



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

---

---



**FACULTAD DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“Variación fisiológica y genética de  
cepas silvestres del complejo  
*Trichoderma harzianum*”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

**YESSICA ALCANTAR DIMAS**

ASESOR DE TESIS:

**D.C GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO**



Morelia, Michoacán, Mayo 2018

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología y Conservación Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Se contó con el apoyo de la Beca de Apoyo para la Titulación (SEP-CNBES) en su programa 2016-2017 al proyecto “Variación fisiológica y genética de cepas silvestres del complejo *Trichoderma harzianum*”. Se agradece el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica (CIC-UMSNH) durante el periodo 2016-2017 al proyecto “Potencial biotecnológico de cepas de *Trichoderma* spp. nativas del estado de Michoacán”.

## DEDICATORIAS

**A Dios** que siempre está conmigo y permitirme cumplir otra meta más en mi vida.

**A mis padres** María Rosa y Emiliano por los esfuerzos y sacrificios que hicieron para brindarme una profesión; su apoyo y confianza que tuvieron en mí.

**A mis hermanos** Gabriel y Gabriela por su apoyo e impulso para seguir adelante y estar siempre a mi lado.

## AGRADECIMIENTOS

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

A mi asesor el **D.C Gerardo Vázquez Marrufo** por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por sus conocimientos, consejos, paciencia y apoyo brindado en la elaboración de mi tesis.

Al **D.C Jesús Andrei Rosales Castillo** por sus enseñanzas y apoyo en la parte experimental de este proyecto.

A la **D.C Marina Arredondo Santoyo** por su apoyo y paciencia brindado en el aprendizaje de gran parte de las técnicas de laboratorio empleadas.

A mi prima **Stephanie Sánchez Dimas** por sus consejos y apoyo.

A mis amigos por su amistad y ánimo, con quienes compartí momentos inolvidables: **Moisés Valdés López, Brenda Zavala Torres, Roberto Campos López, Isaí Mendoza Cruz, Karla Ivonne González, Bryan Martínez Martínez, Yveet Sierra y José Martin Carlos Pérez.**

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> .....	4
2.2 Biología general de <i>Trichoderma</i> .....	4
2.2.1 Requerimientos nutricionales.....	6
2.2.2 Temperatura .....	7
2.2.3 pH .....	7
2.3 <i>Trichoderma</i> y sus hábitats .....	8
2.4 Importancia biotecnológica de <i>Trichoderma</i> .....	9
2.4.1 Producción de enzimas.....	9
2.4.2 Sustancias con actividad biológica .....	10
2.5 Utilización de hongos del género <i>Trichoderma</i> como agentes de control biológico.....	11
2.6 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> durante el biocontrol .....	12
2.6.1 Antibiosis .....	12
2.6.2 Competencia por nutrientes.....	13
2.6.3 Micoparasitismo.....	13
2.6.4 Inducción de resistencia en plantas.....	14
2.7 Análisis de diversidad genética en <i>T. harzianum</i> .....	15
2.8 Descripción del género <i>Trichoderma</i> en México .....	17
2.9 Antecedentes del estudio de <i>Trichoderma</i> spp. en Michoacán.....	18
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo General .....	21
4.2 Objetivos Particulares .....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Cepas de estudio .....	22
5.2 Medios de cultivo .....	22
5.2.1 Agar Papa Dextrosa (PDA).....	22
5.2.2 Agar Extracto de Malta (AEM) .....	23
5.3 Viabilidad celular y obtención de inóculos.....	23
5.4 Cinéticas de crecimiento .....	23

5.4.1 Crecimiento de <i>T. harzianum</i> en diferentes temperaturas .....	23
5.4.2 Efectos del pH en el crecimiento de <i>T. harzianum</i> .....	24
5.5 Obtención de conidias.....	24
5.6 Ensayos de germinación a diferentes temperaturas .....	25
5.7 Amplificación mediante PCR de marcadores tipo microsatélite .....	25
6. RESULTADOS .....	27
6.1 Viabilidad de las cepas de estudio .....	27
6.2 Cinéticas de crecimiento .....	27
6.2.1 Crecimiento de <i>T. harzianum</i> en diferentes temperaturas .....	27
6.2.2 Crecimiento de <i>T. harzianum</i> en diferentes valores de pH .....	39
6.3 Evaluación de la capacidad de germinación de las cepas de <i>T. harzianum</i> .	45
6.4 Amplificación mediante PCR de marcadores tipo microsatélite .....	47
7. DISCUSIÓN.....	50
7.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial .....	50
7.2 Efectos del pH en el crecimiento micelial y conidiación .....	51
7.3 Germinación de las cepas de <i>T. harzianum</i> .....	52
7.4 Amplificación de marcadores tipo microsatélite mediante PCR .....	54
8. RESUMEN DE RESULTADOS.....	56
9. CONCLUSIONES .....	56
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Pág.
<b>Figura 1.</b>	Variación en la morfología y conidiación de las cepas de <i>T. harzianum</i> en medio PDA a diferentes temperaturas de incubación.	28
<b>Figura 2.</b>	Variación en la morfología y conidiación de las cepas de <i>T. harzianum</i> en medio AEM a diferentes temperaturas de incubación.	29
<b>Figura 3.</b>	Cinéticas de crecimiento de la cepa CMU-1 (Panel A), CMU-14 (Panel B) y CMU-19 (Panel C) de <i>T. harzianum</i> en diferentes temperaturas.	31
<b>Figura 4.</b>	Cinéticas de crecimiento de las cepas CMU-18 (Panel A), CMU-23 (Panel B) y CMU-90 (Panel C) de <i>T. harzianum</i> en diferentes temperaturas.	35
<b>Figura 5.</b>	Cinéticas de crecimiento de las cepas CMU-25 (Panel A), CMU-34 (Panel B) y CMU-44 (Panel C) de <i>T. harzianum</i> en diferentes temperaturas.	38
<b>Figura 6.</b>	Diferencias morfológicas y potencial de condición a diferente pH de las cepas de <i>T. harzianum</i> .	40
<b>Figura 7.</b>	Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>T. harzianum</i> CMU-1 (Panel A), CMU-14 (Panel B), CMU-18 (Panel C), CMU-19 (Panel D), CMU-23 (Panel E) y CMU-25 (Panel F) en diferentes valores de pH.	42
<b>Figura 8.</b>	Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>T. harzianum</i> CMU-34 (Panel A), CMU-44 (Panel B) y CMU-90 (Panel C) en diferentes valores de pH.	44
<b>Figura 9.</b>	Porcentaje de germinación de cepas de <i>T. harzianum</i> .	45
<b>Figura 10.</b>	Morfología de conidias de las cepas de estudio CMU-14 (Panel A), CMU-18 (Panel B), CMU-34 (Panel C), CMU-44 (Panel D) y CMU-90 (Panel E).	46

- Figura 11.** Patrones de amplificación de las cepas de *T. harzianum* con distintos oligos de ThSSR. 47
- Figura 12.** Patrones de amplificación de las cepas de *T. harzianum* con distintos oligos. 48



## ÍNDICE DE TABLAS

No.	Título	Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Datos de las cepas silvestres de <i>T. harzianum</i> .	22
<b>Tabla 2.</b>	Iniciadores y condiciones para la amplificación mediante PCR de secuencias microsatélite de las cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> .	26
<b>Tabla 3.</b>	Comparación cualitativa de conidiación de cepas de <i>T. harzianum</i> en diferentes medios de cultivo y temperatura de incubación.	39
<b>Tabla 4.</b>	Comparación cualitativa de conidiación de cepas de <i>T. harzianum</i> .	44
<b>Tabla 5.</b>	Producción de conidias en las cepas de estudio.	45
<b>Tabla 6.</b>	Detalles del tamaño de alelos observados con los diferentes oligos utilizados para evaluar la diversidad genética de cepas de <i>T. harzianum</i> .	49

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SSR	Secuencia de repeticiones simple
CMU	Cepario Michoacano Universitario
mg	Miligramos
mL	Mililitros
AEM	Agar Extracto de Malta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
TA	Temperatura ambiente
h	Horas
mm	Milímetros
cm	Centímetros
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
L	Litros
min	Minutos
s	Segundos
lb/in <sup>2</sup>	Libras por pulgada cuadrada
PDA	Agar Papa Dextrosa

## RESUMEN

Se analizaron nueve cepas silvestres del complejo *Trichoderma harzianum* del estado de Michoacán para evaluar la variabilidad fisiológica y genética. Se evaluó el crecimiento micelial, la capacidad de conidiación y la germinación de conidias de las cepas en los medios Agar Papa Dextrosa y Agar Extracto de Malta. También se evaluó la variación genética empleando marcadores microsatélites de secuencias repetitivas simples (SSRs, por sus siglas en inglés). Las cepas mostraron un crecimiento micelial óptimo entre los 16 y 32 °C, retrasando su crecimiento a 36 °C. A valores de pH de 4.0, 7.0 y 9.0 no se observaron diferencias significativas en las cinéticas de crecimiento micelial de las cepas de estudio. La mayoría de las cepas conidieron entre los 16 y 32 °C y a valores de pH de 4.0 y 7.0, disminuyendo a 36 °C y a pH de 9.0. De las nueve cepas analizadas, las conidias de las cepas CMU-14, CMU-18, CMU-34 y CMU-44 mostraron germinación a 16 °C, 28 °C, y 36 °C, la cepa CMU-90 mostró germinación solo a 28 °C. No se evaluó la capacidad de germinación de las cepas CMU-1, CMU-19, CMU-23 y CMU-25 debido a su lenta o nula conidiación. Los patrones de amplificación obtenidos para las cepas del complejo *T. harzianum* con iniciadores dirigidos a SSRs, mostraron un número variable de bandas para cada uno. La caracterización de cepas de *Trichoderma harzianum* permite la generación de información sobre la fisiología básica de cepas del género, al mismo tiempo que contribuye al establecimiento de criterios adecuados para el desarrollo de productos de biocontrol.

**Palabras clave:** *Trichoderma harzianum*, crecimiento, conidiación, germinación, SSR (secuencias repetitivas simples).

## ABSTRACT

Nine wild strains of *Trichoderma harzanium* from Michoacan state were analyzed to evaluate the physiological and genetic variability. The micelial growth, the conidiation capacity, and the conidia germination of the strains was evaluated in the medium Potato Dextrose Agar and Malt Extract Agar. The genetic variability was evaluated too, using microsatellites of simple sequences repetitive. The strains showed an optimum micelial growth between 16 and 32° C, delaying their growth at 36 °C. At pH values of 4.0, 7.0 and 9.0 not significant differences were observed in the micelial growth kinetic of the study strains. Most of the strains showed conidiation between 16 and 32 °C at pH values of 4.0 and 7.0 and delayed conidiation at 36 °C and pH of 9.0. Of the nine strains analyzed, the conidia of strain CMU-14, CMU-18, CMU-34 and CMU-44 showed germination at 16 °C, 28 °C and 36 °C, the strain CMU-90 showed germination only at 28 °C. The germination capacity of the strains CMU-1, CMU-19, CMU-23 y CMU-25 wasn't evaluated due to their slowly or null conidiation. The amplification patrons obtained of the strains of *T. harzanium* with directed primers to SSRs showed a variable number of bands for each one. The characterization of strains of *Trichoderma harzanium* permits the generation of information about the basic physiological of the gender strains. At same time that contribute to the establishment of appropriate criteria for the development of biocontrol products.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*, growth, conidiation, germination, SSR (simple repetitive sequence).

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas de relevancia agrícola causan pérdidas económicas importantes, además de incidir en la disponibilidad de productos de calidad para el consumidor. Entre los patógenos que atacan los cultivos, los hongos se caracterizan por su agresividad y resistencia (Chet *et al.*, 1997). La distribución de distintas especies de hongos y oomicetes fitopatógenos, como aquellas pertenecientes a los géneros *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, entre otros, se han propagado durante los últimos años en todas las regiones productivas debido a los cambios introducidos en la agricultura, con efectos perjudiciales en prácticamente todos los cultivos de importancia económica (Chet *et al.*, 1997). Además, no sólo los cultivos en crecimiento, sino también las frutas, granos y vegetales almacenados son presa de las infecciones por hongos.

Al inicio de la segunda mitad del siglo pasado, la estrategia empleada para combatir las infecciones fúngicas en la agricultura fue principalmente el uso de plaguicidas, sustancias químicas que además de combatir al patógeno han mostrado efectos adversos en otras especies animales y vegetales, así como en la salud humana (Benítez *et al.*, 2004). En la actualidad, el combate a hongos y otros microorganismos fitopatógenos forma parte de una estrategia denominada Manejo Integrado que involucra desde prácticas de preparación del terreno hasta la selección de variedades y genotipos del cultivo de interés (Benítez *et al.*, 2004). Parte de esa estrategia contempla el uso de productos biológicos para el control de plagas.

Baker y Cook (1974) definen el Control Biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas. Aunque se conocen las interrelaciones de organismos biocontroladores con diferentes hospedantes y patógenos, su aplicación como

biofungicidas es reciente y aún no completamente implementada debido en parte a que se requiere la selección de un aislamiento “intrínsecamente antagónico”, es decir, un enemigo natural del fitopatógeno; así como de su producción y formulación en grandes cantidades y bajo costo, que garantice su supervivencia en el suelo.

El control biológico de patógenos del suelo a través de la adición de microorganismos antagonistas, es un medio no químico (no contaminante) potencial para el control de enfermedades de plantas. Sin embargo, debido a varios factores ambientales, la mayoría de los hongos antagonistas no muestran efectos consistentes de biocontrol, por lo tanto, es necesario reducir hasta cierto punto su variabilidad y garantizar su persistencia en el campo para convertir a los hongos biocontroladores en una alternativa atractiva al uso de pesticidas químicos. Hay una enorme diversidad de microorganismos que colonizan las raíces de las plantas y algunos de estos desempeñan funciones benéficas en el control biológico: protegen al huésped de plagas y enfermedades y promueven el crecimiento de las plantas liberando señales similares a las hormonas (Mukherjee *et al.*, 2013). Entre estos organismos se incluyen diversos grupos de bacterias, así como hongos que forman endo y ecto-micorrizas, y especies de diversos géneros de ascomicetes, incluyendo *Trichoderma* spp.

Los aislamientos de distintas especies de *Trichoderma* son conocidos por su capacidad para controlar patógenos de plantas (Elad y Freeman, 2002), y son las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como control biológico, debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos, su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos. Cuando se planifica la aplicación de cepas antagonistas de *Trichoderma* con fines de control biológico, es muy importante considerar los parámetros ambientales que afectan a los agentes de biocontrol en el suelo. Una serie de parámetros ambientales abióticos y bióticos influye en la eficacia del biocontrol de *Trichoderma* spp. En ese sentido, algunos parámetros importantes a

considerar son los efectos de la temperatura, el potencial de agua y el pH, la presencia de plaguicidas, iones metálicos y bacterias antagónicas en el suelo.

En este trabajo se pretende analizar aspectos fisiológicos básicos y genéticos significativos entre cepas silvestres del complejo *Trichoderma harzianum* del estado de Michoacán. Dichos estudios permitirán determinar el potencial biotecnológico de las cepas evaluadas como agentes de control biológico.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Taxonomía del género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794 y posteriormente Rifai (1969) hizo el primer agrupamiento en agregados de especies que en términos generales, actualmente todavía se utiliza, con actualizaciones en ciertas secciones y grupos proveídos por el uso de herramientas de filogenia molecular que se han convertido en una técnica estándar en la sistemática de hongos. El uso de estas herramientas y el desarrollo de marcos teóricos adecuados para el empleo de los datos de análisis molecular en el reconocimiento de especies han llevado rápidamente a un aumento del número de especies de *Trichoderma*.

Actualmente, se han descrito 254 especies y dos variedades dentro del género *Trichoderma* (Bissett *et al.*, 2015), aunque constantemente se están describiendo nuevas especies cuando se analizan aislados provenientes de regiones geográficas no estudiadas o nuevos nichos (Chen y Zhuang, 2016, 2017; Qin y Zhuang, 2016).

De acuerdo con revisiones recientes sobre los grupos y subgrupos taxonómicos dentro de los hongos, y del propio género, el arreglo sistemático del género *Trichoderma* es: Reino Fungi, Subreino Dikarya, Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales y Familia Hypocreaceae (Hibbett *et al.*, 2007; Kubicek y Druzhinina, 2014).

### 2.2 Biología general de *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* son un grupo de hongos filamentosos de vida libre en el suelo, oportunistas, simbiote de plantas y micoparásitas. De manera particular, los hongos del género *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizósfera, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos. Este grupo fúngico es importante para las plantas, al contribuir en el control de hongos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes de control biológico de hongos causantes de enfermedades para



diferentes plantas (Druzhinina y Kubicek, 2005; Ávila-Miranda *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2007).

Los miembros de *Trichoderma* son hongos aeróbicos con una gran versatilidad para la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno; sin embargo, se ven favorecidos por la presencia de materia orgánica de origen vegetal. En relación al entorno fisicoquímico, el crecimiento vegetativo es más afín a una alta humedad y temperaturas entre los 20 y 28 °C. Se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin 1988; Jackson *et al.*, 1991).

La esporulación asexual depende principalmente del tipo y la disponibilidad de la fuente de carbono (Friedl *et al.*, 2008) y puede ser modulada por parámetros tales como la iluminación, la privación de nutrientes, un pH bajo y daño mecánico (Steyaert *et al.*, 2010; Schmoll *et al.*, 2010; Carreras-Villaseñor *et al.*, 2012). Las colonias que se desarrollan bajo condiciones de luz alterna (fotoperiodo), suelen ser blancas y algodonosas al inicio y después con anillos concéntricos, alternando una banda delgada hialina con otra ancha de color verde oscuro, mientras que bajo la luz continua uniformemente de color verde oscuro (Schmoll *et al.*, 2010). La luz influye además en la producción de metabolitos secundarios (Purschwitz *et al.*, 2006; Schmoll *et al.*, 2010).

Las características de la colonia, la tasa de crecimiento en el cultivo, la pigmentación, la disposición de los conidióforos y la forma de los conidios son los caracteres morfológicos importantes utilizados para distinguir las diferentes especies de *Trichoderma*. Las cepas de *Trichoderma* a menudo pueden identificarse fácilmente mediante una morfología distintiva que incluye un crecimiento rápido, en su inicio las colonias tienen color blanco y aterciopeladas, micelio con septos simples disperso en su mayoría, con pigmentos conidiales de color verde oscuro o amarillento con esporulación densa y una estructura de conidióforos repetidamente ramificada (Misra, 2009). Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal.

