* con marcadores dominantes son sencillas y pueden desarrollarse en geles de agarosa y analizarse con equipo básico de biología molecular, lo que los hace una opción de bajo costo para el análisis genético de poblaciones de especies animales y vegetales, así como de microorganismos procarióticos y eucarióticos. La posibilidad de homoplasia en bandas del mismo tamaño y de que algunos de los *loci* no sean neutros, así como la

dificultad para asignar homocigocidad/heterocigocidad, han sido algunas de las principales limitaciones asociadas al uso de marcadores dominantes en estudios de genética de poblaciones, ampliamente documentadas en el caso de los AFLPs. Estas mismas ventajas y limitaciones son aplicables a otros marcadores de características similares como los ISSRs, los ensayos rep-PCR (incluidos BOX, ERIC y REP) y los RAPDs; en este último caso se agrega la falta de reproducibilidad. La combinación entre sí, o con marcadores co-dominantes, permite superar estas desventajas, siendo aplicados al análisis de heterocigocidad, diferenciación genética intra e inter poblacional, migración y dispersión, estructura poblacional, asociaciones genotipo-ambiente, flujo genético, entre otros.

Desde los primeros trabajos de tipificación molecular en *T. harzianum* a la fecha, uno de los objetivos comunes ha sido establecer correlaciones entre un genotipo y un fenotipo determinado o alguna característica de relevancia biotecnológica. Por lo anterior, debido a la diversidad en el antagonismo *in vitro* hacia microorganismos fitopatógenos (Capítulo 1) y en la producción de enzimas hidrolíticas (Capítulo 2), en este apartado del trabajo se planteó el objetivo de analizar la diversidad genética en las cepas de *T. harzianum* de estudio. La intención era conocer el número de genotipos presentes en las cepas de dicha especie aquí estudiadas e identificar la posible relación entre un genotipo particular y las características fenotípicas analizadas en los capítulos anteriores. Para realizar el análisis genéticos se eligieron los marcadores ISSR y UP-PCR, debido a su reproducibilidad, capacidad de diferenciación entre cepas de *Trichoderma* spp. previamente probada, la posibilidad de aplicarlos sin conocimiento previo del genoma de la especies y cepas analizadas, facilidad de desarrollo y posibilidad de interpretación de datos, y por último, su costo relativamente bajo comparado con técnicas de tipificación de mayor reproducibilidad.

Además del interés en establecer relaciones entre genotipo y fenotipo, el desarrollo de un producto de biocontrol para llevar a su comercialización involucra diferentes etapas de un proceso que incluye, entre otras el descubrimiento de una cepa adecuada, la producción en masa y su registro. En el caso de esta última etapa, el registro de una cepa específica requiere que su identidad y estabilidad sean

determinadas con la máxima precisión posible, lo cual es de vital importancia para asegurar la estabilidad genética del producto y para proteger la propiedad intelectual (Avis *et al.*, 2001). Por otra parte, una tipificación adecuada de cepas de *Trichoderma* spp. empleadas en productos de biocontrol permite evaluar su permanencia en campo, lo que es importante para evaluar el tiempo de acción del producto aplicado, y por lo tanto su periodicidad de aplicación (Avila-Miranda *et al.*, 2006).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cepas analizadas**

Se evaluaron las cepas de *H. lixii*/ *T. harzianum* (CMU-1, CMU-14, CMU-16, CMU-23, CMU-25, CMU-43, CMU-51, CMU-90 y CMU-183), de la colección de cepas de interés en el proyecto.

### **Extracción de ADN**

El ADN genómico se extrajo de cultivos en medio sólido agar papa dextrosa (PDA) con 5 días de incubación. Se recuperó el micelio y se congeló con N<sub>2</sub> líquido, se maceró, se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se adicionaron 500 µL buffer de lisis (SDS 0.5%, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.5). Se agregó el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (1:1:1), se agitó en vortex por 1 min y se centrifugó a 1500 g. La fase acuosa se recuperó, se trató con RNAsa (0.5U/ µL a 37 °C por dos horas), se extrajo nuevamente con fenol/cloroformo (1:1), y se centrifugó de la manera previamente descrita; de la fase acuosa recuperada el ADN se precipitó con el mismo volumen de isopropanol frío. La pastilla se lavó con etanol (70%), se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µL de H<sub>2</sub>O destilada desionizada estéril. La integridad del ADN se corroboró en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBER Green (Invitrogen, USA).

### **Ensayos de amplificación mediante PCR**

El ADN genómico de cada una de las cepas de *H. lixii*/ *T. harzianum* se utilizó como molde para la amplificación con distintos oligonucleótidos usados para generar huellas genéticas (*fingerprint*) de hongos mediante la generación de patrones de

bandeo complejos (Tabla 1). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 10  $\mu$ L. Para todas las muestras la concentración de la mezcla de reacción fue la misma: 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0; 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM de cada dNTP; 0.2 mM de oligonucleótido; 0.5 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, USA); 25 ng/ $\mu$ L de ADN; el volumen final se ajustó con H<sub>2</sub>O destilada desionizada estéril a 10  $\mu$ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador de gradiente modelo Veriti (Applied Biosystem, USA) mediante el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 7 min, seguido de 33 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 48 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, corridos a 100 V y teñidos con SYBER Green (Invitrogen, USA).

### Análisis de geles

Para la determinación del número y el tamaño de las bandas generadas para cada cepa con cada uno de los iniciadores utilizados se utilizó el software Gelanalyzer (Lazar y Lazar, <http://www.gelanalyzer.com/>).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para el análisis de diversidad genética en *T. harzianum*.

Primer	Secuencia (5'→3')	Referencia
ISSR1	CTA CAC ACA CAC ACA CAC	
ISSR2	AG AG AGAG AG AG AG AG TA	
ISSR3	ACA CAA CAA CAA CAA CAA	
ISSR4	GAG AGA GAG AGA GAG AACC	
ISSR5	AGA GAG AGA GAG AGAG	Consolo <i>et al.</i> , 2012
ISSR6	AATG AATG AATG AATG	
UP-PCR(3-2)	TAAGGGCGGTGCCAGT	
UP-PCR(AA2M2)	CTGCGACCCAGAGCGG	
REP 1	CG CG CATC GGC	Hassan <i>et al.</i> , 2014
REP 2	CG CTTATC GGCCTAC	
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC	Alves <i>et al.</i> , 2006

### Construcción de dendrogramas

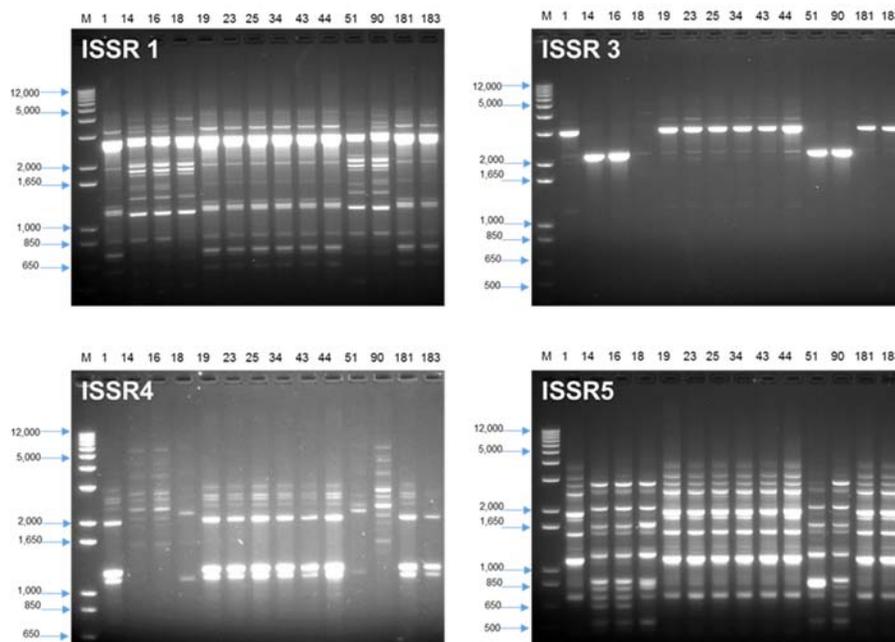
A partir de los patrones de amplificación obtenidos se construyó una matriz dicotómica de 1 (presencia de banda) y 0 (ausencia de banda). Dicha matriz fue utilizada para calcular las distancias euclidianas entre las cepas mediante el

algoritmo de Ne y Li (Dice) y con éstas distancias se generó un dendograma mediante el criterio UPGMA, ambas operaciones se realizaron en el programa PAST ver. 1.81 (Hammer *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

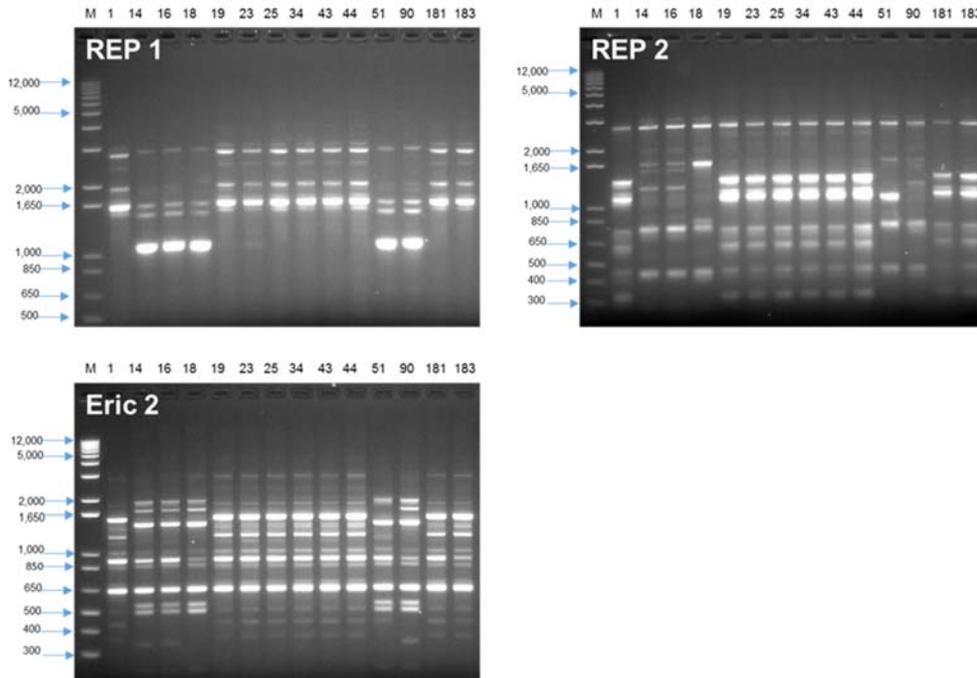
Al realizar los ensayos de amplificación se encontró que los dos iniciadores UP, así como los iniciadores ISSR2 e ISSR6 no mostraron amplificación en todas las cepas analizadas o generaron un número muy limitado de bandas (menos de 4) en algunas de éstas. Por esta razón, no se incluyeron los resultados de dichos iniciadores en este apartado y ya no fueron utilizados en análisis posteriores.

Con los iniciadores se presentaron patrones de bandeo complejos en todas las cepas analizadas, generando un número variable de bandas. Dentro de la marcadores tipo ISSR, el iniciador ISSR5 fue el que generó un mayor número de bandas con tamaños entre 350 y 4000 Kb (Fig. 1). El iniciador ISSR3 fue el que generó el menor número de bandas entre las cepas de estudio con tamaños entre 1100 y 5000 Kb.



**Figura 1.** Patrones de amplificación de las cepas de *Trichoderma harzianum* con distintos iniciadores ISSR. Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio. En cada carril aparece el número de cepa CMU correspondiente y M indica el marcador de peso molecular, 1 Kb ladder plus (Invitrogen, USA). En cada gel aparece el nombre del iniciador utilizado.

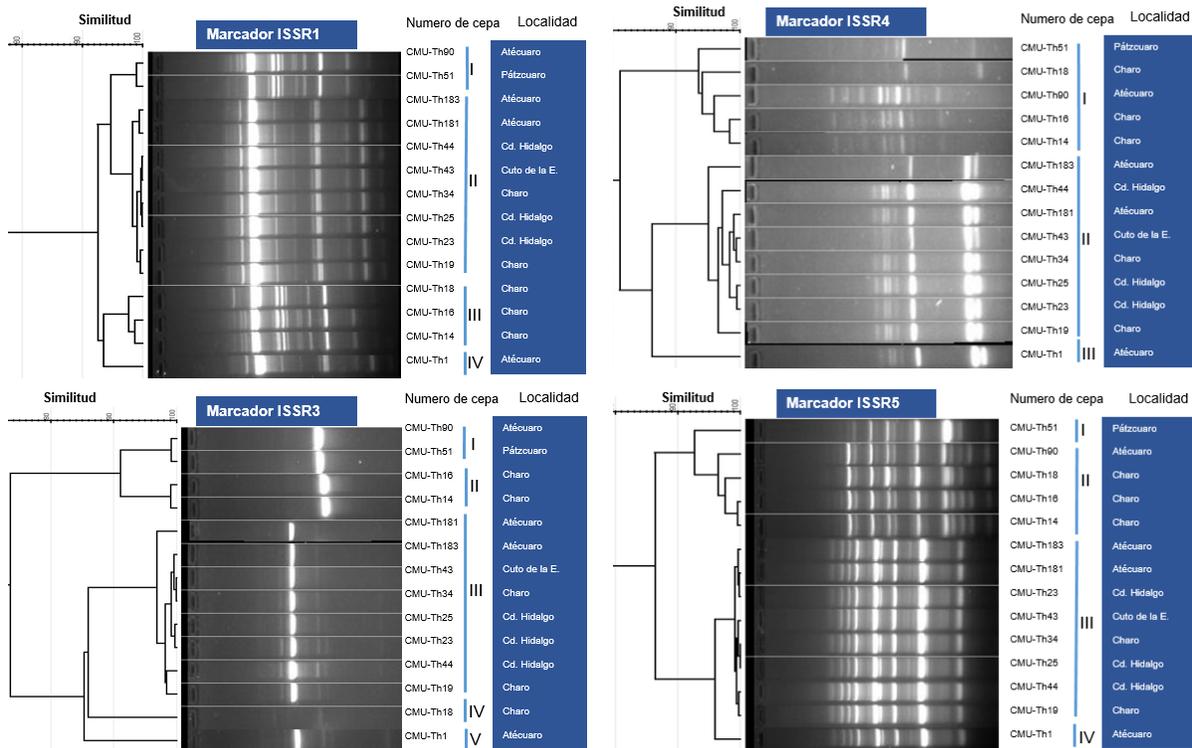
En el caso de los iniciadores empleados para amplificar elementos repetitivos el iniciador ERIC2 generó un mayor número de bandas entre las cepas de estudio, con tamaños entre 350 y 3500 Kb (Fig. 3). El iniciador REP1 fue el que generó un menor número de bandas, con tamaños entre 1000 y 3500 Kb.



