



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp.  
AISLADAS DE UN CULTIVO DE SORGO**

**TESIS  
QUE PRESENTA**

**Michelle Zepeda Vidales**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**Director de Tesis:**

**D.C. Gerardo Vázquez- Marrufo**

## AGRADECIMIENTOS

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

**D. C. Gerardo Vázquez-Marrufo** por sus consejos, apoyo, paciencia, confianza y su constante asesoramiento en el desarrollo de la presente tesis, antes y después; así como el haberme brindado la oportunidad de incluirme como parte de su excelente y profesional equipo de trabajo.

A la **M.C Karla Ivonne González Martínez** por brindarme tu valiosa amistad desde el inicio, por tu paciencia y apoyo en la enseñanza de las técnicas utilizadas, por ser comprensiva, por compartir tantas alegrías y momentos juntas.

A la **D.C Virginia Angélica Robinson Fuentes** por depositar su confianza en mi, ya que al culminar esta etapa no hubiese sido posible sin su decidido apoyo, esperando no haberla defraudado. Gracias totales.

**D. C. Miguel Tapia Ruíz** mis más sinceros agradecimientos, por haber sido parte fundamental en mi carrera, ya que con todo su intelecto, profesionalismo y ética, sembró en mí todavía más la pasión de ésta bella y extraordinaria carrera.

## DEDICATORIAS

A **DIOS** por haberme dado sabiduría y fuerza guiándome en el trayecto de mi vida.

A mi madre, **María Eugenia** por creer en mí y alentarme desde mi niñez para mi formación, por tu amor, tu amistad infinita, inculcándome buenos sentimientos, valores y que la humildad siempre va primero.

A mi tía Lic. **América Vidales Alfaro**, por su apoyo incondicional, amor y cariño, por motivarme a cumplir mis metas y siempre seguir adelante sin importar las dificultades.

A mis amigas **Katy, Michelle y Hillary** por su apoyo y cariño incondicional, que siempre están ahí cuando más las necesito.

A **Jean**, por su amistad, cariño y amor inquebrantable, por escucharme y apoyarme en cada momento; por tu compañía a la distancia en esta etapa de mi vida que ha sido maravillosamente etérea.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| II. ANTECEDENTES.....   | 5  |
| II.1 Clasificación del género <i>Trichoderma</i> .....                                  | 5  |
| II.2 Ciclo de vida de <i>Trichoderma</i> spp. ....                                      | 6  |
| II.3 Características morfológicas del género <i>Trichoderma</i> .....                   | 6  |
| II. 4 Estilos de vida de <i>Trichoderma</i> spp.....                                    | 7  |
| II. 5 Biocontrol .....  | 8  |
| II.5.1 Mecanismos directos.....   | 9  |
| II.6 Aspectos fisiológicos de <i>Trichoderma</i> spp. ....                              | 12 |
| II. 7 Germinación en <i>Trichoderma</i> spp. ....                                       | 17 |
| II. 8 Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en <i>Trichoderma</i> spp. .... | 18 |
| II.9 <i>Trichoderma</i> spp. en agroecosistemas .....                                   | 22 |
| III. HIPÓTESIS .....  | 23 |
| IV. OBJETIVOS.....  | 23 |
| IV.1 Objetivo General .....   | 23 |
| IV.2 Objetivos Particulares.....  | 23 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 24 |
| V.1 Cepas de estudio .....  | 24 |
| V.2 Medios de cultivo .....   | 25 |
| V. 3 Obtención de inóculos .....  | 26 |
| V. 4 Elaboración de cinéticas de crecimiento y registro de conidiación.....             | 26 |
| V. 5 Cosecha y conteo de conidias .....   | 27 |
| V. 6 Determinación de porcentajes de germinación de conidias.....                       | 27 |
| V.7 Análisis genético molecular.....  | 27 |
| V.8 Secuenciación y análisis filogenético .....   | 29 |
| V. 9 Detección de actividad enzimática hidrolítica extracelular .....                   | 30 |
| V. 10 Análisis estadístico .....  | 31 |
| VI. RESULTADOS.....   | 33 |
| VI. 1 Viabilidad celular de las cepas de estudio.....                                   | 33 |
| VI. 2 Cinéticas de crecimiento de las cepas de estudio .....                            | 33 |

|  |    |
|--|----|
| VI. 3 Evaluación de la capacidad de germinación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....               | 43 |
| VI. 4 Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en cepas silvestres de <i>Trichoderma</i> spp..... | 44 |
| VI. 5 Análisis filogenético.....   | 46 |
| VII. DISCUSIÓN .....   | 50 |
| VIII. RESUMEN DE RESULTADOS .....  | 57 |
| IX. CONCLUSIÓN.....  | 57 |

