

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS:

*“Estudio fisiológico de mutantes Trichoderma atroviride
afectadas en respuesta a la luz azul”*

Que presenta el p.Q.F.B César Miguel Calderón Montañez para
obtener el título de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

marzo 2007

INDICE GENERAL

	PAGINA
INDICE DE ABREVIATURAS	4
INDICE DE FIGURAS	6
I. INTRODUCCION	8
I.1 Características generales del género <i>Trichoderma</i>	8
I.2 Clasificación Taxonómica	9
I.3 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE <i>Trichoderma</i>	10
I.3.1 CONTROL BIOLÓGICO	10
I.3.2 UTILIZACIÓN DE HONGOS DEL GÉNERO <i>TRICHODERMA</i> COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO.	11
I.4 RESPUESTA DE <i>Trichoderma</i> A FACTORES AMBIENTALES	18
I.5 EL SISTEMA BIOLOG	20
	23
II. OBJETIVOS	23
II.1 Objetivo general	23
II.2 Objetivos particulares	23
	24
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	25
IV.1 Cepas Utilizadas	25

IV.2 Medios de cultivo y fluidos	25
IV.2.1 Medio PDA (Agar de dextrosa y papa)	25
IV.2.2 Medio Vogel (stock 50x)	25
IV.2.3 Fluido de Inoculación	26
IV.3 Cinética de crecimiento en medio Vogel	27
IV.4 Determinación de la utilización de fuentes de carbono mediante el sistema BIOLOG	27
IV.4.1 Obtención del preinoculo	27
IV.4.2 Preparación de la suspensión.	28
IV.4.3 Inoculación e incubación de las microplacas para hongos filamentosos BIOLOG.	28
IV.4.4 Elaboración de Dendograma	29

V. RESULTADOS	30
V.1 Cinéticas de crecimiento en medio Vogel	30
V.1.1 Luz	30
V.1.2 Oscuridad	31
V.1.3 Fotoperíodo	31
V.2 Porcentaje de utilización de nutrientes en las diferentes condiciones de cultivo	32
V.3 Utilización de fuentes de carbono en las Placas BIOLOG.	33
V.4 Dendograma de Distancias fisiológicas en el Sistema BIOLOG	36
VI. DISCUSIÓN	39
VII. CONCLUSIONES	42
VIII. BIBLIOGRAFÍA	43

INDICE DE ABREVIATURAS

RFLP	análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción
RAPD	polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar
ITS	secuencias espaciadoras intergénicas del ADN ribosómico
ABC	ATP-binding cassette
Avr	genes de avirulencia
nm	nanómetros
ATP	Adenosin Trifosfato
AMPc	AMP cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramos
ml	Mililitros
°C	Grados centígrados
H ₂ O	Agua
%	Por ciento

T	Transmitancia
FF	Hongos filamentosos
μL	Microlitros
h	horas

INDICE DE FIGURAS

		PAGINA
FIGURA 1	Enrollamiento de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre la hifa de su huésped, <i>Phytophthora capsici</i> , hongo causante de la podredumbre del pimiento.	13
FIGURA 2	Confrontación de <i>Phytophthora capsici</i> (P.c.) y <i>Trichoderma Harzianum</i> (T.h.).	16
FIGURA 3	Cepa de <i>Trichoderma atroviride</i> que ha sido crecida en la oscuridad y posteriormente expuesta a la luz	19
FIGURA 4	Formación de conidias a lo largo de las líneas donde fue cortado el micelio.	20
FIGURA 5	Fuentes de carbono en la microplaca para hongos filamentosos (FF).	30
FIGURA 6	Cinética de crecimiento en medio Voguel a 28 °C con exposición a la luz las 24 horas durante el tiempo en que el micelio llenó la caja.	31
FIGURA 7	Cinética de crecimiento en medio vogel a 28 °C en total oscuridad	32
FIGURA 8	Cinética de crecimiento en medio Voguel a 28 °C en fotoperíodo, con 12 horas de Luz y 12 horas de oscuridad	34

FIGURA 9	Microplaca Biolog de cepas IMI	34
FIGURA 10	Microplaca Biolog de cepas Blr1	34
FIGURA 11	Microplaca Biolog de cepas Blr2	35
FIGURA 12	Microplaca Biolog de cepas PKA-C-S8	35
FIGURA 13	Microplaca Biolog de cepas SEBlr2	36
FIGURA 14	Microplaca Biolog de cepas Antisentido	36
FIGURA 15	Dendograma de distancia Fisiológica	38

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Características Generales del Género *Trichoderma*.

El género *Trichoderma* constituye un número diverso de especies de hongos saprofitos, comúnmente establecidos en el suelo sobre madera en descomposición y restos de plantas (Jensen y Wolffhechel, 1995; Smith, 1995) ⁽²⁹⁾, la presencia de varias especies difiere entre hábitat y están influidas por las condiciones ambientales. Estas se pueden encontrar en el aire, partes aéreas de plantas, pero especialmente en suelos, incluyendo humus forestales (Samuels, 1996) ⁽²⁸⁾.

Las especies del género *Trichoderma* están clasificadas como hongos imperfectos dentro de la subdivisión Deuteromycota, ya que no se les conoce reproducción sexual ⁽²²⁾. Estas se reproducen clonalmente mediante un ciclo de vida asexual en el que se alternan micelio y esporas o conidias. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. Las conidias poseen un solo núcleo haploide, son ovoides, de color verde (excepcionalmente hialinos) y se forman sobre estructuras muy ramificadas o conidióforos que a su vez se sitúan sobre células especiales denominadas fialides (Rosen et., al., 1974). En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación se producen otro tipo de estructuras de resistencia denominadas clamidosporas (Lewis y Papavizas, 1984) ⁽³⁹⁾. Crecen a un ritmo rápido en cultivo con la producción de numerosas esporas de color verde, característica de este género ⁽²²⁾, utilizan un amplio rango de compuestos como fuente de carbono y nitrógeno, entre los que se encuentran monosacáridos, disacáridos (Danielson y Davey 1973), polisacáridos complejos, purinas, pirimidinas y aminoácidos (Tye, 1973), taninos condensados y catequinas (Arrieta-Escobar, 1982) ⁽²⁹⁾.

I.2 Clasificación Taxonómica

El género *Trichoderma* se encuentra dentro del grupo de hongos asexuales denominado Deuteromycota (Tabla I). Las primeras clasificaciones taxonómicas de género *Trichoderma* son preliminares y se basan fundamentalmente en las características morfológicas de las especies (crecimiento rápido, esporulación abundante, conidias verdes y conidióforos mal definidos) ⁽³⁹⁾.

El Género *Trichoderma* fue propuesto por Person en 1794 con 4 especies, Rifai en 1969 agrega 9 especies más; posteriormente, Bisset eleva algunas de las especies agregadas por Rifai a rango de sección, agrupándolas en 4 secciones: *Lonibrechiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma* e *Hypocreanum* ⁽²⁸⁾.

Tabla I. Clasificación taxonómica del género *Trichoderma* (Samuels, 1996; Kuhls et al., 1997) ⁽²⁸⁾.

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Hyphales
Familia	Moniliaceae

A pesar de su importancia económica, la taxonomía del género es aún problemática y los estudios están basados en la morfología (Samuels, 1996), se intenta mejorarla utilizando acercamientos moleculares ⁽²⁹⁾, como cariotipos electroforéticos, análisis de isoenzimas, análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD), secuenciación de ADN (por ejemplo, de secuencias espaciadoras intergénicas del ADN ribosómico o ITS), junto con técnicas bioquímicas y fisiológicas. Así, se han ido redefiniendo o confirmando tanto secciones completas como especies dentro del género (Lieckfeldt et al., 1998). Por ejemplo, la inclusión en el género *Trichoderma* de *Gliocladium virens* ha sido aceptada sólo después de

ser determinada mediante el análisis de secuencias de ITS (Rehner y Samuels, 1994) ⁽³⁹⁾.

I.3 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE *Trichoderma*.

I.3.1 CONTROL BIOLÓGICO

La industria agrícola se ha visto afectada por diferentes enfermedades causadas por una gran variedad de microorganismos fitopatógenos, tales como bacterias, nemátodos u hongos, derivando de esto pérdidas considerables en la producción, tanto en cosecha como en postcosecha ⁽³³⁾.

Los hongos constituyen uno de los mayores problemas en el control de plagas, debido a la diversidad de especies como a las grandes pérdidas que originan, sin embargo el ser humano a ideado diferentes compuestos químicos para el control de estos patógenos, demostrando gran eficacia y rapidez en su eliminación. A su vez, el control químico presenta varios inconvenientes como son su toxicidad y baja especificidad ⁽³³⁾, ya que además de atacar el fitopatógeno “blanco”, eliminan a otros organismos beneficios; incluso la persistencia de los compuestos químicos en el medio ambiente conllevan efectos ecológicos y biológicos adversos, como la contaminación de aguas subterráneas y la aparición de hongos patógenos resistentes a la acción de los fungicidas⁽³⁹⁾. Debido a esto, y aunado a una creciente concientización social ante el deterioro ambiental por la utilización masiva de compuestos químicos, se han buscado otras alternativas más factibles y seguras de control como son el uso de microorganismos antagonistas de los agentes infecciosos. Esta estrategia es conocida como “control biológico” y puede definirse como “la reducción de la cantidad de inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno por medio de uno o más organismos” ⁽³⁸⁾. La supresión de enfermedades utilizando agentes de control biológico es una manifestación de interacciones entre la planta, el patógeno, el antagonista, la comunidad microbiana que existe alrededor de la planta y el ambiente físico en que se encuentra. Incluso en un ambiente creado artificialmente

en el laboratorio, el estudio del biocontrol involucra un mínimo de tres organismos (16).

Los “agentes de control biológico” que se utilizan para este fin pueden ser variedades de plantas más resistentes a la enfermedad, patógenos hipovirulentos que compitan por el espacio y los nutrientes con las cepas silvestres, u otros organismos que interfieran con la supervivencia del patógeno o con sus mecanismos para provocar la enfermedad (39).

I.3.2 UTILIZACIÓN DE HONGOS DEL GÉNERO *Trichoderma* COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO.

En la actualidad muchas especies del género *Trichoderma* han sido utilizadas como agentes de biocontrol en una gran variedad de enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos (27). Esta utilidad deriva de las características que poseen las especies de dicho género, como son su ubicuidad, la facilidad para ser aisladas y cultivadas, además crecen rápido en un gran número de sustratos y no atacan plantas superiores (Papavizas et al. 1982) (14). Adicionalmente, las especies del género *Trichoderma* pueden desarrollarse en un ambiente poco favorable para otros microorganismos, debido a que presentan una resistencia natural frente a muchos compuestos tóxicos, incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas como el DDT y compuestos fenólicos (2). Esta resistencia a compuestos tóxicos está asociada a la presencia de sistemas de transporte ABC (ATP-binding cassette) en cepas de *Trichoderma*, el cual permite el transporte de diferentes sustancias a través de la membrana hacia el exterior de la célula, y la sobreexpresión de genes ABC hace que disminuya la acumulación de sustancias tóxicas dentro de la célula (17).

Fue en 1932 que Weindling sugirió el uso de *Trichoderma* como antagonista de hongos fitopatógenos (4), al observar y describir en detalle el micoparasitismo de *T. lignorum* hacia *Rhizoctonia solani* (22); desde entonces se han hecho un gran número de experimentos de control biológico utilizando especies de *Trichoderma*.

En la actualidad se comercializan con este fin cepas de *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*, principalmente ⁽³⁹⁾.