**Figura 2.** Patrones de amplificación de las cepas de *Trichoderma harzianum* con iniciadores para elementos repetitivos (rep-PCR). Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio. En cada carril aparece el número de cepa CMU correspondiente y M indica el marcador de peso molecular, 1 Kb ladder plus (Invitrogen, USA). En cada figura aparece el nombre del iniciador utilizado.

Con cada uno de los patrones de amplificación obtenidos se construyeron patrones de agrupamiento para evaluar la diversidad genética intraespecífica en las de cepas de *T. harzianum* analizadas. En el caso de los marcadores ISSR, se generaron agrupamientos similares, aunque con diferencias en la colocación de algunas de las cepas analizadas. De manera interesante, en general, independientemente del marcador, algunas de las cepas siempre aparecieron agrupadas, por ejemplo, CMU-51 y CMU90, CMU-14 y CMU-16. Por otra parte, la cepa CMU-1 siempre apareció separada del resto de las cepas analizadas (Fig. 3). Además, no se encontró que las cepas se agruparán de acuerdo a la localidad de proveniencia, en ese sentido también destaca el caso de las cepas CMU-51 y

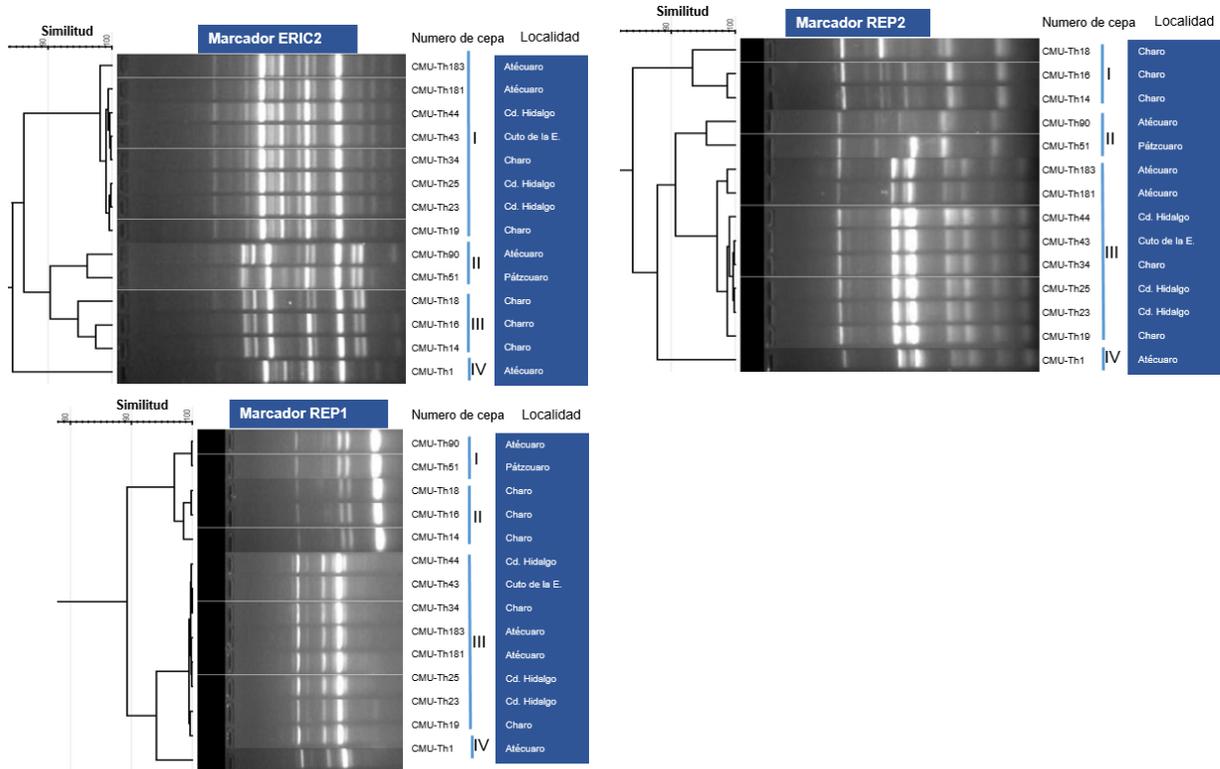
CMU90, quienes no obstante de provenir de Pátzcuaro y Atécuaro, respectivamente, permanecen agrupadas, como se mencionó anteriormente. Por último, es de destacar la cepa CMU-34, que con todos los iniciadores empleados aparece genéticamente diferenciada del resto de cepas provenientes de Charo.



**Figura 3.** Dendrogramas generados con los resultados de amplificación de los iniciadores ISSR en las cepas de *T. harzianum*. Con la matriz dicotómica obtenida se calculó la similitud (S) usando el coeficiente de correlación de Pearson y a partir de ésta se generó el patrón de agrupamiento mediante el criterio UPGMA.

Al igual que los marcadores ISSR, los elementos repetitivos ERIC y REP, generaron distintos patrones de agrupamiento en las cepas de *T. harzianum* de estudio (Fig. 4). Con estos marcadores también se mantuvieron agrupadas algunas cepas que lo hicieron con los iniciadores ISSR, como los pares CMU-51 y CMU-90, CMU-14 y CMU-16. En este último caso se agrega la cepa CMU-18 que en la mayoría de los dendrogramas con ISSR también aparece agrupada con estas dos cepas. También con estos marcadores la cepa CMU-1 aparece genéticamente distinta del resto de cepas analizadas, en una rama terminal única. Al igual que con los iniciadores ISSR, la cepa CMU-34 de Charo aparece agrupada con otras cepas

provenientes de distintas localidades. Los patrones de agrupamiento generados con los elementos repetitivos tampoco muestran congruencia entre la localidad de procedencia y la similitud genética de las cepas analizadas.



**Figura 4.** Dendrogramas generados con los resultados de amplificación obtenidos con iniciadores para distintos elementos repetitivos en las cepas de *T. harzianum*. Con la matriz dicotómica obtenida se calculó la similitud (S) usando el coeficiente de correlación de Pearson y a partir de ésta se generó el patrón de agrupamiento mediante el criterio UPGMA.

## DISCUSIÓN

En este apartado del trabajo se evaluó la diversidad genética entre las cepas de *Trichoderma harzianum* de estudio. Salvo los iniciadores ISSR2, ISS6 y los UP empleados, el resto de iniciadores generaron patrones de amplificación en todas las cepas analizadas. En relación a los iniciadores tipo UP, los resultados obtenidos contrastan con estudios previos en los que se ha logrado la amplificación con este tipo de iniciadores en *T. harzianum* (Bulat *et al.*, 1998; Cumagun *et al.*, 2000; Lübeck *et al.*, 2000), algunos de los cuales han servido para separar entre genotipos de dicho complejo (Lübeck *et al.*, 1999). No obstante, existen otros trabajos con los que nuestros resultados muestran congruencia, en el sentido de que los iniciadores UP

muestran pocas bandas de amplificación en cepas de *T. harzianum* (Consolo *et al.*, 2012). Dichos contrastes son una evidencia de la gran variabilidad genética global que presentan las cepas de *T. harzianum*, y resaltan la necesidad de probar diferentes iniciadores con la finalidad de encontrar aquellos más propicios para estudiar las relaciones genéticas en una colección de cepas silvestres de dicho taxón.

Dada la capacidad de diferenciación entre cepas encontradas aquí y en los escasos trabajos previos (Siddiquee *et al.*, 2012), así como la reproducibilidad y facilidad de ejecución para generar patrones de amplificación con iniciadores para ISSR, es de extrañar el escaso uso de ésta para el análisis poblacional de *Trichoderma* spp. en general y de *T. harzianum* en particular. Algo similar podría decirse para los elementos repetitivos, cuyos resultados se discuten a continuación. Estos dos marcadores constituyen una herramienta ideal que a futuro será utilizada con más frecuencia para distinguir genotipos en cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de Michoacán.

En relación a los resultados de agrupamiento encontrados empleando los marcadores ISSR, previamente se ha documentado la falta de correlación entre la localidad de proveniencia y el patrón de agrupamiento generado con dicho tipo de marcador en *T. harzianum* (Siddiquee *et al.*, 2012). Los resultados encontrados en el presente estudio muestran que los elementos repetitivos son útiles para realizar discriminación de cepas y análisis poblacional en este taxón. En congruencia con los resultados de este trabajo, el marcador BOX ha sido útil para diferenciar cepas de *T. reesei* y *T. viride* (Grosch *et al.*, 2006). En relación a la diversidad intraespecífica de *T. harzianum* empleando elementos repetitivos en el análisis (REP, BOX, ERIC), nuestros resultados son congruentes con los de Hassan *et al.* (2014), encontrando grupos mayoritarios y cepas que se distinguen genéticamente del resto.

En los patrones de agrupamiento obtenidos con los distintos marcadores, la cepa CMU-1 aislada de Atécuaro aparece genéticamente distinta, ya que no se agrupó con otras cepas del mismo sitio de procedencia. Por otra parte, las cepas CMU-90 (Atécuaro), CMU-51 (Pátzcuaro), se agruparon con todos los iniciadores, en la mayoría de los dendrogramas junto con CMU-14 y CMU-16, las dos provenientes

de Charo. Las cepas CMU-181 y CMU-183, ambas de Atécuaro, permanecieron agrupadas en la mayoría de los dendrogramas; al igual que las cepas CMU-23 y CMU-25 de Ciudad Hidalgo.

El origen de la diversidad genética de las cepas de *T. harzianum* aquí analizadas se desconoce. Sin embargo, es importante considerar que *T. harzianum* es considerado en la actualidad un complejo de especies crípticas (Chaverri *et al.*, 2015), por lo que es factible que parte de esa variación se deba al hecho de que se están analizando diferentes especies del complejo, las cuales no se pueden distinguir plenamente a la fecha con el análisis filogenético realizado (Cázares-García *et al.*, 2016). Otras explicaciones relacionadas con el ciclo de vida y las frecuencias de mutación han sido ofrecidas por Consolo *et al.* (2012). Así, se propone que debido a que *Trichoderma* presenta especies heterotálicas diploides (Seidl *et al.* 2009), hay cepas que pueden variar genéticamente más rápidamente que otras de acuerdo a la frecuencia de entrecruzamiento sexual. Por otra parte, mecanismos como la frecuencia de mutación, la recombinación y la migración (Chaverri *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2009) también pueden participar en la generación de variación genética en *T. harzianum*.

El hecho de que en este estudio se encuentren cepas provenientes de diferente localidad con gran similitud genética probablemente este reflejando un fenómeno de migración reciente, en el que no se han alcanzado a diferenciar cepas que provienen de un mismo fondo genético. Este podría ser el caso de los pares de cepas CMU-51/CMU-90 y CMU-14/CMU-16. Por otro lado, es probable que distintas cepas provenientes del mismo ecosistema estén sujetas a una presión selectiva diferente, por lo que se han diferenciado genéticamente, este podría ser el caso de la cepa CMU-1 proveniente de Charo, la cual se distingue genéticamente del resto de cepas provenientes del mismo sitio. No obstante, es necesario incluir un mayor número de cepas de cada localidad con la finalidad de conocer más detalladamente la estructura poblacional del complejo *T. harzianum* en Michoacán y los mecanismos que explican dicha estructura. Esto, además de permitir un conocimiento ecológico de uno de los taxa más representativos del género *Trichoderma* ayudaría a la selección de cepas con características genéticas y fisiológicas deseables para ciertas

aplicaciones biotecnológicas, como el caso del biocontrol abordado en el presente trabajo.

### Referencias Bibliográficas

- [1] Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*. 158(2): 112-121.
- [2] Araujo, R. (2014). Towards the genotyping of fungi: methods, benefits and challenges. *Current Fungal Infection Reports*. 8(3): 203-210.
- [3] Avila-Miranda, M., Herrera-Estrella, A., Peña-Cabriales, J. J. (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(7): 1823-1830.
- [4] Avis, T. J., Hamelin, R. C., Bélanger, R. R. (2001). Approaches to molecular characterization of fungal biocontrol agents: some case studies. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 23(1): 8-12.
- [5] Bowen, J. K., Franicevic, S. C., Crowhurst, R. N., Templeton, M. D., Stewart, A. (1996). Differentiation of a specific *Trichoderma* biological control agent by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 24(3): 207-217.
- [6] Broughton, R., Buddie, A. G., Smith, D., Ryan, M. J. (2012). The effect of cryopreservation on genomic stability in strains of the fungus *Trichoderma*. *CryoLetters*. 33(4): 299-306.
- [7] Buhariwalla, H. K., Srilakshmi, P., Kannan, S., Kanchi, R. S., Chandra, S., Satyaprasad, K., Waliyar F., Thakur R. P., Crouch, J. H. (2005). AFLP analysis of *Trichoderma* spp. from India compared with sequence and morphological-based diagnostics. *Journal of Phytopathology*. 153(7-8): 389-400.
- [8] Bulat, S. A., Lübeck, M., Mironenko, N., Jensen, D. F., Lübeck, P. S. (1998). UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Mycological Research*. 102(08): 933-943.

- [9] Carter, G. L., Allison, D., Rey, M. W., Dunn-Coleman, N. S. (1992). Chromosomal and genetic analysis of the electrophoretic karyotype of *Trichoderma reesei*: mapping of the cellulase and xylanase genes. *Molecular microbiology*. 6(15): 2167-2174.
- [10] Cázares-García, S. V., Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Garcidueñas, M., Robinson-Fuentes, V. A., Gómez-Reyes, V. M., Vázquez-Marrufo, G. (2016). Typing and selection of wild strains of *Trichoderma* spp. producers of extracellular laccase. *Biotechnology Progress*. 32(3): 787-798.
- [11] Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., Geiser, D. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Molecular phylogenetics and evolution*. 27(2): 302-313.
- [12] Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- [13] Chen, X., Romaine, C. P., Ospina-Giraldo, M. D., Royse, D. J. (1999). A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mold epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52(2): 246-250.
- [14] Consolo, V. F., Mónaco, C. I., Cordo, C. A., Salerno, G. L. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4). 1389-1398.
- [15] Cumagun, C. J. R., Hockenhull, J., Lübeck, M. (2000). Characterization of *Trichoderma* isolates from Philippine rice fields by UP-PCR and rDNA-ITS1 analysis: identification of UP-PCR markers. *Journal of Phytopathology*. 148(2): 109-115.
- [16] De Respinis, S., Vogel, G., Benagli, C., Tonolla, M., Petrini, O., Samuels, G. J. (2010). MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*. 9(1): 79-100.