**INDICE DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Representación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp. a nivel macroscópico y microscópico..... | 7  |
| Figura 2. Productos de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos .....                       | 20 |
| Figura 3. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. estudiados en el presente trabajo.....                     | 24 |
| Figura 4. Desarrollo micelial y conidiación de las cepas de estudio en medio PDA. ....                   | 34 |
| Figura 5. Desarrollo micelial y conidiación de las cepas de estudio en medio AEM. ....                   | 35 |
| Figura 6. Cinéticas de crecimiento en distinto medio de cultivo.....                                     | 38 |
| Figura 7. Porcentaje de germinación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. estudiadas. ....             | 44 |
| Figura 8. Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....  | 45 |
| Figura 9. Relaciones filogenéticas de las cepas de estudio de <i>Trichoderma</i> spp. ....               | 47 |
| Figura 10. Relaciones filogenéticas de las cepas de estudio de <i>Trichoderma</i> spp.. ....             | 48 |
| Figura 11. Electroferogramas de las secuencias del gen ITS de la cepa 2T6G (A), 2T22G (B) y T5HD (C)..   | 49 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Tabla 1. Clasificación del género <i>Trichoderma</i> . .....  | 5                                    |
| Tabla 2. Ejemplos de enzimas producidas por <i>Trichoderma</i> spp. empleando diferentes sustratos, se resalta en color morado las especies de <i>Trichoderma</i> que fueron de particular interés en el presente trabajo. .... | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |

**“Si tuviera la suerte  
de alcanzar alguno de mis ideales,  
sería en nombre de toda la humanidad”**

*Nikola Tesla*



**ABREVIATURAS**

|                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| °C                  | Grados Celsius                      |
| μL                  | Microlitros                         |
| AEM                 | Agar extracto de malta              |
| PDA                 | Agar papa dextrosa                  |
| ADN                 | Ácido desoxirribonucleico           |
| CMU                 | Cepario Michoacano Universitario    |
| g/L                 | Gramos por litro                    |
| lbf/in <sup>2</sup> | Libras fuerza por pulgada cuadrada  |
| kb                  | Kilobase                            |
| M                   | Marcador de peso molecular          |
| MBX                 | Medio basal xilanólisis             |
| mg                  | Miligramos                          |
| MFs                 | Microarreglos fenotípicos           |
| mL                  | Mililitros                          |
| mM                  | Milimolar                           |
| MMV                 | Medio Mínimo Vogel                  |
| nm                  | Nanómetros                          |
| PCR                 | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH                  | Potencial de hidrógeno              |
| V                   | Volts                               |

## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la identificación molecular, así como la evaluación de características fisiológicas y bioquímicas de 12 especies fúngicas de *Trichoderma* provenientes de tres compartimentos diferentes de un agroecosistema de sorgo. Se analizó el crecimiento micelial mediante cinéticas de crecimiento, así como la capacidad de conidiación y germinación de conidias, además se evaluó la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares. Las cinéticas de crecimiento realizadas en tres diferentes temperaturas, demostraron que las cepas de estudio crecen y conidian óptimamente a 28°C en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) que en medio Agar Extracto de Malta (AEM). Las cepas de *Trichoderma* de rizósfera crecieron y germinaron mejor a temperaturas extremas de 16°C y 36°C que las cepas endófitas de tejido foliar y de raíz. En general, las cepas de estudio germinaron mejor en AEM que en PDA. Para los ensayos de germinación se seleccionaron las cepas que presentaron los mejores niveles de conidiación. Las cepas T4RB y T2HF aisladas de raíz y tejido foliar respectivamente, mostraron los porcentajes de germinación. La cepa T2HF presentó un 98% de germinación en medio PDA y 91.3% en AEM, mientras que la cepa T4RB presentó un 80% en germinación en ambos medios de cultivo. Las cepas de suelo mostraron una variación significativa en la capacidad de germinación. Al evaluarse la actividad enzimática hidrolítica extracelular se presentó una mejor producción en cepas provenientes de suelo. El análisis filogenético empleando la región ITS y la secuencia parcial del gen  $1\alpha$  (*tef1*) distribuyó a las cepas de estudio en distintos grupos terminales. La cepa T4RB esta relacionada con *T. atroviride*; las cepas 3T9G y 3T17G se asociaron con secuencias de *T. virens*, mientras que las cepas 2T21G, 2T6G y 2T22G se agruparon junto con cepas de la especie *T. afroharzianum*. Por último, las cepas T5DH y T4HD aparecen juntas en un clado terminal que tiene como vecino a la especie *T. bannaense* y *T. harzianum*. Los resultados mostraron una heterogeneidad fisiológica entre las cepas provenientes de un mismo compartimento del agroecosistema, aun entre las endófitas foliares y de raíz cuyo número analizado fue bajo.