Existen en el mercado diferentes productos de *Trichoderma* que se comercializan para diferentes cultivos, como es *RootShield*, para el control de enfermedades en tomate y pepino; *Trieco*, para el control de fitopatógenos en café, cítricos, uvas, chile, algodón y tabaco; *TRICHODEX 20SP*, para el control de *B. cinerea* en uva, así como también para el control de enfermedades en tomate y pepino producidos en invernaderos comerciales (O’neill et al, 1996; Fravel et al., 1999; Elad, 2000); *F-Stop* en el control de *F. oxysporum* en tomate ⁽²⁹⁾.

Se han descrito tres tipos de mecanismos por medio de los cuales hongos del género *Trichoderma* interaccionan con el agente infeccioso, y estos incluyen la liberación de metabolitos antibióticos, como son las enzimas hidrolíticas que atacan a la pared celular, la competición directa por los nutrientes y el espacio disponibles, así como el micoparasitismo ⁽³³⁾.

Es importante mencionar que estos mecanismos no actúan de manera aislada, sino que interaccionan de manera sinérgica obteniendo como resultado una mayor eficacia en la eliminación del fitopatógeno ⁽³³⁾.

Además de la capacidad de *Trichoderma* para atacar o inhibir directamente el crecimiento de fitopatógenos también pueden inducir en las plantas, tanto sistémica como localmente, resistencia contra un amplio número de enfermedades que son causadas por fitopatógenos incluidos bacterias, hongos y virus ⁽¹⁷⁾.

a) Micoparasitismo

El micoparasitismo es un término que describe una serie de múltiples pasos en la degradación y final asimilación del hongo fitopatógeno ⁽²⁴⁾, y es el primer evento observado durante la interacción de *Trichoderma* con su huésped. Los eventos que sigue el micoparasitismo son complejos, y toman lugar como a continuación se menciona: las cepas de *Trichoderma* detectan al patógeno y crecen alrededor de él, esta detección es debida a la producción de exocitinasas, enzimas que catalizan la liberación de oligómeros provenientes de la pared celular del patógeno, estos oligómeros a su vez retornan a *Trichoderma*

provocando la liberación de endocitinasas, las cuales comienzan adherirse al hongo blanco antes de que el contacto se realice ⁽¹⁷⁾.

Una vez producido el contacto, *Trichoderma spp.* se adhiere a su huésped enrollándose alrededor de éste y formando estructuras parecidas a ganchos, conocidas como apresorios; esta adherencia es mediada mediante el enlace de carbohidratos presentes en la pared celular de *Trichoderma* a lectinas presentes en el huésped ⁽¹⁷⁾. Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune que se aglutinan en la célula y/o precipitan glicoconjugados, participan en el reconocimiento y especificidad del ataque al hospedero por parte del agente antagónico (Elad, Chet, Boyle y Henis, 1983b) y en la interacción hospedero-micoparásito (Goldman et al.,1994) ⁽²⁸⁾.

El siguiente evento que se observa es la producción de varias enzimas con la capacidad de degradar la pared celular, y probablemente también se producen antibióticos de tipo peptabioles, dicha combinación de sustancias resulta en la disolución de la pared celular; por último, se observa la aparición de agujeros en el sitio donde se formó el apresorio, lo que permite la entrada de la hifa de *Trichoderma* dentro del hospedero (Figura 1) ⁽¹⁷⁾.

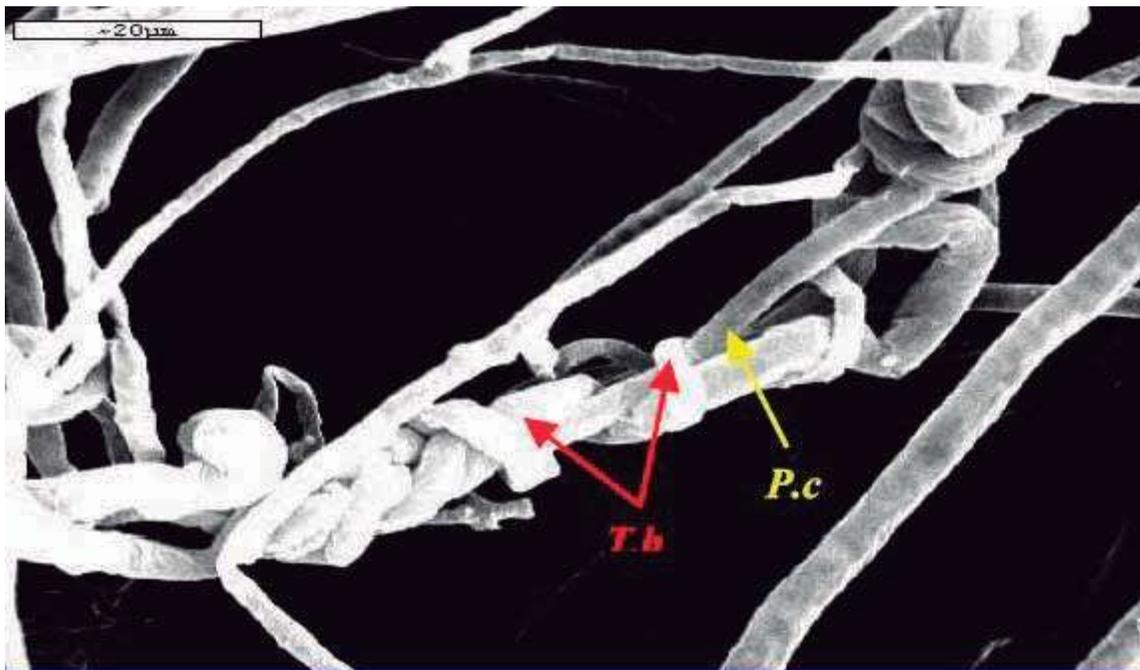


Fig. 1: Microfotografía donde se muestra el enrollamiento de *Trichoderma harzianum* sobre la hifa de su huésped, *Phytophthora capsici*, hongo causante de la podredumbre del pimiento ⁽¹⁴⁾.

en la eliminación del hongo patógeno, y esto se ha confirmado mediante experimentos donde se hizo crecer *Trichoderma* en un medio previamente adicionado con micelio de algún patógeno, observándose un aumento significativo en la secreción extracelular de β -1,3-glucanasas, quitinasas y proteinasas. Teniendo en cuenta que la estructura de la mayoría de los hongos está compuesta en gran parte por quitina, β -1,3-glucano y proteínas, es lógico que *Trichoderma* utilice estas enzimas como un mecanismo de ataque contra el hongo patógeno ⁽³⁷⁾, dando como resultado cambios estructurales a nivel celular, tales como la vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y terminando con lisis celular ⁽¹⁴⁾.

b) Antibiosis

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos, volátiles y no volátiles, que impiden el desarrollo de microorganismos antagonistas. Entre esos metabolitos se encuentran la producción de ácido harziánico, alameticina, peptabioles, la 6-pentil- α -pirona, atroviridina, y la glioviridina, entre otros. La secreción de estas sustancias se ha visto claramente correlacionada con la capacidad de biocontrol, ya que la purificación y aplicación del antibiótico tienen los mismos resultados sobre el fitopatógeno que si se aplica todo el hongo ⁽²⁾. El modo de acción de la mayoría de los antibióticos identificados se desconoce. Se sabe que la gliotoxina se une selectivamente a los grupos tioles de la membrana citoplásmica (Jones y Hancock, 1998) y que las trichorzianinas actúan modificando la permeabilidad de la membrana de la célula formando canales iónicos de la misma (Schirmbock et al., 1994) ⁽³⁹⁾.

La combinación de enzimas hidrolíticas y antibióticos resulta en un nivel más alto de antagonismo que el obtenido con un solo mecanismo. En este caso se ha observado un sinergismo entre la gliotoxina y endocitina de *T. harzianum*, así como entre enzimas hidrolíticas y peptabioles en la conidiación de *B. cinerea* (Howell año?) ⁽²⁾. (2003)

La importancia de la antibiosis en el antagonismo es específica de cada interacción. Así, mientras que la supresión de *Pythium* por *Trichoderma* es imprescindible la producción de gliotoxina (Howell, 1995), en el caso de *Rhizoctonia solani* la presencia de este compuesto no es importante ⁽³⁹⁾.

c) Competencia

Trichoderma tiene mayores posibilidades de utilizar y tomar nutrientes del suelo comparado con otros organismos, debido a la capacidad de metabolizar diferentes azúcares que se encuentran en el ambiente, como los polímeros de celulosa, glucanos y quitina, entre otros. En *T. harzianum* se ha encontrado un transportador con alta afinidad para la glucosa, denominado Gtt1, que se expresa solamente en ambientes donde la concentración de glucosa está en muy bajas condiciones, incluso esta cepa se encuentra presente en ambientes donde la concentración de nutrientes es escasa ⁽²⁾.

En cuanto a la competencia directa por el espacio y nutrientes, se han hecho diversos estudios para mejorar la producción de biomasa de *Trichoderma* y así enfrentarlo a ciertos patógenos, tal es el caso de la podredumbre del pimiento causada por *Phytophthora capsici* donde se muestra claramente un desplazamiento e inhibición del crecimiento, hasta que *Trichoderma* ocupa totalmente el espacio ocupado por *P. capsici*, derivando esta invasión en su muerte ⁽¹⁴⁾.

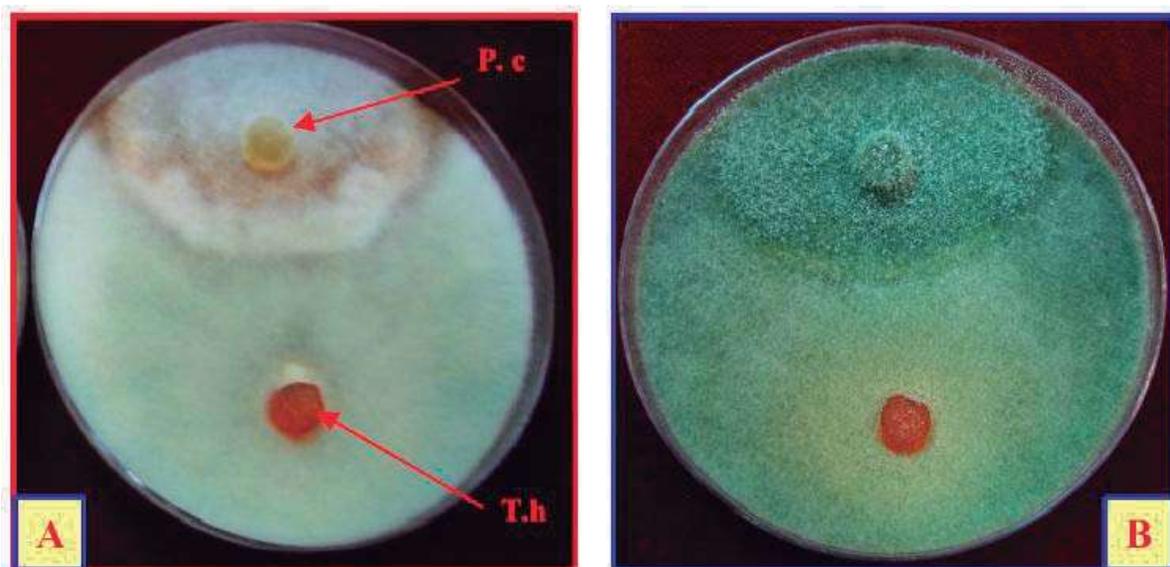


Fig. 2: Confrontación de *Phytophthora capsici* (P.c.) y *Trichoderma Harzianum* (T.h.).
(A) inhibición del crecimiento de P.c por T.h en medio PDA.
(B) T.h invade totalmente la superficie de la colonia de P. capsici y esporula sobre la misma (14).