- [17] de Souza, J. T., Pomella, A. W., Bowers, J. H., Pirovani, C. P., Loguercio, L. L., Hebbar, K. P. (2006). Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches'-broom pathogen. *Phytopathology*. 96(1): 61-67.
- [18] Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barres, B., Carlier, J., Tharreau, D., Giraud, T. (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 44(10): 933-949.
- [19] Geistlinger, J., Zwanzig, J., Heckendorff, S., Schellenberg, I. (2015). SSR Markers for *Trichoderma virens*: their evaluation and application to identify and quantify root-endophytic strains. *Diversity*. 7(4): 360-384.
- [20] Gil-Lamaignere, C., Roilides, E., Hacker, J., Müller, F. (2003). Molecular typing for fungi a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection*. 9(3): 172-185.
- [21] Gómez, I., Chet, I., Herrera-Estrella, A. (1997). Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Molecular and General Genetics*. 256(2): 127-135.
- [22] Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., Berg, G. (2006). Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research*. 110(12): 1464-1474.
- [23] Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 1. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- [24] Hassan, M. M., Gaber, A., El-Hallous, E. I. (2014). Molecular and morphological characterization of *Trichoderma harzianum* from different Egyptian soils. *Wulfenia Journal*. 21: 80-96.
- [25] Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. T., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5): 1890-1898.

- [26] Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H., Montagu, M., Geremia, R. A. (1993). Electrophoretic karyotype and gene assignment to resolved chromosomes of *Trichoderma* spp. *Molecular microbiology*. 7(4): 515-521.
- [27] John, N. S., Anjanadevi, I. P., Nath, V. S., Sankar, S. A., Jeeva, M. L., John, K. S., Misra, R. S. (2015). Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus*—A polyphasic approach. *Biological Control*. 90: 164-172.
- [28] Kredics, L., Ládai, M., Körmöczi, P., Manczinger, L., Rákhely, G., Vágvölgyi, C., Szekeres, A. (2012). Genetic and biochemical diversity among *Trichoderma* isolates in soil samples from winter wheat fields of the Great Hungarian Plain. *Acta Biologica Szegediensis*. 56(2): 141-149.
- [29] Latha J., Verma A., Mukherjee P. K. (2002). PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collections—a need for re-identification of these economically important fungi. *Current Science*. 83(4): 372-374.
- [30] López-Mondéjar R., Ros M., Pascual J. A. (2011). Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*. 56(1): 59-66.
- [31] Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*. 11(12): 2453-2465.
- [32] Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6): 2418-2428.
- [33] Lübeck, M., Alekhina, I. A., Lübeck, P. S., Jensen, D. F., Bulat, S. A. (1999). Delineation of *Trichoderma harzianum* into two different genotypic groups by a highly robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridization. *Mycological Research*. 103(03): 289-298.
- [34] Lübeck, M., Poulsen, S. K., Liibeck, E. S., Jensen, D. E., Thrane, U. (2000) Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS 1 ribotyping,

- UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. 185(2): 129-134.
- [35] Mahfooz, S., Singh, S. P., Rakh, R., Bhattacharya, A., Mishra, N., Singh, P. C., Chauhan P. S., Nautiyal C. S., Mishra, A. (2016). A Comprehensive Characterization of Simple Sequence Repeats in the Sequenced *Trichoderma* Genomes Provides Valuable Resources for Marker Development. *Frontiers in Microbiology*. 7: 575.
- [36] Mäntylä, A. L., Rossi, K. H., Vanhanen, S. A., Penttilä, M. E., Suominen, P. L., Nevalainen, K. H. (1992). Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum* (reesei) strains. *Current genetics*. 21(6): 471-477.
- [37] Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad, Y., Freeman, S. (2004). Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to AP-PCR and ITS sequence analyses. *Phytoparasitica*. 32(4): 370-375.
- [38] Meyer, W., Morawetz, R., Börner, T., Kubicek, C. P. (1992). The use of DNA-fingerprint analysis in the classification of some species of the *Trichoderma* aggregate. *Current Genetics*. 21(1): 27-30.
- [39] Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brownd, A. E., Seaby, D. A. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*. 140(4): 769-777.
- [40] Naeimi, S., Kocsubé, S., Antal, Z., Okhovvat, S., Javan-Nikkhah, M., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2011). Strain-specific SCAR markers for the detection of *Trichoderma harzianum* AS12-2, a biological control agent against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. *Acta Biologica Hungarica*. 62(1): 73-84.
- [41] Nath, V. S., John, N. S., Anjanadevi, I. P., Hegde, V. M., Jeeva, M. L., Misra, R. S., Veena, S. S. (2014). Characterization of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Phytophthora colocasiae* associated with leaf blight of taro. *Annals of Microbiology*. 64(4): 1513-1522.
- [42] Nybom, H., Weising, K., Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investigative Genetics*. 5(1): 1.

- [43] Park, M. S., Seo, G. S., Bae, K. S., Yu, S. H. (2005). Characterization of *Trichoderma* spp. associated with green mold of oyster mushroom by PCR-RFLP and sequence analysis of ITS regions of rDNA. *The Plant Pathology Journal*. 21(3): 229-236.
- [44] Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E., Monte, E. (2005). Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology*. 49(1): 25-33.
- [45] Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*. 5(1): 63-69.
- [46] Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C. P., Schmoll, M. (2009). Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(33): 13909-13914.
- [47] Shanmugam, V., Sharma, V. (2008). Genetic relatedness of *Trichoderma* isolates antagonistic against *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi inflicting carnation wilt. *Folia Microbiologica*. 53(2): 130-138.
- [48] Sharma, K., Mishra, A. K., Misra, R. S. (2009). Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. *Journal of Phytopathology*. 157(1): 51-56.
- [49] Siddiquee, S., Abdullah, F., Guan, T., Rohaza, E. (2007). Level in allozyme variations of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and its taxonomic implications. *Research Journal of Microbiology*. 2(10): 717-726.
- [50] Siddiquee, S., Tan, S. G., Yusuf, U. K., Fatimah, N. H. N., Hasan, M. M. (2012). Characterization of Malaysian *Trichoderma* isolates using random amplified microsatellites (RAMS). *Molecular Biology Reports*. 39(1): 715-722.
- [51] Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 6: 791.
- [52] Stasz, T. E., Weeden, N. F., Harman, G. E., (1988). Methods of isoenzyme electrophoresis for *Trichoderma* and *Gliocladium* species. *Mycologia*. 80(6): 870-874.

- [53] Stocco, M. C., Mónaco, C. I., Abramoff, C., Lampugnani, G., Salerno, G., Kripelz, N., Cordo C. A., Consolo, V. F. (2016). Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of Septoria leaf blotch of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(3): 1-10.
- [54] Szekeres, A., Láday, M., Kredics, L., Varga, J., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Nagy, E. (2006). Rapid identification of clinical *Trichoderma longibrachiatum* isolates by cellulose-acetate electrophoresis-mediated isoenzyme analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 12(4): 369-375.
- [55] Taylor, J. W., Geiser, D. M., Burt, A., Koufopanou, V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1): 126-146.
- [56] Toda, T., Hyakumachi, M., Arora, D. K. (1999). Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. *Microbiological research*. 154(3): 247-258.
- [57] Vahabi, K., Sharifnabi, B., Zafari, D. (2009). Genetic diversity of *Trichoderma* spp. associated with button mushroom, *Agaricus bisporus*, inferred from AFLP markers and ITS sequencing. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 44(2): 239-253.
- [58] van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(3): 1-46.
- [59] Vanhee, L. M., Nelis, H. J., Coenye, T. (2010). What can be learned from genotyping of fungi?. *Medical mycology*. 48(1): 60-69.
- [60] Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*. 5(1): 25-40.
- [61] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*. 23(21): 4407-4414.

- [62] Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*. 18(24): 7213-7218.
- [63] Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*. 18(22): 6231-6235.
- [64] Wuczkowski, M., Druzhinina, I., Gherbawy, Y., Klug, B., Prillinger, H., Kubicek, C. P. (2003). Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiological research*. 158(2): 125-133.
- [65] Zamir, D., Chet, I. (1985). Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Canadian journal of microbiology*. 31(6): 578-580.
- [66] Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20(2): 176–183.

## CAPÍTULO 4

### DIVERSIDAD METABÓLICA Y PATRONES DE CONIDIACIÓN EN CEPAS SILVESTRES DE *Trichoderma harzianum*

#### RESUMEN

Se evaluó la variación en la capacidad metabólica y de conidiación de nueve cepas silvestres de *T. harzianum* empleando el ensayo de microarreglos fenotípicos (MFs) con placas Biolog®. El criterio para la selección de cepas para el análisis metabólico fue el resultado del análisis genotípico realizado en el Capítulo 3, seleccionando cepas de distintos genotipos. Se encontró que los sustratos mejor utilizados para el crecimiento de las cepas analizadas fueron  $\alpha$ -ciclodextrina, ácido  $\gamma$ -amino-butírico,  $\alpha$ -D-Glucosa, D-Manosa, gentiobiosa y N-acetil-D-glucosamina. Los sustratos menos utilizados por las cepas de *T. harzianum* estudiadas fueron N-acetil-D-manosamina, D-arabinosa, glucoronamida, ácido-D-sacárico, L-serina, L-treonina, 2-amino etanol y putrescina. Se observó una variabilidad significativa en la capacidad de las cepas analizadas para aprovechar y crecer en los 95 sustratos de las placas Biolog. La cepa que mostró la mayor capacidad metabólica fue la cepa CMU-183, mientras que aquella que mostró una menor capacidad en la utilización de sustratos fue la CMU-51. La capacidad de conidiación en los distintos sustratos también mostró variación entre las cepas de estudio. La cepa que conidió en mayor cantidad de fuentes de carbono fue la CMU-25 y la que conidió en menos fuentes de carbono fue la CMU-43. Las cepas fueron capaces de conidiar en 42 fuentes de carbono distintas, pero los sustratos en los que se observó mayor conidiación fueron D-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, gentiobiosa y D-trealosa. La variación metabólica y de conidiación observada puede deberse a que las cepas analizadas son diferentes especies del complejo *T. harzianum*. Los resultados son útiles para el crecimiento y producción masiva de conidias de las cepas de estudio, con fines de formulación de un producto de biocontrol.

## INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Trichoderma* crecen y completan su ciclo de desarrollo en una gran variedad de sustratos orgánicos vivos o inertes (Ver Introducción General). La gran variedad de hábitats y estilos de vida que se presentan dentro del género, enfrenta a las especies de *Trichoderma* con una amplia diversidad de condiciones ambientales en las que se presentan distintos procesos de presión selectiva (referencia de introducción de nichos y hábitats). Debido a esto, la capacidad de las especies y cepas de *Trichoderma* para utilizar una amplia variedad de compuestos determina en gran medida su probabilidad de sobrevivir en distintos ambientes y superar condiciones ambientales y ecológicas diversas. Aunque en la naturaleza es factible encontrar monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos de bajo peso molecular que pueden ser empleados como fuente de C por parte de *Trichoderma* spp., las formas más abundantes de fuentes de C en la naturaleza, particularmente en suelo y mantillo, son poliméricas. Los polisacáridos, en general cualquier otro biopolímero proveniente de restos celulares u organismos vivos, deben de ser hidrolizados extracelularmente a estructuras simples que después son transportadas al interior celular para ser metabolizadas.

La relevancia ecológica y biotecnológica de las enzimas hidrolíticas extracelulares en *Trichoderma* spp. ya se trató en la introducción general y el segundo capítulo del presente trabajo. En relación a los mecanismos de transporte, estos son importantes para la incorporación de nutrientes y para la excreción de sustancias tóxicas o metabolitos secundarios, así como para el mantenimiento de la homeostasis de iones.

El sistema Biolog se introdujo como técnica de análisis bioquímico-metabólico bacteriano a finales de la década de 1970-1980 (Bochner y Savageau, 1977). En dicho trabajo se describió el uso de sales de tetrazolio para evaluar la capacidad de un microorganismo para utilizar (catabolizar) un grupo de metabolitos. Posteriormente ese sistema se convirtió en una placa de 96 pozos con metabolitos distintos que podían ser ensayados de manera simultánea y que podía ser utilizado para analizar la diversidad metabólica de una cepa bacteriana o con fines de identificación de especies (Bochner, 1989). Con el incremento en la capacidad de

analizar no solamente el aprovechamiento de fuentes de C, N, P y S, sino de evaluar otros aspectos del ambiente de crecimiento como el pH, la sensibilidad a compuestos químicos y estrés osmótico, al análisis mediante el sistema Biolog se le definió como Microarreglos Fenotípicos, o MF (Bochner *et al.*, 2001; Bochner, 2003).

Aunque el mismo inventor del sistema Biolog documenta su aplicación para el análisis metabólico de levaduras y hongos filamentosos, no proporciona mayor detalle sobre los resultados obtenidos (Bochner *et al.*, 2001). Sin embargo, la primera caracterización de diversidad metabólica sobre cepas silvestres de hongos filamentosos en la que se realizó una correlación con la diversidad genética fue en *Fusarium compactum* (Wildman, 1995; Talbot *et al.*, 1996). Posteriormente se evaluó la utilidad del sistema Biolog para el análisis de la diversidad funcional de la comunidad fúngica en suelo y mantillo de ecosistemas de bosque y desierto (Dobranic y Zak, 1999; Sobek, y Zak, 2003). El primer reporte del uso del Biolog en especies de hongos filamentosos compara la utilización de fuentes de carbono entre *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Magnaporthe grisea* y *Mycosphaerella graminicola* y realiza la caracterización metabólica de cepas de *A. nidulans* (Tanzer *et al.*, 2003). A partir de esos trabajos pioneros, el sistema Biolog y los Microarreglos Fenotípicos han sido utilizados en diversas áreas de la investigación fúngica. En el análisis ecológico, el sistema permite evaluar la capacidad metabólica de la comunidad fúngica para establecer relaciones con variables ambientales (Stefanowicz, 2006). En esta misma área, se han estudiado las características ecofisiológicas de cepas de comunidades saprofitas en ambientes naturales (Deacon *et al.*, 2006; Di Lonardo *et al.*, 2013). Además, los perfiles metabólicos generados con el sistema Biolog pueden combinarse con otras estrategias de análisis oomico para evaluar la ecofisiología de una especie, como en el caso de *Aspergillus nidulans* y sus transiciones del saprofitismo al parasitismo (Reverberi *et al.*, 2013). Otras áreas de aplicación del sistema Biolog incluyen la caracterización de especies de relevancia médica (Kaur *et al.*, 2015) y biotecnológica (Pinzari *et al.*, 2014). Recientemente se ha documentado, con la ayuda del Biolog, que el efecto de fungicidas de uso agrícola contra *Fusarium kyushuense* dependen de la fuente de carbono, lo cual tiene relevancia en el manejo de este tipo de plagas en campo

(Wang *et al.*, 2016). En taxonomía, los perfiles de utilización de metabolitos del Biolog han sido de ayuda para diferenciación entre especies en los géneros *Dendryphiella* (De la Cruz *et al.*, 2006), *Cladosporium* (Wirsel *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2012), *Oidiodendron* (Rice y Currah, 2005) y *Penicillium* (Berni *et al.*, 2011), entre otros.