**Palabras clave:** *Trichoderma*, crecimiento, conidiación, germinación, análisis filogenético.

## ABSTRACT

In the present work, molecular identification was carried out, as well as the evaluation of physiological and biochemical characteristics of 12 fungal species of *Trichoderma* from three different compartments of a sorghum agroecosystem. Mycelial growth was analyzed by growth kinetics, as well as the capacity for conidiation and germination of conidia, in addition, the production of extracellular hydrolytic enzymes were evaluated. Growth kinetics performed at three different temperatures showed that the study strains grow and conidia optimally at 28°C in Potato Dextrose Agar (PDA) medium than in Malt Extract Agar (MEA) medium. *Trichoderma* strains from the rhizosphere grew and germinated better at extreme temperatures of 16°C and 36°C than the endophytic strains from foliar and root tissue. In general, the study strains germinated better on AEM than on PDA. For the germination tests, the strains that presented the best conidiation levels were selected. The strains T4RB and T2HF isolated from root and foliar tissue, respectively, showed the percentages of germination. The T2HF strain showed 98% germination in the PDA medium and 91.3% in AEM, while the T4RB strain showed 80% germination in both culture media. Soil strains showed significant variation in germination capacity. When evaluating the extracellular hydrolytic enzymatic activity, a better production was presented in strains from the soil. Phylogenetic analysis using the ITS region and the partial sequence of the 1 $\alpha$  gene (*tef1*) distributed the study strains into different terminal groups. The T4RB strain is related to *T. atroviride*; strains 3T9G and 3T17G were associated with *T. virens* sequences, while strains 2T21G, 2T6G, and 2T22G were grouped with strains of the *T. afroharzianum* species. Finally, the T5DH and T4HD strains appear together in a terminal clade that is neighbored by the species *T. bannaense* and *T. harzianum*. The results showed a physiological heterogeneity between the strains from the same compartment of the agroecosystem, even among the foliar and root endophytes whose number analyzed was low.

**Key Words:** *Trichoderma*, growth, conidiation, germination, phylogenetic analysis.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción agrícola ha sido una actividad relevante para el establecimiento de las primeras sociedades humanas y para el mantenimiento de las sociedades actuales (Bellwood, 2012; Fróna et al., 2019). Distintos factores han permitido que la producción agrícola experimentara un incremento significativo a partir del siglo pasado, particularmente en la segunda mitad (Ramankutty et al., 2018). Una de las razones por las que se ha podido incrementar la producción agrícola ha sido el empleo de distintas sustancias químicas denominadas genéricamente como pesticidas (Sharma et al., 2020). Los pesticidas se han definido de distintas maneras y se pueden clasificar atendiendo distintas características. Así, la OMS establece que los pesticidas pueden definirse “compuestos químicos que se usan para matar plagas, incluidos insectos, roedores, hongos y plantas no deseadas (malezas) (FAO, 2021). En la actualidad se usan más de 1000 diferentes pesticidas en todo el mundo, tanto en la salud pública para matar vectores de enfermedades como los mosquitos, como en la agricultura, para matar las plagas que dañan los cultivos (FAO, 2021). Para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA, por sus siglas en inglés), un pesticida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar a cualquier plaga, que puede ser empleado como regulador de plantas, defoliante o desecante, o bien como estabilizador de nitrógeno (EPA, 2021). Con relación a su clasificación, los pesticidas pueden dividirse de acuerdo con el tipo químico, origen u organismos blanco. Por ejemplo, los pesticidas pueden ser orgánicos, inorgánicos sintéticos y naturales; o bien, pueden adquirir nombres más específicos de acuerdo con la especie o grupo biológico sobre el que actúan, como herbicidas contra malezas, insecticidas contra insectos, fungicidas contra hongos, entre otros (Sharma et al., 2020).