En condiciones donde carece el hierro, algunas cepas de *Trichoderma* producen sideróforos y con estos detienen el crecimiento de otros hongos. Por esta razón la composición del suelo influye en la eficiencia del biocontrol ejercida por este hongo, de acuerdo a la disponibilidad de este compuesto. La competencia ha sido particularmente importante para el biocontrol de fitopatógenos tal como *Botrytis cinerea*, el principal agente patógeno durante la pre- y post-cosecha en varios países. La ventaja de utilizar cepas de *Trichoderma* para el control de *B. cinerea* es la combinación de varios mecanismos al mismo tiempo, así hacen prácticamente imposible la aparición de cepas resistentes. Entre esos mecanismos el más importante es la competencia por nutrientes, ya que *B. cinerea* es particularmente sensible a la carencia de nutrientes (2).

d) Inducción de Resistencia

La inducción de resistencia por parte de *Trichoderma* ha sido pobremente estudiada comparado con las respuestas que son inducidas por rizobacterias. Lo que probablemente fue la primera demostración clara de la capacidad de *Trichoderma* de inducir resistencia a las plantas fue la publicación hecha por Bigirima y colaboradores en 1997, quienes inocularon la tierra de un cultivo de

frijol con *Trichoderma harzianum*, cepa T-39, y observaron que la planta adquiría resistencia a enfermedades que son causadas por *Boitritis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum*.⁽¹⁷⁾.

En otros estudios se han utilizado cepas silvestres y mutantes de *Trichoderma virens* para probar la capacidad de controlar la enfermedad de semillas de algodón que es causada por *Rhizoctonia solani*, y se observó que tanto la producción de antibióticos y micoparasitismo no mostraron tener un papel importante en el biocontrol de la enfermedad. Sin embargo, las cepas mostraron capacidad para inducir la producción de fitoalexina (compuesto con actividad antimicrobial que producen las plantas en respuesta a ataques de patógenos) en las semillas, lo que se correlacionó fuertemente con el control de la enfermedad⁽¹⁷⁾.

Las cepas de *Trichoderma* inducen resistencia a las plantas mediante la secreción de tres tipos de compuestos: proteínas con función enzimática u otras funciones, como la xilanasa que induce la producción de etileno en las plantas; proteínas codificadas por genes de avirulencia (Avr); finalmente oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular que se producen durante las interacciones que ocurren en la naturaleza entre *Trichoderma*, fitopatógenos y la raíz de la planta.⁽¹⁷⁾.

1.3.3 Otras aplicaciones de *Trichoderma*

Algunos miembros del género *Trichoderma* han mostrado capacidad de convertir la celulosa en glucosa, mediante la secreción de enzimas denominadas endoglucanasas, exoglucanasas y celobiosas. La mayoría de los estudios se han enfocado a las especies *T. viride*, *T. reesei* y *T. harzianum*, las cuales se han modificado genéticamente con el fin de obtener altos niveles en la producción de esas enzimas a nivel industrial, con el fin de degradar celulosa en descomposición. La glucosa resultante en la despolimerización de la celulosa puede tener amplios usos, como son en la industria farmacéutica, en la industria papelera y también puede ser utilizada como una fuente de glucosa en la alimentación animal, entre otras aplicaciones⁽⁴¹⁾.

I.4 RESPUESTA DE *Trichoderma* A FACTORES AMBIENTALES.

El proceso de esporulación, mediante la producción de esporas asexuales, es el principal mecanismo a través del cual *Trichoderma* sobrevive y se expande en el suelo. Las esporas asexuales son conocidas como conidias, y son estructuras especializadas de alta resistencia con la capacidad de permanecer en estado de latencia por un largo período de tiempo hasta que se reestablezcan las condiciones necesarias que permitan su germinación. Desde el punto de vista biotecnológico, este proceso es de gran importancia debido a que formulaciones de una gran variedad de productos comerciales se elaboran a base de esporas de *Trichoderma* ⁽¹⁸⁾.

Diversos factores ambientales como la limitación de nutrientes, la exposición a la luz, además de ciertos tipos de estrés como la limitación de espacio (*in vitro*), la desecación y la herida del micelio vegetativo, son desencadenantes de la esporulación en *Trichoderma*.

La luz influye de una manera importante en los organismos vivos ya que es la principal fuente de energía para la biosfera así como también muestra una gran capacidad de inducir cambios en el comportamiento y morfología de casi todas las formas de vida ⁽⁹⁾.

En particular, las respuestas fisiológicas que induce la luz azul ha sido estudiada en una amplia variedad de organismos, entre ellos están los hongos, en los que influye de varias maneras como son en el metabolismo, crecimiento, en la reproducción sexual y asexual, en la formación de pigmento, entre otros fenómenos ⁽⁹⁾.

Trichoderma puede crecer en total oscuridad, siempre y cuando los nutrientes no estén limitados en el medio. Las colonias maduras de *Trichoderma* que crecen en la oscuridad se observan de color verde oscuro, pero si se les hace incidir un pulso de luz (400-480 nm) podrá distinguirse la formación de un anillo en el perímetro de la colonia que corresponde al momento de la exposición (Figura 3) ⁽⁹⁾.



Fig. 3: Cepa de *Trichoderma atroviride* que ha sido crecida en la oscuridad y posteriormente expuesta a la luz, donde se observa la formación de un anillo de esporas (anillo blanco) que corresponde al momento de exposición a la luz.

La fotoinducción es “recordada” mientras el cultivo es mantenido en condiciones que no permiten el crecimiento celular (bajas temperaturas o en ausencia de oxígeno). Cuando el cultivo es devuelto a condiciones favorables para su crecimiento la colonia comienza a esporular ⁽⁸⁾.

Entre los cambios bioquímicos que siguen a la iluminación de colonias que crecen en la oscuridad son cambios en el potencial de la membrana, aumento en los niveles de ATP intracelular, un aumento agudo y disminución rápida de la concentración de AMPc seguidos de un segundo pulso de AMPc con una disminución más prolongada (4), así como la activación de adenil ciclasa y la fosforilación de proteínas ⁽⁹⁾.

Neurospora crassa es considerado un modelo para el estudio de respuestas bioquímicas, genéticas y moleculares a la luz; un complejo formado por las proteínas WC-1 y WC-2 controlan las respuestas a la luz en este ascomiceto. Recientemente se han clonado dos genes en *T. atroviride* denominados blr-1 y blr-2 (blue light regulators), homólogos de los encontrados en *N. crassa* wc-1 y wc-2, respectivamente. La secuenciación de la proteína BLR-1 indica que tiene todas las características de receptor de luz azul, mientras que BLR-2 pudiera interactuar con BLR-1 a través de un dominio PAS para formar un complejo.

Otro de los factores desencadenantes de esporulación en *Trichoderma* es la carencia de nutrientes, y se ha demostrado que una repentina privación de fuentes de carbono imita el efecto que tiene la luz sobre este hongo, al observarse la formación de un discreto anillo de esporas en el borde de la colonia donde ha crecido, tal como le ocurre a una colonia que ha crecido en la oscuridad se le hace llegar un pulso de luz ⁽⁹⁾.

Se ha demostrado también que la herida mecánica del micelio vegetativo es un desencadenante de esporulación en *Trichoderma*, al observarse la formación de esporas en el área dañada del micelio (Figura 4) ⁽⁸⁾.

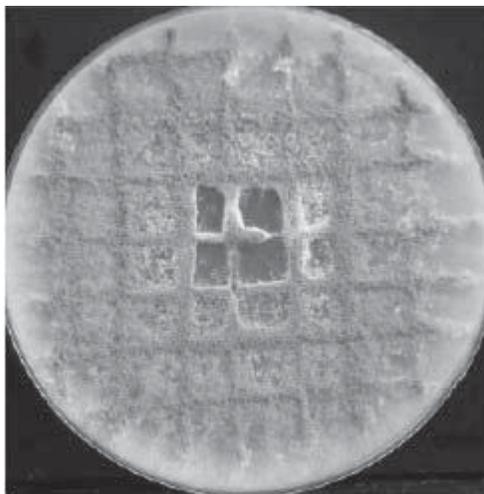


Fig. 4: La conidiación es desencadenada por daño mecánico. El micelio de la cepa fue cortado en rayas con un bisturí y fotografiado 24 horas después. Se observa la formación de conidias a lo largo de las líneas donde fue cortado el micelio ⁽⁸⁾.

I.5 EL SISTEMA BIOLÓGICO

Existen diferentes tecnologías que nos proporcionan una amplia información acerca de la célula y resultan de gran utilidad para el entendimiento del funcionamiento y mecanismos que emplea en su crecimiento y desarrollo; por ejemplo el empleo de métodos que se enfocan en el análisis de proteínas (proteómica) (O’Farrell et al. 1995), y aquellos métodos para el análisis de ácidos nucleicos (genómica), desarrollado por Fodor y colaboradores en 1993 ⁽⁷⁾. En la

actualidad existen numerosas especies de hongos cuyo genoma ha sido secuenciado. El estudio de un gen en particular se hace mediante microarreglos de DNA o mediante el análisis proteómico ⁽¹²⁾.

La información codificada en el genoma de una célula es reflejada como rasgos celulares o fenotipos ⁽⁷⁾, cuyo conocimiento es necesario para identificar los efectos de mutaciones en el genoma y para determinar la función de un gen ⁽¹²⁾. Una técnica desarrollada para el análisis de rasgos fenotípicos de la célula emplea el sistema BIOLOG mediante la utilización de microarreglos fenotípicos, y se basa en el metabolismo del carbono, del nitrógeno, del fósforo y del azufre en el microorganismo. El sistema BIOLOG está conformado por una microplaca con 95 pocillos que contienen fuentes de carbono diferentes y utiliza violeta de tetrazolio como colorante para detectar la respiración celular; durante el metabolismo de nutrientes en un organismo existe flujo de electrones desde la fuente de carbono hacia el NADH, mediante la cadena de transporte de la célula, el NADH producido cede sus electrones al tetrazolio y entonces se hace evidente la reacción mediante la formación de un color púrpura en el pocillo ⁽⁷⁾;

La Microestación BIOLOG además contiene un lector de microplacas compatible (OmniLog), que puede leer automáticamente los patrones desarrollados en las microplacas en unos cuantos segundos y obtener la identificación del microorganismo Gram Positivo (GP), Gram Negativo (GN), Anaerobio (AN), Levadura (YT) u hongo filamentoso (FF) y crear una base de datos propia.

La utilidad de dicho sistema abarca muy diversas áreas relacionadas con servicios de laboratorio en distintas ramas de la salud pública, la agricultura y la industrial. El sistema BIOLOG posee una base de datos sobre características fisiológicas de aproximadamente 2000 microorganismos tanto procariotes como eucariotes. En dicha base de datos se encuentran los registros de 500 especies de bacterias Gram negativas, 300 especies de bacterias Gram positivas, 350 especies de bacterias anaeróbicas, 500 especies de hongos filamentosos y 250 especies de levaduras.

La secuenciación del genoma de un organismo se basa en la secuencia de bases en el DNA y no indica la función que tienen todos los genes en la célula; debido a esto la tecnología de BIOLOG mediante microarreglos fenotípicos puede ser utilizada para analizar el efecto que pueda tener la alteración de un gen determinado, proporcionando una relación directa entre genotipo y fenotipo ⁽⁷⁾.