En el presente apartado de este trabajo el sistema Biolog se empleó para evaluar la diversidad metabólica intraespecífica en las cepas de *Trichoderma harzianum* estudiadas. No son muchos los estudios en los que dicha herramienta se ha empleado para evaluar diversidad intraespecífica en hongos. Como se comentó líneas arriba, en el ascomicete anamorfo *Fusarium compactum* (Wildman, 1995; Talbot *et al.*, 1996), fue el primero en el que se obtuvieron patrones de diversidad metabólica en un poblaciones silvestres. Recientemente se ha analizado la diversidad metabólica intraespecífica con esta herramienta en *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus terreus*, aunque en un número limitado de cepas de cada especie (Rola *et al.*, 2015). En *Aspergillus nidulans* se han analizado mediante Biolog una serie de mutantes del gen *areA*, el cual codifica para un activador transcripcional de la familia GATA que media la represión catabólica en el aprovechamiento de fuentes de N, asegurando la utilización preferencial de amonio y L-glutamina sobre otras fuentes de nitrógeno alternativas. Dicho estudio mostró que diferentes mutaciones en el gen *areA* tienen distintos efectos fisiológicos sobre la utilización de fuentes de C y N (Tanzer *et al.*, 2003). Otras especies de hongos en los que se ha evaluado la diversidad metabólica intraespecífica mediante el sistema Biolog son los basidiomicetes *Ganoderma lucidum* (Pawlik *et al.* 2015), *Coprinus comatus* (Pawlik *et al.* 2014) y *Flammulina velutipes* (Janusz *et al.*, 2015), de relevancia medicinal y alimenticia.

El sistema Biolog y los Microarreglos Fenotípicos en *Trichoderma* spp. se ha empleado como herramienta de ayuda en trabajo taxonómico para caracterizar y describir nuevas especies como *Trichoderma brevicompactum* (Kraus *et al.*, 2004), separar *T. strigosellum* como nueva especie, distinta de *T. strigosum* (López-Quintero *et al.*, 2013); identificar una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* de relevancia biotecnología aislada de ambientes marinos (Mohamed-Benkada *et al.*,

2006; Ruiz *et al.*, 2007); separar la especie críptica *Trichoderma parareesei* del complejo *Hypocrea jecorinal/T. reesei*, asignándola como nueva especie (Atanasova *et al.*, 2010; Druzhinina *et al.*, 2010); e identificar un grupo de siete nuevas especies de Asia (Bissett *et al.*, 2003). En un trabajo contemporáneo de estos dos estudios anteriores, además de evaluarse las posibles relaciones entre los patrones de utilización de sustratos con los grupos taxonómicos, se realizaron las primeras observaciones fisiológicas. Así, se documentó el aprovechamiento global de las distintas fuentes de carbono de 16 taxa, encontrando que no existía una congruencia plena entre el patrón de aprovechamiento de sustratos y la separación entre especies (Kubicek *et al.*, 2003). Se documentó que los sustratos mejor aprovechados por *Trichoderma* spp. para su crecimiento fueron D-manitol, N-acetil-D glucosamina, L-eritritol, glicerol, fructosa, fucosa, L-arabinosa, D-galactosa, y xilitol. Los compuestos en los que se observó el peor crecimiento de las especies evaluadas fueron los ácidos glicil-L-glutámico, succinámico,  $\alpha$ -hidroxibutírico, hidroxifenilacético y málico, así como y los sustratos L-prolina,  $\alpha$ -cetoglutarato, L-tiamina, putresina, uridina, psicosa y turanosa. De manera interesante, la única fuente de nitrógeno que promovió el crecimiento fue la asparagina. Por último, en este estudio pionero en el género, se documentó que las cepas de *T. harzianum* mostraron una mayor versatilidad para la utilización de fuentes de carbono que el resto de especies evaluadas, así como una variación más amplia en el aprovechamiento de sustratos entre las cepas analizadas.

Los MF también contribuyeron a diferenciar a *Trichoderma pleurotum* de *Trichoderma pleuroticola*, especies que constituyen las principales plagas asociadas al cultivo y producción de *Pleurotus ostreatus* (seta) alrededor del mundo (Komoń-Zelazowska *et al.*, 2007). La diferencia significativa en el aprovechamiento de sustratos para el crecimiento miceliar de ambas especies, en combinación con ensayos de confrontación *Trichoderma*-*P. ostreatus*, permitió establecer la hipótesis de que *T. pleuroticola* ha seguido un patrón evolutivo similar al de otras especies saprofitas y micoparasíticas de la clada Harzianum, constituyendo el riesgo de infección más importante en la producción de *P. ostreatus*; por otra parte *T. pleurotum* aparece como plaga en el proceso de producción de setas de manera

secundaria, con un nicho más bien asociado a la colonización y aprovechamiento de los sustratos vegetales empelados en dicho proceso. De manera interesante, en este mismo estudio se encontraron similitudes fisiológicas y de antagonismo entre *T. pleurotica* y *T. aggressivum*, esta última especie plaga de cultivos de *Agaricus bisporus* (champiñón), lo que en parte sirvió como base para el establecimiento de la hipótesis anteriormente descrita (Komoń-Zelazowska *et al.*, 2007).

Otros trabajos se han enfocado más en la aplicación del sistema Biolog en la evaluación de distintos aspectos fisiológicos y de desarrollo de especies dentro del género y su relación con el potencial biotecnológico o el estilo de vida de las especies de *Trichoderma* analizadas. El análisis Biolog sobre la cepa tipo QM 6a de *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*), de mutantes y transformantes derivadas de esta, y de cepas silvestres de la misma especie, mostró que la primera presenta características metabólicas distintas de las cepas silvestres de reciente aislamiento (Druzhinina *et al.*, 2006). Por ejemplo, las cepas silvestres crecieron mejor que la cepa tipo en N-acetil-D-glucosamina y en los ácidos fumárico, quínico, succínico, y bromosuccínico que la cepa tipo. Otro aspecto interesante de dicho trabajo fue el hecho de que mutantes hiper e hipo productoras de celulasa extracelular derivadas de la cepa tipo mediante distintos tipos de mutágenos presentaron patrones metabólicos similares a ésta, lo que indicaba que los procesos de mutagénesis no habían modificado la fisiología global de las cepas. Dos aspectos aplicados de interés en este trabajo fueron la documentación de los sustratos que incrementaban la producción de celulasa extracelular (D-sorbitol y ácido sacárico) en las mutantes estudiadas, y la observación de que transformantes con un plásmido de resistencia a higromicina presentaban variaciones metabólicas debidas a la zona de integración del plásmido y no al número de copias que se integraban. De manera interesante, aunque en este trabajo se forma un grupo de sustratos en los que se favorece la conidiación, no se discute dicho resultado en detalle.

Recientemente se utilizó el sistema Biolog para ayudar en la diferenciación de dos cepas de *Trichoderma cf. atroviride*, una de las cuales sirvió como base para el desarrollo de productos comerciales de biocontrol (Lange *et al.*, 2016). Dichas cepas no pudieron ser diferenciadas mediante secuencias genéticas utilizadas para ese fin

dentro del género, incluidos entre otros los genes *tef1*, *ech42* y la región ITS nucleares, así como el gen *cox1* mitocondrial, por lo que fue necesaria la secuenciación genómica para generar marcadores de identificación genética. No obstante de la gran similitud genética entre ambas cepas, el sistema Biolog reveló diferencias en los patrones de utilización de fuentes de carbono para el crecimiento y la conidiación de éstas. Aun más, el análisis de mutantes en dos genes que presentaron SNP entre las cepas de estudio mostró diferencias fisiológicas y metabólicas significativas, aunque las causas de esto no quedaron claramente establecidas (Lange *et al.*, 2016). Así, este estudio en particular muestra la relevancia del uso simultáneo de genómica con Biolog para la caracterización estructural y funcional de cepas que ya se encuentran en uso comercial.

En la misma línea del trabajo anterior, el sistema Biolog fue utilizado para evaluar cepas del complejo *T. harzianum* que se caracterizaban por presentar altos niveles de quitinasa extracelular. Aquí la idea era encontrar marcadores genéticos y fisiológicos que permitieran seleccionar cepas de *T. harzianum sensu lato* con alta actividad quitinolítica extracelular (Nagy *et al.*, 2007). En el primer tipo de marcadores se encontraron alelos en las secuencias de las regiones genéticas ITS1, ITS2 y *tef1*, que permiten identificar a cepas sobre-productoras de quitinasa. En relación a un posible marcador fisiológico, el sistema Biolog mostró que de las 95 fuentes de carbono analizadas, las cepas sobre-productoras de quitinasa no crecían en N-acetil- $\beta$ -D-manosamina; además, se encontró que la actividad quitinolítica exacerbada en dichas cepas no les confería un mejor crecimiento en N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina o glucosamina, sustratos de la enzima (Nagy *et al.*, 2007).

Al analizar el efecto de la luz sobre el crecimiento micelial de *Hypocrea atroviridis*, el análisis apoyado en el sistema Biolog mostró que en condiciones de iluminación continua o fotoperiodo, un grupo de 17 sustratos, que incluyó monosacáridos, polioles y oligosacáridos, es decir sustratos relacionados con la degradación de la pared celular vegetal, estimularon el crecimiento (Friedl *et al.*, 2008a). Este resultado es congruente con el estilo de vida saprofito y de exposición a radiación solar en suelo de *Trichoderma* spp. (*Hypocrea*). En la misma especie el sistema Biolog permitió encontrar grupos de fuentes de carbono que estimulan la

esporulación asexual (conidiación): aquellas que permiten la esporulación en la oscuridad, y con las cuales en presencia de luz se estimula dicho proceso de diferenciación celular; aquellas donde hay esporulación en la oscuridad y la luz no estimula el proceso; y aquellas en presencia de las cuales el hongo presenta una mejor conidiación que en la oscuridad (Friedl *et al.*, 2008b). También se encontró que en sustratos como los ácidos orgánicos y los aminoácidos *H. atroviridis* no es capaz de conidiar. Tanto en el crecimiento micelial como en el proceso de esporulación, se encontró que los fotoreceptores juegan un papel importante en la selección y el efecto de las fuentes de carbono (Friedl *et al.*, 2008a, b). Además, se mostró que la fuente de carbono es el factor principal que define el proceso de conidiación y que la luz juega un papel catalítico, en contraste con las hipótesis previas que planteaban la iluminación como la variable más importante en dicho proceso (Friedl *et al.*, 2008b).

Son pocos los estudios en los que se ha utilizado el sistema Biolog para caracterizar cepas silvestres de *Trichoderma* spp. con potencial para su aplicación en productos de biocontrol de plagas de cultivos de relevancia agrícola. En ese sentido Kumar *et al.* (2011) analizan 18 cepas de *Trichoderma* spp. de distintas especies que muestran potencial para antagonizar diversas especies de hongos fitopatógenos, comparando el patrón de agrupamiento generado mediante los resultados del sistema Biolog, con el obtenido mediante el análisis de polimorfismos genéticos empleando marcadores RAPDs. Aunque las diferencias en los patrones de agrupamiento entre los dos métodos empleados (Biolog/RAPDs) son evidentes, los resultados de dicho trabajo son difíciles de interpretar y discutir debido a que los autores nunca definen a que especie pertenece cada una de las cepas estudiadas y tampoco proporcionan información sobre diferencias intra o interespecíficas en la utilización de sustratos.

En un estudio muy similar al realizado en el presente trabajo, se analizan genética y fisiológicamente 21 cepas pertenecientes a las especies *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. tomentosum* y *T. koningiopsis*, para evaluar su capacidad de antagonizar *in vitro* contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lopes *et al.*, 2012). En dicho trabajo, las cepas de *T. harzianum* presentan un patrón de agrupamiento generado con los resultados del sistema Biolog que difiere del generado mediante el análisis filogenético. Adicionalmente, dentro de los grupos formados por las cepas de *T.*

*harzianum* se observa variación entre las cepas analizadas. En general, las fuentes de carbono en las que se observó un mejor crecimiento de las cepas de estudio fueron D-glucosa, glicerol, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, i-eritritol, gentiobiosa, D-arabitol, D-fructosa, dextrina, y xilosa.

Todos los antecedentes anteriormente expuestos muestran la importancia del sistema Biolog y los microarreglos fenotípicos en el análisis fenotípico y la caracterización de hongos en general, y de *Trichoderma* spp. en particular, y como la combinación de dicha herramienta con el análisis genómico proporciona un nivel muy fino para el estudio de cepas de relevancia biotecnológica. No obstante, la aplicación de perfiles metabólicos en la diferenciación de cepas con potencial aplicación en biocontrol de plagas de relevancia agrícola es escasa, particularmente para evaluar diversidad intraespecífica dentro de *T. harzianum*. Por lo anterior, en este trabajo se planteó la necesidad de utilizar el sistema Biolog en este último sentido, analizando las cepas de *T. harzianum* de estudio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cepas de estudio**

En este caso se estudiaron únicamente las cepas de *H. lixii*/*T. harzianum* (CMU-1, CMU-14, CMU-16, CMU-23, CMU-25, CMU-43, CMU-51, CMU-90, y CMU-183), debido a que el objetivo era analizar la variación intraespecífica y cepas de dicha especie con distintos genotipos, de acuerdo a como fueron definidos en el capítulo anterior. Así, hay representantes de los cuatro grupos genéticos para este análisis.

### **Patrones de aprovechamiento de sustratos**

Las cepas se inocularon en Agar Extracto de Malta (AEM) al 2% y se incubaron a 28 °C, en foto-periodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad hasta observar formación abundante de conidios (5 – 12 días, dependiendo de la cepa). Las conidias obtenidas se resuspendieron en tubos de ensayo de borosilicato con 16 mL de solución estéril de Phytigel (0.25% Phytigel, 0.03% Tween 40, H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>). La suspensión se ajustó a un valor de 75 (+/- 2) de transmitancia a una longitud de onda de 590 nm. Se adicionaron 100 µL de suspensión conidial en cada uno de los pozos de la

MicroPlaca FF Biolog® (Biolog, Inc., Hayward, CA.) incubándose en oscuridad a 28°C. Se realizaron mediciones de absorbancia a 490 nm (actividad mitocondrial) y 750 nm (producción micelial) utilizando el lector de microplacas Biolog MicroStation™ Reader (Biolog, Inc., Hayward, CA.). Con las lecturas obtenidas a 750 nm se generó un Mapa de Calor (Heatmap) empleando el software MeV v4.0 (Lopes *et al.*, 2012).

Además de los patrones de asimilación y crecimiento, también se documentaron los patrones de conidiación de las cepas de estudio en las distintas fuentes de carbono de la MicroPlaca FF Biolog® 8 días después de su inoculación a 28 °C. El interés en dicho análisis surgió de manera circunstancial, después de haber terminado las determinaciones de asimilación y crecimiento, ya que a la fecha existen muy pocos reportes del uso de las placas Biolog® FF para analizar la conidicación en hongos.