Los conidióforos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, que generalmente son ovalados, unicelulares y con tonalidades verdes los cuales aseguran la generación del hongo. El micelio de *Trichoderma* spp. también es capaz de generar clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales, que toleran condiciones ambientales adversas, por lo que son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova, 1999). Su pared celular está compuesta principalmente por quitina y glucanas. Parámetros ambientales abióticos y bióticos pueden tener una influencia negativa sobre la eficacia de biocontrol de cepas de *Trichoderma* spp: por lo tanto, es muy importante recopilar información sobre los efectos de los factores ambientales en las diferentes actividades de las cepas con potencial de control biológico.

### **2.2.1 Requerimientos nutricionales**

La composición nutricional del medio de cultivo influye de manera relevante en la producción de conidias y la germinación, y puede también tener efectos sobre la velocidad de crecimiento micelial (Agosin y Aguilera, 1998; Daryaei *et al.*, 2016a). La influencia de las fuentes de carbono (C) y nitrógeno (N) sobre el proceso de crecimiento y conidiación recibieron una atención especial en estudios fisiológicos de *Trichoderma* spp. Una relación óptima de C:N es necesaria para la producción y calidad óptimas de las conidias (Yu *et al.*, 1998); experimentos iniciales mostraron que se produce una mejor conidiación en presencia de L-alanina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico y casamino- ácidos como fuentes de nitrógeno. Las mejores fuentes de carbono son la dextrosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa, ribosa y celobiosa (Danielson, 1973).

Recientemente se ha re-evaluado el papel de las fuentes de C y N en el desarrollo y conidiación de *Trichoderma* spp. Empleando el sistema Biolog para identificar los patrones metabólicos, se ha documentado que los sustratos mejor aprovechados para el crecimiento en distintas cepas de *Trichoderma* spp. fueron D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, L-eritritol, glicerol, fructosa, fucosa, L-arabinosa, D-galactosa y xilitol (Kubicek *et al.*, 2003). 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 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 de algunas de las cepas de estudio fue la asparagina. Usando el mismo sistema, se ha descrito que monosacáridos, polioles y oligosacáridos estimulan el crecimiento del micelio vegetativo en *Hypocrea atroviridis*, fase sexual de *Trichoderma*, y que no es capaz de conidiar en sustratos como los ácidos orgánicos y los aminoácidos (Friedl *et al.*, 2008).

### 2.2.2 Temperatura

La reproducción y el crecimiento de *Trichoderma* spp. están fuertemente influenciados por la temperatura y la edad del cultivo (Hallsworth y Magan, 1996; Daryaei *et al.*, 2016b). *Trichoderma* crece en una amplia gama de temperaturas. En cuanto al intervalo de temperaturas máximas que pueden tolerar, Danielson y Davey (1973) indican que *T. harzianum* tolera temperaturas entre los 30 y 38 °C, mientras que Knudsen y Bin (1990) señalaron que la temperatura óptima de crecimiento para cepas de la misma especie fue de 20 °C.

De manera similar, un estudio de caracterización fisiológica realizado por Rodríguez y Arcia (1993) de *Trichoderma* spp., indicó que las temperaturas óptimas para el crecimiento de las cepas analizadas estuvieron entre los 25 y 30 °C. Sin embargo, existen reportes en los que se documenta el crecimiento en temperaturas más extremas. Por ejemplo, para cepas de *T. koningii* la temperatura máxima de crecimiento varía de 32 a 35 °C, en *T. hamatum* va de 30 a 35°C, mientras que para *T. viridi* y *T. polysporum* varía entre 28 y 31°C, creciendo mejor que las otras especies inclusive a 7 °C. Las especies que toleran temperaturas máximas más altas son *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum*, que pueden crecer de 40 a 41 °C (Danielson y Davey, 1973).

### 2.2.3 pH

La reproducción y el crecimiento de *Trichoderma* están fuertemente influenciados por factores abióticos como el pH (Hallsworth y Magan, 1996; Daryaei *et al.*,

2016). La adaptación ambiental de los hongos filamentosos al pH permite que crezcan en amplios rangos de acidez (Peñalva y Arst, 2004).

La conidiación de *Trichoderma* es favorecida a niveles de pH ácido y el pH óptimo para la reproducción puede variar entre cepas/especies. Por ejemplo, cepas de distintas especies pueden crecer en suelos con pH desde 5.5 a 8.5, aunque los valores óptimos se encuentran entre 5.5 y 6.5, es decir, en un ambiente ligeramente ácido (Jackson *et al.*, 1991; Kredics *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha observado que la morfología colonial es influenciada por el pH en *T. pleuroticola* (Steyaert *et al.*, 2010). Además, se ha documentado que el proceso de conidiación en *T. hamatum*, *T. atroviride* y *T. pleuroticola* ocurre a valores de pH ácidos cuando el medio de cultivo se encuentra regulado, pero ocurre a cualquier pH cuando no se tiene amortiguado el pH (Steyaert *et al.*, 2016), lo que implica que posiblemente la capacidad del micelio para modificar el pH del medio permite que éste promueva la conidiación.

### **2.3 *Trichoderma* y sus hábitats**

Las especies de este género son reconocidas como hongos cosmopolitas del suelo, con una amplia colonización de hábitats y nichos ecológicos (Schuster y Schmoll, 2010). Se consideran entre las especies más exitosas, debido a su amplia distribución por todas las latitudes, desde los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) hasta los acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). Esta amplia distribución obedece a su alta capacidad reproductiva (Harman *et al.*, 2004), a su gran capacidad para producir enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan una gran diversidad de sustratos y al hecho de que poseen un metabolismo versátil (Atanasova *et al.*, 2014). Las especies de *Trichoderma* pueden ser de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, y otras son micoparásitas.

## 2.4 Importancia biotecnológica de *Trichoderma*

### 2.4.1 Producción de enzimas

*Trichoderma reesei* se ha caracterizado por ser la más importante en la producción de enzimas para uso industrial, debido en gran medida a su notable poder celulolítico (Schuster y Schmoll, 2010). A la fecha 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. Actualmente se han detectado, en diferentes especies de *Trichoderma*, genes y actividades de exo- $\beta$ -1,4-glucanasas, endo- $\beta$ -1,4-glucanasas,  $\beta$ -glucosidasas (Strakowska *et al.*, 2014), tanto en especies saprofiticas como micoparasíticas (Schmoll *et al.*, 2016).

En fechas recientes se han utilizado herramientas modernas para el análisis de enzimas extracelulares en *Trichoderma* spp. Así, el estudio 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).

Las xilanasas son enzimas que participan en la degradación de la pared celular vegetal y abarcan actividades de endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas, enzimas importantes en la hidrólisis de la xilana, el componente mayoritario de la hemicelulosa. Las aplicaciones industriales de las xilanasas secretadas por especies del género *Trichoderma* incluyen 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). La producción de dichas enzimas es limitada en *Trichoderma* spp. en comparación con otras especies de hongos, ya que en el genoma de *T. reesei* se han encontrado únicamente cuatro genes que codifican para xilanasas y uno para xilosidasa (Martínez *et al.*, 2008). El secretoma de *T. harzianum* en presencia de celulosa muestra la presencia de dichas enzimas (Do Vale *et al.*, 2012).

Las quitinasas son otras enzimas hidrolíticas extracelulares de relevancia producidas por *Trichoderma* spp., las cuales degradan a la quitina, el polímero estructural en la pared celular de hongos y en el exoesqueleto de insectos y crustáceos; dicha actividad enzimática ha sido relacionada con la actividad entomopatógena y micoparasítica (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). Así, el análisis genómico muestra que las especies micoparasíticas *T. atroviride* y *T. virens* tienen un mayor número de genes de quitinasas que el saprófito *T. reesei* (Kubicek *et al.*, 2011). Las quitinasas son útiles en la producción de quitina-oligosacáridos, glucosamina y N-acetil glucosamina, sustancias con actividad antitumoral y otras actividades farmacológicas; 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).

Las proteasas extracelulares también han sido estudiadas en *Trichoderma* spp. en relación a su participación en el micoparasitismo y a algunas aplicaciones industriales. Evidencia experimental muestra la activación de la transcripción de genes de proteasas extracelulares de *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei* 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 serina proteasa de *T. pseudokoningii* posee actividad nematocida contra el parásito de plantas *Meloidogyne incognita* (Chen *et al.*, 2009).

Otras enzimas extracelulares de relevancia biotecnológica producidas por especies del género *Trichoderma* incluyen a las amilasas (Juwon y Emmanuel, 2012), lipasas (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 y sus proteínas codificadas, en comparación con las enzimas anteriormente descritas.

#### **2.4.2 Sustancias con actividad biológica**

Las especies del género *Trichoderma* producen diversos metabolitos secundarios con actividad biológica (Hermosa *et al.*, 2012; Zeilinger *et al.*, 2016), entre los que se encuentran los peptaiboles (Hermosa *et al.*, 2012) denominados también

peptaibióticos (Zeilinger *et al.*, 2016), un grupo de péptidos no ribosomales. De las aproximadamente 317 estructuras de peptaiboles registradas, cerca del 80% provienen del género *Trichoderma* (Hermosa *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016). Los peptaiboles denominados tricoconias obtenidos de *T. koningii* tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas y hongos (Xiao-Yan *et al.*, 2006). Las tricofuminas obtenidas de *Trichoderma* spp. presentan actividad morfogénica en hongos fitopatógenos y propiedades neurolépticas en ratones de laboratorio (Berg *et al.*, 2003), mientras que peptaiboles producidos por *T. harzianum* tienen actividad larvicida contra insectos (Shakeri y Foster, 2007). 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). Otros 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).

## **2.5 Utilización de hongos del género *Trichoderma* como agentes de control biológico**

El término “control biológico” o “biocontrol” puede ser definido como el control de “un organismo por parte de otro” (Narayanasamy, 2013), o bien como “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 potencial de las especies de *Trichoderma* como agentes de control biológico de enfermedades de las plantas fue reconocido por primera vez por Weindling (Weindling, 1934), quien describió la acción de micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de los géneros *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, así como sus efectos benéficos para el control de enfermedades de las plantas. Actualmente los agentes de biocontrol utilizados para el combate de patógenos

fúngicos del suelo, incluyen especies de *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Fusarium* no patogénico (Paulitz y Bélanger, 2001). Sin embargo, la versatilidad, la amplia gama de mecanismos biológicos y la plasticidad ecológica que posee *Trichoderma*, le han permitido posicionarse como un excelente agente de control biológico.

Son tres los mecanismos identificados por los cuales *Trichoderma* spp. puede controlar a un fitopatógeno: la liberación de metabolitos con actividad antifúngica (antibiosis), 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 actúan de manera sinérgica, generando 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 induce la resistencia en plantas contra un amplio número de enfermedades ocasionadas por bacterias, hongos y virus (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). Estos mecanismos se exponen en la siguiente sección.

## **2.6 Mecanismos de acción de *Trichoderma* durante el biocontrol**

### **2.6.1 Antibiosis**

Anteriormente se mencionó que las especies del género *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos, volátiles y no volátiles, que impiden el desarrollo de microorganismos fitopatógenos. Dichos metabolitos incluyen pironas, terpenoides, esteroides y policétidos (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). En el caso de compuestos volátiles, se incluye la producción de alcoholes, cetonas, alcanos, furanos, mono- y sesquiterpenos, así como pironas. Además, hay que considerar en este apartado también la producción de péptidos no ribosomales descritos con anterioridad (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). La secreción de dichos metabolitos se ha visto claramente correlacionada con la capacidad de biocontrol, ya que la purificación y aplicación del compuesto genera los mismos resultados sobre el fitopatógeno que si se aplica el hongo viable. El mecanismo de acción sobre el fitopatógeno de muchas de estas sustancias se desconoce.



### **2.6.2 Competencia por nutrientes**

Este mecanismo resulta tener una alta eficacia debido a que la falta de nutrientes es la causa más común de muerte para los microorganismos fitopatógenos. Uno de los principales nutrientes que delimitan la colonización y desarrollo de hongos es el Hierro, debido a su escasez y baja disponibilidad en suelo. En la mayoría de los hongos filamentosos la absorción de Hierro es esencial para su supervivencia, de tal forma que, al llevarse a cabo una inanición de dicho metal, los hongos secretan moléculas quelantes denominadas sideróforos que permiten movilizar el hierro del medio ambiente evitando su absorción por otros microorganismos. Algunas cepas de *Trichoderma* producen sideróforos altamente eficientes para quelar hierro, deteniendo de esta forma el crecimiento de otros hongos. Se ha propuesto que la competencia por hierro permite a *Trichoderma* spp. 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. es capaz de competir en ambientes de baja concentración de glucosa por su capacidad para transportar al interior celular eficientemente dicho azúcar. En *T. harzianum* se ha descrito el transportador Gtt1 con alta afinidad para la glucosa, que se expresa solamente en ambientes donde la glucosa está presente en muy baja concentración (Benítez *et al.*, 2004). Una característica adicional relacionada con el éxito de *Trichoderma* spp. como competidor en suelo es su capacidad para sensor y responder a cambios de pH en el entorno (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

### **2.6.3 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 necrotróficas, 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).

La interacción antagonista-patógeno durante el proceso micoparasítico se divide en cuatro etapas (Woo *et al.*, 2006):

- i) crecimiento quimiotrófico, en donde *Trichoderma* spp. puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes (Vinale *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2012), mediante gradientes de señales no del todo claras;
- ii) reconocimiento, se establece el primer contacto entre el micelio de *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno, con una alta eficiencia por parte del antagonista (Mukherjee *et al.*, 2012);
- iii) en la etapa de adhesión y enrollamiento, *Trichoderma* spp. se adhiere a su huésped enrollándose y formando apresorios, proceso en el que participa una lectina presente en la pared del patógeno (Leeder *et al.*, 2011; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014); y
- iv) actividad lítica, que involucra la producción de enzimas líticas extracelulares por parte de *Trichoderma* spp., fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas del micoparásito, culminando la interacción con la lisis de la pared celular y la digestión de los contenidos celulares del hospedero, causando su muerte (Mukherjee *et al.*, 2012).

En el parasitismo a nivel microscópico no todas estas interacciones son siempre observadas, pues al parecer dependen del aislado de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del ambiente.

#### **2.6.4 Inducción de resistencia en plantas**

La inducción de resistencia en plantas por parte de *Trichoderma* spp. 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 parasitica* en tabaco, tanto mediante la aplicación de inóculos como de extractos de *Trichoderma* spp. (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

La capacidad antagonista de *Trichoderma* es altamente variable y en diversos estudios se ha demostrado que las cepas nativas de un lugar son más efectivas que las importadas (Belayneh-Mulaw *et al.*, 2010; Gal-Hemed *et al.*, 2011). Debido a esto, la aplicación de productos de biocontrol con cepas provenientes de regiones geográficas distantes, o de ecosistemas o cultivos diferentes a los que se está intentando proteger, no suelen ser tan efectivos. Esto resalta la importancia de continuar aislando y caracterizando cepas de *Trichoderma* spp. para su aplicación a determinados cultivos o condiciones ecológicas.

## **2.7 Análisis de diversidad genética en *T. harzianum***

La diversidad genética entre cepas de *T. harzianum* mediante técnicas moleculares se ha determinado empleando diferentes marcadores y con diferentes fines. El uso de marcadores genéticos del tipo microsatélite se inicia con el desarrollo y generalización de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Los polimorfismos son cambios espontáneos en el ADN. Surgen como consecuencia de alteraciones en el ADN, ya sea al nivel de nucleótidos (sustitución de una base por otra), al nivel de segmentos de ADN (delección, adición, inversión y

transferencia de ADN de una posición a otra) o como consecuencia de la recombinación (Hoelzel y Dover, 1991).

En los últimos años, la utilización de microsatélites como marcador molecular en estudios de conservación de la diversidad ha aumentado considerablemente, debido a su elevada tasa de polimorfismo y posibilidad de poder trabajar con cantidades reducidas de ADN (Selkoe y Toonen, 2006). Los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo (Selkoe y Toonen, 2006).

Los microsatélites o secuencias repetitivas simples (SSR, Simple Sequence Repeats) 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). Para evaluar la diversidad genética en una población empleando regiones SSR, 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 codominantes, 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 (Selkoe y Toonen, 2006). El polimorfismo en los microsatélites se detecta en las diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. El mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Ellegren, 2004). Las ventajas que ofrecen los microsatélites se deben a su reproducibilidad, naturaleza multialélica, herencia codominante, abundancia relativa y buena cobertura genómica (Singh *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2012, Mahfooz *et al.*, 2012).

El genoma entero y los recursos EST están disponibles para varias especies de *Trichoderma* tales como *Trichoderma hamatum* (Carpenter *et al.*, 2005), *Trichoderma* sp. (Vizcaino *et al.*, 2007), *T. harzianum* (Scherf *et al.*, 2009), *T. atroviride* (Seidl *et al.*, 2009) y *T. asperellum* (Liu *et al.*, 2010).

Por lo tanto, estas bases de datos de secuencias proporcionan un método más rápido y fácil para identificar los loci de microsatélites. 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). Posteriormente se 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. Recientemente, Siddiquee *et al.* (2011) usaron microsatélites amplificados al azar (RAMS) para estudiar las variaciones genéticas dentro de aislados de *Trichoderma* de Malasia. La transferibilidad de los marcadores SSR entre las especies ha hecho posible el análisis comparativo del genoma para las especies *Trichoderma*, donde SSRs constituyen puntos de anclaje para regiones específicas del genoma de diferentes especies. Por lo tanto, es importante desarrollar marcadores informativos para explorar el genoma de las especies de *Trichoderma* para estudiar la genética de poblaciones, las huellas genéticas y el análisis filogenético que, a su vez, pueden proporcionar información para establecer la estrategia de conservación de estas especies antagonistas con alto potencial biotecnológico.