II. OBJETIVOS

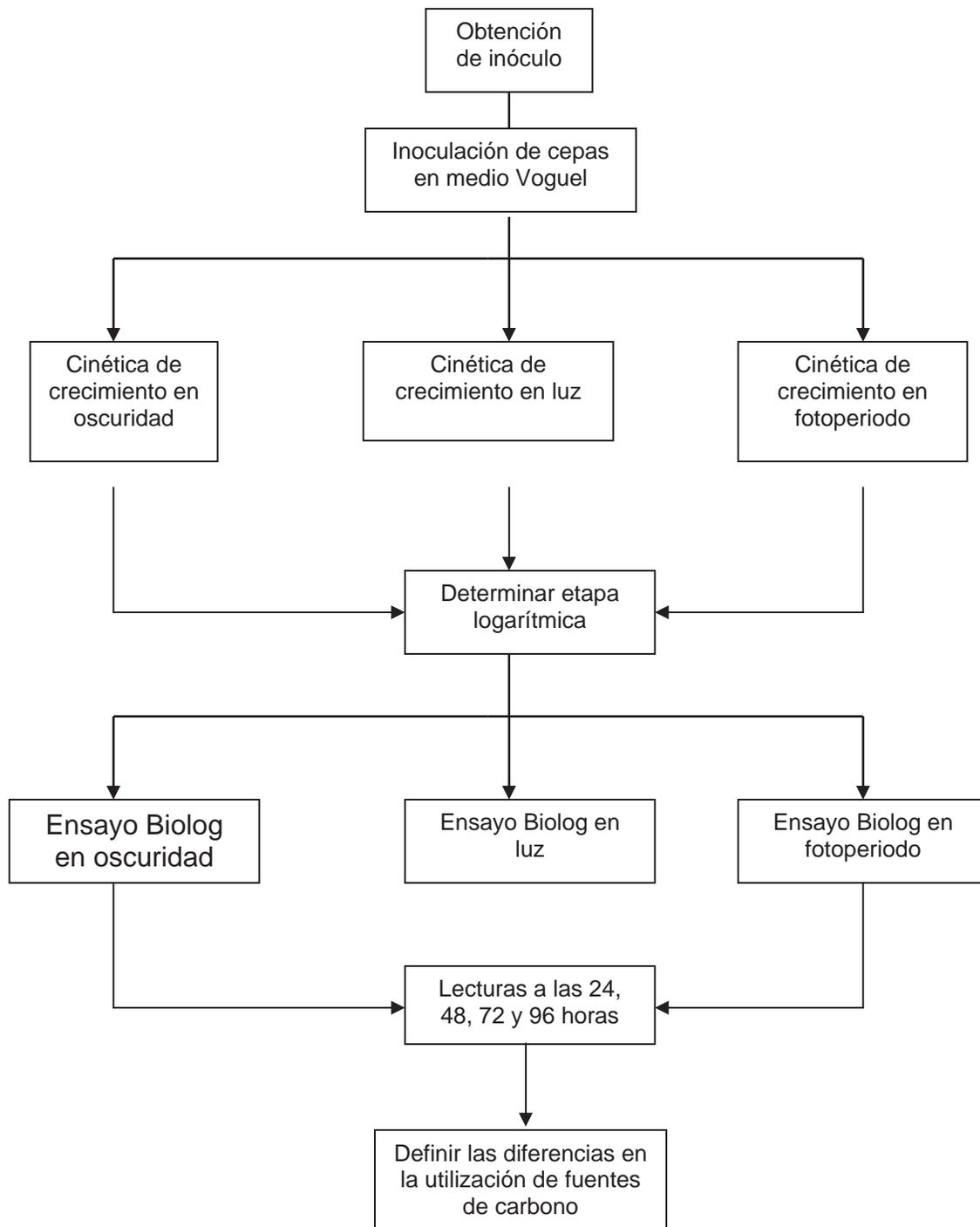
II. 1 Objetivo General

Establecer la correlación existente entre la incidencia de luz y el patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono en *Trichoderma atroviride*

II.2 Objetivos Particulares

- i) Conocer el efecto de la luz sobre el patrón de crecimiento de las cepas de estudio.
- ii) Establecer el patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono de la cepa silvestre de *T. atroviride* en relación a la incidencia de luz.
- iii) Determinar las diferencias en el patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono en relación a la incidencia de luz entre las cepas afectadas en su respuesta a luz azul y la cepa silvestre.

III. ESTRATEGIA



IV. MATERIAL Y METODOS

IV.1 Cepas Utilizadas

Las cepas empleadas fueron mutantes generadas en el Laboratorio del Dr. Alfredo Herrera-Estrella del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato denominadas Blr-1, Blr-2, SEBlr-2, PKA-C-S8, Antisentido, así como la cepa silvestre de referencia IMI.

IV.2 Medios de cultivo y fluidos

IV.2.1 Medio PDA (Agar de dextrosa y papa)

Este medio se utilizó con el fin de conservar el micelio de las cepas estudiadas; se empleó el medio comercial (BD Bioxon), disolviéndose 39 g en 1 litro de agua destilada y esterilizando en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C.

IV.2.2 Medio Vogel (stock 50x)

Este medio se empleó para hacer la cinética de crecimiento en las diferentes condiciones de incubación (oscuridad, luz, fotoperíodo);

Formulación para una concentración final de 50X

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .5H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄	250 g
NH ₄ NO ₃	100 g
*MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g
*CaCl ₂ .2H ₂ O	5 g
**Biotina (5 mg/100 mL etanol 50%)	5 mL
Solución de oligoelementos	5 mL

* Se disolvieron previamente y por separado en 20 mL de agua desionizada

** Se mantuvo a 4 °C y protegida de la luz.

Se aforó la solución a 1 litro con H₂O desionizada y posteriormente se agregaron 3 mL de cloroformo como conservador; la solución se mantuvo a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

Solución de oligoelementos.

Ácido cítrico.2H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ .H ₂ O	5 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	1 g (predisuelto en 1ml H ₂ SO ₄)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.072 g
H ₃ BO ₃	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.05 g

Se disolvió en 100 mL de agua desionizada.

Para sembrar el hongo, el stock se diluyó en agua destilada para obtener una concentración final de 1X, se le agregó agar bacteriológico (BD Bioxon), y glucosa (J.T.Baker) a una concentración del 15%. Posteriormente se procedió a esterilizar el medio en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

IV.2.3 Fluido de Inoculación

Para inocular placas de Biolog_{MR} se utilizó el fluido proporcionado por el proveedor (FF INOCULATING FLUID, BIOLOG, Hayward, CA 94545), el cual contiene los siguientes componentes: Tween 40, 0.23% y Gellan Gum (Phytigel), 0.25%. Dicho fluido se preparó de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Brevemente, se hiervió un litro de agua destilada y a esta se añadieron 2.5g de Gellan Gum y 0.3 g de Tween 40. La solución se mantuvo en agitación constante hasta que la solución se tornó clara, indicando con eso que los componentes han sido debidamente disueltos. Posteriormente se dejó que el fluido alcanzará una temperatura de 45 °C y el líquido se vertió en tubos de 20 x 50 con tapa de rosca,

con un volumen de 16 mL en cada tubo; finalmente estos se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos.

IV.3 Cinética de crecimiento en medio Vogel

En general, para las tres condiciones experimentales (oscuridad, luz y fotoperíodo), se tomó micelio del hongo con un sacabocados de 7 mm de diámetro de la periferia de una colonia proveniente de cepas crecidas en medio PDA a 28 °C y se transfirieron a medio Vogel para posteriormente incubar a una temperatura de 28 °C y tomar registro del desarrollo miceliar cada 12 horas hasta que el medio ha sido totalmente cubierto por el hongo.

Para cada una de las condiciones la cinética de crecimiento se realizó de la siguiente manera:

a) Luz: las cepas fueron mantenidas las 24 horas del día expuestas a la luz.

b) Oscuridad: las cepas fueron cubiertas completamente con papel aluminio para evitar cualquier rayo de luz y así mantenerlas en total oscuridad.

c) Fotoperíodo: las cepas fueron expuestas durante un período de 12 horas a la luz y posteriormente se envolvían en papel aluminio para mantenerlas en oscuridad durante las siguientes 12 horas, y así sucesivamente hasta que el medio de la caja era cubierto totalmente por el hongo.

Todas las curvas de crecimiento se hicieron por triplicado con el objetivo de promediar el resultado de las mediciones y así determinar la desviación estándar resultante de cada uno de los puntos en la curva.

IV.4 Determinación de la utilización de fuentes de carbono mediante el sistema BIOLÓG

IV.4.1 Obtención del preinoculo

Las cepas creciendo en medio PDA a 28°C fueron utilizadas para inocular medio Vogel al 15 % de agar y 2 % glucosa. Estas se incubaron a 28 °C y se dejaron crecer en las condiciones antes descritas hasta la etapa logarítmica y con

este micelio se preparó la suspensión de incubación para placas BIOLOG. Se inocularon varios medios por cepa para obtener el micelio suficiente para la posterior preparación de la suspensión.

IV.4.2 Preparación de la suspensión.

Después que el hongo ha crecido hasta encontrarse en la etapa logarítmica media se procedió a preparar la suspensión; para este fin se utilizó una espátula de metal estéril con la cual se cosechó el micelio de la placa y se colocó en un mortero previamente esterilizado en el cual se maceró el hongo hasta que el micelio fue pulverizado en pequeñas partículas, agregándole posteriormente 2-3 mL del fluido de inoculación.

Para preparar la suspensión, y una vez triturado el hongo, previamente se debe estandarizar el fluido y ajustarlo a 0% T haciendo uso de un turbidímetro y el estándar específico para hongos filamentosos (FF); con el fluido se ajusta a 0% T y en seguida se coloca el estándar que debe dar una lectura de 75% T y, basándose en ese rango de turbidez, se procede a preparar la suspensión, con un margen de error de ± 2 . La suspensión del hongo debe ser de uniforme para evitar interferencia en la lectura del turbidímetro.

IV.4.3 Inoculación e incubación de las microplacas para hongos filamentosos BIOLOG.

La inoculación de las placas, al igual que las lecturas en el sistema BIOLOG, se realizó en las condiciones establecidas anteriormente para cada cepa.

La suspensión obtenida de las células del hongo se vertió sobre el reservorio multicanal estéril; para inocular la microplaca se empleó la micropipeta electrónica, programada previamente para despachar 100 μ L en cada uno de los pocillos de la microplaca. Una vez inoculadas las microplacas se incubó a 28 °C, realizando lecturas a las 24, 48, 72 y 96 h en el sistema BIOLOG.