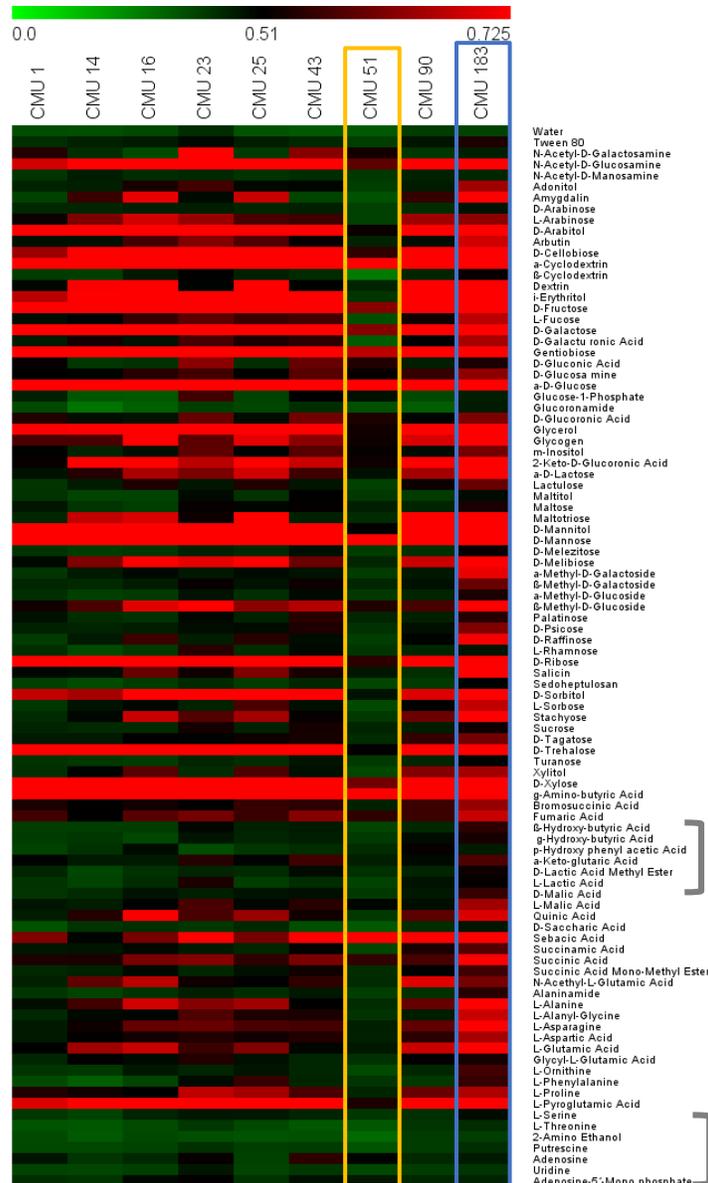
### **Generación de dendrogramas**

A partir de los patrones de aprovechamiento de sustratos de las palcas Biolog® se construyó una matriz dicotómica de 1 (utilización) y 0 (no utilización) con base en las lecturas generadas a 750 nm después de 3 días de incubación. Dicha matriz fue utilizada para calcular las distancias euclidianas entre las cepas mediante el algoritmo de Ne y Li (Dice) y con éstas distancias se generó un dendrograma mediante el criterio UPGMA, ambas operaciones se realizaron en el programa PAST ver. 1.81 (Hammer *et al.*, 2001).

## **RESULTADOS**

### **Diversidad metabólica en *T. harzianum***

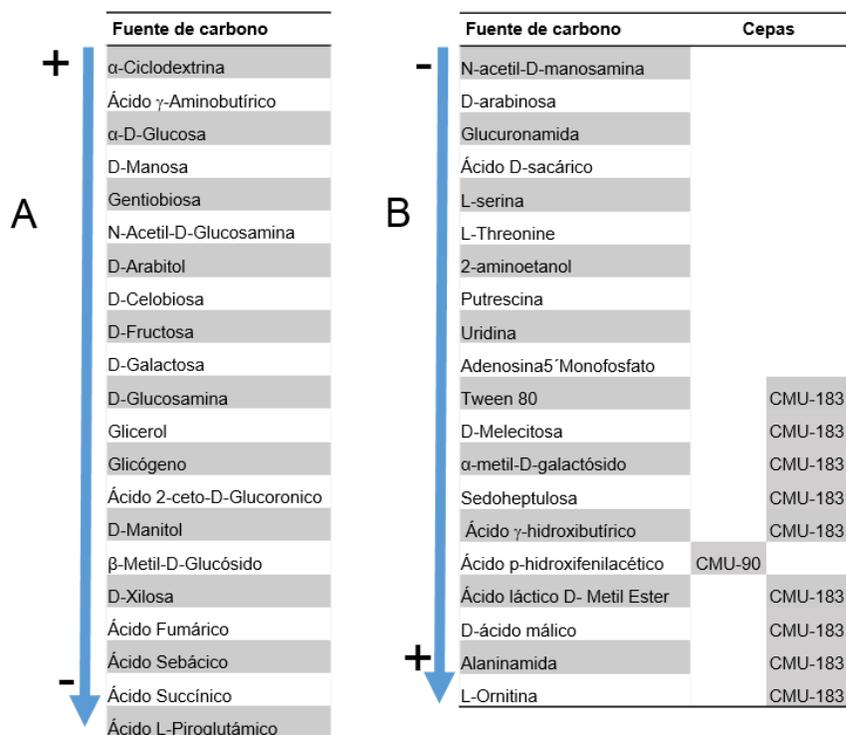
La cepa que mostró la mayor versatilidad metabólica fue la cepa CMU-183, mientras que aquella que mostró una menor versatilidad en la capacidad de utilización de sustratos fue la CMU-51 (Fig. 1).



**Figura 1.** Mapa de calor de asimilación de fuentes de carbono en las cepas de *T. harzianum* de estudio. El bajo crecimiento micelial es representado por el color verde claro ( $0 \leq A_{750} 0.3 \leq$ ), un alto crecimiento micelial es representado por el color rojo ( $0.6 \leq A_{750} 0.725 \leq$ ). Un crecimiento micelial intermedio es representado por el color negro ( $0.4 \leq A_{750} 0.55 \leq$ ). El rectángulo color azul indica la cepa que asimiló mayor cantidad de fuentes de carbono (CMU-183) y el rectángulo amarillo indica la cepa que asimiló menor cantidad de fuentes de carbono (CMU-51). Los corchetes en color gris indican las fuentes de carbono menos asimiladas por las cepas evaluadas de manera general. El crecimiento micelial se evaluó a 750 nm.

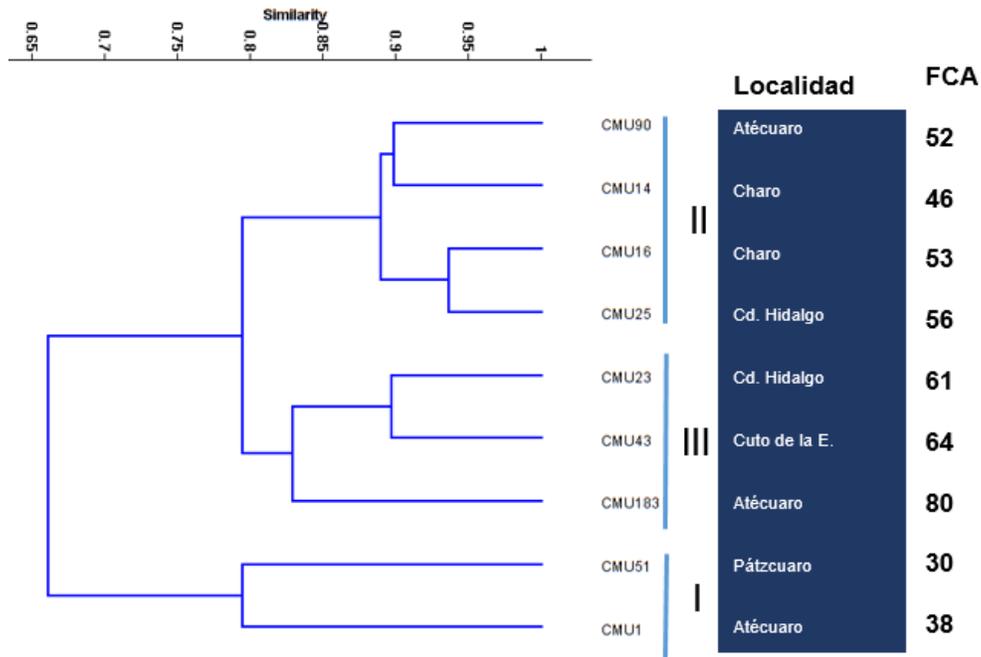
El ensayo de asimilación de sustratos mostró que los sustratos mejor metabolizados por la mayoría de las cepas de *T. harzianum* fueron  $\alpha$ -ciclodextrina, ácido  $\gamma$ -amino-butírico,  $\alpha$ -D-glucosa, D-manosa, gentiobiosa y N-acetil-D-glucosamina (Fig. 2 A). Los sustratos menos metabolizados por las cepas de *T. harzianum* estudiadas fueron

N-acetil-D-manosamina, D-arabinosa, glucuronamida, ácido-D-sacárico, L-serina, L-treonina, 2-amino etanol, y putrescina (Fig. 2 B).



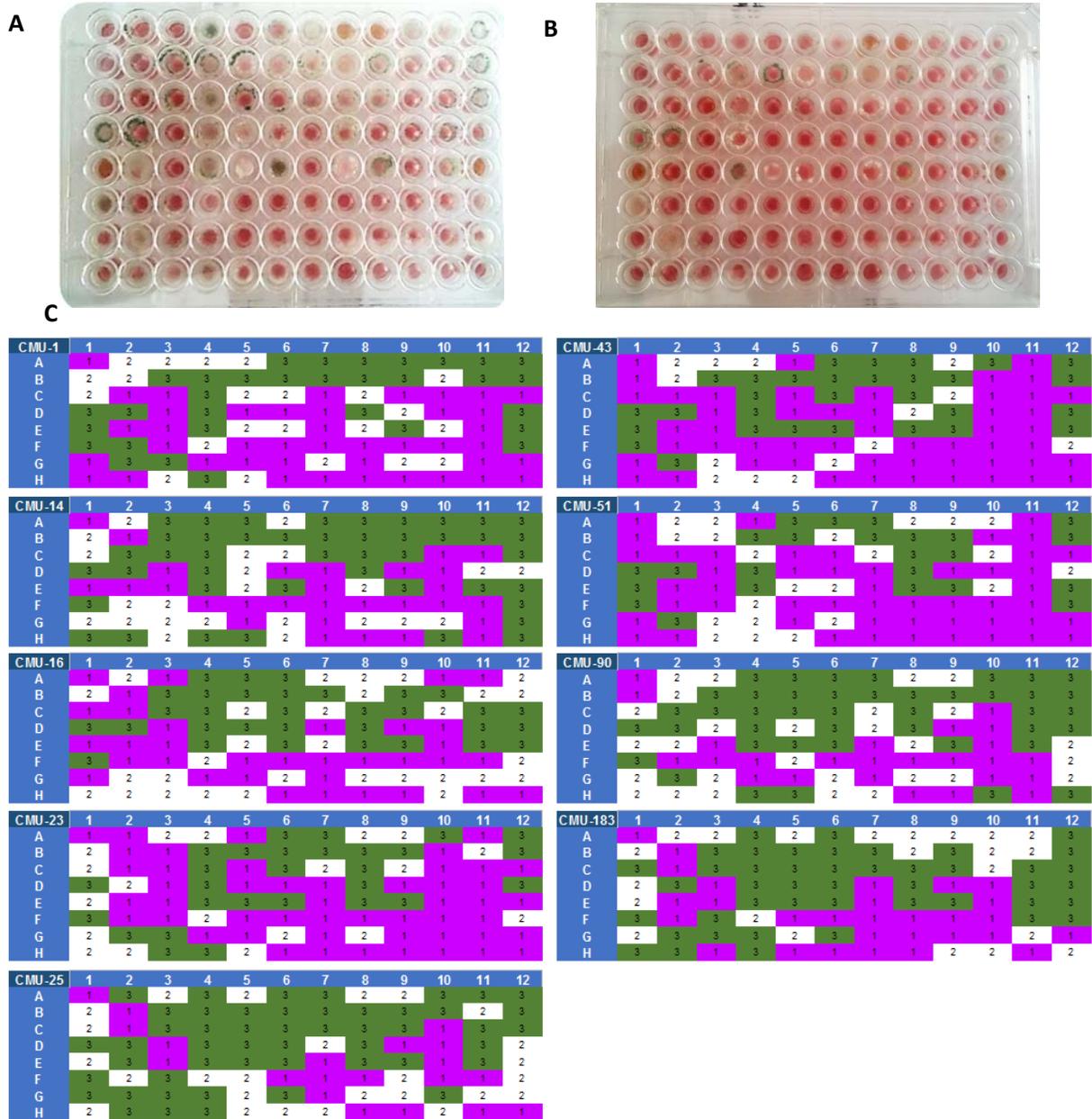
**Figura 2.** Perfiles de asimilación de sustratos. 2(A). Fuentes de carbono mejor asimiladas por cepas de *T. harzianum*, en esta columna fueron ordenadas de (+) que fueron asimiladas por todas las cepas a (-) en la parte inferior que fueron asimiladas por 7 u 8 cepas. 2(B) Fuentes de carbono menos asimiladas por cepas de *T. harzianum* ordenadas de (-) que no fueron asimiladas por ninguna cepa a (+) que fueron asimiladas por alguna de las cepas de estudio.

Con los resultados obtenidos a partir de los patrones de aprovechamiento de sustratos se construyó una matriz dicotómica la cual se utilizó para construir un dendrograma con base en las distancias euclidianas obtenidas (Figura 3). El dendrograma obtenido agrupó a las cepas de estudio en tres grandes ramas, correspondientes a las cepas con capacidad metabólica menor (Grupo I), intermedia (Grupo II) y mayor (Grupo III). La capacidad metabólica de las cepas no presentó relación con su origen geográfico, ya que en cada uno de los tres grupos se presentaron cepas provenientes de diferentes localidades.



**Figura 3.** Dendrograma de asimilación de fuentes de carbono. Se generó a partir de la asimilación de fuentes de carbono de las cepas de *T. harzianum* apreciándose la formación de tres grandes grupos. Al lado de cada cepa se muestra la localidad de colecta y aislamiento. Lateral a esta columna se encuentra el número de fuentes de carbono asimiladas (FCA), por las cepas de estudio.