## **2.8 Descripción del género *Trichoderma* en México**

En México las especies descritas de *Trichoderma* spp. Vienen principalmente de áreas de cultivo, y las descripciones de especies a partir de cepas que provienen de áreas naturales es escasa. Por otra parte, en algunos estudios, particularmente aquellos con énfasis agronómico, las cepas estudiadas se describen únicamente a partir de características morfológicas micro y macroscópicas, siendo escasos los

estudios en los cuales se utilizan marcadores genético moleculares para la determinación taxonómica. Entre los trabajos en los cuales se hace una identificación apoyada en marcadores genéticos, se puede describir la descripción de cepas de *T. harzianum* en suelo de cultivo de ajo del estado de Guanajuato (Avila-Miranda *et al.*, 2006), *H. viridescens*/*T. viridescens* aislada de una planta de cacao en Tabasco (Cuervo-Parra *et al.*, 2014). También se ha descrito la presencia de *T. asperellum* en suelo de cultivo de chile y de huerta de mango en los estados de Chihuahua y Guerrero y de *T. longibrachiatum* en suelo de huerta de mango en Colima (Guigón-López *et al.*, 2010). Una de las descripciones más detalladas de diversidad de cepas de *Trichoderma* spp. en un agroecosistema de México es la realizada para plantaciones de cacao en el estado de Tabasco, en las que se registró la presencia de las especies *T. harzianum*/*H. lixii*, *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. reesei*/*H. jecorina*, *T. koningiopsis*/*H. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*/*H. sagamiensis*, *T. pleurotica*, *T. spirale*, *T. virens*/*H. virens* (Torres-De la Cruz *et al.*, 2015). Se ha identificado a las especies *T. reesei*, *T. viridescens*, *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* a partir de cepas aisladas de suelo de cultivos de agave en el estado de Jalisco (Sánchez y Robelleo, 2010). Otras especies descritas para agroecosistemas de México son *T. koningiopsis*, *T. neocrassum* y *T. crassum* a partir de cepas aisladas en suelo de plantío de plátano en el estado de Veracruz (Sánchez-López *et al.*, 2012; Zavala-González *et al.*, 2016). Existen otros trabajos en los que se describen cepas de *Trichoderma* spp. en México, sin embargo, no se describe la especie o bien la descripción taxonómica no es robusta. Así, la diversidad de especies de *Trichoderma* en México aún es incipiente, por lo que es necesario realizar la caracterización de más aislados, particularmente provenientes de ecosistemas naturales.

## **2.9 Antecedentes del estudio de *Trichoderma* spp. en Michoacán**

El presente trabajo representa una continuación de estudios previos desarrollados en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de

San Nicolás de Hidalgo. En el laboratorio se han descrito todas las especies del género *Trichoderma* reportadas para Michoacán, las cuales incluyen además de las del complejo *T. harzianum* aquí estudiado, a las especies *H. olivascens*/*T. olivascens*, *T. trixiae*, *T. viridialbum*, *T. tomentosum*, *T. tomentosum*, *H. atroviridis*/*T. atroviride*, *H. rufa*/*T. viride*, *H. koningii*/*T. koningii* y *T. gamsii* (Cázares-García et al. 2016). Dichas cepas provienen de diferentes ecosistemas de bosques de *Pinus* spp. y *Quercus* spp. de la entidad. Hasta donde se pudo documentar en este trabajo, estas son todas las especies de *Trichoderma* reportadas para el estado de Michoacán.

Los estudios de antagonismo inician con el trabajo de Morales-Gallardo (2016) en donde se evaluaron las características fisiológicas, bioquímicas, genéticas y antagonismo *in vitro* contra microorganismos fitopatógenos de 23 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en distintos ecosistemas del estado de Michoacán. Se realizaron ensayos de confrontación duales y pruebas de inhibición hacia estos hongos y oomicetes fitopatógenos, así como análisis cualitativo de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y se realizó la evaluación de la diversidad genética de cepas de *T. harzianum* mediante marcadores de Interespaciadores de Secuencias Repetidas Simples (ISSRs por sus siglas en inglés). Este trabajo generó información sobre la biología básica de especies/cepas del género, al mismo tiempo que proveyó de bases para la selección de las cepas CMU-8 de *H. atroviride*/*T. atroviride* y CMU-218 de *H. rufa*/*T. viride* para el desarrollo de productos de biocontrol.

Posteriormente, Marín-Esquivel (2017) analizó los aspectos fisiológicos básicos y la capacidad antagónica e inhibición *in vitro* de microorganismos fitopatógenos frente a cepas nativas del estado de Michoacán. En este trabajo se evaluaron por primera vez la acondición y la germinación de cepas nativas de Michoacán en diferentes condiciones de cultivo.

Las cepas de *T. harzianum* constituyen cerca del 50% de la colección del cepario silvestre en Michoacán. Se ha observado que cepas de *T. harzianum* presentan diferencias en su capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos y se ha documentado diversidad genética entre cepas de regiones geográficas adyacentes

(Stoco *et al.*, 2016). Esto mismo se observó en las cepas de *T. harzianum* procedentes de Michoacán (Morales-Gallardo, 2016), pero se desconoce si dichas cepas presentan características distintas en crecimiento, conidiación y germinación, dependiendo de las condiciones de cultivo. Esto es lo que se intenta evaluar en el presente trabajo.



### **3. HIPÓTESIS**

Existen diferencias fisiológicas y genéticas significativas entre cepas silvestres del complejo *Trichoderma harzianum* provenientes de ecosistemas dentro de una misma región geográfica.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Realizar una caracterización fisiológica y genética básica de cepas silvestres del complejo *Trichoderma harzianum*.

#### **4.2 Objetivos Particulares**

- I. Conocer el efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial y la conidiación de cepas silvestres del complejo de *Trichoderma harzianum*.
- II. Determinar la influencia del medio de cultivo en el crecimiento micelial y la conidiación de cepas silvestres de *Trichoderma harzianum*.
- III. Establecer la capacidad de conidiación de las cepas de interés en diferentes condiciones de cultivo.
- IV. Investigar la capacidad de germinación de cepas silvestres de *Trichoderma harzianum* en diferentes condiciones de cultivo.
- V. Identificar diferencias genéticas entre las cepas de interés, empleando un marcador codominante.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas de estudio

Se estudiaron 9 aislados silvestres de *Hypocrea lixii*/*Trichoderma harzianum* 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 estudio se obtuvieron de distintas localidades 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).

**TABLA 1.** Datos de las cepas silvestres de *T. harzianum* (Cázares-García et al. 2016).

Clave CMU	Especie	Localidad de colecta	Tipo de vegetación
CMU-1	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino
CMU-14	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Parque Nacional “José Ma. Morelos”, Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-18	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Parque Nacional “José Ma. Morelos”, Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-19	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Parque Nacional “José Ma. Morelos”, Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-23	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-25	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-34	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Parque Nacional “José Ma. Morelos”, Charo	Bosque Pino-Encino
CMU-44	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Presa Gachupina. Cd. Hidalgo	Bosque Pino-Encino
CMU-90	<i>H. lixii</i> / <i>T. harzianum</i>	Puerto Madroño (Atécuaro)	Bosque Pino-Encino

### 5.2 Medios de cultivo

#### 5.2.1 Agar Papa Dextrosa (PDA)

Para la preparación de este medio de cultivo se utilizó la marca comercial BD DIFCO (USA). Se pesaron 39 g de polvo y se suspendieron en 1 L de agua destilada. Se mezcló perfectamente y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras por pulgada cuadrada de presión durante 15 min.

### **5.2.2 Agar Extracto de Malta (AEM)**

Para la preparación de este medio de cultivo se utilizó la marca comercial BD DIFCO (USA). Se pesaron 33.6 g de medio y se suspendieron en 1 L de agua destilada. Se mezcló perfectamente y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras por pulgada cuadrada de presión durante 15 min.

### **5.3 Viabilidad celular y obtención de inóculos**

Debido a que las cepas de estudio de *Trichoderma harzianum* se encontraban conservadas en el CMU, fue necesario confirmar la viabilidad de éstas. Por lo cual se recuperaron las cepas de los tubos de conservación en agua y se inocularon en medio PDA. Los cultivos se incubaron a 28 °C y se evaluó el desarrollo del micelio. A partir de estos cultivos se realizó nuevamente una resiembra y se incubaron a 28°C hasta la fase logarítmica de crecimiento. Se tomaron inóculos con un sacabocados de 6 mm de diámetro del borde del micelio vegetativo de la colonia en crecimiento activo de cada cepa, se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL que contenían agua destilada estéril y se almacenaron a temperatura ambiente.

De los tubos de almacenamiento de las cepas recuperadas se realizaron los cultivos para la toma de inóculos. Los fragmentos cilíndricos con micelio se colocaron en el centro de placas de Petri con medio PDA y se incubaron a 28 °C hasta que el micelio cubrió 2/3 partes de la caja, momento en el cual se tomaron inóculos con un sacabocados de 6 mm de diámetro del borde del micelio, los cuales sirvieron como inóculo en todos los experimentos realizados. Se realizaron resiembras continuas y todos los inóculos fueron tomados de esta manera.

### **5.4 Cinéticas de crecimiento**

#### **5.4.1 Crecimiento de *T. harzianum* en diferentes temperaturas**

Para la determinación de la capacidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma harzianum* en diferentes medios de cultivo se utilizaron los medios PDA y AEM anteriormente descritos. Las cajas Petri con cada uno de los medios

se inocularon colocando en el centro un cilindro de 6 mm de diámetro obtenido del borde de una colonia en crecimiento de cada cepa y se incubaron a diferentes temperaturas: 16°C, 20°C, 32°C y 36°C en oscuridad. El diámetro colonial se midió cada 24 h hasta que el micelio cubrió por completo la placa; también se registró el tiempo de aparición de conidias en las distintas temperaturas de crecimiento. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

#### **5.4.2 Efectos del pH en el crecimiento de *T. harzianum***

Se determinó la influencia del pH del medio en el crecimiento de cepas de *Trichoderma harzianum* en medio PDA. El medio se preparó de la manera previamente descrita y se ajustó el pH a 4.0, 7.0 y 9.0 con HCl 0.1N (pH 4.0) o NaOH (pH 7.0 y 9.0) según el caso. El medio se esterilizó como se describió anteriormente. Las placas de cultivo se inocularon colocando en el centro un cilindro de 6 mm de diámetro obtenido del borde de una colonia en crecimiento de cada cepa y se incubaron a 28°C en oscuridad. El diámetro colonial se midió cada 24 h hasta que el micelio cubrió por completo la placa. También se registró el tiempo de aparición de conidias en las distintas condiciones de crecimiento. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

#### **5.5 Obtención de conidias**

Las conidias de las cepas de *T. harzianum* se obtuvieron de cultivos de conidiación constante incubados en Agar Papa Dextrosa (PDA) a una temperatura de 16°C. Las conidias se obtuvieron de las placas de cultivos adicionando 2 mL de agua destilada estéril y usando una espátula de Drigalski para raspar las conidias en suspensión. Así recuperadas las conidias se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se realizaron lavados agitando suavemente en el vortex durante 30 s, centrifugando por 10 min a 250 x g y retirando el agua de la superficie. El lavado se repitió varias veces hasta observar que el agua era transparente, indicando la ausencia de medio de cultivo, restos celulares y micelio. Se realizó un conteo de conidias en la suspensión utilizando una cámara de

Neubauer, para determinar el número de conidias por mL. La suspensión conidial se almacenó en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL a temperatura ambiente.

### **5.6 Ensayos de germinación a diferentes temperaturas**

Los ensayos de germinación se realizaron en la misma semana en la que se cosecharon las conidias. Se ajustó el cálculo para inocular 30 conidias por placa en 1 mL de agua. Se tomó una alícuota de la suspensión conidial, la cual se agitó 15 s en el vortex para resuspender el paquete conidial. Dicho volumen se empleó para inocular cajas de Petri con PDA que se distribuyó de manera homogénea en la caja con una espátula de Drigalski. Las placas se incubaron en experimentos independientes por triplicado a 16°C, 28°C y 36°C en obscuridad. Las cajas se analizaron cada 12 h para observar la aparición de colonias, indicando germinación.

### **5.7 Amplificación mediante PCR de marcadores tipo microsatélite**

Se utilizó ADN genómico de 9 cepas de la especie *Trichoderma harzianum* empleando 5 diferentes oligos (Tabla 2). Los ensayos de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 10 µL que contenía 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de cada uno de los dNTP's, 0.2 U de Taq DNA polimerasa, 10 pM de cada uno de los oligos (Invitrogen, USA) y 25 µg de ADN genómico en tubos de PCR de 25 µL. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), consistiendo de un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, posteriormente se realizaron 45 ciclos que comprendían una desnaturalización a 94 °C durante 20 s, una temperatura de alineamiento de 53 °C durante 20 s, y una extensión de 72 °C durante 20 s, llevándose a cabo una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los amplicones generados se examinaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con SYBER Green (Invitrogen, USA).

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

**Tabla 2. Iniciadores y condiciones para la amplificación mediante PCR de secuencias microsatélite de las cepas de *Trichoderma harzianum*.**

Oligos	Secuencia (5' → 3')	Motivos	Tm (°C)	No. de alelos esperados	Tamaño esperado del alelo (pb)
TaSSR 1	AAGCGGTCAGTTGAAAGTAACG AAGGGTTTTGCTTGCCAGATA	(ATTA) <sub>3</sub>	53	2	142
TaSSR 4	CTTGACCTGCTACAACAACACTGC TGCCATCTCTCTCTCTCTCTCA	(TGC) <sub>4</sub>	53	2	397
ThSSR 4	GTCGTCGGCCATCATTCC TTTCAAGGGCAGGACTCTCTCT	(AC) <sub>6</sub>	53	5	147
ThSSR 6	GCGAATGTCACCATCATCTTC TGAGAGAGCCGGAGTATAGGAG	(GAAGA) <sub>4</sub>	53	2	313
TvSSR 1	CTATGGTGCCTCTGGTCTTTTC GATGTTGGACTTGATACCACCC	(CAT) <sub>4</sub>	53	2	340

La secuencia de los primers es la reportada por Rai *et al.* (2016). La temperatura de alineamiento de todos los primers se optimizó en el presente trabajo para generar amplicones en las cepas de estudio.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Viabilidad de las cepas de estudio

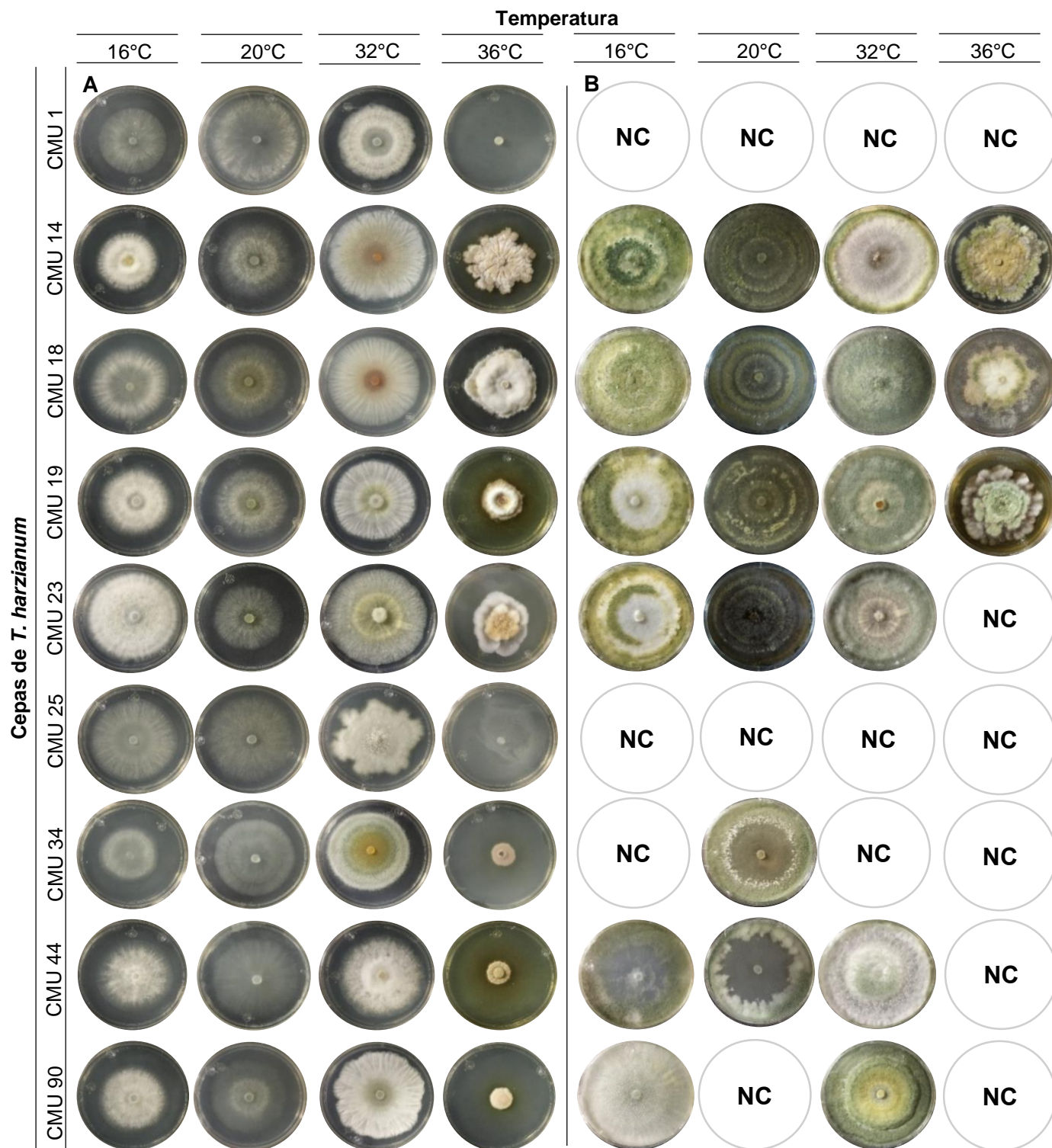
Las nueve cepas mostraron viabilidad, iniciando con un crecimiento rápido de micelio vegetativo sobre la superficie del medio de cultivo, desarrollando posteriormente micelio aéreo de coloración blanca con aspecto algodonoso-aterciopelado, con borde regular y formación de anillos hialinos dependiendo de la cepa. La aparición de conidias fue evidente a nivel macroscópico, presentando un color amarillo-verde que posteriormente cambio a un verde oscuro, dependiendo de la cepa.