A1 Water	A2 Tween 80	A3 N-Acetyl-D- Galactosamine	A4 N-Acetyl-D- Glucosamine	A5 N-Acetyl-D- Mannosamine	A6 Adonitol	A7 Amygdalin	A8 D-Arabinose	A9 L-Arabinose	A10 D-Arabitol	A11 Arbutin	A12 D-Cellobiose
B1 α -Cyclodextrin	B2 β -Cyclodextrin	B3 Dextrin	B4 l-Erythritol	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-Glucosamine	B12 α -D-Glucose
C1 Glucose-1- Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Glucuronic Acid	C4 Glycerol	C5 Glycogen	C6 m-Inositol	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 α -D-Lactose	C9 Lactulose	C10 Maltitol	C11 Maltose	C12 Maltotriose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Melezitose	D4 D-Melibiose	D5 α -Methyl-D- Galactoside	D6 β -Methyl-D- Galactoside	D7 α -Methyl-D- Glucoside	D8 β -Methyl-D- Glucoside	D9 Palatinose	D10 D-Psilose	D11 D-Raffinose	D12 L-Rhamnose
E1 D-Ribose	E2 Salicin	E3 Sedoneptulosan	E4 D-Sorbitol	E5 L-Sorbose	E6 Stachyose	E7 Sucrose	E8 D-Tagatose	E9 D-Trehalose	E10 Turanose	E11 Xylitol	E12 D-Xylose
F1 γ -Amino-butiric Acid	F2 Bromosuccinic Acid	F3 Fumaric Acid	F4 β -Hydroxy-butiric Acid	F5 γ -Hydroxy-butiric Acid	F6 p -Hydroxyphenyl- acetic Acid	F7 α -Keto-glutaric Acid	F8 D-Lactic Acid Methyl Ester	F9 L-Lactic Acid	F10 D-Malic Acid	F11 L-Malic Acid	F12 Quiric Acid
G1 D-Saccharic Acid	G2 Sebacic Acid	G3 Succinamic Acid	G4 Succinic Acid	G5 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G6 N-Acetyl-L- Glutamic Acid	G7 Alaninamide	G8 L-Alanine	G9 L-Alanyl-Glycine	G10 L-Asparagine	G11 L-Aspartic Acid	G12 L-Glutamic Acid
H1 Glycyl-L-Glutamic Acid	H2 L-Carnitine	H3 L-Phenylalanine	H4 L-Proline	H5 L-Pyroglutamic Acid	H6 L-Serine	H7 L-Threonine	H8 2-Amino Ethanol	H9 Putrescine	H10 Adenosine	H11 Uridine	H12 Adenosine-5'- Monophosphate

Fig. 5. Fuentes de carbono en la microplaca para hongos filamentosos (FF).

IV.4.4. Elaboración de Dendogramas

Los resultados de utilización de sustratos de cada uno de los pozos de la microplaca Biolog® se registraron como 0 cuando no hubo detección de cambio de color en el pozo y como 1 cuando se observó cambio de color. Con estos datos se construyó una matriz dicotómica la cual fue utilizada para la generación de un dendograma utilizando el software FreeTree (Hampel y col., 2001). Con dicho paquete se calcularon las distancias genéticas mediante el algoritmo de Nei y Li y se generó un patrón de agrupamiento mediante el criterio de UPGMA. El análisis bootstrap se realizó mediante el mismo software utilizando 1000 réplicas. De la misma manera se construyó un patrón de agrupamiento a partir de la matriz dicotómica obtenida mediante las bandas generadas por los distintos aislados en el ensayo RAPD y con la matriz dicotómica de los resultados de la resistencia a antibióticos. En el caso de la sensibilidad a antibióticos, la resistencia se consideró como un 1 y cualquier nivel de sensibilidad como 0.

V. RESULTADOS

V.1 Cinéticas de crecimiento en medio Voguel

V.1.1 Luz

La figura 5 muestra la cinética de crecimiento de las cepas Blr2, Blr1, SEBlr2, IMI, PKA-C-S8 y antisentido en condiciones de iluminación continua. Se puede observar como las cepas que tardan más en llegar a la fase estacionaria de crecimiento son la cepa antisentido y la cepa PKA-C-S8, las cuales tardan más de 100 h para completar su cinética. El resto de las cepas llega a la fase estacionaria a las 72 h de incubación. No obstante, es interesante observar que todas las cepas mostraron la similitud de alcanzar la etapa logarítmica media a las 36 horas de incubación (Fig 5).

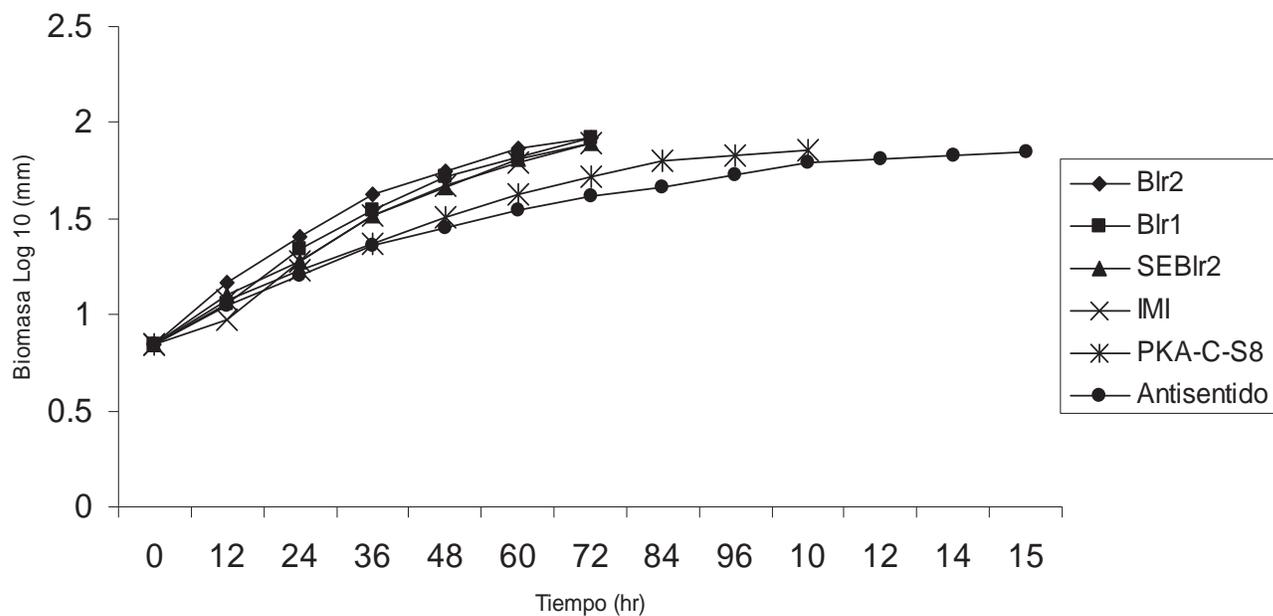


Fig. 5. Cinética de crecimiento en medio Voguel a 28 °C con exposición a la luz las 24 horas durante el tiempo en que el micelio llenó la caja.

V.1.2 Oscuridad

Aparentemente no se distinguen grandes diferencias en el comportamiento de las cepas al haber crecido en total oscuridad respecto a su desarrollo en luz (Fig. 6). Sin embargo, existe una tendencia a alcanzar en un período más corto la etapa logarítmica media, de hecho las cepas PKA-C-S8 y SEBlr2 alcanzan dicha fase a las 24 horas de incubación, lo que nos indica que el micelio del hongo se desarrolla de una manera más acelerada creciendo en la oscuridad.

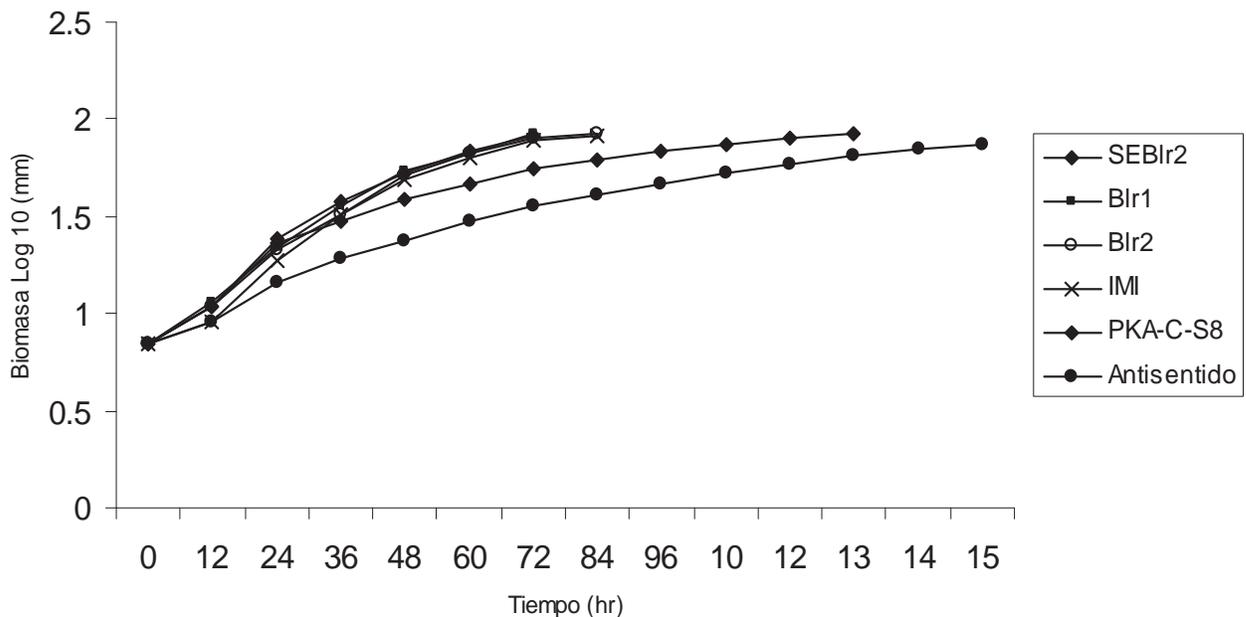


Fig. 6: Cinética de crecimiento en medio Vogel a 28 °C en total oscuridad

V.1.3 Fotoperíodo

En la figura 7 se muestra la cinética de crecimiento de todas las cepas en fotoperíodo. Las cepas SEBlr2, IMI, Blr1 y Blr2 muestran un crecimiento similar, mientras que en las cepas PKA-C-S8 y antisentido similitudes observa un ligero retardo en el crecimiento con respecto a las primeras. Todas las cepas tardaron un tiempo notablemente menor en alcanzar su etapa logarítmica con respecto a la incubación en condiciones de iluminación continua y de oscuridad. En esta

condición las cepas alcanzaron su etapa logarítmica media a las 24 horas de incubación.

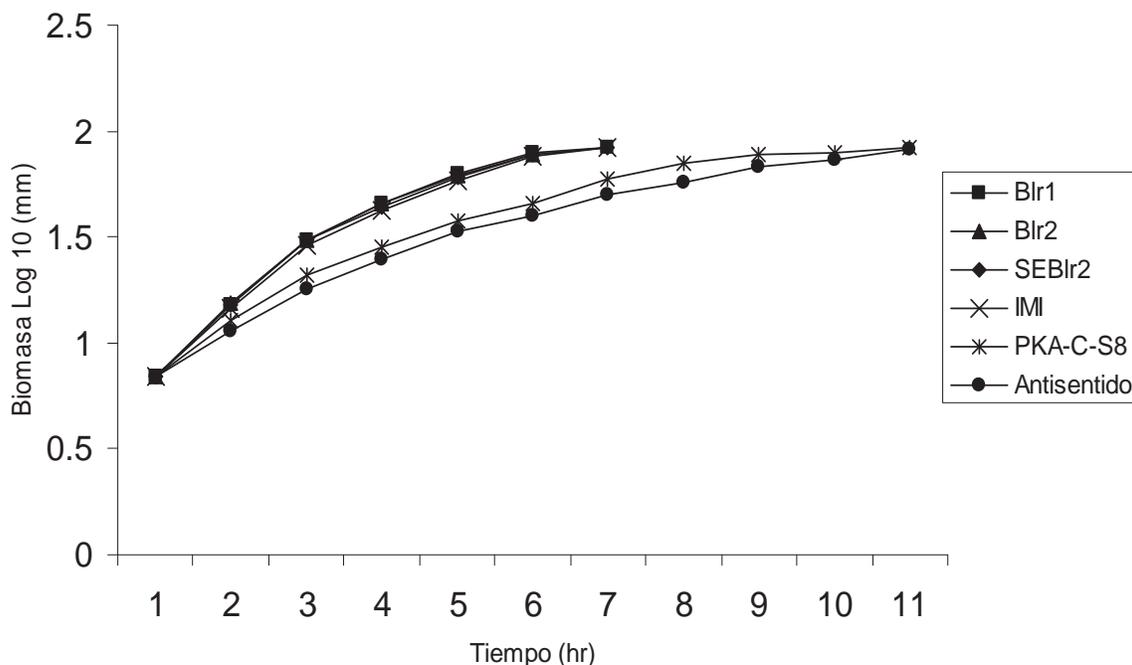


Fig. 7: Cinética de crecimiento en medio Voguel a 28 °C en fotoperíodo, con 12 horas de Luz y 12 horas de oscuridad, durante el tiempo en que el micelio llenó leal medio de cultivo.