A pesar de su relevancia en el incremento de la producción agrícola, desde el inicio de la década de los años 60 del siglo XX se evidenciaron algunos de los efectos adversos de los pesticidas en la salud y los ecosistemas (Sharma et al., 2020). La evidencia de dichos efectos no deseados de los pesticidas se ha acumulado en los últimos años, mostrando que están directamente relacionados con diversas enfermedades en seres humanos, incluidas asma, diabetes, cáncer, leucemia y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Bourguet

y Guillemaud, 2016; Kim et al., 2017). También se ha documentado la acumulación de pesticidas en alimentos y sus efectos nocivos en la diversidad biológica (Gomes et al., 2020; Sánchez-Bayo et al., 2016; Calatayud-Vernich et al., 2018; Uhl y Brühl, 2019). A pesar de estos efectos adversos en la salud humana y la biodiversidad, el uso de pesticidas se ha considerado necesario, ya que se ha documentado que pérdidas globales de aproximadamente entre el 23 y el 38% en cultivos de relevancia mundial como el maíz, el trigo y el algodón se debe a distintos tipos de plagas y enfermedades por diferentes especies de fitopatógenos (Popp et al., 2013). Sin embargo, también se ha incrementado la resistencia a los pesticidas más ampliamente empleados a nivel global (Bourguet y Guillemaud, 2016). Así, tanto la necesidad de asegurar la producción agrícola, como la baja en la eficacia de los agroquímicos empleados para ciertas plagas y enfermedades, ha llevado a la búsqueda de alternativas para el combate de plagas y fitopatógenos, que no sean tóxicas para los ecosistemas y el ser humano. Una de esas alternativas es el “control biológico” o “biocontrol”.

Existen distintas definiciones y acepciones del término “biocontrol” o “control biológico”, entre las que se encuentran algunas relativamente simples, como “el control de un organismo por parte de otro” (Narayanasamy, 2013), o bien otras más complejas que lo mencionan 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” (Narayanasamy, 2013). Existe una gran variedad de organismos biocontroladores que incluyen principalmente a bacterias, hongos, insectos y otros invertebrados, los cuales se comercializan para ser aplicados en diversos cultivos de relevancia agronómica a nivel global, generando en conjunto un nicho de mercado importante (van Lenteren et al., 2018). Entre las características que hacen atractivo el uso de organismos para el control biológico se incluyen la baja toxicidad hacia la salud humana y vida silvestre, la reducción en la cantidad de residuos tóxicos derivados de los pesticidas, el éxito para el combate de plagas y patógenos que han desarrollado resistencia a los agroquímicos convencionales, entre otros (van Lenteren et al., 2018).

Entre los microorganismos que destacan por su uso en el biocontrol, se encuentran miembros del género de hongos ascomicetes *Trichoderma*. Las especies dentro de dicho género emplean una combinación de estrategias de control de organismos fitopatógenos que

incluyen la competencia por nutrientes, la inactivación de factores de virulencia, la antibiosis y la interacción directa mediante micoparasitismo (Silva et al., 2019). Además de estas estrategias de antagonismo hacia microorganismos fitopatógenos, las especies de *Trichoderma* presentan una gran versatilidad fisiológica y resistencia a factores de estrés (Silva et al., 2019) e interactúan también con las plantas regulando su balance hormonal, mejorando su vigor y salud general (Guzmán-Guzmán et al., 2019). Por lo anterior, el aislamiento y caracterización de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. con la finalidad de encontrar cepas que sean antagonistas eficientes, con perspectivas de su uso en el biocontrol de diferentes fitopatógenos, continúa siendo un tópico de interés global (dos Reis Almeida et al., 2007; Consolo et al., 2012; John et al., 2015; You et al., 2016; Debbi et al., 2018; Tomah et al., 2020). Por todo esto, en el presente trabajo se realizó una caracterización fisiológica y genético molecular de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de un cultivo de sorgo, con la finalidad de evaluar su potencial para el biocontrol de fitopatógenos.

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 campo, particularmente en el suelo. Una serie de parámetros ambientales abióticos y bióticos influyen en la eficacia del biocontrol de *Trichoderma* spp. Algunos de estos 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 antagonicas en el suelo. Por otra parte, el éxito actual de diversas especies de *Trichoderma* como agentes biocontroladores se debe a las características que presentan, tales como su amplia distribución geográfica que les permite desarrollarse en muy diversas condiciones climáticas en diferentes compartimentos de los ecosistemas; particularmente en la rizósfera, es decir, pueden colonizar y crecer en las raíces a medida que se desarrollan. Las cepas con mayor competencia en la rizósfera se pueden agregar al suelo o semillas mediante cualquier método. Además de colonizar raíces, las especies de *Trichoderma* compiten eficientemente por nutrimentos y espacio contra otros microorganismos.

Las diversas especies del género *Trichoderma* producen tres tipos de propágulos principales, que son micelio, esporas y clamidosporas, los cuales poseen distintas características fisiológicas, y presentan diferencias en términos de la capacidad de generación, estabilidad y actividad para emplearse como agentes de biocontrol (Li et al.,

2016). Recientemente, se han demostrado varios métodos generales nuevos tanto para el control biológico como para provocar la mejora del crecimiento de las plantas y ahora está claro que debe haber cientos de genes separados y productos génicos involucrados en estos procesos. Esta red de interacciones génicas juega un papel relevante en el micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, tolerancia al estrés mediante un mejor desarrollo de raíces y plantas, solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos, resistencia inducida e inactivación de las enzimas del patógeno (Harman et al., 2004; Contreras-Cornejo et al. 2016).