De las colonias obtenidas en los cultivos de recuperación, se obtuvo micelio con el cual se hicieron re-siembras semanales para mantener micelio en crecimiento activo como fuente de inóculo para todos los experimentos.

### 6.2 Cinéticas de crecimiento

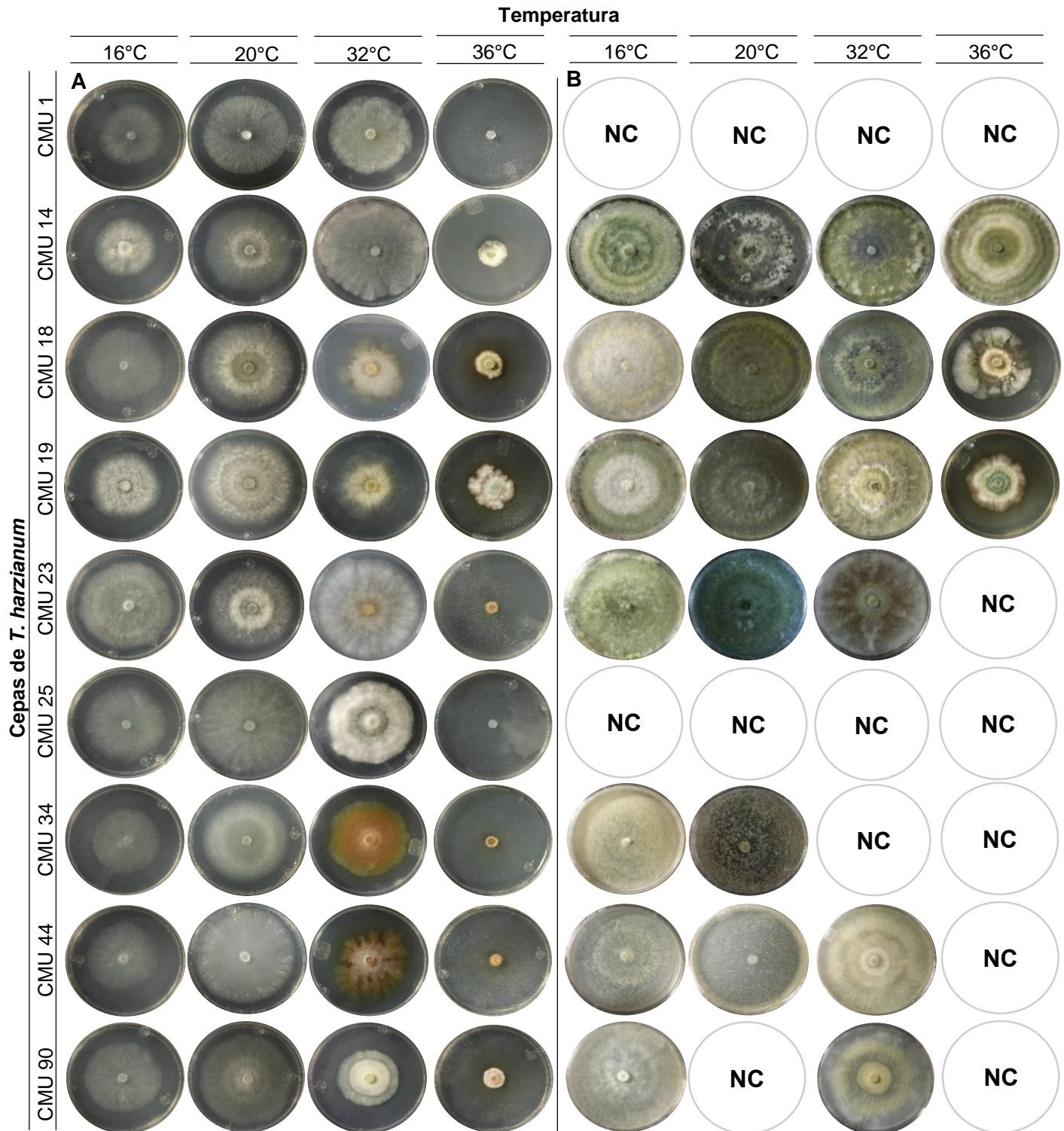
#### 6.2.1 Crecimiento de *T. harzianum* en diferentes temperaturas

Se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas de estudio a diferentes temperaturas en medio sólido PDA y AEM, con la finalidad de conocer la capacidad de desarrollo del micelio y el potencial de conidiación en diferentes condiciones como se observa en las figuras 1 y 2.



**Figura 1.** Variación en la morfología y conidiación de las cepas de *T. harzianum* en medio PDA a diferentes temperaturas de incubación. En el panel A se observan las colonias en crecimiento exponencial y en el panel B se observa la conidiación (NC, no se observó conidiación). Las placas Petri mostradas son representativas de ensayos por triplicado para cada temperatura.



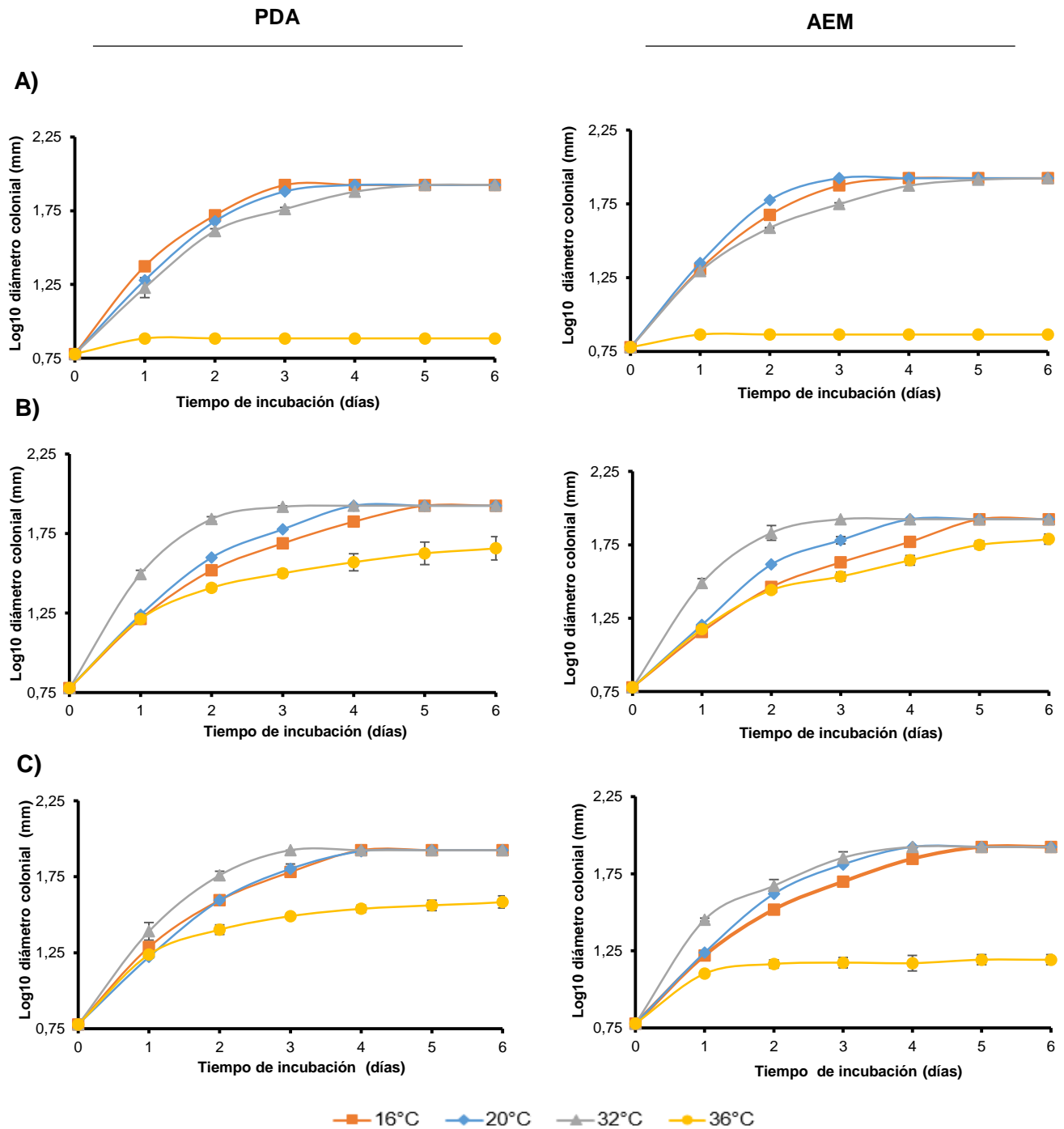


**Figura 2.** Variación en la morfología y conidiación de las cepas de *T. harzianum* en medio AEM a diferentes temperaturas de incubación. En el panel A se observan las colonias en crecimiento exponencial y en el panel B se observa la conidiación (NC, no se observó conidiación). Las placas Petri mostradas son representativas de ensayos por triplicado para cada temperatura.

En medio PDA la cepa CMU-1 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 16°C, llenando la caja de cultivo al tercer día de incubación (Fig. 3A). A 20°C y 32°C se presentó un retraso significativo en el crecimiento, llenando la caja de cultivo hasta el cuarto y quinto día de incubación, respectivamente (Fig.3A). Para esta cepa, la temperatura de 36°C fue la que más afectó el crecimiento del micelio, el cual se detuvo sin mostrar cambios hasta el décimo día en el que se tomó la última medición (Fig. 3A). Esta cepa no mostró producción de conidias a ninguna temperatura. En medio AEM la cepa CMU-1 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 20 °C llenando la caja de cultivo al tercer día de incubación (Fig 3A). A la temperatura de 16 °C se presentó un retraso significativo en el crecimiento, llenando la caja de cultivo al cuarto día de incubación (Fig. 3A). A la temperatura de 32 °C el retraso del crecimiento micelial es más evidente, llenando la caja a los seis días (Fig. 3A). La temperatura de 36 °C fue la que más afectó el crecimiento del micelio, ya que no hubo desarrollo notable de este, el cual se detiene sin mostrar cambios hasta el décimo día en el que se tomó la última medición (Fig. 3A). Esta cepa no presentó producción de conidias a ninguna temperatura de incubación.

En medio PDA la cepa CMU-14 mostró un crecimiento óptimo a las temperaturas de 20 °C y 32 °C, llenando la caja de cultivo al cuarto día de incubación (Fig. 3B), y presentando producción de conidias al cuarto y quinto día respectivamente, las cuales iniciaron con una tonalidad amarilla y posteriormente tomaron una tonalidad verde (Fig. 1). A los 16 °C se observó un ligero retraso con respecto a las temperaturas anteriores, llenando la caja al quinto día (Fig. 3B), pero desde el tercer día la cepa mostró producción de conidias con una tonalidad amarilla que posteriormente viraron a una tonalidad verde (Fig. 1). A la temperatura de 36 °C, esta cepa tuvo un crecimiento lento, llenando la caja después de los diez días de incubación (Fig. 3B). Al séptimo día mostró producción de conidias amarillas que posteriormente tomaron una tonalidad verde (Fig. 1). En medio AEM la cepa CMU-14 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 32 °C, llenando la caja al tercer día de incubación (Fig.3B), mismo día en el que inició la producción de

conidias con tonalidad amarilla que posteriormente cambió a una tonalidad verde (Fig 2).



**Figura 3.** Cinéticas de crecimiento de las cepas de *T. harzianum* CMU-1 (Panel A), CMU-14 (Panel B) y CMU-19 (panel C) en diferentes temperaturas. Las cepas se inocularon en medio PDA y AEM, incubándose a las temperaturas indicadas. El diámetro colonial se midió cada 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

A las temperaturas de 16 °C y 20 °C de incubación la cepa mostró un retraso significativo, llenando la caja al quinto y cuarto día, respectivamente (Fig 3B). La producción de conidias inició al séptimo y quinto día de incubación a 16 °C y 20 °C, respectivamente, con una tonalidad amarilla las cuales se fueron tornando verde al paso de los días (Fig. 2). A los 36 °C el retraso de micelio es más evidente, llenando la caja al octavo día de incubación (Fig. 3B). La producción de conidias se inició al quinto día de incubación, las cuales se produjeron con una tonalidad amarilla que posteriormente viró a una tonalidad verde (Fig. 2).

En medio PDA la cepa CMU-19 mostró un crecimiento óptimo a 32 °C llenando la caja de cultivo al tercer día de incubación (Fig. 3C), empezando la producción de conidias al quinto día, con una tonalidad amarilla que posteriormente tomó una tonalidad verde (Fig. 1). A la temperatura de 16 °C y 20 °C se presentó un retraso significativo en el crecimiento, llenando la caja de cultivo al cuarto y quinto día de incubación, respectivamente (Fig. 3C). La producción de conidias se inició al séptimo y quinto y día de incubación a 16 °C y 20 °C respectivamente, las cuales se produjeron con una tonalidad amarilla que posteriormente viró a una tonalidad verde (Fig. 1). La temperatura de 36 °C, fue la que más afectó el crecimiento de micelio, retrasando su crecimiento, sin llegar a llenar la caja hasta el décimo día en el que se tomó la última medición (Fig. 3C). La producción de conidias se inició al séptimo día de incubación, las cuales se produjeron con una tonalidad amarilla que posteriormente viró a una tonalidad verde (Fig. 1). En medio AEM la cepa CMU-19 mostró un crecimiento óptimo a las temperaturas de 20 °C y 32 °C, en las cuales el micelio llenó la caja de cultivo al cuarto día de incubación (Fig. 3C), iniciando la conidiación al quinto y tercer día de incubación, respectivamente. Las conidias inicialmente se produjeron con una tonalidad amarilla que posteriormente tomaron una tonalidad verde (Fig. 2). A la temperatura de 16 °C se presentó un retraso significativo en el crecimiento del micelio, llenando la caja de cultivo al quinto día de incubación (Fig. 3C). La producción de conidias a esta temperatura se presentó al sexto día, con una tonalidad verde (Fig. 2). A la temperatura de 36 °C se ve afectado el crecimiento del micelio, presentando un desarrollo lento respecto a las temperaturas anteriores y no llenó la caja hasta el décimo día en

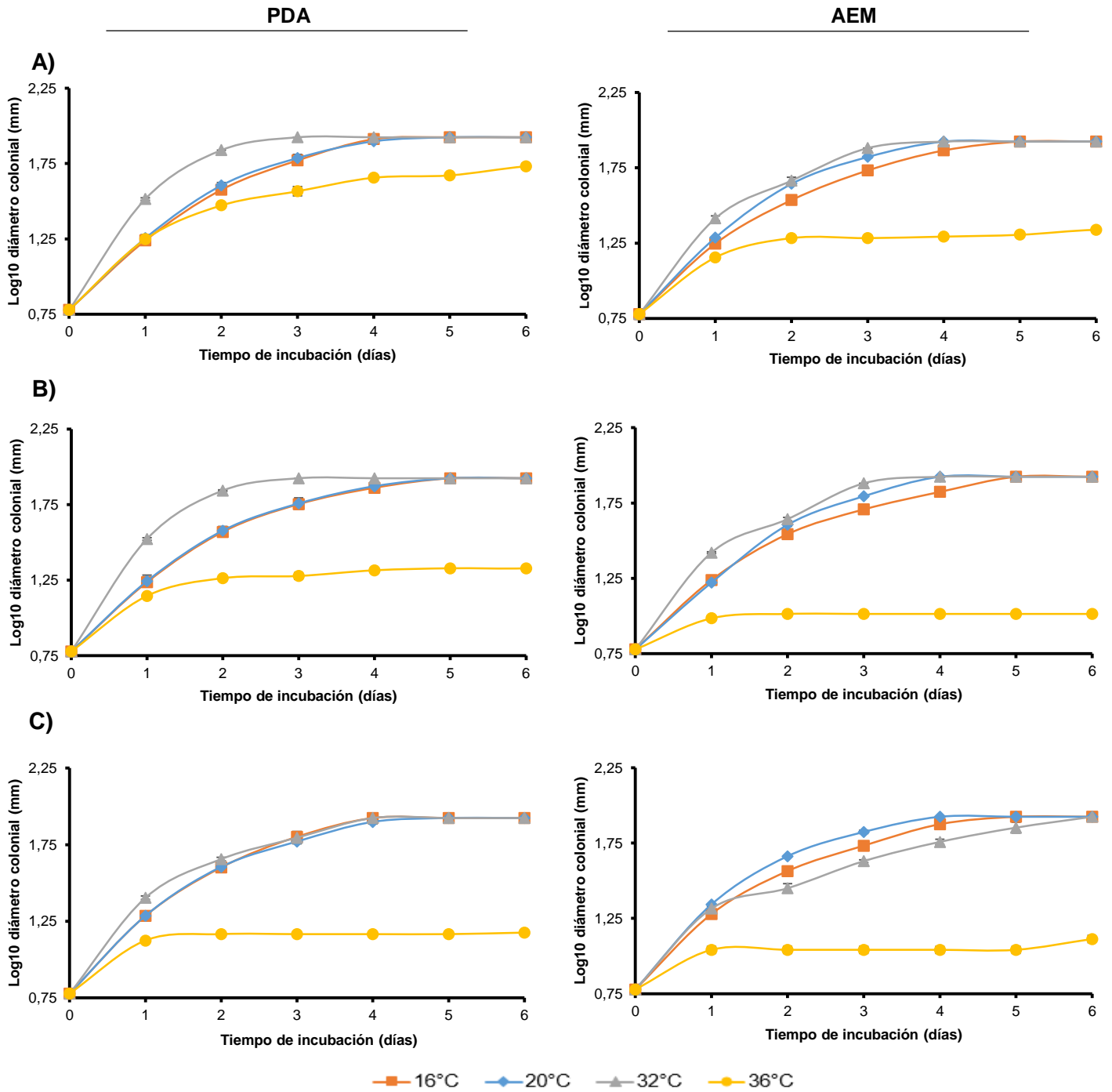
que se tomó la última medición (Fig. 3C). La producción de conidias se inició al noveno día de incubación, las cuales se produjeron con una tonalidad amarilla que posteriormente viró a una tonalidad verde (Fig. 2).