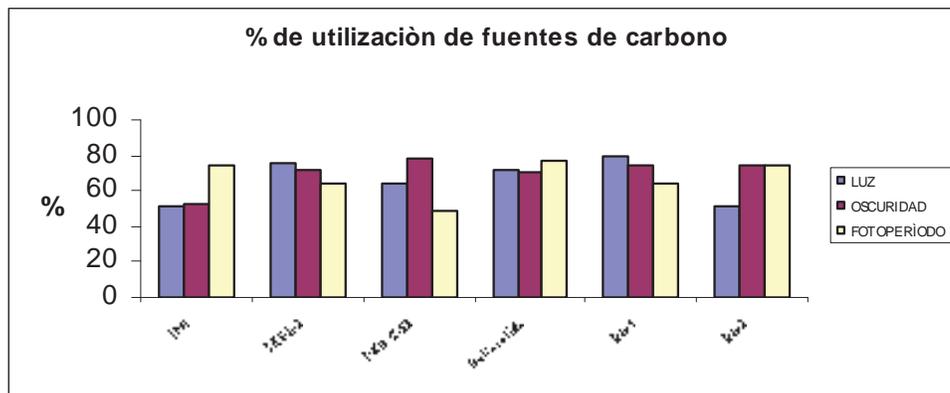
V.2 Porcentaje de utilización de nutrientes en las diferentes condiciones de cultivo

En la gráfica 1 se muestran las diferencias en cada mutante, expresada en porcentaje de utilización de fuentes de carbono, crecidas en las diferentes condiciones de cultivo; no es posible definir un patrón de comportamiento que distinga a todas las cepas en conjunto, sin embargo se observa claramente comportamientos diferentes en cada condición de crecimiento.

La cepa silvestre IMI junto a la mutante Blr2 muestra una disminución de su metabolismo al crecer en total luz, mientras que en Blr1 y SEBlr2 muestra claramente un efecto contrario a las anteriores.

También podemos observar el gran aumento del metabolismo que muestra IMI junto a la mutante Antisentido al haber desarrollado su micelio en condiciones de fotoperíodo, cosa contraria que presentan las cepas Blr1, PKA-C-S8 al igual que SEBlr2 disminuyendo notoriamente su actividad metabólica.

Solamente la cepa PKA-C-S8 muestra un aumento significativo de utilización de nutrientes al haber crecido en total oscuridad.



V.3 Utilización de fuentes de carbono en las Placas BIOLOG.

Las figuras 8-13 muestran las diferencias que se observaron en los patrones de aprovechamiento de fuentes de carbono de cada uno de las cepas de estudio en distintas condiciones de iluminación. En dichas figuras son evidentes las diferencias ocasionadas por las condiciones de iluminación tanto en una misma cepa como entre cepas.

IMI

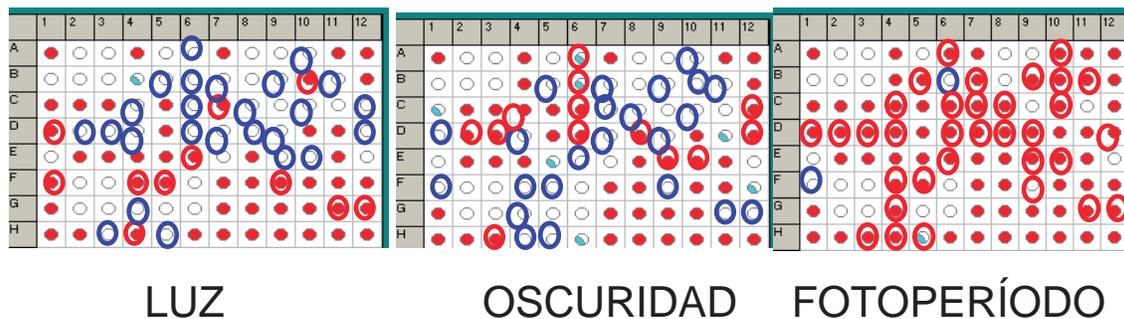


Fig. 8 Patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono de la cepa control IMI. Se muestra la placa BIOLOG indicando con círculos rojos las fuentes de carbono utilizadas y con círculo azul las no utilizadas en cada condición de iluminación.

Blr1



Fig. 9. Patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono de la cepa Blr1. Se muestra la placa BIOLOG indicando con círculos rojos las fuentes de carbono utilizadas y con círculo azul las no utilizadas en cada condición de iluminación.

Blr2

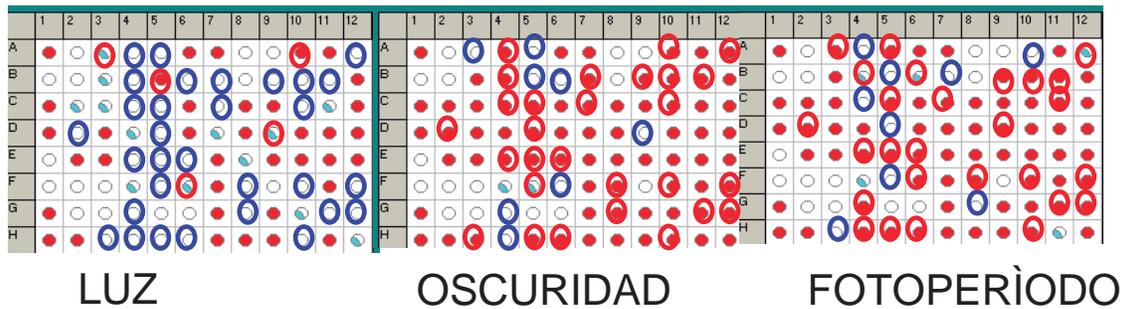


Fig. 10. Patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono de la cepa Blr2. Se muestra la placa BIOLOG indicando con círculos rojos las fuentes de carbono utilizadas y con círculo azul las no utilizadas en cada condición de iluminación.

PKA-C-S8



Fig. 11. Patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono de la cepa PKA-C-S8. Se muestra la placa BIOLOG indicando con círculos rojos las fuentes de carbono utilizadas y con círculo azul las no utilizadas en cada condición de iluminación.

SEBr2



Fig. 12. Patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono de la cepa SEBr2. Se muestra la placa BIOL OG indicando con círculos rojos las fuentes de carbono utilizadas y con círculo azul las no utilizadas en cada condición de iluminación.

ANTISENTIDO

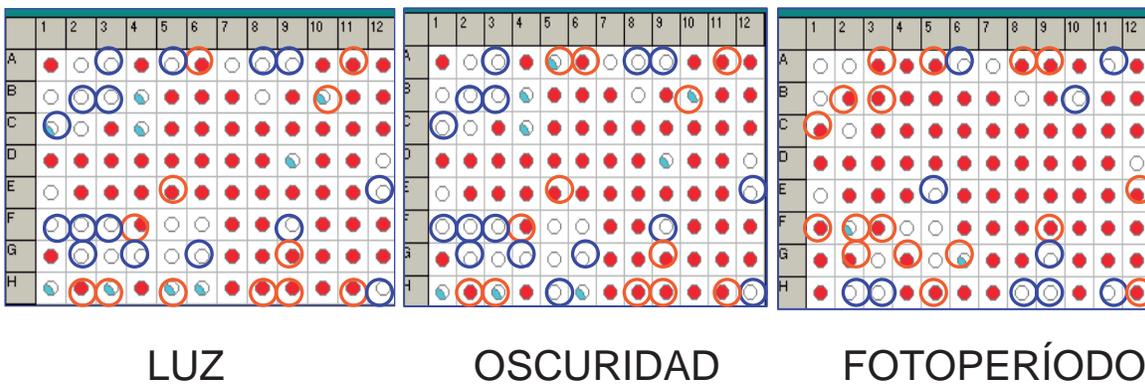
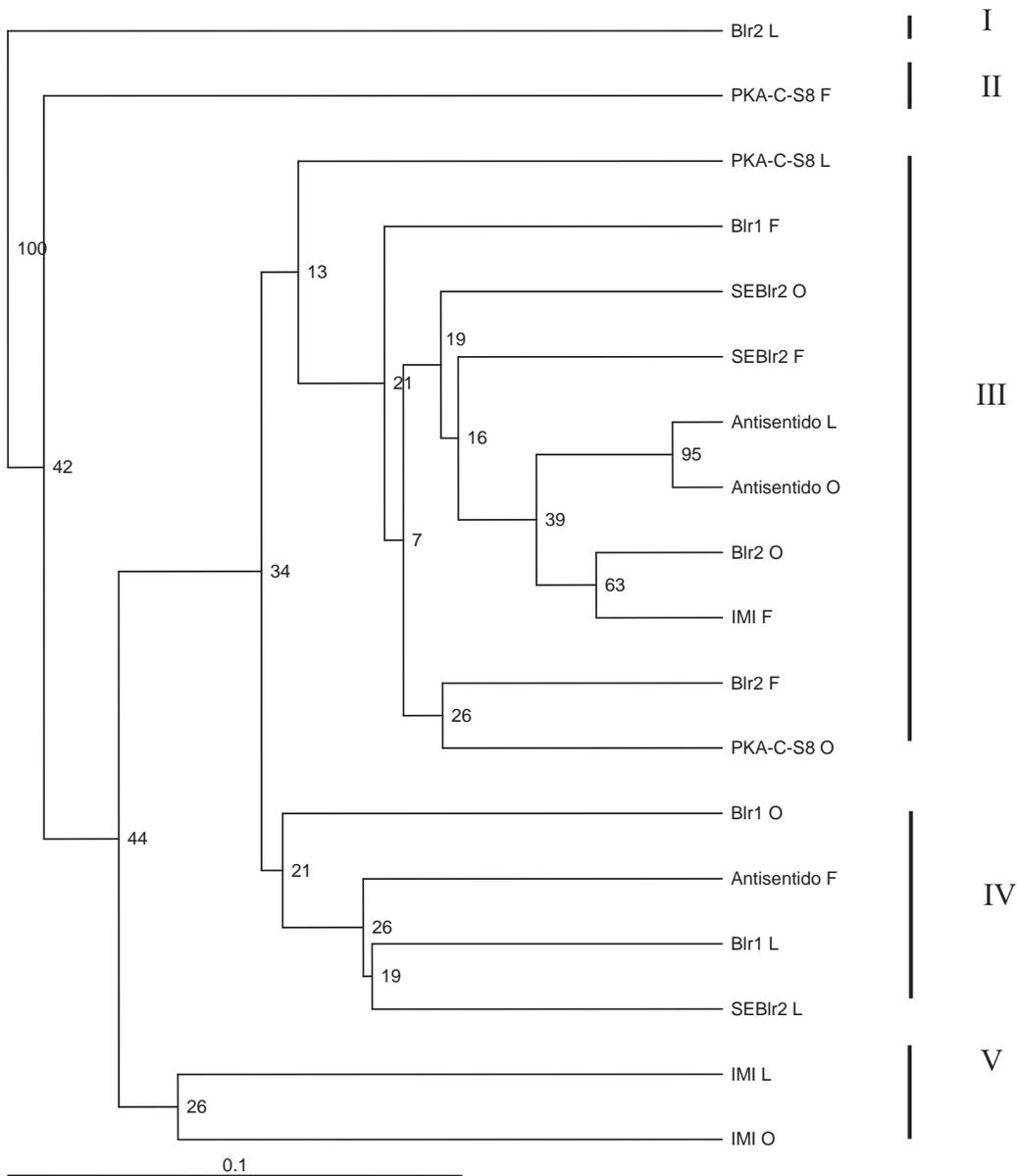


Fig. 13. Patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono de la cepa Antisentido. Se muestra la placa BIOL OG indicando con círculos rojos las fuentes de carbono utilizadas y con círculo azul las no utilizadas en cada condición de iluminación.