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se pretende analizar aspectos fisiológicos básicos y genéticos significativos de cepas de *Trichoderma* spp. nativas del estado de Michoacán, obtenidas a partir de un cultivo de sorgo, incluyendo los efectos de cultivo *in vitro* en distintos medios de cultivo, el efecto de la temperatura en el análisis cinético de crecimiento y potencial de germinación de conidias; así como la detección de actividad enzimática hidrolítica extracelular.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Clasificación del género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez en 1794 por Persoon (Samuels 2006) y en la actualidad se reconocen dentro de dicho grupo taxonómico aproximadamente a 254 especies y dos variedades (Bissett *et al.*, 2015), aunque continuamente se añaden nuevas especies al género. Se considera que *Trichoderma* es el estado asexual (anamorfo) de formas sexuales (teleomorfo) dentro del género *Hypocrea*; no obstante, en varios casos se ha encontrado que especímenes de *Hypocrea* y *Trichoderma* que se consideraban como pares de anamorfo/teleomorfo consisten en especies separadas. El ejemplo más representativo en ese sentido lo constituye *H. lixii* y *T. lixii*, que actualmente se consideran especies diferentes (Chaverri *et al.* 2015). Debido a esto, y a la aportación de estudios sistemáticos y taxonómicas del análisis filogenético proporcionado por las técnicas de biología molecular, se ha establecido la regla de nombrar tanto al estado asexual (anamorfo) y sexual (teleomorfo) como *Trichoderma* en la descripción del holomorfo, aunque el nombre de *Hypocrea* debe de incluirse cuando se habla por primera vez de alguna especie dentro del género (Bissett *et al.*, 2015). De acuerdo con revisiones recientes sobre los grupos y subgrupos taxonómicos dentro de los hongos, y del propio género, la clasificación completa del género *Trichoderma* es (Tabla 1): Reino Fungi, Subreino Dikarya, Phylum Ascomycota, Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales y familia Hypocreaceae (Hibbett *et al.*, 2007; Kubicek y Druzhinina, 2014; Rossman *et al.*, 2013).

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

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



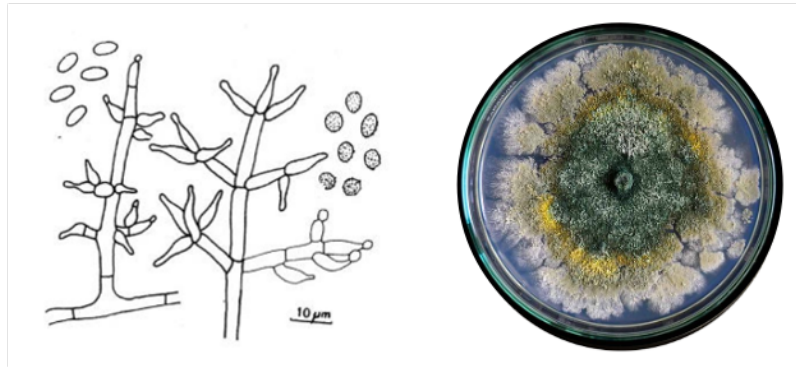
## II.2 Ciclo de vida de *Trichoderma* spp.

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

## II.3 Características morfológicas del género *Trichoderma*

La identificación basada en las características morfológicas fue uno de los primeros métodos para la identificación y verificación de especies de *Trichoderma* spp. Sin embargo, es difícil realizar una descripción de la colonia con suficiente precisión para que sea realmente útil para la identificación a nivel de especie, aunque las tasas de crecimiento en cultivo fueron útiles para distinguir especies similares. Además, cepas de *Trichoderma viride* y algunas veces *Trichoderma atroviride*, producen un olor característico semejante a coco (Kubicek y Harman, 1998), algo que se ha sido utilizado como criterio taxonómico para dichas especies. Entre las características macroscópicas de *Trichoderma* spp. en cultivo sólido se encuentran la presencia de micelio aéreo y de gránulos formados por las conidias de color verde o amarillas, y también destaca, en general, un rápido crecimiento (Figura 1) (Bissett, 1991). A

nivel microscópico, *Trichoderma* spp. presenta conidióforos ramificados repetidamente, generalmente de manera regular, dendrítica, es decir, con ramificaciones en un número indefinido de niveles, en el que las ramificaciones primarias forman ramificaciones secundarias más pequeñas que también pueden ramificarse, y así sucesivamente.