En medio PDA la cepa CMU-18 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 32 °C, llenando la caja de cultivo al tercer día de incubación (Fig. 4A) e iniciando al mismo tiempo la producción de conidias con una tonalidad amarilla que posteriormente tomaron una tonalidad verde (Fig. 1). A las temperaturas de 16 °C y 20 °C se presentó un retraso significativo en el crecimiento del micelio, llenando la caja al quinto día (Fig. 4A) e iniciando la producción de conidias al quinto y séptimo de incubación respectivamente, con tonalidad amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 1). La temperatura de 36 °C fue la que más afectó el desarrollo del micelio, mostrando un crecimiento lento y llenando la caja hasta el décimo día (Fig. 4A) e iniciando la producción de conidias al sexto día de incubación, con tonalidad amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 1). En medio AEM la cepa CMU-18 mostró un crecimiento óptimo a las temperaturas de 20 °C y 32 °C, llenando la caja Petri al cuarto día de incubación (Fig. 4A). Esta cepa mostró la producción de conidias al quinto y tercer día de incubación a 20 °C y 32 °C, respectivamente, iniciando con una tonalidad amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 2). A la temperatura de 16 °C se muestra un retraso significativo en el desarrollo del micelio, llenando la caja al quinto día de incubación (Fig. 4A) e iniciando la producción de conidias hasta el octavo día con una tonalidad amarilla que posteriormente viró a verde (Fig. 2). La temperatura a la que se ve afectado el crecimiento de micelio es a 36 °C de incubación, mostrando un crecimiento lento, aunque en el último día de medición aún seguía incrementando el diámetro de la colonia (Fig. 4A) e iniciando la producción de conidias hasta el sexto día, con una tonalidad amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 2).

En medio PDA la cepa CMU-23 mostró un crecimiento optimó a la temperatura de 32 °C, llenando la caja Petri al tercer día de incubación (Fig. 4B) e iniciando la producción de conidias con una tonalidad verde al cuarto día (Fig. 1). En las temperaturas de 16 °C y 20 °C el desarrollo del micelio muestra un retraso

significativo, llenando la caja al quinto día de incubación (Fig. 4B) e iniciando la producción de conidias al décimo y quinto día, respectivamente, con una tonalidad amarilla que posteriormente se torna verde (Fig. 1). A la temperatura de 36 °C se observa un crecimiento lento del micelio en comparación con las otras temperaturas (Figura 4B), sin producción de conidias. En medio AEM la cepa CMU-23 mostró un crecimiento óptimo a las temperaturas de 20 °C y 32 °C, llenando la caja al cuarto día de incubación (Fig. 4B), conidiando al quinto y tercer día de incubación, respectivamente, con una tonalidad verde (Fig. 2). A la temperatura de 16 °C se observa un retraso significativo del crecimiento, llenando la caja al quinto día de incubación (Fig. 4B) e iniciando la producción de conidias hasta el séptimo día de incubación, con una tonalidad amarilla que se tornó verde (Fig. 2). La temperatura de 36 °C fue la que más afectó el crecimiento del micelio, ya que no hubo desarrollo notable del micelio deteniéndose su expansión sin mostrar cambios significativos hasta el décimo día en el que se tomó la última medición (Fig. 4B). A esta temperatura la cepa no mostró producción de conidias. En medio PDA la cepa CMU-90 mostró un crecimiento óptimo a las temperaturas de 16 °C y 32 °C, llenando la caja Petri al cuarto día de incubación con producción de conidias al noveno y tercer día de incubación, respectivamente (Fig. 4C), con una tonalidad amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 1). A la temperatura de 20 °C se observa un retraso significativo, llenando la caja al quinto día de incubación (Fig. 4C), sin presentar producción de conidias. La temperatura de incubación de 36 °C fue la que más afectó el desarrollo del micelio, mostrando un crecimiento lento en comparación con las otras temperaturas (Fig. 4C) y sin producción de conidias. En medio AEM la cepa CMU-90 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 20 °C, llenando la caja Petri al cuarto día de incubación (Fig. 4C), pero sin producción de conidias. A las temperaturas de 16 °C y 32 °C se observa un retraso significativo del crecimiento micelial, llenando la caja Petri al quinto y sexto día de incubación, respectivamente (Fig. 4C). La producción de conidias de inició al noveno y cuarto día de incubación a 16 °C y 32 °C, respectivamente, con una tonalidad amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 2). La temperatura de incubación de 36 °C afecta significativamente el

desarrollo del micelio, mostrando un crecimiento lento (Fig. 4C) y sin producción de conidias.



**Figura 4.** Cinéticas de crecimiento de las cepas de *T. harzianum* CMU-18 (Panel A), CMU-23 (Panel B) y CMU-90 (panel C) en diferentes temperaturas. Las cepas se inocularon en medio PDA y AEM, incubándose a las temperaturas indicadas. El diámetro colonial se midió cada 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

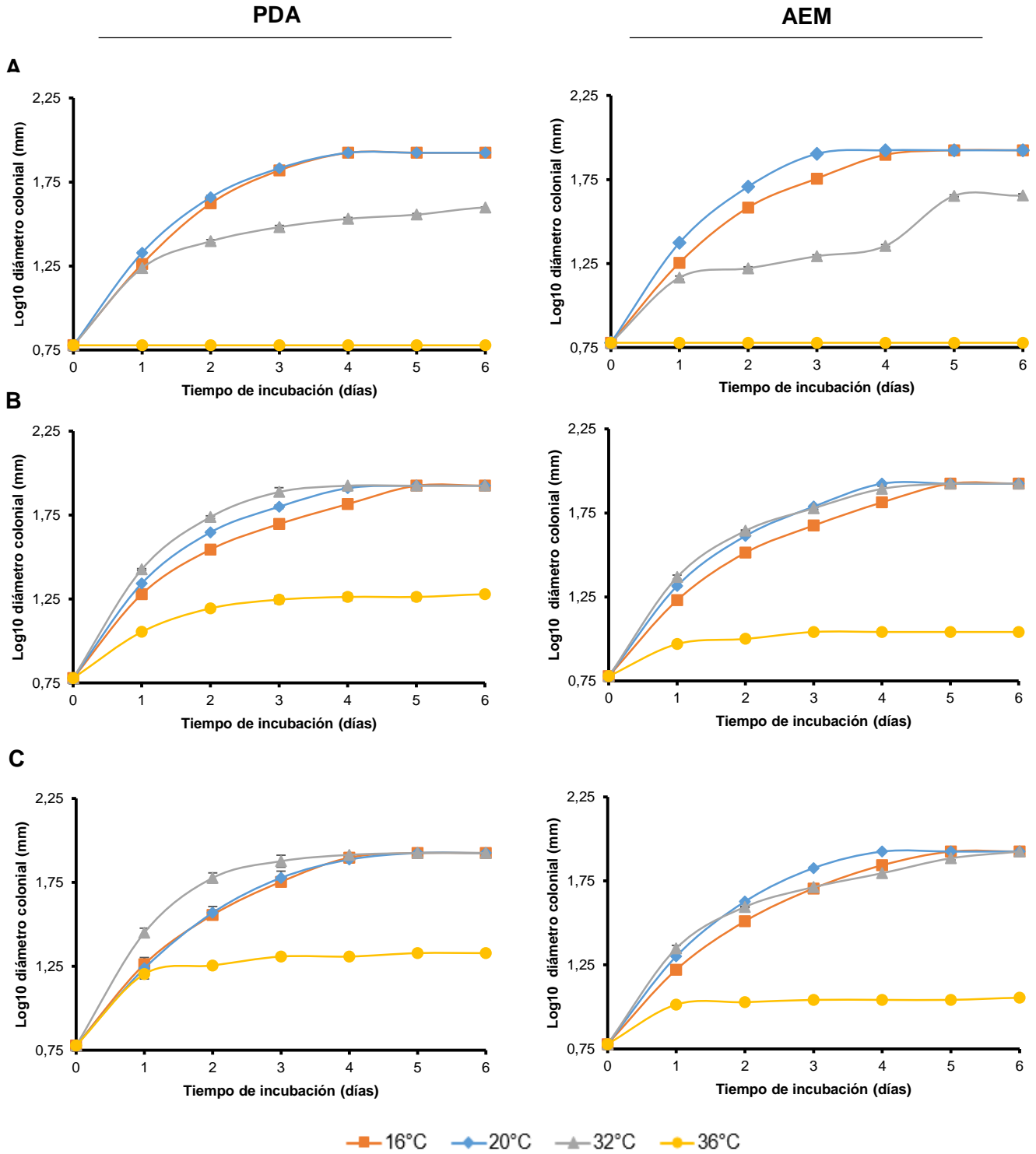
La cepa CMU-25 mostró en medio PDA un crecimiento óptimo a las temperaturas de 16 °C y 20 °C, llenando el micelio la caja Petri al cuarto día de incubación (Fig. 5A). A la temperatura de 32 °C se observó un crecimiento lento del micelio, el cual no llenó la caja hasta el décimo día que se realizó la última medición (Fig. 5A). A la temperatura de 36 °C esta cepa no mostró crecimiento (Fig. 5A). En medio AEM la cepa CMU-25 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 20 °C, llenando la caja de Petri al cuarto día de incubación (Fig. 5A). A la temperatura de 16 °C se observó un retraso significativo, al llenar la caja de Petri al quinto día de incubación (Fig. 5A). A la temperatura de 32 °C se ve afectado el crecimiento del micelio, el cual fue lento en comparación con las otras temperaturas mientras que a 36°C no hubo crecimiento del micelio (Fig. 5A). Esta cepa no mostró producción de conidias a ninguna temperatura de incubación en ninguno de los medios de cultivo.

En medio PDA la cepa CMU-34 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 32 °C, llenando la caja Petri al cuarto días de incubación (Fig. 5B), sin mostrar producción de conidias. A las temperaturas de 16 °C y 20 °C se observa un retraso, llenando la caja Petri al quinto día de incubación (Fig. 5B) y mientras que a la primera temperatura no conidió, en la segunda inicio la producción de conidias al quinto día de incubación, con una tonalidad amarilla que viró a verde (Fig. 1). La temperatura de 36 °C afectó significativamente el desarrollo del micelio, sin llegar a llenar la caja ni conidiar hasta el décimo día que se tomó la última medición (Fig. 5B). En medio AEM la cepa CMU-34 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 20 °C, llenando la caja Petri al cuarto día de incubación (Fig. 5B) e iniciando la producción de conidias con una tonalidad verde al quinto día de incubación (Fig. 2). A las temperaturas de 16 °C y 32 °C se observó un retraso en el crecimiento del micelio, llenando la caja Petri al quinto día de incubación (Fig. 5B); mientras que a 16 °C la cepa inició la producción de conidias al noveno día de incubación con una tonalidad amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 2), a 32°C no presentó conidiación. A 36°C el micelio detuvo su crecimiento al tercer



día de incubación, sin cambios hasta el décimo día que se tomó la última medición (Fig. 5B). A esta temperatura esta cepa no mostró producción de conidias.

En medio PDA la cepa CMU-44 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 32 °C, llenando la caja Petri al cuarto día de incubación (Fig. 5C) e iniciando la producción de conidias al séptimo día de incubación, con una tonalidad verde (Fig. 1). A las temperaturas de 16 °C y 20 °C se presentó un retraso de un día en el crecimiento, llenando la caja Petri al quinto día de incubación (Fig. 5C) e iniciando la producción de conidias con tonalidad verde al noveno y quinto día de incubación, respectivamente (Fig. 1). A la temperatura de 36 °C se afectó el crecimiento del micelio, mostrando un desarrollo lento con respecto a las temperaturas anteriores (Fig. 5C) y sin presentar producción de conidias. En medio AEM la cepa CMU-44 mostró un crecimiento óptimo a la temperatura de 20 °C, llenando la caja Petri al cuarto día de incubación (Fig. 5C) e iniciando la producción de conidias de tonalidad verde al quinto día (Fig. 2). A las temperaturas de 16 °C y 32 °C se observó un retraso del crecimiento micelial, llenando la caja al quinto y sexto día de incubación respectivamente (Fig. 5C), y en ambas temperaturas la aparición de conidias con una tonalidad amarilla que posteriormente viró a verde se presentó al séptimo día (Fig. 2). La temperatura de 36 °C afectó significativamente el crecimiento del micelio deteniéndose al tercer día y permaneciendo sin cambios hasta el décimo día que se tomó la última medición (Fig. 5C), sin presentar producción de conidias.



**Figura 5.** Cinéticas de crecimiento de las cepas de *T. harzianum* CMU-25 (Panel A), CMU-34 (Panel B) y CMU-44 (Panel C) en diferentes temperaturas. Las cepas se inocularon en medio PDA y AEM, incubándose a las temperaturas indicadas. El diámetro colonial se midió cada 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Se evaluó cualitativamente la capacidad de conidiación de las cepas de estudio de *T. harzianum* en los dos medios de cultivo y las diferentes temperaturas de incubación analizadas. La Tabla 3 muestra una comparación de la cantidad de conidias observadas macroscópicamente en las cepas de estudio a las distintas temperaturas de incubación en los diferentes medios de cultivo. En general, en medio PDA a temperaturas de 16 °C, 20 °C y 32 °C se observa que la mayoría de cepas de estudio conidieron eficientemente, disminuyendo dicha capacidad a la temperatura de 36 °C. En medio AEM se observó que la mayoría de las cepas conidieron a las temperaturas de 16 °C, 20 °C y 32 °C, disminuyendo significativamente la producción de conidias a la temperatura de 36 °C.

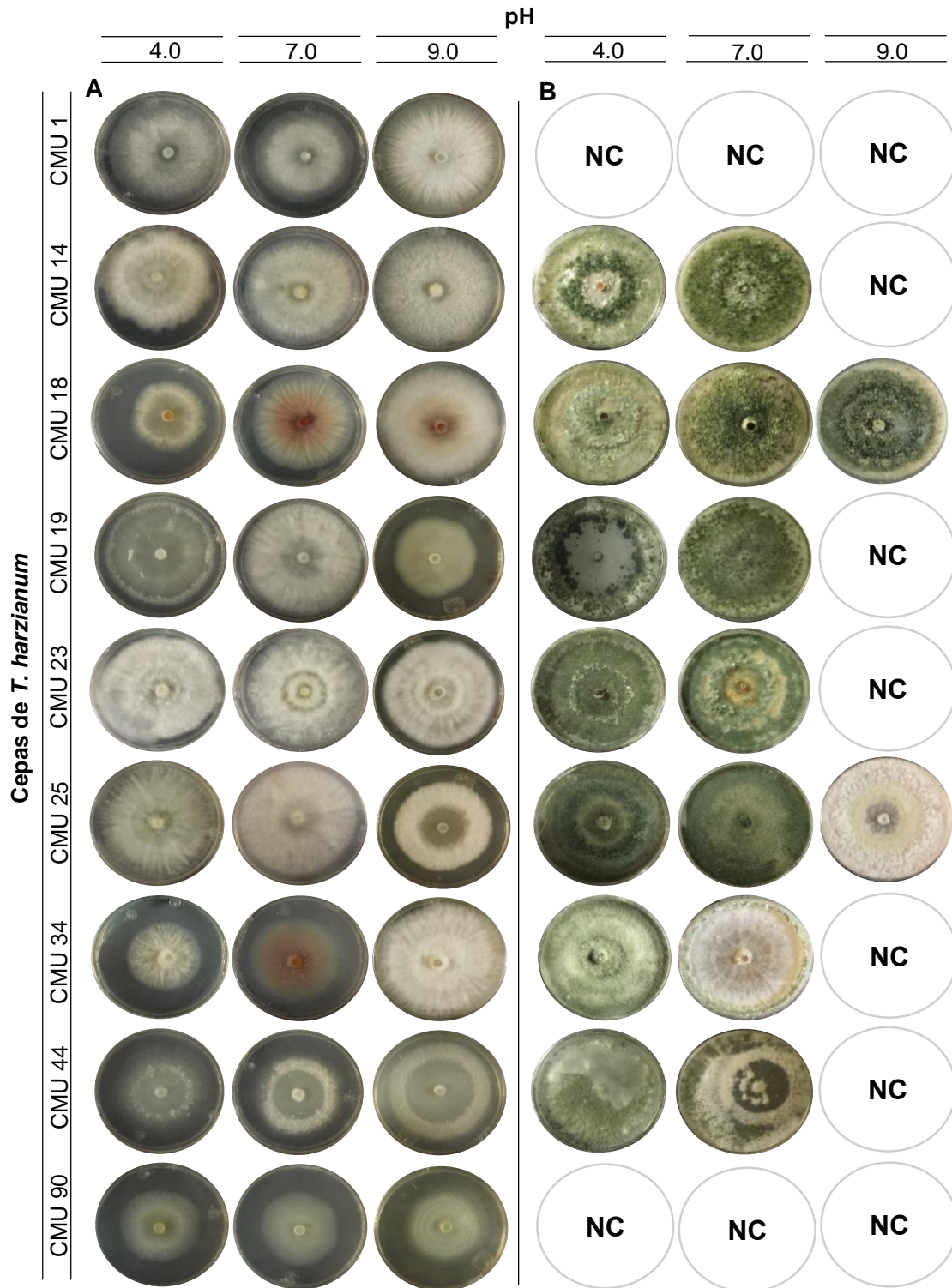
**Tabla 3.** Comparación cualitativa de conidiación de cepas de *T. harzianum* en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación.

Medio de cultivo	Temperatura	Cepas de <i>T. harzianum</i>								
		CMU-1	CMU-14	CMU-18	CMU-19	CMU-23	CMU-25	CMU-34	CMU-44	CMU-90
PDA	16°C	-	+++	+++	++	++	-	-	++	+
	20°C	-	++	++	++	++	-	+	+	-
	32°C	-	+	++	+++	+	-	-	++	+++
	36°C	-	+	+	+	-	-	-	-	-
AEM	16°C	-	++	+	++	++	-	++	+	+
	20°C	-	+	++	+	++	-	++	++	-
	32°C	-	+++	++	++	+	-	-	++	++
	36°C	-	++	+	+	-	-	-	-	-

\*Clave: - no hubo conidiación, + conidiación escasa, ++ conidiación moderada, +++ conidiación abundante.

### 6.2.2 Crecimiento de *T. harzianum* en diferentes valores de pH

Las modificaciones del pH afectaron el crecimiento y la producción de conidias de las cepas de estudio, presentando evidentes diferencias en la morfología colonial y el potencial de conidiación (Fig. 6).