V.4 Dendograma de Distancias fisiológicas en el Sistema BIOLOG

Al realizar un dendograma con base en la matriz dicotómica obtenida a partir de la utilización de fuentes de carbono en las distintas condiciones de incubación se observa que para una misma cepa, el patrón fisiológico cambia

significativamente de acuerdo a la incidencia de luz (Figura 14). El dendograma generado muestra la formación de cinco grupos principales. En el grupo I se encuentra a la mutante Blr2 en condiciones de iluminación continua (Blr2 L), la cual se separa con una alta confianza estadística del resto de cepas. El grupo 2 está formado únicamente por la cepa PKA-C-S8 en condición de fotoperiodo, mientras que en los grupos III y IV se encuentran la gran mayoría de las cepas de estudio distribuidas sin una aparente relación con la condición de incubación (Figura 14). El grupo V se encuentra formado por la cepa IMI en condiciones de oscuridad permanente y luz continua.



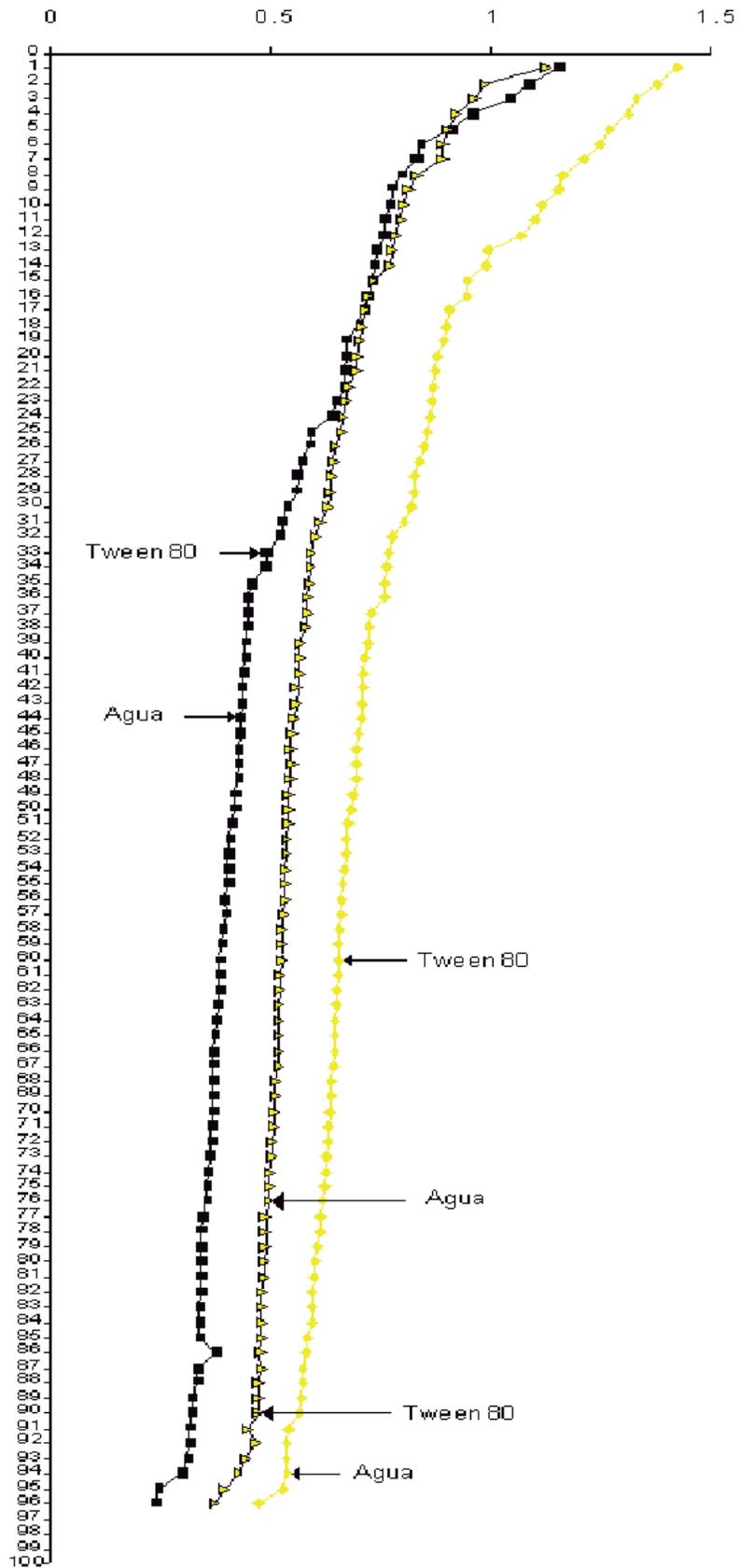
Fig, 14 Dendograma obtenido a partir del patrón de utilización de fuentes de carbono mediante el ensayo BIOLOG. Cada una de las cepas de estudio fue probada en condiciones de luz continua (L), obscuridad continua (O) y fotoperiodo (F).

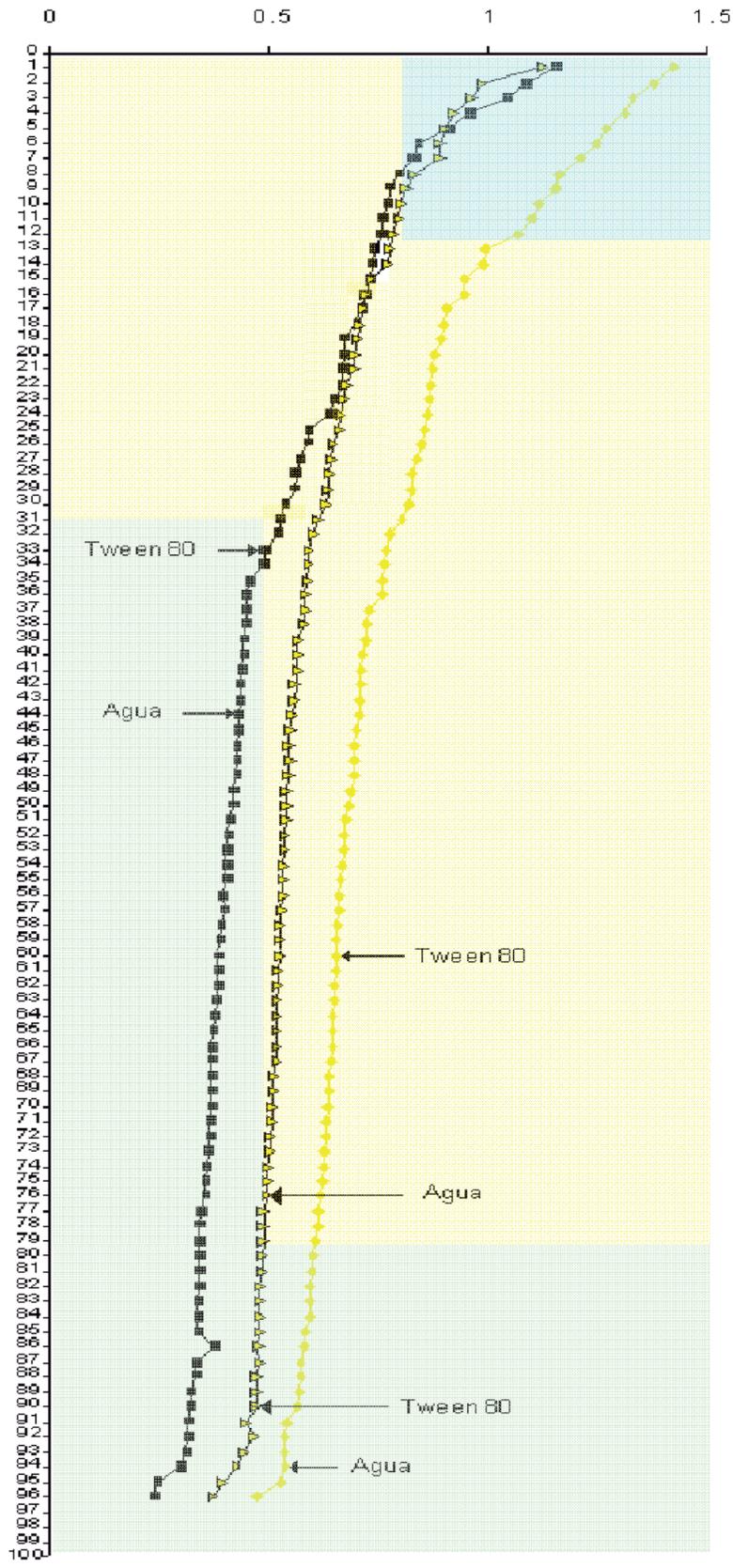
V.5 Densidad Micelial a 790 nm

Con la finalidad de clasificar a todos los nutrientes proporcionados por el sistema BIOLOG, en base a su aprovechamiento por las cepas en estudio, se construyó una gráfica para cada condición de crecimiento (Luz-Oscuridad-Fotoperíodo), y se procedió a agruparlos en tres Cluster o grupos, en base a su densidad óptica a 790 nm, a las 48 horas de incubación.

La gráfica, para las tres condiciones, muestra una misma tendencia, sin embargo se observa un aumento notable en la densidad cuando las cepas han sido crecidas en luz, ya que su pico máximo es de 1.422 nm de absorbancia, aunque es importante también el hecho de que tanto en luz como en oscuridad y fotoperíodo el componente que es clasificado como número uno es el Glicerol.

Fig. 15. Utilización de fuentes de carbono en las diferentes condiciones de cultivo. La línea amarilla, con círculos amarillos, indica las distintas absorbancias de todos los nutrientes en total exposición a la luz. La línea negra con triángulos amarillos representa a las cepas en fotoperiodo. La condición de total oscuridad está representada por la línea negra con cuadros negros.





VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontraron diferencias fenotípicas entre cepas de *T. atroviride* afectadas en su respuesta a luz azul, derivadas de la cepa silvestre IMI. Aun más, el patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono varió dentro de una misma cepa al modificar las condiciones de iluminación durante el proceso de incubación. El presente trabajo constituye el primer estudio realizado sobre el patrón de aprovechamiento de fuentes de carbono en *T. atroviride* empleando el sistema BIOLOG. Aun más, en relación a especies del género *Trichoderma* o sus teleomorfos del género *Hypocrea* únicamente existen dos reportes en los cuales se analiza el patrón de microarreglos fenotípicos con base en el ensayo BIOLOG, ambos relacionados con *Hypocrea jecorina* (anamorfo *T. reesei*). Así, empleando el ensayo BIOLOG para la generación de microarreglos fenotípicos se observó que la cepa de cepario QM 6a de *H. jecorina* posee un patrón de utilización de fuentes de carbono distinto de cepas silvestres de la misma especie que han sido aisladas recientemente (Druzhinina y col., 2006). Esta observación se atribuye a un proceso de “domesticación” generado por la resiembra continua durante más de 60 años de dicha cepa, con la cual se ha efectuado un proceso de selección. Por otra parte, en el mismo estudio se ha documentado que mutantes de *H. jecorina* sobepductoras de celulasa presentan prácticamente el mismo patrón de utilización de fuentes de carbono que la cepa silvestre de la cual se derivaron (QM 6a). No obstante, se encontró que un incremento en la expresión de celulasa

esta correlacionado de manera inversamente proporcional con la capacidad para crecer en adonitol, 2- cetogluconato y ácido γ - aminobutírico, y de manera directamente proporcional con la capacidad para crecer en D- sorbitol y ácido sacárico (Druzhinina y col., 2006).

Una diferencia importante entre *T. reesei* y *T. atroviride* es el aprovechamiento de Tween 80. Mientras que las cepas de *T. reesei* estudiadas pueden aprovechar con relativamente buena eficiencia dicha fuente de carbono (Druzhinina y col., 2006), las cepas de *T. atroviride*, salvo la SEBlr2 en condición de iluminación continua, no emplean este sustrato. Otra diferencia interesante es el aprovechamiento del ácido γ -amino butírico, el cual es la fuente de carbono mejor aprovechada por toas las cepas de *T. reesei* estudiadas, mientras que en el caso de *T. atroviride* se observa que la utilización de dicha fuente de carbono depende de la incidencia de luz y en el caso de la cepa Blr2 no es aprovechada en ninguna de las condiciones de incubación probadas. En el mismo sentido, la L-sorbosa mostró ser mal metabolizad por parte de *T. reesei* pero fue aprovechada por la todas las cepas de *T. atroviride*, por lo menos en dos condiciones de iluminación. En oposición, el ácido bromofumárico mostró ser una fuente de carbono mal empleada tanto por *T. reesei* como por *T. atroviride*. Otra similitud entre las cepas de las especies comparadas se de en el mal aprovechamiento del ácido succinámico y algunos de sus derivados.

En las cepas aquí estudiadas se encontraron casos en los cuales bajo ninguna circunstancia de iluminación se pudo aprovechar una fuente de carbono, pero si fueron aprovechados en otras cepas en distintas condiciones de iluminación. Tal es el caso de la L-ramnosa y la D-ribosa en la cepa Antisentido, o los isómeros de D y L-arabinosa para Blr2. También hubo alguna fuente de carbono de utilización muy restringida, como la α -ciclodextrina que solo fue empleada por la cepa PKA-C-S8 cultivada en oscuridad o el ácido sebácico, empleado únicamente por la cepa antisentido en fotoperiodo.

Una conclusión del trabajo de Druzhinia y col. (2006) es el hecho de que mutantes generadas por distintos métodos no específicos (UV, radiación, transformación mediante DNA), difieren de la cepa silvestres en la utilización de

algunas fuentes de carbono, lo que posiblemente se debe al hecho de que se están alterando otras funciones fisiológicas aparte de aquellas para las que fueron seleccionadas. Las mutantes producidas en el presente estudio son mutantes generadas hacia un blanco (locus) específico mediante técnicas de DNA recombinante. Así, es de esperar que las mutantes utilizadas en el presente estudio no se encuentren afectadas en otras funciones genéticas con respecto a la cepa silvestre. Por lo anterior, cualquier diferencia en el patrón de utilización de fuentes de carbono de acuerdo a las condiciones de iluminación, puede ser atribuida al gen *blr1* y/o *blr2*. Por lo anterior, es necesario la realización de estudios adicionales que permitan explicar a un nivel molecular el papel de dichos genes en el aprovechamiento de distintas fuentes de carbono en *T. atroviride*.

VIII. CONCLUSIONES

Se observaron cambios en el comportamiento de las mutantes que crecieron en las diferentes condiciones de cultivo; en la curva de crecimiento se distingue claramente una disminución de la etapa logarítmica cuando todas las cepas han sido cultivadas en condiciones de fotoperíodo, aproximadamente alcanzan su etapa logarítmica a las 24 horas de haber sido cultivadas, 12 horas menos que en oscuridad y luz, lo que nos indica una modificación en el comportamiento del hongo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- **Arrieta-Escobar**, A.y Belin, J.M. (1982). Effects of polyphenolic compounds on the Growth and cellulolytic activity of a strain of *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng. **24**, 983-989
- **Benítez Tahía**, Ana M. Rincón, M. Carmen Limón, Antonio C. Codón. 2004: Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. INTERNATIONAL MICROBIOLOGY
- **Bissett**, J. (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum. Sect. Nov. Canadian Journal of Botany, **62**, 924-931
- **Bissett**, J. (1991a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. Canadian Journal of Botany, **69**, 2357-2371
- **Bissett**, J. (1991b). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. Canadian Journal of Botany, **69**, 2372-2417
- **Bissett**, J. (1991c). A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. Canadian Journal of Botany
- **Bochner Barry R.**, Gadxinski Peter, and Panomitros Eugenia. 2001: Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Funcion. *Genome Research*. **11**: 1246-1255.
- **Casas-Flores Sergio**, Rios-Momberg Mauricio, Bibbins Martha, Ponce-Noyola Patricia and Herrera-Estrella Alfredo.2004: BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, **150**, 3561-3569.
- **Casas-Flores Sergio**, Rios-Momberg Mauricio, Rosales Saavedra Teresa, Martínez-Hernández Pedro, Olmedo-Monfil Vianey, and Herrera-Estrella Alfredo. 2006: Cross Talk between a Fungal Blue-Light Perception System and the Cyclic AMP Signaling Pathway. *EUKARYOTIC CELL*. p. 499-506
- **Chet I.**, A. Ordentlich, R. Shapira and A. Oppenheim. 1990: Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant and Soil* **129**: 85-92
- **Danielson**, R.M. y Davey, C.B. (1973). Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. Soil Biol. Biochem. **5**, 505-515
- **Druzhinina S.** Irina, Schmoll Monika, Seiboth Bernhard, and Christian P. Kubicek. 2006. Global Carbon Utilization Profiles of Wild-Type, Mutant, and Transformant Strains of *Hypocrea jecorina*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2126-2123
- **Elad**, Y., Chet, I., Boyle, P., y Henis, Y. (1983b). Parasitism of *Trichoderma* spp., on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology. **73**. 85-88.

- **Ezziyyani Mohammed**, Pérez Sánchez Consuelo, Ahmed Sid Ahmed, María Emilia Requena & María Emilia Candela. 2004: *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 36,45
- **Goldman**, G.H., Hayes, C., y Harman, G.E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Biotechnology Tibtech*, 12, 478-482.
- **Handelsman** Jo, and Eric V. Stabb. 1996: Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, vol. 8, 1855-1869.
- **HAMPL**, V., Pavlicek, A., and Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting –based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 731-735.
- **(10) Harman Gary E.**, Howell Charles R., Viterbo Ada, Ilan Chet and Matteo Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *NATURE REVIEWS-MICROBIOLOGY*. Volume 2. 43-56
- **Herrera-Estrella**. ANÁLISIS GENÓMICO FUNCIONAL DE LA REPRODUCCIÓN ASEXUAL DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Trichoderma atroviride*, *CONACYT 2000*
- **Horwitz**, B. A., S. Malkin, and J. Gressel. 1984. Roseoflavin inhibition of photoconidiation en a *Trichoderma* riboflavin auxotroph: indirect evidence for flavin requirement for photoreactions. *Photochem. Photobiol.* 40:763-769.
- **Howell CR**. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and Commercial applications. London: Taylor & Francis, 173-184.
- **Howell CR** (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87:4-10
- **Howell C.R**. 2003: Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*. Vol. 87, 4-10
- **Jensen**, D.F., Wolffhechel, H. (1995). Biological control: Benefits and risks. (Series: Plant and microbial biotechnology research. En M.T.H., Heikki y J.m. Lynch (Eds.) *The Use of fungi, particularly Trichoderma spp. And Gliocladium spp., to control root rot and damping off disease* (pp. 177-189). Cambridge: Cambridge University Press.
- **Kubicek C.P.**, R.L Mach, C.K Peterbauer and M. Lorito. 2001: TRICHODERMA: FROM GENES TO BIOCONTROL. *Journal of Plant Pathology*, Special issue, 11-23
- **Kuhls**. K., Lieckfeldt, E., Sammuels, G.J. Meyer, W, Kubicek, C.P., y Borner, T. (1997). Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analsis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89, 442-460. (el género *Trichoderma*)

- **Lieckfeldt**, E., Kuhls, K., y Muthumeenakshi, S. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: C.P. Kubicek y Harman, G.E. (Eds.) *Molecular taxonomy of Trichoderma and Gliocladium and their teleomorphs* (pp. 35-56). London: Taylor & Francis Ltd.
- **Mendoza-Mendoza** Artemio, J. Pozo María, Grzegorski Darlene, Martínez Pedro, García Juan M., Carlos Cortés, Charles Kenerley and Alfredo Herrera-Estrella (2003). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. *PNAS*, vol. 100, no.26, 15965-15970
- **Michel Aceves** Alejandro Casimiro. 2001: CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp EUASCOMYCETES: HYPOCREALES), SU ANTIBIOSIS Y MICOPARASITISMO SOBRE *Fusarium subglutinans* Y *F. oxysporum* (HYPHOMYCETES:HYPHALES). Tesis de Doctorado, Tecoman, Colima, México.
- **Ochoa Moreno** María Elena. 2002: ANTIBIOSIS Y MICOPARASITISMO DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. (HYPHOMYCETES: HYPHALES), SOBRE *Mycosphaerella fijiensis* (LOCULOASCOMYCETES: DOTHIDEALES). Tesis de Maestría. Tecoman, Colima, México
- **Papavizas** GC, Roberts DP, Kim KK. Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. *Can J Microbiol* 1990; 36: 484-489
- **Papavizas** GC & Lumsden RD. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 398-413.
- **Papavizas** GC, Lewis JA & Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- **Rey Manuel**, Delgado-Jarana Jesús , Rincón Ana M^a, Limón M^a Carmen y Benítez Tahía. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev Iberoam Micol* 17:S31-S36.
- **Samuels**, G.J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100, 923-935 (el género *Trichoderma*), 7:249-260
- **Smith**, W.H. (1995). Forest ocurrente of *Trichoderma* species: Emphasis on potencial Organochlorine (Xenobiotic) degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32, 179-183.
- **Tye**, R.J.; Willets, A.J. 1973. Fungal growth on methanol. *J.Gen. Microbiol.* 77, 1-2, 69, 2418-2420.
- **Vázquez-Garcidueñas** Soledad, Carlos A. Leal-Morales, Alfredo Herrera-Estrella. 1998: Analysis of the β -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol.* 64 (4): 1442-1446.
- (2) **Vázquez Garcidueñas** Ma. Soledad, Virgen Calleros Gil. CONTROL BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE MICOPARÁSITOS.

- (9) WWW.fondosdigitales.us.es/public_thesis/413/9498.pdf
- **Whipps John M.** 2001: microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, Roots Special Issue, pp. 487-511.
- **Zaldívar Mercedes**, Velásquez Juan Carlos, Contreras Inés, Pérez Luz María. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. *EJB Electronic Journal of Biotechnology de Valparaíso-Chile*. ISSN: 0717-3458.