**Figura 1.** Representación morfológica de *Trichoderma* spp. a nivel macroscópico y microscópico. Del lado derecho se observa el aspecto colonial, mientras que del lado izquierdo se muestra un esquema de la estructura completa del conidióforo (George, 2019).

Los conidióforos del género *Trichoderma* pueden aparecer como ramas pareadas que asumen un aspecto piramidal, terminando en una o más fiálides. Las fiálides pueden mantenerse en verticilos o pueden ser penicilados y pueden agruparse densamente en un eje principal ancho o solitarios. Los conidios de la mayoría de las especies de *Trichoderma* miden menos de 5 µm de largo y ancho, y pueden ser globosos, subglobosos, elipsoidales u oblongos. La pigmentación de los conidios varía de verde oscuro a casi gris, y la ornamentación puede ser suave, verrugosa o tuberculada, y es un carácter de especie (Samuels, 1996).

#### **II. 4 Estilos de vida de *Trichoderma* spp.**

Las especies del género *Trichoderma* spp. presentan distintos estilos de vida, incluyendo el saprofitismo de vida libre, la simbiosis como endófitos de plantas y el micoparasitismo, siendo este último la razón por la cual son ampliamente utilizados como agentes de control biológico (Harman et al., 2004; Atasanova et al., 2014). La competencia por espacio y nutrientes, la producción de metabolitos tóxicos que impiden la colonización de microorganismos fitopatógenos y el micoparasitismo basado en el antagonismo directo de

los patógenos de las plantas, son mecanismos de *Trichoderma* spp. utilizados en el proceso de biocontrol (Viterbo et al., 2011). Durante la interacción con las raíces de una planta, *Trichoderma* spp. confiere atribuciones benéficas entre las que destaca la promoción del crecimiento y el aumento de la resistencia sistémica, ejerciendo efectos sobre su desarrollo y productividad (Harman, 2006). Las especies del género se han reportado en una gran variedad de sustratos naturales y artificiales, lo que muestra su potencial como un microorganismo oportunista y su adaptabilidad a diferentes condiciones ecológicas (Fried y Druzhinina, 2012). El principal mecanismo de reproducción asexual de *Trichoderma* spp. es mediante la producción de conidios que se da en respuesta a señales de estrés para permitir al hongo sobrevivir y dispersarse. La inducción de la conidiogénesis es afectada por las condiciones ambientales como disponibilidad de nutrientes, luz y pH bajo, entre otros factores (Carreras-Villaseñor et al., 2012).

## II. 5 Biocontrol

Los términos y conceptos relacionados con el control y manejo biológico de enfermedades de plantas de relevancia agropecuaria han ido modificándose con el tiempo de acuerdo con el entendimiento de los procesos de interacción entre microorganismos, y entre estos y la planta. Así, como se mencionó anteriormente, “control biológico” o “biocontrol” en un sentido muy amplio puede ser definido como el control de “un organismo por parte de otro” (Narayanasamy, 2013). Aunque el término también ha sido empleado en un sentido más amplio para designar “el uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir los efectos de organismos no deseados (patógenos) y favorecer organismos deseables como cultivos, arboles, animales, insectos y microorganismos benéficos” (Narayanasamy, 2013). El desarrollo de un microorganismo que controla a otro depende de diversos factores que favorecen una actividad antagónica, como se explicará más adelante para el caso de *Trichoderma* spp. Los agentes de control biológico fúngico pueden producir enzimas, compuestos antifúngicos y antibacterianos que pueden restringir el desarrollo de fitopatógenos (Narayanasamy, 2013).

Se han descrito los mecanismos mediante los cuales las especies del género *Trichoderma* interactúan con el fitopatógeno, entre los incluyen la liberación de metabolitos con actividad antifúngica, la competencia directa por los nutrientes y el espacio

disponibles y, por último, el micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). Estos mecanismos no actúan de manera aislada, sino que interaccionan de manera sinérgica obteniendo como resultado una mayor eficacia en la eliminación del agente infeccioso. Además de la capacidad de *Trichoderma* spp. para atacar o inhibir directamente el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, también pueden inducir la resistencia en plantas, tanto sistémica como localmente, contra un amplio número de enfermedades que son causadas por bacterias, hongos y virus (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

Es probable que las actividades de los agentes de control biológico (ACB) se vean influenciadas por varios factores, incluidos los requisitos de los ACB para el crecimiento y la reproducción, su supervivencia y perpetuación en las condiciones de campo, la naturaleza del patógeno, los requisitos de las plantas hospederas para obtener altos rendimientos, las condiciones del suelo, el microclima del dosel de los cultivos, los insumos agrícolas y las interacciones con otros organismos de la rizósfera y la filósfera. De estos factores, las condiciones ambientales pueden influir en los tres componentes que interactúan, es decir, la planta huésped, los agentes patógenos y el agente biocontrolador. El objetivo esperado de tener plantas sanas capaces de proporcionar productos libres de enfermedades depende de la capacidad de la planta huésped para superar los efectos nocivos del patógeno o patógenos con la ayuda activa de los agentes de control biológico.