**Figura 6.** Diferencias morfológicas y potencial de condición a diferente pH de las cepas de *T. harzianum*. Se incubaron a 28°C en medio PDA. En el Panel A se observa el crecimiento exponencial y en el Panel B se observa la condición (NC, no se observó conidiación). Las placas Petri mostradas son representativas de ensayos por triplicados para cada pH.

La cepa CMU-1 mostró un crecimiento óptimo a pH 4.0, 7.0 y 9.0 llenando la caja Petri a los tres días de incubación (Fig. 7A), sin conidiar a ningún pH.

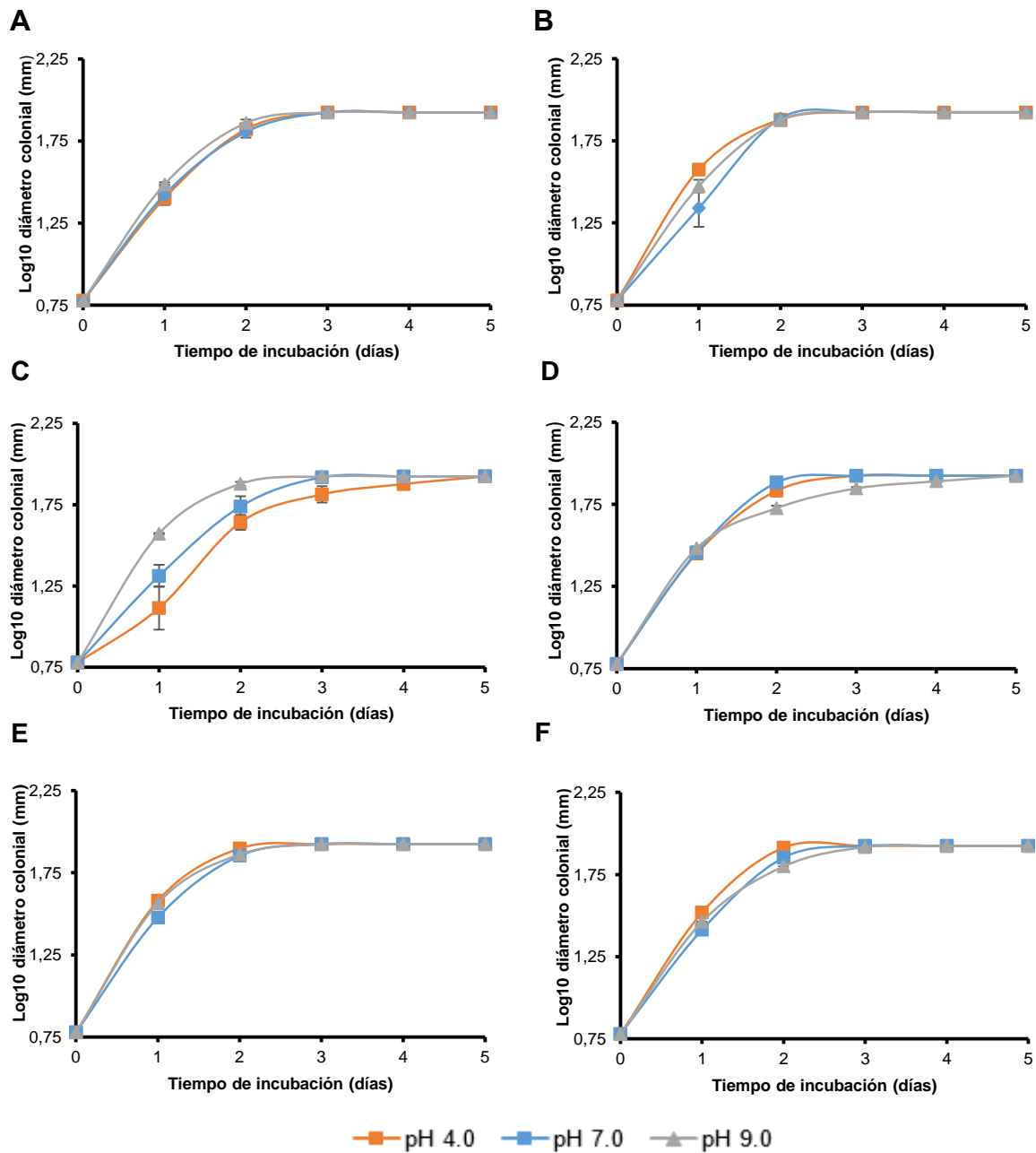
La cepa CMU-14 mostró un crecimiento óptimo a pH 4.0, 7.0 y 9.0 llenando la caja Petri a los tres días de incubación (Fig. 7B). La producción de conidias fue diferente para cada pH, se observó macroscópicamente mayor cantidad de conidias a pH 7.0 que a pH de 4.0 (Tabla 4). La aparición de conidias se inició al sexto día a pH 4.0 y 7.0, con una coloración amarillo-verde que posteriormente cambio a una coloración verde oscuro (Fig. 6); a pH de 9.0 no se observó conidiación.

La cepa CMU-18 mostró un crecimiento óptimo a pH 9.0, llenando la caja Petri al tercer día de incubación (Fig. 7C). A los valores de pH 7.0 y 4.0 se presentó un retraso significativo en el desarrollo micelial, llenando la caja Petri al cuarto y quinto día de incubación, respectivamente, como se observa en la figura 7C. A pH de 4.0 y 9.0 esta cepa empezó a conidiar al quinto día, mientras que a pH 7.0 conidió hasta el séptimo día. La aparición de conidias se presentó al inició con una coloración blanca a pH 4.0, mientras que a valores de pH 7.0 y 9.0 se presentó con una coloración verde claro, que posteriormente tomó una coloración verde (Fig. 6). Macroscópicamente se observó mayor cantidad de conidias a pH 7.0 y menor a pH 4.0 (Tabla 4).

La cepa CMU-19 mostró un crecimiento óptimo a pH 4.0 y 7.0, llenando la caja Petri a los tres días de incubación. A pH 9.0 hubo un crecimiento lento, llenando la caja Petri a los cinco días (Fig. 8A). La producción de conidias se inició al sexto día a pH de 4.0 y 7.0 con una coloración amarillo-verde que posteriormente cambió a un verde oscuro como se observa en la figura 6. Macroscópicamente se observó mayor cantidad de conidias a pH 7.0 y menor a pH 4.0 (Tabla 4), y no hubo producción de conidias de esta cepa a pH de 9.0.

La cepa CMU-23 mostró un crecimiento óptimo a pH 4.0, 7.0 y 9.0, llenando la caja Petri al tercer día de incubación como se muestra en la figura 7E. La producción de conidias inició al cuarto día de incubación, con una coloración amarillo-verde claro que posteriormente se tornó de color verde oscuro (Fig. 6). Se observó macroscópicamente mayor cantidad de conidias a pH de 4.0 que a pH de

7.0 (Tabla 4). Esta cepa no mostró producción de conidias a pH de 9.0, dentro de los 10 días que se monitorearon.



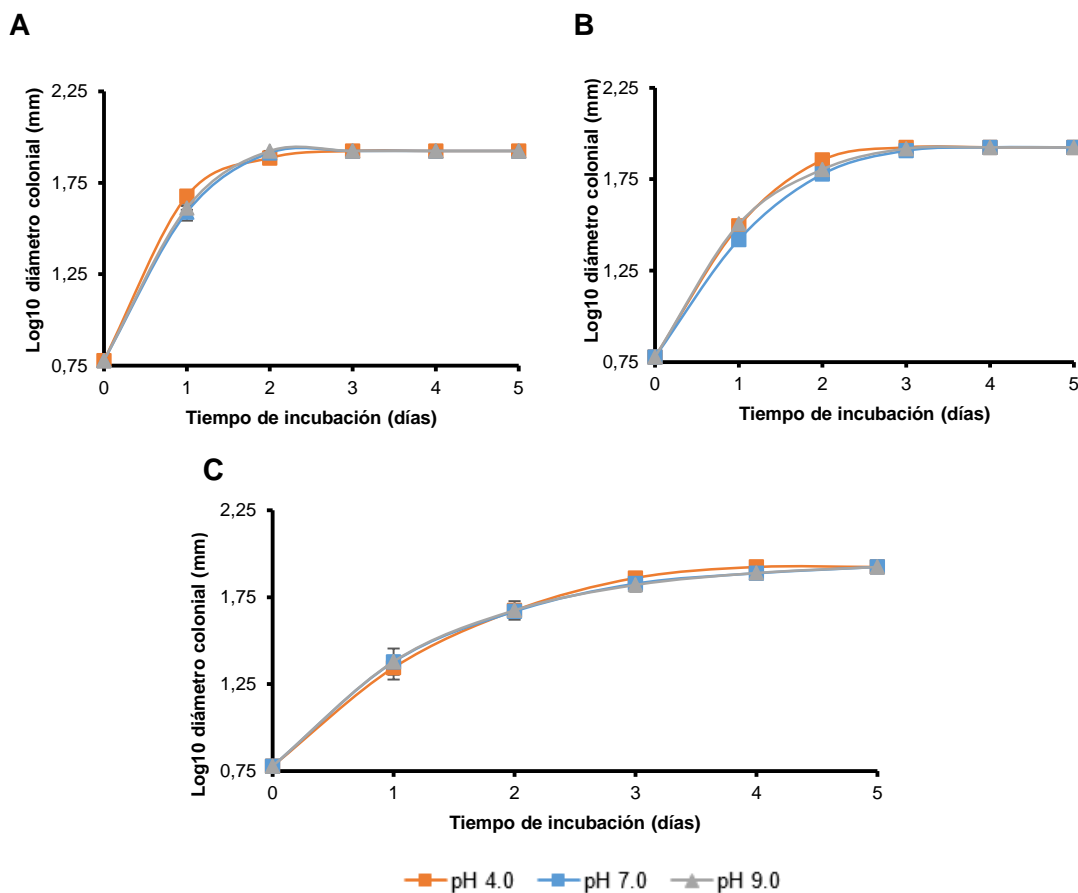
**Figura 7.** Cinéticas de crecimiento de las cepas de *T. harzianum* CMU-1 (Panel A), CMU-14 (Panel B), CMU-18 (Panel C), CMU-19 (Panel D), CMU-23 (Panel E) y CMU-25 (Panel F) en diferentes valores de pH. Las cepas se inocularon en medio PDA al pH especificado, incubándose a la temperatura de 28°C. El diámetro colonial se midió cada 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La cepa CMU-25 mostró un crecimiento óptimo a pH 4.0, 7.0 y 9.0 llenando la caja Petri al tercer día de incubación (Fig. 7F). Esta cepa empezó a conidiar con una coloración verde al segundo día de incubación a pH 4.0 y 7.0, y a pH 9.0 a los ocho días (Fig. 6). La cantidad de conidias observadas macroscópicamente fue mayor a pH 4.0 y 7.0 y menor a pH 9.0 como se observa en la Tabla 4.

La cepa CMU-34 mostró un crecimiento óptimo a pH 9.0, llenando la caja Petri al segundo día de incubación. A pH 4.0 y 7.0 se observó un retraso significativo llenando la caja al tercer día de incubación (Fig. 8A). Esta cepa empezó a conidiar al cuarto día a pH 4.0 con una coloración verde (Fig. 6). A pH 7.0 empezó a conidiar al sexto día de incubación (Fig. 6) y a pH 9.0 no hubo conidiación. La cantidad de conidias observadas macroscópicamente fue mayor a pH 4.0 y menor a pH 7.0 como muestra en la Tabla 4.

La cepa CMU-44 mostró un crecimiento óptimo a pH 4.0, 7.0 y 9.0 llenando la caja Petri a los tres días de incubación (Fig. 8B). Esta cepa empezó a conidiar al octavo día a pH 4.0 con una coloración verde (Fig. 6). A pH 7.0 empezó a conidiar al séptimo día con una coloración amarilla que posteriormente se tornó verde (Fig. 6) y a pH 9.0 no presentó conidiación. Macroscópicamente a pH 4.0 hubo mayor cantidad de conidias que a pH 7.0 (Tabla 4).

La cepa CMU-90 mostró un crecimiento óptimo a pH 4.0 llenando la caja al cuarto día de incubación. A pH 7.0 y 9.0 se observa un retraso significativo llenando la caja a los cinco días de incubación (Fig. 8C). Esta cepa no presentó conidiación a ningún pH.



**Figura 8.** Cinéticas de crecimiento de las cepas de *T. harzianum* CMU-34 (Panel A), CMU-44 (Panel B) y CMU-90 (Panel C) en diferentes valores de pH. Las cepas se inocularon en medio PDA al pH especificado, incubándose a la temperatura de 28°C. El diámetro colonial se midió cada 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

**Tabla 4.** Comparación cualitativa de conidiación de cepas de *T. harzianum* a diferente pH.

pH	Cepas de <i>T. harzianum</i>								
	CMU-1	CMU-14	CMU-18	CMU-19	CMU-23	CMU-25	CMU-34	CMU-44	CMU-90
4.0	-	++	+	+	+++	+++	+++	++	-
7.0	-	+++	+++	+++	++	+++	+	+	+
9.0	-	-	++	-	-	+	-	-	-

\*Clave: - no hubo conidiación, + conidiación escasa, ++ conidiación moderada, +++ conidiación abundante.



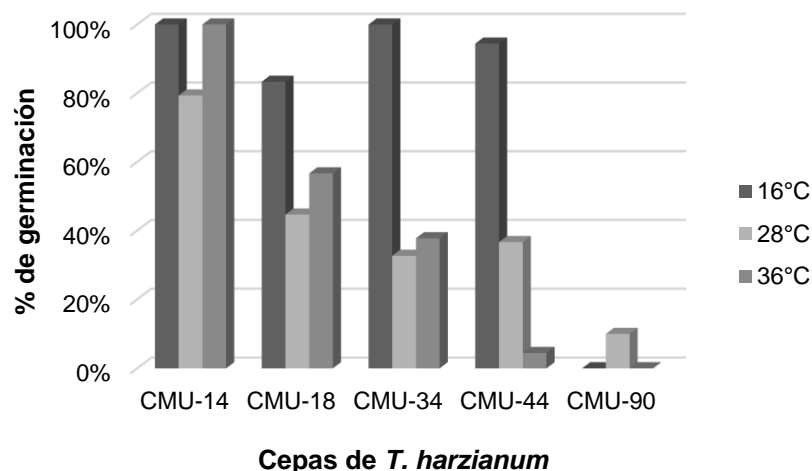
### 6.3 Evaluación de la capacidad de germinación de las cepas de *T. harzianum*.

De las nueve cepas que mostraron capacidad de conidiación sin daño mecánico, las cuales fueron CMU-14, CMU-18, CMU-34, CMU-44 y CMU-90, se realizaron determinaciones cuantitativas para analizar su potencial para germinar *in vitro* a distintas temperaturas. En general, la cepa CMU-90 presentó una mayor producción de conidias por mL que las demás cepas, siendo dicha diferencia de un orden de magnitud, como se observa en la Tabla 5.

**Tabla 5. Producción de conidias en las cepas de estudio.** Se realizó una determinación cuantitativa de las conidias por mL de las cepas de estudio.

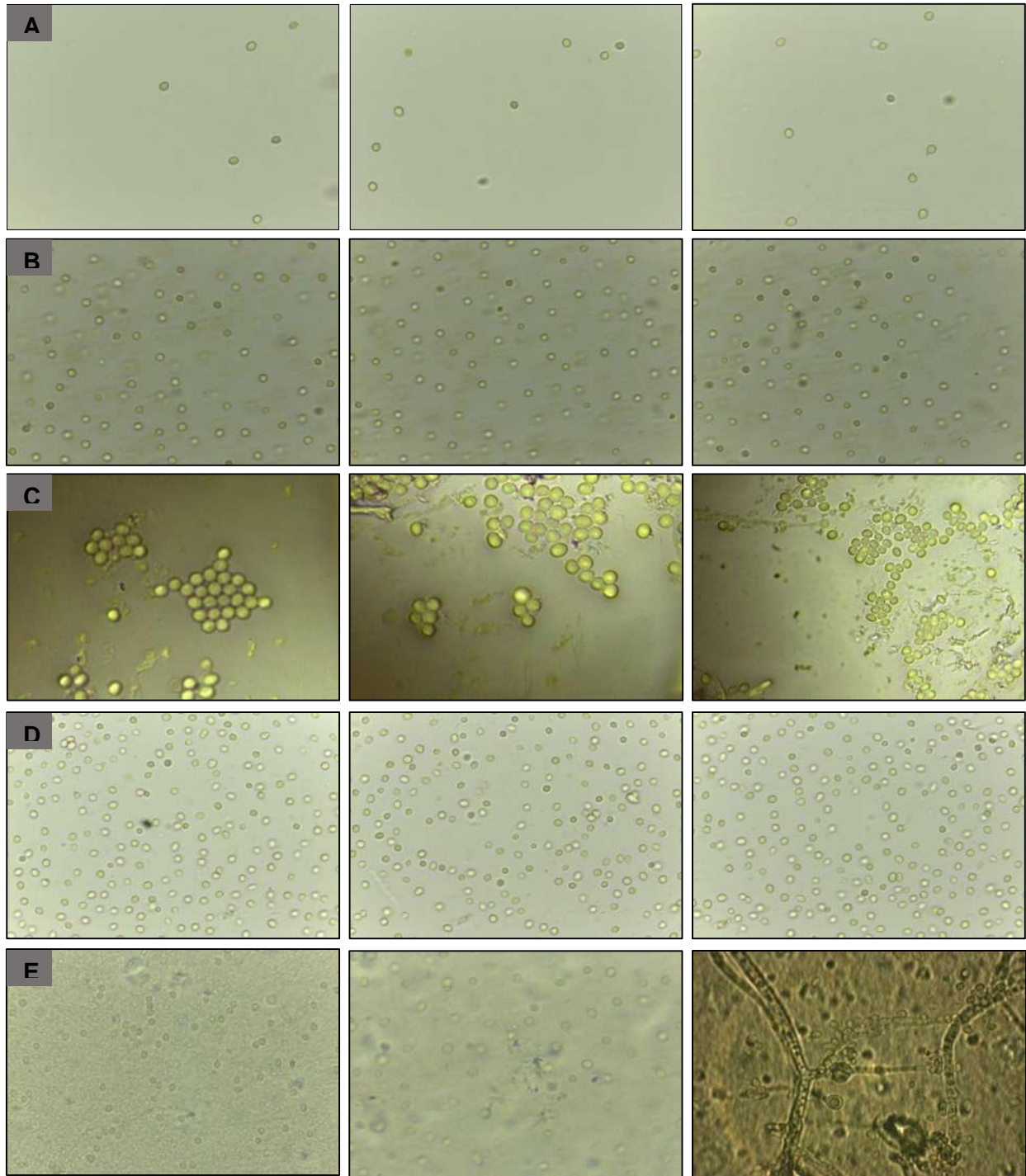
Cepa	Conidias por mL
CMU-14	200, 000
CMU-18	177, 000
CMU-34	521, 000
CMU-44	428, 000
CMU-90	1, 148, 000

Las cinco cepas fueron capaces de germinar a la temperatura de 28°C, mientras que a las temperaturas extremas de 16 °C y 36 °C todas fueron capaces de germinar, excepto la cepa CMU-90 (Fig. 9).