Al continuar la incubación de las placas Biolog® con cada una de las cepas de estudio, después de terminado el análisis de crecimiento y asimilación de fuentes de carbono, se encontró que éstas mostraron una capacidad diferencial para conidiar en los distintos sustratos evaluados. La cepa que conidió en mayor cantidad de fuentes de carbono fue la CMU-25 (Fig.4A), mientras que la cepa que conidió en menos fuentes de carbono fue la CMU-51 (Fig.4B). El resto de las cepas tuvieron una conidiación intermedia. En total, las cepas fueron capaces de conidiar en 50 fuentes de carbono distintas (Fig. 5). No obstante, los sustratos en los que se observó una mayor conidiación fueron D-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, gentobiosa y D-trealosa, en ese orden (Fig. 5).



**Figura 4. Patrones de conidiación de las cepas de *T. harzianum* en distintas fuentes de carbono.** Se muestran las placas Blolog® de las cepas CMU-25 (A) y CMU-51 (B) con mayor y menor grado, respectivamente de conidiación y producción micelial, en las fuentes de carbono evaluadas. En (C) se muestra un esquema de los patrones de conidiación en las placas Biolog® de las cepas *T. harzianum* estudiadas. El color violeta (1) indica que la cepa asimila la fuente de carbono pero no crece. El color blanco (2) indica producción micelial y el color verde (3) muestra la producción de conidias maduras. La conidiación se evaluó 8 días después de su inoculación.

**Tabla 1.** Patrones de conidiación de las cepas de *T. harzianum* en las placas Biolog®.

Cepa	Sin crecimiento	Micelio	Conidiación
CMU-1	42	22	32
CMU-14	29	23	44
CMU-16	34	30	32
CMU-23	49	19	28
CMU-25	20	26	50
CMU-43	52	14	30
CMU-51	50	22	24
CMU-90	25	28	43
CMU-183	29	22	45

La cepa CMU-51 fue la que conidió en menos fuentes de carbono y las cepas CMU-25 y CMU-183 las que conidieron en un mayor número de éstas.

**Figura 5.** Fuentes de carbono en las que más y menos conidiación se presentó en las cepas de estudio.

## DISCUSIÓN

El análisis de la fuentes de carbono que promueven el crecimiento y la conidiación en *Trichoderma* spp. es importante desde el punto de vista de la biología básica de las especies del género y desde el punto de vista biotecnológico, para la obtención de conidios de manera masiva. Empleando el sistema Biolog en *T. atroviride* (*H. atroviridis*) se ha demostrado que la conidiación depende fundamentalmente de la fuente de carbono, y que la luz es solo un componente catalítico en dicho proceso (Friedl *et al.*, 2008b), algo que posiblemente sea común a las especies del género *Trichoderma*. Así, independientemente del régimen de iluminación del cultivo, la selección de la fuente de carbono es fundamental para un proceso de conidiación masiva.

La gran variación intraespecífica en la capacidad metabólica de cepas de *T. harzianum* utilizando el sistema Biolog encontrada en el presente trabajo corrobora estudio previos con dicho taxón empleando la misma herramienta de análisis (Kubicek *et al.*, 2003). Se ha propuesto que dicha variabilidad es una de las razones por las cuales *T. harzianum* es el taxón con más amplia distribución geográfica dentro del género (Kubicek *et al.*, 2003). También se ha hipotetizado que la causa de tal variabilidad puede ser atribuida a la presencia de un transposon en cepas de *T. harzianum* (Kubicek *et al.*, 2003), aunque no ha habido ninguna corroboración experimental o bioinformática posterior de tal aseveración. Sin embargo, actualmente se encuentra bien establecido que *T. harzianum* es un complejo formado por especies crípticas con una gran similitud genética (Chaverri *et al.*, 2003; Chaverri *et al.*, 2015), lo que podría explicar la variación metabólica, así como la variabilidad en los resultados de antagonismo (capítulo 1) y producción de enzimas hidrolíticas (capítulo 2), encontradas en el presente trabajo. Así, a futuro sería interesante analizar si las cepas de *T. harzianum* aquí analizadas pertenecen a diferentes especies dentro del complejo, y si esto puede explicar la variabilidad fisiológica y genética encontrada en el presente trabajo.

En general, las cepas aquí estudiadas mostraron mal crecimiento en N-acetil- $\beta$ -D-manosamina. La incapacidad para crecer en dicho sustrato ha sido empleada como evidencia de cepas con alta actividad quitinolítica (Nagy *et al.*, 2007). Las

cepas CMU-51 y CMU-183 de *T. harzianum* mostraron el nivel más alto y el más bajo de actividad quitinolítica, respectivamente (ver capítulo 2). La primera de estas cepas mostró un crecimiento más lento que la segunda en el sustrato mencionado, por lo que dicho resultado parece estar en congruencia con la relación respecto a la actividad quitinolítica. Sin embargo, en general, todas las cepas de *T. harzianum* mostraron un crecimiento muy lento en N-acetil- $\beta$ -D-manosamina, independientemente del nivel de actividad de quitinasa extracelular mostrado. No obstante, el análisis de actividad quitinolítica aquí realizado fue semicuantitativo, por lo que aun está por determinarse si efectivamente las cepas de *T. harzianum* analizadas muestran o no congruencia plena con la relación respecto a la capacidad de crecimiento en el sustrato antes mencionado (Nagy *et al.*, 2007).

Las diferencias en los resultados de utilización de fuentes de carbono entre las cepas CMU-51 y CMU-183 son muy interesantes, ya que la primera cepa mostró la capacidad metabólica más reducida y la segunda la más versátil, de todas las cepas evaluadas. Se ha postulado que las diferencias en las capacidades metabólicas reveladas mediante el sistema Biolog pueden ser una herramienta para la diferenciación entre especies del complejo *T. harzianum* (revisado en Atanasova y Druzhinina, 2010). Entre los sustratos que dicha cepa no puede utilizar se encuentran los ácidos  $\alpha$ -cetoglutarico, L-málico y succinámico. Esto es relevante ya que se ha postulado que la utilización de estos sustratos permite diferenciar a *T. pleurotica* de *T. aggressivum* (Komon-Zelazowska *et al.*, 2007), ambas especies del complejo *T. harzianum*. El análisis filogenético empleando las secuencias ITS y *tef1* coloca a las cepas CMU-51 y CMU 183 en ramas distintas pero muy cercanas dentro del complejo *T. harzianum* (Cázares-García *et al.*, 2016), por lo que los perfiles metabólicos pudieran estar definiendo su separación como especies dentro del complejo y posiblemente asignando a la cepa CMU-51 como *T. aggressivum*, algo que estaría por resolverse con mayor precisión a futuro.

Otra característica de las cepas dentro del complejo *T. harzianum* encontrada mediante el análisis Biolog, es la capacidad para crecer en presencia de L-fenilalanina, en contraste con otras especies dentro del género, que no pueden utilizar dicha fuente de carbono (Kubicek *et al.*, 2003). No obstante, la mayoría de las

cepas de *T. harzianum* aquí analizadas no pudieron utilizar dicho sustrato para crecer, aunque las cepas CMU-23, CMU-25 y CMU-183, si bien lentamente, si mostraron crecimiento en él. De la misma manera, una característica metabólica sobresaliente con respecto a otras especies del género, es la capacidad para crecer aunque lentamente en los ácidos bromosuccínico y hidroxifenilacético (Kubicek *et al.*, 2003). De las cepas aquí analizadas, la CMU-51 fue la que peor crecimiento mostró en el primer sustrato y la CMU-183 la que creció mejor en éste. Mientras que la CMU-16 y la CMU-90 mostraron mejor crecimiento en ácido hidroxifenilacético que el resto de las cepas analizadas. Nuevamente, una explicación posible para la falta de crecimiento de algunas de las cepas estudiadas en presencia de L-fenilalanina, y la variabilidad observada respecto al crecimiento en los ácidos bromosuccínico y hidroxifenilacético, es que en el presente trabajo se analizaron especies dentro del complejo *T. harzianum* distintas de las analizadas en el trabajo previo (Kubicek *et al.*, 2003).

De manera interesante, mientras que los sustratos en los que se presentó mejor crecimiento de la mayoría de las cepas de *T. harzianum* aquí analizadas fueron  $\alpha$ -ciclodextrina, ácido  $\gamma$ -amino-butírico,  $\alpha$ -D-glucosa, D-manosa, gentiobiosa y N-acetil-D-glucosamina; previamente se ha reportado que D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, L-eritritol, glicerol, fructosa, fucosa, L-arabinosa, D-galactosa, y xilitol, son los sustratos mejor aprovechados por las distintas especies de *Trichoderma* para el crecimiento (Kubicek *et al.*, 2003). En un reporte más reciente en el que se analizaron cepas silvestres de las especies *T. asperellum*, *T. tomentosum*, *T. koningiopsis* y siete cepas *T. harzianum*, se documentó que en general, las fuentes de carbono en las que se observó un mejor crecimiento de las cepas de estudio fueron D-glucosa, glicerol, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, i-eritritol, gentiobiosa, D-arabitol, D-fructosa, dextrina, y xilosa (Lopes *et al.*, 2012). De este conjunto de sustratos, solo la N-acetil-D-glucosamina es común entre los estudios previos y el presente trabajo, lo que muestra que conforme se analizan más cepas de distintas especies y de diferentes regiones geográficas, es difícil establecer una tendencia respecto al uso de fuentes de carbono dentro del género *Trichoderma*. Así, nuestros resultados sugieren futuros estudios sobre la capacidad metabólica y una diversidad

distinta dentro del género a la de los reportes realizados a la fecha.

En relación a la conidiación, los sustratos en los que ocurrió dicho fenómeno de diferenciación celular en la mayoría de las cepas analizadas fueron D-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, gentobiosa, D-trealosa, D-manitol y D-sorbitol. Estudios previos han mostrado sustratos que promueven la conidiación en *T. harzianum* y otras especies del género, que coinciden con los encontrados en el presente trabajo. Los 10 principales sustratos que en este estudio promovieron la conidiación en *T. harzianum* también lo hacen en *T. atroviride* (*H. atroviridis*) (Jakubíková *et al.*, 2006; Friedl *et al.*, 2008b), bajo diferentes condiciones de cultivo e iluminación. Se ha documentado el incremento de la conidiación de *T. harzianum* cuando se agrega manitol a medio rico V8 (Harman *et al.*, 1991), la D-trealosa en *T. reesei* (*H. jecorina*) (Druzhinina *et al.*, 2010) y los siete sustratos que fueron los principales promotores de la conidiación en este trabajo también la promovieron en *T. parareesei* nom. prov. (Druzhinina *et al.*, 2010). Sin embargo, este estudio es congruente con resultados previos que muestran que existe una diferencia significativa en la utilización de sustratos empleados para conidiación en diferentes especies de *Trichoderma* spp. Así, mientras que *T. reesei* solo puede conidiar en siete fuentes de carbono de las 95 que contienen las placas Biolog, *T. parareesei* nom. prov. puede hacerlo en 62 (Druzhinina *et al.*, 2010), y en este trabajo se encontraron 10 fuentes principales en los que la mayoría de las cepas de *T. harzianum* puede conidiar, pero más de 20 fuentes en total, dependiendo de la cepa.

Se ha postulado que la versatilidad en la utilización de fuentes de carbono para el crecimiento y la conidiación, son un reflejo de la capacidad de las especies de *Trichoderma* spp. para distribuirse ampliamente en diferentes hábitats o para ocupar un nicho ecológico determinado (Druzhinina *et al.*, 2010). Así, aquellas especies que tienen una gran versatilidad metabólica, aprovechando una amplia diversidad de fuentes de carbono para crecer y producir conidias tenderán a ocupar distintos hábitats y tendrán una distribución geográfica más amplia que aquellas especies con una versatilidad metabólica disminuida. De hecho, la comparación metabólica, junto con otros análisis fisiológicos, bioquímicos y genéticos, entre especies genéticamente cercanas de *Trichoderma* spp. puede ayudar a evidenciar especiación

simpátrica, con uno de los taxones estudiados especializándose en ocupar el tejido foliar y siendo más competitivo como micoparásito, mientras que la otra especie ocupando el suelo y el mantillo, con menor potencial micoparasítico (Druzhinina *et al.*, 2010). Así, la evidencia metabólica aquí generada puede estar revelando diferencias en los estilos de vida de las cepas de *T. harzianum* analizadas, algo que debe de ser evaluado con más profundidad en estudios futuros. Además, como se ha comentado previamente, es muy posible que dichas diferencias estén mostrando especies crípticas distintas dentro del complejo *T. harzianum*.

Recientemente se ha evaluado el papel de la metiltransferasa LaeA, un regulador global de la transcripción, en el proceso de conidiación de *T. atroviride* (Aghcheh *et al.*, 2013). Mutantes con el gen *lae1* no funcional muestran deficiencias en la conidiación bajo diferentes condiciones de cultivo, incrementa la sensibilidad al estrés oxidativo y disminuye la capacidad micoparasítica de *T. atroviride*. En contraste, las sobreexpresantes de dicho gen mantienen su capacidad de conidiación e incrementan el vigor micoparasítico (Aghcheh *et al.*, 2013). Es muy probable que dicho gen tenga el mismo papel fisiológico en otras especies del género, incluida *T. harzianum*, por lo que a futuro sería interesante evaluar el proceso de conidiación en mutantes de dicho gen, en combinación con distintas fuentes de carbono en *T. harzianum*, con la idea de conocer más a detalle los mecanismos moleculares que gobiernan la producción de conidias en dicho taxón. Además, es interesante probar distintas condiciones de iluminación y determinar el nivel de maduración de las conidias en cada condición de cultivo, como se ha realizado para *T. atroviride* (*H. atroviridis*) (Friedl *et al.*, 2008b).

## Referencias Bibliográficas

- [1] Aghcheh, R. K., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. (2013). The putative protein methyltransferase LAE1 of *Trichoderma atroviride* is a key regulator of asexual development and mycoparasitism. *PLoS ONE*. 8(6): e67144.
- [2] Atanasova, L., Druzhinina, I. S. (2010). Global nutrient profiling by phenotype microArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi. *Journal of Zhejiang University Science B*. 11(3): 151-168.
- [3] Atanasova, L., Jaklitsch, W. M., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2010). Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina/T. reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(21): 7259-7267.
- [4] Berni, E., Degola, F., Cacchioli, C., Restivo, F. M., Spotti, E. (2011). Polyphasic approach for differentiating *Penicillium nordicum* from *Penicillium verrucosum*. *Food Additives and Contaminants*. 28(4): 477-484.
- [5] Bissett, J., Szakacs, G., Nolan, C. A., Druzhinina, I., Gradinger, C., Kubicek, C. P. (2003). New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*. 81(6): 570-586.
- [6] Bochner, B. R., Savageau, M. A. (1977). Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 33(2): 434-444.
- [7] Bochner, B. R. (1989). Sleuthing out bacterial identities. *Nature*. 339:157-158.
- [8] Bochner, B. R., Gadzinski, P., Panomitros, E. (2001). Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research*. 11(7): 1246-1255.
- [9] Bochner, B. R. (2003). New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nature Reviews Genetics*. 4(4): 309-314.
- [10] Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 27(2): 302-313.