## II.5.1 Mecanismos directos

### A) Micoparasitismo

Las relaciones antagónicas entre microorganismos se han clasificado en dos grupos principales atendiendo el nivel de agresividad hacia el hospedero. En el primer grupo se encuentran las interacciones de tipo biotrófico, en las cuales el micoparásito se alimenta del hongo blanco sin matarlo. En el segundo grupo se encuentran las interacciones necrotóficas, en las cuales el hongo micoparasítico ataca a su presa, primero detectándola y después orientando el crecimiento en dicha dirección; una vez producido el contacto, *Trichoderma* spp. se adhiere a su huésped enrollándose a su alrededor 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). El agente de control biológico puede

parasitar al patógeno y obtener nutrición de este, no solo de sus hifas, sino que también puede penetrar y destruir las estructuras de dispersión como los esclerocios y esporas, que le permiten al patógeno resistir condiciones ambientales adversas. (Narayanasamy, 2013). La actividad antagonista de los agentes de control biológico fúngico está asociada con la capacidad de producir enzimas degradadoras de la pared celular (denominadas con la abreviatura *CWDE* por sus siglas en inglés, *cell-wall-degrading-enzymes*). Por ejemplo, la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa es una *CWDE* importante involucrada en el micoparasitismo de *Trichoderma* spp. (Narayanasamy, 2013).

No existe evidencia contundente sobre el tipo de señal que es detectada por *Trichoderma* spp. para percibir a un hongo hospedero, aunque se piensa que la acción de enzimas hidrolíticas del propio micoparásito permiten la liberación de moléculas de señalización liberadas de la pared celular de la presa (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que las lectinas juegan un papel importante en el enrollamiento de *Trichoderma* spp. alrededor de la hifa del fitopatógeno (Leeder *et al.*, 2011; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

#### *B) Antibiosis*

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

### C) Competencia

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

En el caso de nutrientes orgánicos, se ha propuesto que *Trichoderma* spp. son capaces de competir en ambientes de baja concentración de glucosa por su capacidad para transportar al interior celular eficientemente dicho monosacárido, particularmente *T. harzianum*. En esta especie, se ha descrito un transportador con alta afinidad para la glucosa, denominado Gtt1, que se expresa solamente en ambientes donde la glucosa está presente en muy baja concentración (Benitez *et al.*, 2004). Una característica adicional relacionada con el éxito de *Trichoderma* spp. como competidor en suelo es su capacidad para sensor y responder a cambios de pH en el entorno. Mutantes de *T. virens* con un regulador transcripcional clave para la respuesta a modificaciones de pH, crecen más lentamente a un pH superior 7 y muestran una capacidad disminuida para sobrecrecer a *Rhizotconia solani* y *Sclerotium rolfsii*, aun en medio ácido (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

### D) Inducción de resistencia en plantas

La inducción de resistencia en plantas por parte de *Trichoderma* 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 descrito. 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).

## II.6 Aspectos fisiológicos de *Trichoderma* spp.

### II. 4. 1 Señales ambientales que influyen en la conidiación de *Trichoderma* spp.

La transición del micelio vegetativo a la producción de conidias está determinada por la interacción de señales ambientales, por lo que un factor por sí solo no es necesariamente suficiente para provocar cambios; más bien, es la combinación de factores lo que determina el resultado. Señales conocidas que influyen en la conidiación de *Trichoderma* spp. incluyen la luz, ritmos endógenos, relación de C:N, el pH ambiental del medio, calcio extracelular, daño físico al micelio y la presencia de compuestos orgánicos volátiles derivados de hongos. (Steyaert *et al.*, 2010).