**Figura 9. Porcentaje de germinación de cepas de *T. harzianum*.** Se inocularon aproximadamente 30 conidias de las cepas de estudio por caja Petri en medio PDA que se incubaron a diferentes temperaturas y se analizaron cada 12 h para observar la aparición de colonias, indicando germinación.

La morfología de las conidias de las cepas CMU-14, CMU-18, CMU-34, CMU-44 y CMU-90 se muestra en la Figura 10. Las conidias de las cepas de estudio en general presentan una pared delgada y una pigmentación verde.



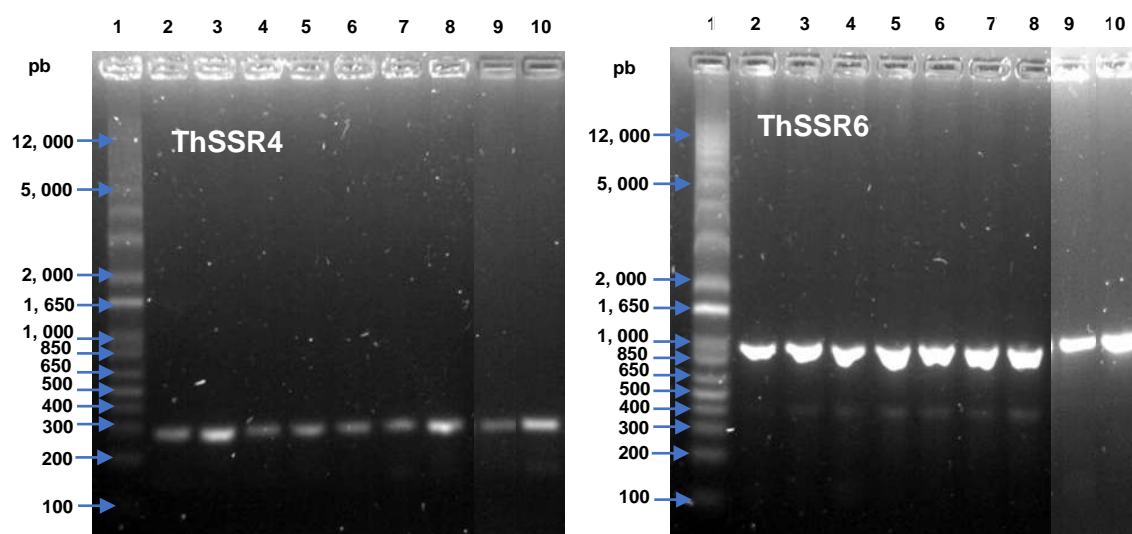
**FIGURA 10.** Morfología de las conidias de las cepas de estudio CMU-14 (panel A), CMU-18 (panel B), CMU-34 (panel C), CMU-44 (panel D) y CMU- 90 (panel E). Aumento: 100X.

Aunque no se realizó una medición de las estructuras, se puede observar que las conidias de la cepa CMU-34 tienen mayor tamaño que las demás cepas. Las conidias de la cepa CMU-34 presentan una morfología esférica en comparación con las cepas CMU-14, CMU-18, CMU-44 y CMU-90 que presentan una morfología ovoide. En la cepa CMU-90 se pueden observar otras estructuras como hifas y clamidosporas.

#### 6.4 Amplificación mediante PCR de marcadores tipo microsatélite

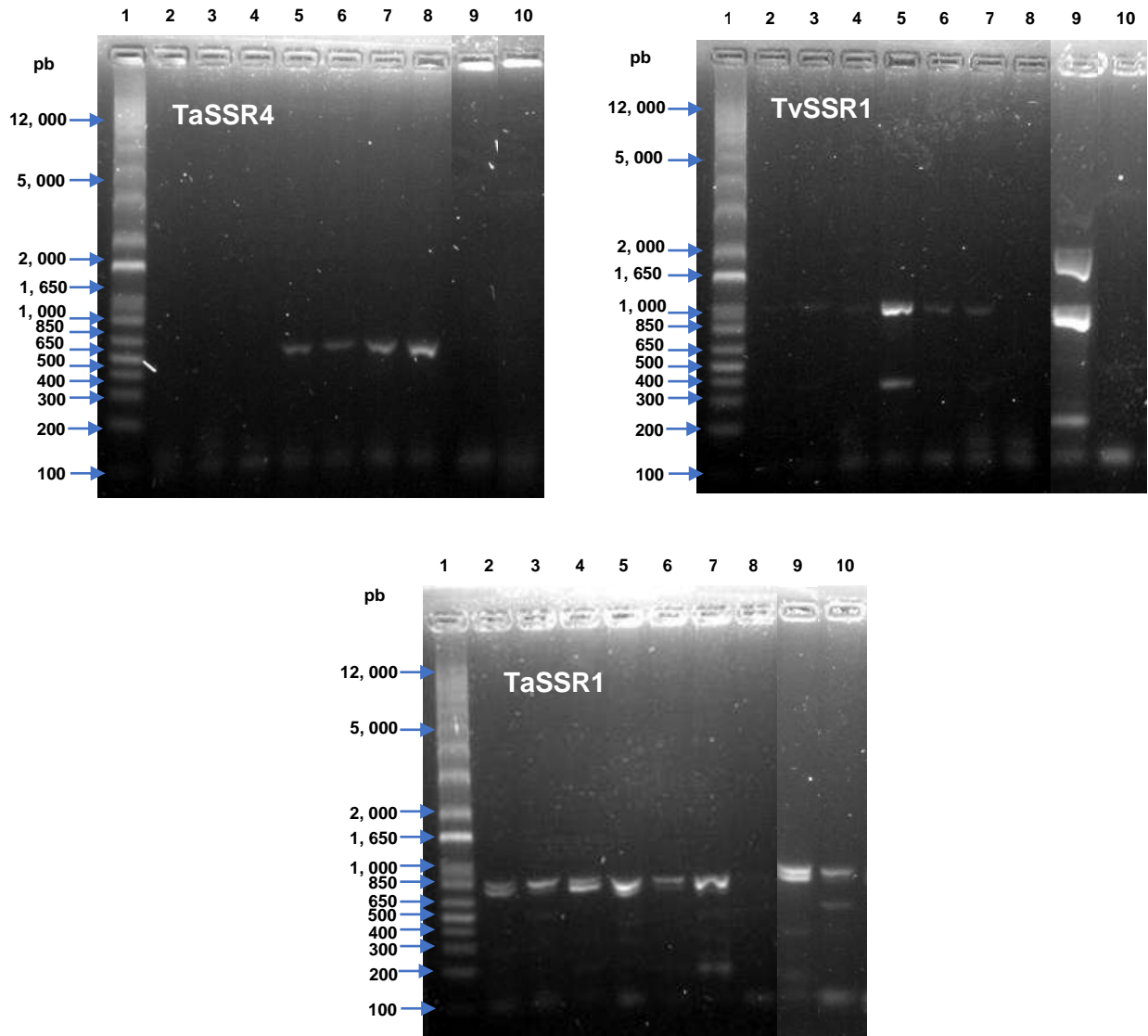
Los cinco oligos utilizados generaron patrones de amplificación en las nueve cepas de estudio de *T. harzianum*, generando un número variable de bandas para cada especie.

El oligo ThSSR4 fue el que generó el menor número de bandas entre las cepas de estudio con tamaños entre 176 y 320 pb. El oligo ThSSR6 generó de 1 a 2 bandas con tamaños entre 384 y 1,047 pb (Fig. 11).



**FIGURA 11.** Patrones de amplificación de las cepas de *T. harzianum* con distintos oligos ThSSR. Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con SYBR Green. Carriles: 1, Marcador de peso molecular, 1 Kb ladder plus (Invitrogen, USA); 2, CMU-18; 3, CMU-19, 4, CMU-14; 5, CMU-23; 6, CMU-25; 7, CMU-44; 8, CMU-1; 9, CMU-90; 10, CMU-34. En cada gel aparece el nombre del oligo utilizado.

El oligo TaSSR1 generó un mayor número de bandas entre las cepas de estudio, con tamaños entre 116 y 715 pb. El oligo TaSSR4 generó de 1 a 2 bandas entre 122 y 577 pb. El oligo TvSSR1 generó de 1 a 4 bandas entre 130 y 1, 710 pb (Fig. 12).



**FIGURA 12.** Patrones de amplificación de las cepas de *T. harzianum* con distintos oligos. Gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con SYBR Green. 1, Marcador de peso molecular, 1 Kb ladder plus (Invitrogen, USA); 2, CMU-18; 3, CMU-19; 4, CMU-14; 5, CMU-23; 6, CMU-25; 7, CMU-44; 8, CMU-1; 9, CMU-90; 10, CMU-34. En cada gel aparece el nombre del oligo utilizado.

En la Tabla 6 se presentan estos resultados, de las cepas de estudio y oligos utilizados.

**TABLA 6.** Detalles del tamaño de alelos observados con los diferentes oligos utilizados para evaluar la diversidad genética de cepas de *T. harzianum*.

Oligo	CEPAS DE <i>Trichoderma harzianum</i>								
	Tamaño del alelo observado (bp)								
	<u>CMU-18</u>	<u>CMU-19</u>	<u>CMU-14</u>	<u>CMU-23</u>	<u>CMU-25</u>	<u>CMU-44</u>	<u>CMU-1</u>	<u>CMU-90</u>	<u>CMU-34</u>
ThSSR4	285	285	292	292	303	320	320	315	315 176
ThSSR6	841	403 846	348 821	388 812	386 831	388 826	382 812	997	1047
TaSSR4	124	115	122	127 549	133 577	133 556	133 545	167	180
TaSSR1	127 648 715	128 445 648 715	135 204 648 715	131 305 394 663	131 615 687	197 419 652	124	116 159 298 627 704	119 431 679
TvSSR1	131 983	130 355 983	136 983	144 376 960	144 374 988	144 177 380 988	144 175	156 245 882 1710	166

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron los efectos de las condiciones de cultivo, incluyendo temperatura, medio de cultivo y pH, sobre el crecimiento, la producción de conidias y las germinación de distintas cepas del complejo de *T. harzianum*. Así mismo, se realizó un análisis en el que se evaluó la variación genética de las cepas de estudio empleando marcadores de secuencias repetitivas simples (SSR).

### 7.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial

La temperatura es probablemente el principal factor abiótico que influye notablemente en el crecimiento micelial y producción de conidias (Hallworth y Magan, 1996). Las cinéticas de crecimiento obtenidas mostraron una gran variación fisiológica entre las cepas de estudio, presentando algunas de éstas una inhibición significativa del crecimiento a la más alta temperatura evaluada, que fue de 36 °C. Estos resultados son congruentes con la evidencia de que las especies del género *Trichoderma* son en su gran mayoría mesofílicas (Kredics *et al.*, 2003). Así, aunque en general las temperaturas óptimas de crecimiento reportadas para *Trichoderma* spp. concuerdan con las presentadas por las cepas aquí analizadas, estudios previos de crecimiento en medio sólido han mostrado que las especies del género *Trichoderma* pueden crecer en temperaturas extremas. Por ejemplo *T. polysporum* crece desde 0 °C y en el caso de *T. koningii* se ha observado crecimiento hasta los 40 °C (Tronsmo y Dennis 1978). Sin embargo, la temperatura óptima para la mayoría de las especies de *Trichoderma* spp. está en el intervalo de 25 a 30 °C (Klein y Eveleigh 1998). En particular, se ha documentado que *T. harzianum* tolera un intervalo de temperaturas máximas sobre los 30 °C a 38 °C, aunque la temperatura óptima es de 20 °C (Danielson y Davey, 1973).

Debido a la alta variación en la temperatura óptima de crecimiento entre cepas de una misma especie, es necesario hacer búsquedas y pruebas en una cantidad importante de aislados, con la finalidad de encontrar buenos candidatos para el biocontrol a bajas y altas temperaturas. Siendo la cepa CMU-18 la que mostró una

mayor resistencia a todas las condiciones de crecimiento en medio PDA, y la cepa CMU-14 la que mostró una mayor resistencia a las condiciones de crecimiento en medio AEM; a futuro sería interesante evaluar estas cepas en temperaturas más bajas y más altas, debido a que no se encontró una inhibición significativa en el crecimiento de dichas cepas en las condiciones evaluadas.

Por otra parte, los requerimientos de temperatura para una producción óptima de conidias en muchos hongos pueden no ser los mismos que las temperaturas óptimas para germinación de conidias, crecimiento del hongo o bioactividad, (Thomas y Jenkins, 1997). Para *Trichoderma sp.* Una producción óptima de conidias se lleva a cabo a temperaturas cercanas a los 25 °C (Domsch *et al.*, 1980). Para el caso de *T. viride* se han reportado cepas que tienen una producción óptima de biomasa entre 20 y 30 °C en medio sólido, aunque se presentan algunas capaces de crecer aún a 5 °C (Jackson *et al.*, 1991). Cepas que pueden crecer a esta última temperatura se han reportado para las especies *T. gamsii*, *T. velutinum* y *T. harzianum* (sin. *H. lixii*) (Shanmugam *et al.*, 2015). La producción de conidias fue similar a la reportada por Domsch., 1980, ya que a las temperaturas de 16 °C, 20 °C y 32 °C se observa que la mayoría de cepas de estudio conidieron eficientemente, disminuyendo dicha capacidad a temperaturas mayores (36 °C). Gracias a la maquinaria de enzimas hidrolíticas como amilasas, celulasas, peptinasas, quitinasas, entre otras, *Trichoderma spp.* es un degradador activo de sustratos como almidón, celulosa y pectina, las cuales son empleadas como fuente de crecimiento (Cucuk *et al.*, 2008).

## **7.2 Efectos del pH en el crecimiento micelial y conidiación**

La adaptación ambiental de los hongos filamentosos al pH permite que los mismos crezcan en amplios intervalos de pH, entre 2.0 y 9.0, siendo el óptimo de 4.0 a 7.0 (Peñalva y Arst, 2004). No obstante, en pH ácido, la asimilación de glucosa favorece el crecimiento y la esporulación de los hongos (Poalacin, 2015). Las cinéticas de crecimiento mostraron una gran variación fisiológica entre las cepas de estudio, aunque mostraron crecimiento entre los intervalos de 4.0 a 9.0. Estos resultados son congruentes con la evidencia de que las especies del género

*Trichoderma* poseen plasticidad fisiológica para crecer en amplios intervalos de pH. La conidiación de *Trichoderma* se favorece a niveles de pH ácido a neutro y el pH óptimo para la reproducción asexual puede variar entre cepas/especies (Steyaert *et al.*, 2017). En los valores de pH probados, la mayoría de las cepas conidieron entre pH de 4.0 y 7.0. La producción de conidias disminuyó al incrementar el pH hasta 9.0, a excepción de las cepas CMU-1 y CMU-90, que no conidieron en ninguna condición de pH probada. Se ha observado que el pH afecta de manera diferencial la conidiación en *Trichoderma* spp, dependiendo de la especie y el medio de cultivo. Por ejemplo, *T. hamatum* disminuye significativamente la conidiación en agar extracto de malta al incrementar el pH de 3 hasta 6, mientras que en *T. atroviride* incrementa (Steyaert *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando se incuban en sustrato sólido usando madera de pino, *T. atroviride* disminuye la producción de conidias cuando aumenta el pH. No obstante, en las cepas que pudieron conidiar, en el presente trabajo se observa el mismo comportamiento de conidiación en todas las cepas dentro de *T. harzianum* analizadas, mostrando que, dentro de la misma especie o complejo, el comportamiento es menos variable. Tanto los antecedentes como los resultados aquí obtenidos demuestran que la variación del pH es un método simple y barato para mejorar la producción de conidios; sin embargo, las condiciones para cada cepa deben ser optimizadas.

### **7.3 Germinación de las cepas de *T. harzianum***

Al igual que el crecimiento y la conidiación, la germinación en *Trichoderma* spp. puede ser afectada por diversos factores ambientales incluyendo el pH del medio, la incidencia de luz, el tipo y la limitación de fuentes de C y N, entre otros (Domsh *et al.*, 1980; Sanogo *et al.*, 2002; Hjeljord y Tronsmo, 2003; Daryaei *et al.*, 2016a). El análisis de los factores microclimáticos y ambientales que afectan la germinación de las conidias de especies del género *Trichoderma* tiene relevancia en el diseño de inóculos que son utilizados para el biocontrol de fitopatógenos y en el éxito en campo de dichos inóculos. Por ejemplo, en ambientes ricos en nutrientes y con alta humedad, se ha encontrado que la eficacia en el biocontrol de



inóculos de *Trichoderma* spp. con una alta densidad de conidias se debe a que la germinación sincronizada de éstas consume una gran cantidad de oxígeno, creando un microambiente anaeróbico que inhibe la germinación de los fitopatógenos (Hjeljord y Tronsmo, 2003). En contraste, en ambientes aeróbicos, la alta densidad de inóculos hace que después de la germinación exista un efecto autoestimulador para la respiración, por lo que se estimula el crecimiento, compitiendo eficientemente por recursos e inhibiendo así al fitopatógeno (Hjeljord y Tronsmo, 2003).