- [11] Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- [12] Deacon, L. J., Pryce-Miller, E. J., Frankland, J. C., Bainbridge, B. W., Moore, P. D., Robinson, C. H. (2006). Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(1): 7-20.
- [13] De la Cruz, T. E. E., Schulz, B. E., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2006). Carbon source utilization by the marine *Dendryphiella* species *D. arenaria* and *D. salina*. *FEMS microbiology ecology*. 58(3): 343-353.
- [14] Di Lonardo, D. P., Pinzari, F., Lunghini, D., Maggi, O., Granito, V. M., Persiani, A. M. (2013). Metabolic profiling reveals a functional succession of active fungi during the decay of Mediterranean plant litter. *Soil Biology and Biochemistry*. 60: 210-219.
- [15] Dobranic, J. K., Zak, J. C. (1999). A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Mycologia*. 91(5): 756-765.
- [16] Druzhinina, I. S., Schmoll, M., Seiboth, B., Kubicek, C. P. (2006). Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Applied and environmental microbiology*. 72(3): 2126-2133.
- [17] Druzhinina, I. S., Komon-Zelazowska, M., Atanasova, L., Seidl, V., Kubicek, C. P. (2010) Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. *PLoS ONE*. 5(2): e9191.
- [18] Friedl, M. A., Schmoll, M., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2008a). Photostimulation of *Hypocrea atroviridis* growth occurs due to a cross-talk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress. *Microbiology*. 154(4): 1229-1241.
- [19] Friedl, M. A., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2008b). Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(1): 245-250.

- [20] Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 1. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- [21] Harman, G. E., Jin, X., Stasz, T. E., Peruzzotti, G., Leopold, A. C., Taylor, A. G. (1991). Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological Control*. 1(1): 23-28.
- [22] Jakubíková, L., Farkaš, V., Kolarova, N., Nemcovič M. (2006). Conidiation of *Trichoderma atroviride* isolate during submerged cultivation in a laboratory stirred-tank fermenter. *Folia Microbiol.* 51(3): 209-213.
- [23] Janusz, G., Czuryło, A., Frąc, M., Rola, B., Sulej, J., Pawlik, A., Siwulski M., Rogalski, J. (2015). Laccase production and metabolic diversity among *Flammulina velutipes* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(1): 121-133.
- [24] Kaur, J., Duan, S. Y., Vaas, L. A., Penesyan, A., Meyer, W., Paulsen, I. T., & Nevalainen, H. (2015). Phenotypic profiling of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic pathogen colonizing human lungs. *PloS one*. 10(3): e0122354.
- [25] Kobayashi, N., Watanabe, M., Hara-Kudo, Y. (2012). Distinctive identification of *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium halotolerans* based on physiological methods. *Journal of Systematics and Evolution*. 50(3): 235-243.
- [26] Komoń-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito M., Kredics L., Kubicek C. P., Druzhinina, I. S. (2007). Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Applied and environmental microbiology*. 73(22): 7415-7426.
- [27] Kraus, G. F., Druzhinina, I., Gams, W., Bissett, J., Zafari, D., Szakacs, G., Koptchinski, A., Prillinger, H., Zare, R., Kubicek, C. P. (2004). *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia*. 96(5): 1059-1073.
- [28] Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal genetics and biology*. 38(3): 310-319.

- [29] Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., Udhayaraj, P., Srivastava, R. C. (2011). Genetic and physiological relatedness of antagonistic *Trichoderma* isolates against soil borne plant pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 44(14): 1399-1409.
- [30] Lange, C., Weld, R. J., Cox, M. P., Bradshaw, R. E., McLean, K. L., Stewart, A., Steyaert, J. M. (2016). Genome-scale investigation of phenotypically distinct but nearly clonal *Trichoderma* strains. *PeerJ*. 4, e2023.
- [31] Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandão, R. S., Monteiro, V. N., Júnior, M. L., Coelho A. S. G., Ulhoa C. J., Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*. 116(7): 815-824.
- [32] López-Quintero, C. A., Atanasova, L., Franco-Molano, A. E., Gams, W., Komoń-Zelazowska, M., Theelen, B., Müller, W. H., Boekhout, T., Druzhinina, I. (2013). DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 104(5): 657-674.
- [33] Mohamed-Benkada, M., Montagu, M., Biard, J. F., Mondeguer, F., Verite, P., Dalgalarondo, M., Bissett, J., Pouchus, Y. F. (2006). New short peptaibols from a marine *Trichoderma* strain. *Rapid communications in mass spectrometry*. 20(8): 1176-1180.
- [34] Nagy, V., Seidl, V., Szakacs, G., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2007). Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Applied and environmental microbiology*. 73(21): 7048-7058.
- [35] Pawlik, A., Malinowska, A., Siwulski, M., Frąć, M., Rogalski, J., Janusz, G. (2014). Determination of biodiversity of *Coprinus comatus* using genotyping and metabolic profiling tools. *Acta biochimica Polonica*. 62(4): 683-689.

- [36] Pawlik, A., Janusz, G., Dębska, I., Siwulski, M., Fraç, M., Rogalski, J. (2015). Genetic and metabolic intraspecific biodiversity of *Ganoderma lucidum*. *BioMed research international*. 726149.
- [37] Pinzari, F., Reverberi, M., Piñar, G., Maggi, O., Persiani, A. M. (2014). Metabolic profiling of *Minimedusa polyspora* (Hotson) Weresub & P.M. LeClair, a cellulolytic fungus isolated from Mediterranean maquis, in southern Italy. *Plant Biosystems*. 148(2): 333-341.
- [38] Reverberi, M., Punelli, M., Scala, V., Scarpari, M., Uva, P., Mentzen, Wieslawa I., Dolezal, A.L., Woloshuk, C., Pinzari, F., Fabbri, A. A., Fanelli, C., Payne, G. A. (2013) Genotypic and Phenotypic Versatility of *Aspergillus flavus* during Maize Exploitation. *PLoS ONE* 8(7): e68735.
- [39] Rice, A. V., Currah, R. S. (2005). Profiles from Biolog FF plates and morphological characteristics support the recognition of *Oidiodendron fimicola* sp. nov. *Studies in Mycology*. 53(1): 75-82.
- [40] Rola, B., Pawlik, A., Fraç, M., Małek, W., Targoński, Z., Rogalski, J., Janusz, G. (2015). The phenotypic and genomic diversity of *Aspergillus* strains producing glucose dehydrogenase. *Acta biochimica Polonica*. 62(4): 747-755.
- [41] Ruiz, N., Dubois, N., Wielgosz-Collin, G., du Pont, T. R., Bergé, J. P., Pouchus, Y. F., Barnathan, G. (2007). Lipid content and fatty acid composition of a marine-derived *Trichoderma longibrachiatum* strain cultured by agar surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry*. 42(4): 676-680.
- [42] Sobek, E. A., Zak, J. C. (2003). The soil FungiLog procedure: method and analytical approaches toward understanding fungal functional diversity. *Mycologia*. 95(4): 590-602.
- [43] Stefanowicz, A. (2006). The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15(5): 669-676.
- [44] Talbot, N. J., Vincent, P., Wildman, H. G., (1996). The influence of genotype and environment on the physiological and metabolic diversity of *Fusarium compactum*. *Fungal Genetics and Biology*. 20(4): 254-267.

- [45] Tanzer, M. M., Arst Jr, H. N., Skalchunes, A. R., Coffin, M., Darveaux, B. A., Heiniger, R. W., Shuster, J. R. (2003). Global nutritional profiling for mutant and chemical mode-of-action analysis in filamentous fungi. *Functional & integrative genomics*. 3(4): 160-170.
- [46] Wang, H., Wang, J., Chen, Q., Wang, M., Hsiang, T., Shang, S., Yu, Z. (2016). Metabolic effects of azoxystrobin and kresoxim-methyl against *Fusarium kyushuense* examined using the Biolog FF MicroPlate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 130: 52-58.
- [47] Wildman, H. G. (1995). Influence of habitat on the physiological and metabolic diversity of fungi. *Canadian journal of botany*. 73(1): 907-916.
- [48] Wirsel, S. G., Runge-Froböse, C., Ahrén, D. G., Kemen, E., Oliver, R. P., Mendgen, K. W. (2002). Four or more species of *Cladosporium* sympatrically colonize *Phragmites australis*. *Fungal Genetics and Biology*. 35(2):99-113.

## DISCUSIÓN GENERAL

La selección de cepas de *Trichoderma* spp. con fines biotecnológicos se ha desarrollado desde hace más de 30 años evaluando colecciones de aislados de diferentes partes del mundo. Estos estudios han permitido la generación de estrategias que optimizan el proceso de selección, los cuales incluyen el análisis de diferentes características fisiológicas, bioquímicas y genéticas del conjunto de cepas de interés. En el presente trabajo se empleó una estrategia que ha sido utilizada en diversos trabajos previos, dada la experiencia acumulada por los años de análisis en la selección cepas.

Sin duda alguna, los criterios de selección más comunes a todos los trabajos han sido desarrollados en medio sólido para analizar *in vitro* distintos aspectos del micoparasitismo de *Trichoderma* spp. Dichos ensayos comprenden la confrontación directa en cultivos duales entre las cepas de *Trichoderma* spp. y el o los fitopatógenos de interés, así como la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos por sustancias solubles o volátiles producidas por el potencial biocontrolador. Casi de manera simultánea, a dichos ensayos se incorporó la evaluación cualitativa o semicuantitativa, también en cultivo sólido, de la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como uno de los criterios de selección de cepas con potencial micoparasítico. En ese sentido cobró relevancia la producción de enzimas hidrolíticas que atacan la pared celular de hongos y de oomicetos. Esto no obstante que, como se mencionó en el capítulo 2, no en todos los estudios se ha presentado una correspondencia entre la capacidad micoparasítica y la producción de enzimas hidrolíticas. Todos estos ensayos realizados en cultivo sólido son de un desarrollo relativamente simple, por lo que permiten el análisis de una gran cantidad de cepas de manera simultánea. No obstante, para algunos de ellos, como el ensayo de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares o la fermentación en líquido empleando distintos sustratos, se han podido desarrollar recientemente métodos para el análisis en microplacas (Cianchetta *et al.*, 2010; Giese *et al.*, 2014; Linde *et al.*, 2014), lo que además de incrementar el número de cepas analizadas en un corto periodo de tiempo, permite hacer una medición cuantitativa más precisa para establecer diferencias más claras entre las cepas de estudio. Sin embargo, dichas

técnicas conllevan el uso de equipo como lectores de placas, lo que incrementa los costos asociados al análisis.

A partir de estos ensayos fundamentales, las estrategias empleadas en la literatura difieren respecto a los tipos de ensayos que se hacen a las cepas de interés. En algunos casos se continúan realizando análisis *in vitro* probando la efectividad de extractos o filtrados crudos del medio de cultivos líquidos sobre la inhibición de fitopatógenos (Alamri *et al.*, 2012), mientras que en otros casos se evalúa la producción de enzimas hidrolíticas de manera cuantitativa, también en cultivos líquidos, con la finalidad de hacer una distinción más fina entre las cepas de estudio (dos Reis Almeida *et al.*, 2007; Qualhato *et al.*, 2013; Witkowska y Maj, 2002). Recientemente se ha incorporado la estrategia de evaluar en alguna de las cepas seleccionadas en los pasos previos los niveles de transcripción de genes que codifican para enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas (Troian *et al.*, 2014). En otros casos se han realizado análisis de promoción del crecimiento *in vitro*, particularmente del sistema radicular, empleando *Arabidopsis thaliana* como planta modelo (Aleandri *et al.*, 2015).

Después de agotar las posibilidades del análisis *in vitro* anteriormente expuestas, la estrategia de diversos trabajos es realizar análisis en macetas, cámaras de crecimiento o invernadero con plantas de interés de una, o un número reducido de las cepas, de *Trichoderma* spp. seleccionadas para evaluar la efectividad de la protección contra patógenos después de las pruebas básicas *in vitro*, y tener una aproximación sobre las posibilidades de su éxito en campo (Anees *et al.*, 2010; Aleandri *et al.*, 2015; Padder y Sharma, 2011; Saxena *et al.*, 2015). Las pruebas en campo son una parte muy importante de un estudio en el que se han seleccionado cepas de *Trichoderma* como biocontrolador de microorganismos fitopatógenos, las cuales van a permitir saber si realmente se cuenta con una cepa con la cual se puede realizar una formulación para su uso agrícola, aunque son relativamente más escasos los estudios que abarcan desde el aislamiento y selección de cepas *in vitro*, hasta la aplicación en campo (ej. Avila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2016; Thangavelu *et al.*, 2004; Tondje *et al.*, 2007), que los que se quedan en la evaluación *in vitro*, varios de los cuales han sido citados en los

capítulos del presente trabajo.

El análisis de la estrategia general usada en la literatura para seleccionar cepas de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador presentado anteriormente no es exhaustivo, pero permite resaltar un aspecto del presente trabajo que representan una contribución a dicha estrategia. Esta contribución al escrutinio de cepas de *Trichoderma* spp. es la adición del análisis de microareglos fenotípicos (MF) o patrón metabólico mediante el sistema Biolog, en combinación con el análisis de huella genética mediante marcadores ISSR y rep-PCR. Como se documenta en la introducción del capítulo correspondiente, el Biolog como herramienta de análisis metabólico ha sido utilizada primordialmente para ayudar a distinguir entre especies del género, para evaluar diversidad y como ayuda al análisis de procesos fisiológicos y bioquímicos en cepas “modelo” y sus mutantes de *Trichoderma* spp. (Atasanova y Druzhinina, 2010), pero, salvo el trabajo de Lopes *et al.* (2012), no como criterio en la selección de cepas biocontroladoras. Por otra parte, como también se mencionó en el capítulo 3, marcadores para la generación de huella genética (*fingerprinting*) han sido utilizados desde hace tiempo con la idea de evaluar diferencias genéticas en cepas de *Trichoderma* spp. y generar patrones que permitan seleccionar genotipos con potencial biocontrolador. Sin embargo, hasta el presente trabajo la inclusión de Biolog junto con la generación de huella genética no habían sido consideradas en conjunto en una estrategia de selección.