En los experimentos cualitativos de germinación, se observó que las cinco cepas evaluadas producían colonias a partir de las conidias entre los 16 y 36°C, excepto la cepa CMU-90 que sólo lo hizo a 28°C. Ese intervalo de temperaturas de germinación es similar al encontrado para otras especies del género *Trichoderma*. Así, se ha determinado que las conidias de *T. stromaticum* pueden germinar de manera óptima entre los 20 y los 30 °C, pero lo hacen en bajo porcentaje a los 15 °C, y prácticamente son incapaces de hacerlo a los 35 °C (Sanogo *et al.*, 2002). En el caso de *T. harzianum* se ha documentado que tanto cepas como productos de biocontrol con conidias pueden germinar entre los 12 y los 25 °C, aunque con diferencias en el tiempo (Hjeljord *et al.*, 2000).

También se ha observado que la temperatura a la cual se produjeron las conidias influye en la capacidad de germinación; así, las conidias de *T. atroviride* que se producen a 30 °C tienen una mejor capacidad de germinación que las que se produjeron a 25 y a 20 °C (Daryaei *et al.*, 2016a), lo cual parece estar relacionado con la capacidad para acumular a cada temperatura azúcares o ácidos grasos que son importantes para la germinación en distintas condiciones (Daryaei *et al.*, 2016b). Este tipo de factores deberán ser analizados a futuro en las cepas de estudio, con la finalidad de evaluar el potencial de germinación de éstas en diferentes condiciones relacionadas con la formulación de un producto de biocontrol.

#### 7.4 Amplificación de marcadores tipo microsatélite mediante PCR

Recientemente las secuencias repetitivas simples (SSR) o marcadores microsatélite se han convertido en la opción preferida para el análisis de variación genética intraespecífica en hongos debido a su naturaleza multialélica, herencia codominante, alta abundancia, hipervarianza, cobertura extensa del genoma, reproducibilidad y poder discriminatorio (Kashyap *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2012; Mahfooz *et al.*, 2012). Diversos estudios mostraron que diferentes taxa exhiben una distribución diferencial de los tipos de repetición de SSR (Tautz *et al.*, 1986; Toth *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009). Con el objetivo de ampliar los conocimientos sobre la diversidad genética de cepas/especies del complejo de *T. harzianum*, en este trabajo se desarrolló una tipificación basada en el uso de secuencias repetitivas simples (SSR).

Los marcadores ThSSR4 y ThSSR6 fueron diseñados con base en el análisis bioinformático del transcriptoma *T. harzianum* (Rai *et al.*, 2016). En el caso del marcador ThSSR4 se amplificaron en el trabajo original 5 alelos para cepas de *T. harzianum* (Rai *et al.*, 2016); sin embargo, en las cepas de la misma especie aquí estudiadas se amplificó sólo un alelo, a excepción de la cepa CMU-34 en la que se observaron dos alelos. En dicho marcador, el tamaño de todos los alelos aquí obtenidos coincidió con el rango de los tamaños reportados previamente para cepas de *T. harzianum* (Rai *et al.*, 2016). De manera contrastante, para el marcador ThSSR6 se habían obtenido previamente dos alelos entre los 360 y 400 pb, y en las cepas aquí analizadas se encontraron de uno a dos alelos, pero en todas las cepas analizadas uno de ellos fue de mayor tamaño al previamente observado en cepas de la misma especie (Rai *et al.*, 2016).

En el caso de los marcadores TaSSR1 y TaSSR4, estos fueron diseñados con base en el análisis bioinformático del transcriptoma *T. atroviride* y previamente se habían encontrado dos alelos entre 180-250 y 400-500 pb en esta especie (Rai *et al.*, 2016). Ambos primers se seleccionaron en el presente trabajo debido a que mostraron amplificación cruzada con cepas de *T. harzianum*. No obstante estar

diseñados para otra especie, la mayoría de las cepas de *T. harzianum* aquí estudiadas presentaron de tres a cinco alelos con los primers del marcador TaSSR1, salvo la cepa CMU-1 en la que sólo se observó un alelo. En contraste, para la amplificación con los primers de TaSSR4 se observaron sólo de uno a dos alelos. Los primers para el marcador TvSSR1 fueron diseñados con base en el análisis bioinformático del transcriptoma *T. vires*, observándose en esta especie dos alelos con los tamaños 400-500 pb (Rai et al., 2016). Estos primers se seleccionaron en el presente trabajo debido a que también mostraron amplificación cruzada con cepas de *T. harzianum*. De manera interesante, este fue el único marcador que en todas las cepas dio dos o más alelos.

El número de cepas estudiadas en el presente trabajo es limitado para realizar un análisis poblacional con los marcadores evaluados. Sin embargo, las diferencias en el número de alelos encontrada muestran claramente diversidad genética en las cepas aquí analizadas, por lo que pueden ser útiles para trabajos poblacionales posteriores en cepas de *T. harzianum* de Michoacán.

## 8. RESUMEN DE RESULTADOS

- i. Los resultados obtenidos en las condiciones evaluadas fueron consistentes con estudios previos del género, ya que las cepas de estudio demostraron tener un crecimiento óptimo entre los 16 y 32 °C en el intervalo de pH entre 2.0 y 9.0.
- ii. Se logró evaluar la capacidad de conidiación *in vitro* de las cepas de *T. harzianum* en diferentes condiciones de cultivo. Coincidiendo también en este caso los resultados con estudios previos ya que las cepas mostraron conidiación en rangos óptimos de pH de 4.0 a 7.0 y temperaturas entre los 16 y 32 °C.
- iii. Las cepas de *T. harzianum* presentan germinación entre los 16 y 36°C, que es consistente con estudios previos.
- iv. El número de alelos encontrados en cada especie es un buen indicador de la diversidad genética. Los microsatelites han demostrado ser una herramienta útil para evidenciar las diferencias genéticas entre las especies de *T. harzianum*.
- v. Los estudios presentados a través de la presente investigación indican alto potencial de algunas cepas/especies del complejo *T. harzianum* aquí estudiadas para ser utilizadas como elemento en el biocontrol, debido a su alta producción de conidias y su amplio rango de conidiación y germinación en distintas condiciones de cultivo.

## 9. CONCLUSIONES

- i. La hipótesis planteada se cumplió, ya que se observó una significativa variación fisiológica y genética en las cepas de estudio.
- ii. Los objetivos del presente trabajo se alcanzaron.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosin, E., Aguilera, J. M. (1998). Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. In: G.E Harman, C.P Kubicek (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control, and Commercial Applications*, vol. 2. London, Taylor & Francis. pp. 205–227.
- 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.
- Atasanova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In VK Gupta, M Schmoll, A Herrera-Estrella, RS Upadhyay, I Druzhinina, MG Tuohy (eds). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. New York, Elsevier. pp. 25-40.
- Ávila-Miranda, M.E., 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 Biol Biochem.* 38: 1823-1830.
- Baker, R., Cook, R. (1974). *Biological control of plant pathogens*. San Francisco USA: W.H. Freeman.
- 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.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology.* 7:249-260.
- 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.

- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*. 6(2): 263-295.
- Carpenter, M. A., Stewart, A., Ridgway, H. J. (2005). Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. *FEMS Microbiol Lett*. 251: 105–112.
- Carreras-Villaseñor, N. Sánchez-Arreguín, J.A., Herrera-Estrella, A.H. (2012). *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*. 158 (1): 3-16.
- 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.
- Cuervo-Parra, J. A., Sánchez-López, V., Romero-Cortes, T., & Ramírez-Lepe, M. (2014). *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(16): 1704-1712.
- Chen, K., Zhuang, W. Y. (2016). *Trichoderma shennongjianum* and *Trichoderma tibetense*, two new soil-inhabiting species in the Strictipile clade. *Mycoscience*. 57(5): 311–319.
- 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 nematicidal activity from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2. *FEMS Microbiology Letters*. 299(2): 135-142.
- Chet, I., Inbar, J., Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow D.T, Söderström B (Eds). *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Berlin, Springer-Verlag. pp 165-184
- Cucuk, C., Kivanci, M. (2008). Effect of carbon source on production of lytic enzymes by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2(2): 23-26

- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(6): 773-782.
- Danielson, R., Davey, C. (1973). Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology & Biochemistry*. 5(5): 495-504.
- Daryaei, A., Jones, E.E., Glare, T.R., Falloon, R.E. (2016). pH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*. 92: 24-30
- Daryaei, A., Jones, E. E., Glare, T. R., Falloon, R. E. (2016a). Nutrient amendments affect *Trichoderma atroviride* conidium production, germination and bioactivity. *Biological control*. 93: 8-14.
- 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.
- 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.
- Domsch, K., Anderson, W., Yersoon, T. H. (1980). *Compendium of soil fungi. Revision of the genus Trichoderma*. London: Academic Press.
- Druzhinina, I., Kubicek, C.P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J Zhejiang*. 6B: 100-112.
- 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.
- Elad, Y., Freeman, S. (2002). Biological control of fungal plant pathogens. In K. Esser y J. W Bennett (eds). *The Mycota XI*. Berlin: Springer. pp 93-109.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 5(6): 435-445.

- 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: 245-250.
- Friedl, M. A., Schmoll, M., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2008). 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.
- 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.
- 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.
- Gruber, S., Seidl-Seiboth, V. (2012). Self-versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*. 158(1): 26-34.
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millan, E., Ávila-Quezada, G.D., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatogénos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:87-96.
- Hallsworth, J. E., Magan, N. (1996). Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl Environ Microbiol*. 62: 2435–2442.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2:43-56.
- 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 (Eds). *In Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Waltham, MA, USA, Elsevier B.V. pp. 125-136.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158(1):17-25.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten, L. H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, c. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgarys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. a., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509-547.
- Hjeljord, L. G., Stensvand, A., Tronsmo, A. (2000). Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biological Control*. 19(2): 149-160.
- Hjeljord, L. G., Tronsmo, A. (2003). Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. *Phytopathology*. 93(12): 1593-1598.
- Hoelzel, A. R., Dover, G. A. (1991). *Molecular genetic ecology*. New York: Oxford University Press.
- Jackson, A.M., Whipps, J.M., Lynch, J.M. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 7:494-501.

- Juturu, V., Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30(6): 1219-1227.
- 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*. (2012): 1-8. doi:10.1155/2012/904763
- Kashyap, P. L., Rai, S., Kumar, S., Srivastava, A. K., Anandaraj, M., Sharma, A. K. (2015). Mating type genes and genetic markers to decipher intraspecific variability among *Fusarium udum* isolates from pigeonpea. *J Basic Microbiol*. 55: 846–856.
- Klein, D., Eveleigh, D. E. (1998). Ecology of *Trichoderma*: basic biology, taxonomy and genetics. In C.P Kubicek, G.E Harman (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, vol 1. London, UK: Taylor & Francis. pp. 57–74.
- Knudsen, G., Bin, L. (1990). Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from Alginate Pellets. *Phytopathology*. 80(8): 724-727.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*. 41(1): 37-42.
- 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:R40. DOI: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol*. 38 (3): 310-319.
- 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. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. pp. 127-156.

- Kumar, S., Maurya, D., Rai, S., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K. (2012). Computational mining and genome wide distribution of microsatellites in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Not Sci Biol.* 4: 127–131.
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L. (2011). The social network: deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology.* 9(6): 440-451.
- 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.
- Liu, Z., Yang, X., Sun, D., Song, J., Chen, G., Juba, O., Yang, Q. (2010). Expressed sequence tags-based identification of genes in a biocontrol strain *Trichoderma asperellum*. *Mol Biol Rep.* 37: 3673–3681.
- Mahfooz, S., Maurya, D. K., Srivastava, A. K., Kumar, S., Arora, D. K. (2012). A comparative in silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in coding regions of three formae speciales of *Fusarium oxysporum* and of EST-SSR markers for polymorphism studies. *FEMS Microbiol Lett.* 328: 54–60.
- 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.
- Marín-Esquivel, M. B. (2017).
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O. Coutinho, P. M, Cullen, D. Danchin, E. G. J. Grigoriev, I. V, Harris, P. , Jackson, M., Kubicek, C. P. , Han, C. S., Ho, I., Larrondo, L. F., Lopez de Leon, A., Magnuson, J. K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A. A., Schmoll, Terry, M. A., Thayer ,N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C. L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C. R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D. S., Lucas, S. M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., & Brettin, T. S. et al. (2008). Genome sequencing and analysis of the

- biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*. 26(5): 553-560.
- Marx, I. J., Van-Wyck, 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.
- Misra, A. K., Gupta V. K. (2009). *Trichoderma*: Biology, Biotechnology and Biodiversity. *Journal of Eco-friendly Agriculture*. 4(2): 99-199.
- Morales-Gallardo, S. (2016).
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G., Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma* plant pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology*. 52(4): 522-529.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh, U.S., Mukherjee, M., Schmoll, M. (2013). *Trichoderma*: Biology and Applications. London, CABI. p.173.
- Nagpure, A., Choudhary, B., Gupta, R. K. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology*. 34(3): 215-232.
- Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of action of fungal biological control agents. In P. Narayanasamy (ed.). *Biological Management of Diseases of Crops, Characteristics of Biological Control Agents*. Vol. 1. Progress in Biological Control. *Springer Science+Business Media Dordrecht*. pp. 99-200.
- 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 (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Heidelberg, Elsevier. pp. 429-453.
- Paulitz, T. C., Belaner, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*. 39: 103-133.
- Peñalva, M. A., Arst, J. H. N. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Ann Rev Microbiol*. 58: 425–451.

- Poalacin, J. (2015). *Estudio del adecuado crecimiento del hongo Trichoderma harzianum y Trichoderma hamatum en sustrato solido (tesis de pregrado)*. Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Purschwitz, J., Müller. S., Kastner, C., Fischer, R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 566-571.
- Qin, W.T., Zhuang, W.Y. (2016). Four new species of *Trichoderma* with hyaline ascospores from central China. *Mycological Progress*. 15(8):811-825.
- Rai, S., Kashyap, P. L., Kumar, S., Kumar-Srivastava, A., Ramteke, P. (2016). Comparative of microsatellites in five different antagonistic *Trichoderma* species for diversity assessment. *World J Microbiol Biotechnol*. 32(2): 1-11.
- Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Res Mycol*. 116: 1-56.
- Rodríguez, I., Arcia, A. (1993). Caracterización fisiológica (temperatura, pH y luz) de 12 aislamientos de *Trichoderma spp*. *In vitro (Resumen)*. 6(2): 53.
- 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 Prot*. 26: 549-555.
- 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.
- Sánchez, V., & Rebolledo, O. (2010). Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista Mexicana de Micología*. 32: 11-18.
- Sánchez-López, V., Martínez Bolaños, L., Zavala González, E. A., & Ramírez Lepe, M. (2012). Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. *Revista Mexicana de Micología*. 36: 17-26.
- Sanogo, S., Pomella, A., Hebbbar, P. K., Bailey, B., Costa, J. C. B., Samuels, G. J., Lumsden, R. D. (2002). Production and germination of conidia of

- Trichoderma Stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciososa* on cacao. *Phytopathology*. 92(10): 1032-1037.
- Scherm, B., Schmoll, M., Balmas, V., Kubicek, C. P., Migheli, Q. (2009). Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Curr Genet*. 55: 81–91.
- 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., Piłsyk, 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.
- Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E.U., Herrera-Estrella, A. (2010). *Trichoderma* in the light of day—physiology and development. *Fungal Genetics and Biology*. 47(11): 909-916.
- Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3): 787-799.
- 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.

- Selkoe, K. A., Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9(5): 615-629.
- 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.
- Shanmugam, V., Chugh, P., Sharma, P. (2015). Cold-tolerant *Trichoderma* species for the management of *Fusarium* wilt of tomato plants. *Annals of Microbiology*. 65(1): 543-551.
- 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.
- Siddiquee, S., Tan, S. G., Yusuf, U. K., Fatimah, N. H. N., Hasan, M. M. (2011). Characterization of Malaysian *Trichoderma* isolates using random amplified microsatellites (RAMS). *Mol Biol Rep*. 39: 715–722.
- Singh, R., Kumar, S., Kashyap P. L., Srivastava, A. K., Mishra, S., Sharma, A. K. (2014). Identification and characterization of microsatellite from *Alternaria brassicicola* to assess cross-species transferability and utility as a diagnostic marker. *Mol Biotechnol*. 56: 1049–1059.
- Stefanova, M. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp.* para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Facultad de Agronomía*. 16: 509-516.
- Steyaert, J. M., Chomic, A., Nieto-Jacobo, M., Mendoza-Mendoza, A., Hay, A. J., Braithwaite, M., Stewart, A. (2017). Yield and cold storage of *Trichoderma* conidia is influenced by substrate pH and storage temperature. *Journal of Basic Microbiology*. 114(2): 198-208.
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Stewart, A. (2016). Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biology*. 114(2): 198-208.

- Steyaert, J.M., Weld, R.J., Mendoza-Mendoza A., Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*. 156: 2887-2900.
- 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): 49.
- 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.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*. 322: 652-656.
- Thomas, M. B., Jenkins, N. E. (1997). Effects of temperatura on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Mycol Res*. 101: 1469–1474.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & la Cruz-Pérez, D. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86(4): 947-961.
- 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.
- Toth, G., Gáspari, Z., Jerzy, J. (2000). Microsatellites in different eukariotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. 10: 967-981.
- Tronsmo, A., Dennis, C. (1978). Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Trans Br Mycol Soc*. 71: 469–474.
- Vinale, F., Sivasithamparamb, K., Ghisalbertic, E.L., Marraa, R., Woo, L., Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 40:1-10.



- Vizcaíno, J.A., Redondo, J., Suarez, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, R., Gonzales, F. J., Rey, M., Monte, E. (2007). Generation, annotation and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75: 853–862.
- Wang, S., Zhang, L., Matz, M. (2009). Microsatellite characterization and marker development from public EST and WGS databases in the reef-building coral *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). *J Hered.* 100:329–337.
- Weindling, R. (1934) Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology.* 24:1153- 1179.
- Widden, P., Scattolin, V. (1988). Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia.* 80: 795-803.
- Woo, S., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology.* 96(2): 125-133.
- 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.
- Yu, X., Hallett, S., Sheppard, J., Watson, A. (1998). Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 20 (6): 333–338.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*-chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews.* 30(2):74-90.
- Zhang, C., Druzhinina, I., Kubicek, C., Xu, T. (2005). *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters.* 251(2): 251-257.

Zavala-González, E. A., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Cruz-Valerio, M., Lopez-Llorca, L. V., & Ramírez-Lepe, M. (2016). Tolerance to chitosan by *Trichoderma* species is associated with low membrane fluidity. *Journal of Basic Microbiology*. 56(7): 792-800.