El uso de una estrategia adecuada para la selección de cepas biocontroladoras no es cosa menor, ya que además de efectiva en costo para analizar un número importante de cepas de manera simultánea, debe de incluir ensayos que abarquen los diversos mecanismos empleados por *Trichoderma* spp. en el proceso de antagonismo (ver Introducción General). Se ha demostrado que cuando se usan ensayos de antagonismo diferentes al de confrontación en placa, cepas que no habían mostrado buenos resultados en dicho ensayo, muestran resultados óptimos de inhibición de fitopatógenos (Schöneberg *et al.*, 2015). Por lo anterior, en el presente trabajo se realizaron ensayos que permitieron evaluar la antibiosis (inhibición de crecimiento, capítulo 1), el antagonismo directo y micoparasitismo (ensayos de confrontación en cultivos duales, capítulo 1; producción

enzimas hidrolíticas, Capítulo 2), y la posible competencia por nutrientes (perfiles metabólicos o MF, capítulo 3). No obstante, la producción de volátiles y el efecto directo sobre el crecimiento y la inducción de resistencia en la planta son pruebas que deberán realizarse a futuro en las cepas de estudio, ya que no se abarcaron en el presente trabajo.

La correlación entre las variables analizadas de las cepas de *Trichoderma* spp., no fue clara. Es decir, la cepa que presentó la mejor capacidad antagónica y de inhibición de crecimiento, no en todos los casos presentó los mejores niveles de actividad enzimática extracelular. En particular, en el caso de las cepas de *T. harzianum*, aquellas que mostraron una mayor diversidad metabólica no fueron las que presentaron los mejores niveles de antagonismo, inhibición o producción de enzimas hidrolíticas extracelulares. Debido a que los análisis de escrutinio de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. con fines de biocontrol han mostrado que las cepas analizadas utilizan diferentes mecanismos para el biocontrol, diversos trabajos han propuesto el uso de mezclas de cepas para el diseño de una formulación que se aplique en campo (Aleandri *et al.*, 2015), aunque no siempre las mezclas de cepas aseguran un mejor resultado.

De las cepas analizadas destacó la de *T. atroviride* (CMU-8), por sus niveles de antagonismo e inhibición y la cepa CMU-218 de *T. viride*, por su producción de enzimas hidrolíticas. Algunas cepas de *T. harzianum* presentaron los mejores niveles de antagonismo (CMU-14, CMU-16 y CMU-90), así como altas actividades de xilanasas y proteasas, y la de *T. trixiae* (CMU-231) mostró altas actividades de quitinasa y celulasa, así como altos valores de antagonismo. Por último, la cepa CMU-183 de *T. harzianum* mostró la mayor versatilidad metabólica. Por lo anterior, sería factible hipotetizar que una mezcla de algunas de las cepas mencionadas anteriormente pueda ser lo adecuado para la formulación de un producto de biocontrol. A futuro sería interesante evaluar dicha posibilidad analizando la protección de dicha mezcla contra las enfermedades causadas por los fitopatógenos estudiados en plantas de relevancia agrícola del estado de Michoacán, de las cuales los patógenos fueron aislados.

El análisis de la utilización de fuentes de carbono puede relacionarse

experimentalmente con la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, ya que se ha mostrado que dichas actividades enzimáticas se inducen de manera diferencial en *Trichoderma* spp., dependiendo de la fuente de carbono, además de residuos celulares de los fitopatógenos (Kaur *et al.*, 2005). Este tipo de análisis puede además ser complementado con herramientas bioinformáticas y de biología molecular, ya que dado el conocimiento de algunos de los genomas de *Trichoderma* spp. (Schmoll *et al.*, 2016), es posible diseñar vectores de expresión y obtener transformantes para la obtención de cepas sobre productoras de alguna de las actividades enzimáticas de interés, con la intención de incrementar su potencial micoparasítico. Las secuencias que podrían manipularse en ese sentido podrían ser las regiones regulatorias de los genes de las enzimas hidrolíticas de interés, o bien algunos reguladores globales cuyo efecto positivo sobre micoparasitismo ya ha sido evaluado previamente (Aghcheh *et al.*, 2013).

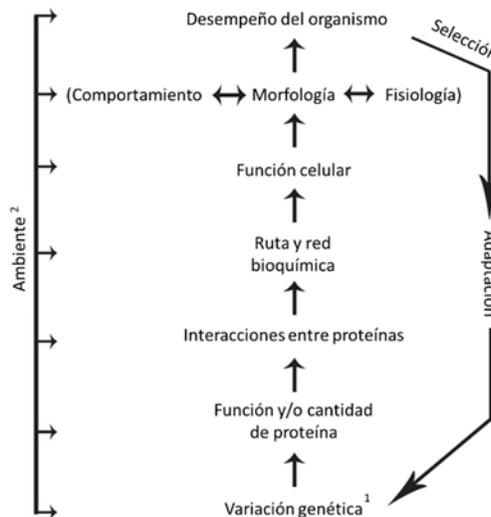
Los resultados generados en el análisis de las cepas de *T. harzianum* sugieren fuertemente una relación entre genotipo y fenotipo. Así, las cepas CMU-23, CMU-43 y CMU-183 que salen agrupadas con todos los marcadores genéticos utilizados, también muestran el mismo patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono y conidiación en placas Biolog. De manera interesante, aunque las dos primeras cepas provienen de localidades distintas, además de compartir genotipo y patrones metabólicos, salvo la capacidad de inhibición hacia *C. coccodes*, también son muy similares en el patrón de antagonismo contra fitopatógenos y, a excepción de la actividad de proteasa, en su capacidad para producir enzimas hidrolíticas extracelulares. El caso de las cepas CMU-14, CMU-16 y CMU-90 es similar; dichas cepas se agrupan en la mayoría de los dendrogramas generados con marcadores genéticos y también en los patrones de agrupamiento construidos con los resultados de las placas Biolog. Aunque en este último caso también se agrupan con la cepa CMU-25, con lo cual no muestran similitud genética.

Adicionalmente, las cepas CMU-14 y CMU-16, ambas provenientes de Charo, muestran prácticamente los mismos patrones de antagonismo contra fitopatógenos y de producción de enzimas extracelulares. Si bien la diferencia notada entre estas cepas es la capacidad de inhibición de crecimiento de *F. mexicanum*, el fitopatógeno

más resistente al ataque de *Trichoderma* spp. aquí estudiado. En contraste, las cepas CMU-1 y CMU-51 que no presentan similitud genética y provienen de distintas localidades, comparten los mismos patrones de aprovechamiento de fuentes de carbono y conidiación. Aun más, salvo la inhibición contra *C. coccodes* estas cepas tienen patrones de antagonismo prácticamente iguales, y aunque presentan algunas diferencias, pueden considerarse malas productoras de enzimas hidrolíticas. Así, este par de cepas pueden considerarse fisiológicamente similares pero genéticamente distintas.

Dentro de una especie o grupos taxonómicos estrechamente relacionados, como el caso del complejo *T. harzianum*, la relación entre la variación genética y las características fenotípicas se establece a diferentes niveles jerárquicos de organización de un sistema biológico (Fig 1., Dalziel et al., 2009). Explicar los resultados de cepas que comparten el mismo genotipo y fenotipo dentro de este modelo es relativamente simple, son cepas que se encuentran sujetas tanto a mecanismos de variación genética como a presión de selección en los distintos niveles jerárquicos similares. Sin embargo, este modelo también permite explicar la falta de relación entre fenotipo y genotipo dentro de los individuos de una población o entre poblaciones.

En aquellos individuos que presentan una gran similitud genética, pero que no comparten semejanzas fisiológicas el ambiente puede modificar el resultado fisiológico final entre estos afectando distintos niveles de la jerarquía biológica (Figura 1). Por otra parte, aquellas cepas que no comparten genotipos pueden estar sujetas a una presión selectiva similar, de tal forma que a partir de variantes genéticas distintas, el ambiente actúa sobre la jerarquía biológica para producir un mismo efecto fisiológico final en organismos distintos de la misma población o taxa estrechamente relacionados. Esto podría explicar por que las cepas CMU-1 y CMU-51, no relacionadas genéticamente, presentan un perfil metabólico muy similar; esta misma explicación puede aplicarse al caso de la cepa CMU-90, que no guarda relación genética cercana con las cepas CMU-14, CMU-16, pero presenta un perfil metabólico similar.



**Figura 1.** Conexiones a través de los niveles de organización biológica. La variación genética puede influir en el fenotipo a diferentes niveles de organización biológica, afectando finalmente las capacidades y la posibilidad de adaptación de un organismo completo. <sup>1</sup>, las variaciones genéticas se dan por diferentes mecanismos; <sup>2</sup>, en el ambiente se incluyen todos los factores bióticos y abióticos que pueden afectar una característica del organismo en cualquiera de los niveles jerárquicos (tomado y traducido de Dalziel *et al.*, 2009).

Aunque las cepas de *Trichoderma* spp. provienen de diferentes localidades, en general, la mayoría fueron colectadas de áreas de bosque templado y se aislaron asociadas a tejido de basidiocarpo de distintas especies de basidiomicetes. Esto puede indicar que dichas cepas están sujetas a presiones selectivas muy similares, por eso la relación entre genotipo y fenotipo es estrecha en varias de éstas, particularmente en las cepas del complejo *T. harzianum*. No obstante, esto parece aplicarse también a cepas que provienen de distintas localidades y ecosistemas como CMU-23 (bosque, Cd. Hidalgo), CMU-43 (pastizal, Cuto de la Esperanza) y CMU-183 (bosque, Atécuaro); lo que sigue es que dichas cepas comparten estilos de vida, algo que está por demostrarse.

En conclusión, la caracterización integral de las cepas de *Trichoderma* spp. realizada en el presente trabajo, abarcando aspectos ecológicos, genéticos, fisiológicos y bioquímicos, permite aportar información para un mejor entendimiento de la biología básica de dicho taxa a nivel regional, al mismo tiempo que provee de herramientas de decisión para la selección de cepas de relevancia biotecnológica.

## Referencias Bibliográficas

- [1] Alamri, S., Hashem, M., Mostafa, Y. S. (2012). In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*. 17(4): 155-167.
- [2] Aleandri, M. P., Chilosi, G., Bruni, N., Tomassini, A., Vettrano, A. M., Vannini, A. (2015). Use of nursery potting mixes amended with local *Trichoderma* strains with multiple complementary mechanisms to control soil-borne diseases. *Crop Protection*. 67: 269-278.
- [3] Aghchegh, R. K., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. (2013) The putative protein methyltransferase LAE1 of *Trichoderma atroviride* is a key regulator of asexual development and mycoparasitism. *PLoS ONE*. 8(6): e67144.
- [4] Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology*. 114(9): 691-701.
- [5] Atanasova, L., Druzhinina, I. S. (2010). Global nutrient profiling by phenotype microArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi. *Journal of Zhejiang University Science B*. 11(3): 151-168.
- [6] Avila-Miranda, M., Herrera- Estrella, A., Peña- Cabriales, J. (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 38(7): 1823-1830.
- [7] Cianchetta, S., Galletti, S., Burzi, P. L., Cerato, C. (2010). A novel microplate-based screening strategy to assess the cellulolytic potential of *Trichoderma* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 107(3): 461-468.
- [8] Dalziel, A. C., Rogers, S. M., Schulte, P. M. (2009). Linking genotypes to phenotypes and fitness: how mechanistic biology can inform molecular ecology. *Molecular ecology*. 18(24): 4997-5017.
- [9] dos Reis Almeida, F. B., Cerqueira, F. M., do Nascimento Silva, R., Ulhoa, C. J., Lima, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*. 29(8): 1189-1193.

- [10] Giese, H., Kruithof, P., Meier, K., Sieben, M., Antonov, E., Hommes, R. W., Büchs, J. (2014). Improvement and scale-down of a *Trichoderma reesei* shake flask protocol to microtiter plates enables high-throughput screening. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 118(6): 702-709.
- [11] Kaur, J., Munshi, G. D., Singh, R. S., Koch, E. (2005). Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*. 153(5): 274-279.
- [12] Linde, T., Hansen, N. B., Lübeck, M., Lübeck, P. S. (2014). Fermentation in 24-well plates is an efficient screening platform for filamentous fungi. *Letters in applied microbiology*. 59(2): 224-230.
- [13] Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandão, R. S., Monteiro, V. N., Júnior, M. L., Coelho A. S. G., Ulhoa C. J., Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*. 116(7): 815-824.
- [14] Padder, B. A., Sharma, P. N. (2011). In vitro and in vivo antagonism of biocontrol agents against *Colletotrichum lindemuthianum* causing bean anthracnose. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 44(10): 961-969.
- [15] Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandao, R. S., Jesuino, R. S. A., Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 35(9): 1461-1468.
- [16] Rojo, F. G., Reynoso, M. M., Ferez, M., Chulze, S. N., Torres, A. M. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop protection*. 26(4): 549-555.
- [17] Saxena, A., Raghuwanshi, R., Singh, H. B. (2015). *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. *Journal of Basic Microbiology*. 55(2): 195-206.
- [18] Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., et al. (2016). The genomes of three uneven siblings:

- footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1): 205-327.
- [19]Schöneberg, A., Musa, T., Voegelé, R. T., Vogelgsang, S. (2015). The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. *Journal of Applied Microbiology*. 118(5): 1165-1179.
- [20]Thangavelu, R., Palaniswami, A., Velazhahan, R. (2004). Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. *Agriculture, ecosystems & environment*. 103(1): 259-263.
- [21]Tondje, P. R., Roberts, D. P., Bon, M. C., Widmer, T., Samuels, G. J., Ismaiel, A., Begoude, A. D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D., Hebbar, K. P. (2007). Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological Control*. 43(2): 202-212.
- [22]Troian, R. F., Steindorff, A. S., Ramada, M. H. S., Arruda, W., Ulhoa, C. J. (2014). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*. 36(10): 2095-2101.
- [23]Witkowska, D., Maj, A. (2002). Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi. *Folia microbiológica*. 47(3): 279-282.

## CONCLUSIONES PARCIALES

1. En relación al antagonismo contra microorganismos fitopatógenos, las cepas de *Trichoderma* spp. aquí estudiadas presentaron variabilidad en su mecanismo de acción, mientras que algunas cepas crecen sobre el fitopatógeno mostrando características micoparasíticas, otras parecen antagonizar por antibiosis, y otras más podrían competir por recursos.
2. A nivel inter-específico, no existe una relación clara entre antagonismo y capacidades bioquímicas o metabólicas en las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas.
3. En general, a nivel intra-específico, posiblemente intra-complejo *T. harzianum*, los resultados indican que existe una relación entre genotipo y fenotipo en las cepas analizadas.
4. El uso de una estrategia integral que incluye datos bioquímicos, fisiológicos y genéticos, permite generar de manera simultánea información sobre la biología básica de las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas y sobre el potencial biotecnológico de éstas.
5. Debido a sus capacidades antagónicas y de producción de enzimas extracelulares, las cepas CMU-8 de *T. atroviride* y CMU-218 de *T. viride* son candidatos ideales para la generación de un producto de biocontrol útil para el combate de microorganismos fitopatógenos en el estado de Michoacán.

## CONCLUSIÓN GENERAL

Las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. de Michoacán analizadas en este trabajo antagonizaron a la mayoría de fitopatógenos provenientes de la misma entidad, mostrando diversidad intra e interespecífica en las características bioquímicas, metab