#### A) Luz

La exposición a la luz es un componente importante de la producción comercial de conidios de *Trichoderma* spp.; sin embargo, sorprendentemente, durante mucho tiempo no se acumuló evidencia de optimización de esta señal morfogénica. Un régimen de luz típico durante la producción es ciclos alternos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, que se basa en la suposición de que esto refleja el ambiente; no obstante, en las zonas de clima templado esto es sólo "natural" para los hongos de la superficie en los equinoccios. En luz constante, la conidiación ocurre continuamente a través la colonia de hongos, mientras que bajo luz-oscuridad alterna

condiciones, los anillos concéntricos de formación de conidios pueden ser visto en los cultivos, y este es un rasgo característico de *Trichoderma* spp. Gutter (1957) presentó la teoría de competencia, que establece que solo las células de una edad específica son sensibles a la luz, como una explicación para la producción de anillos de conidiación. Usando *Trichoderma viride* como sistema modelo, dicho autor demostró que en una hifa es necesaria una edad mínima de aproximadamente 10 h para la fotoconidiación (conidiación inducida por la luz) y que el micelio de más de 20 h ya no responde al estímulo lumínico. Se asumió que, en condiciones de luz constante, todas las células se vuelven competentes cuando pasan a través de la fase metabólica de respuesta durante el desarrollo y crecimiento.

### B) pH

Se ha demostrado que el pH inicial del medio tiene un efecto sobre la conidiación y, a diferencia de la relación C:N, se ha demostrado que los niveles de pH favorecen tanto la conidiación como el crecimiento micelial. Los pH óptimos varían entre aislados, de 4.0 a 6.8. Si bien el pH inicial del medio tiene cierta influencia sobre la conidiación y el crecimiento, el propio cultivo de *Trichoderma* spp. modifica el pH del medio. Los cambios en el pH del medio dependen de las fuentes de nitrógeno; así, con fuentes de nitrógeno primarias (inorgánicas) el pH disminuye, mientras que la alcalinización ocurre cuando el medio se suplementa con fuentes de nitrógeno secundarias (orgánicas), o cuando el nitrógeno primario es limitante. Se ha demostrado que un pH ambiental bajo del medio de cultivo da como resultado una acidificación intracelular; en *T. viride* esto ocurre cuando las hifas se exponen a la luz; sin embargo, no se sabe si esta respuesta está restringida en un entorno con alta concentración de una solución reguladora o buffer. Es posible que, en los medios con pH regulados, el bajo pH ambiental estimule la acidificación intracelular y que la acidificación inducida por la luz esté restringida, mientras que en el medio sin buffer la luz estimule la acidificación intracelular, lo que lleva el pH interno por debajo del umbral de fotoconidiación (Steyaert et al 2010).

### C) Fuentes de Carbono y Nitrógeno

La producción comercial de conidios se basa típicamente en la manipulación de nutrientes y sustratos para promover la conidiación, lo que ha originado una investigación considerable



que aborda las condiciones óptimas de crecimiento para la conidiación *in vitro* en diversas especies de *Trichoderma*. A partir de la literatura existente, se desprende claramente que las fuentes de carbono y nitrógeno y particularmente la relación C:N, además del pH ambiental, son los principales factores nutricionales que influyen en la conidiación en *Trichoderma* spp. Se ha sugerido que la fuente de carbono es el determinante principal tanto para la conidiación en la oscuridad como para la conidiación inducida por la luz en *T. viride* y *T. atroviride* (Chovanec et al., 2001). Se han observado conidios en cultivos de *T. viride* cultivados en 30 de 32 fuentes de carbono, incluidos polisacáridos, aminoácidos y alcoholes. Las tasas de conidiación variaron según la fuente de carbono y el nivel de variación en cultivos en oscuridad. También se ha demostrado que la fuente y concentración de nitrógeno del medio ambiente regula la fotoconidiación (Steyaert et al., 2010). En presencia de fuentes de nitrógeno primarias, los organismos reprimen la expresión de genes necesarios para la utilización de fuentes secundarias y esto se denomina represión de catabólica de nitrógeno (NCR, por sus siglas en inglés). Bajo privación de nitrógeno, o cuando las fuentes primarias son bajas y las fuentes secundarias altas, se produce la desrepresión.

Las fuentes primarias de nitrógeno a base del grupo amino y amonio se utilizan habitualmente para inducir la represión catabólica de nitrógeno en hongos filamentosos, y el crecimiento en  $\text{KNO}_3$  u otros nitratos induce fuertemente la desrepresión del nitrógeno (Marzluf, 1997; ter Schure et al., 2000). Además, cuando se añaden cantidades crecientes de glutamina al medio sólido agar papa-dextrosa (PDA) para promover las condiciones de represión de nitrógeno, el patrón de conidios cambia de un anillo a un disco. En ausencia de nitrógeno suficiente, las células fúngicas pueden asimilar nitratos por reducción a amoníaco, que luego se convierte en glutamato o glutamina; así, el metabolismo primario del nitrógeno puede ocurrir cuando los nitratos son la única fuente de nitrógeno (Marzluf, 1997; Wiame et al., 1985). Las hifas almacenan y transportan aminoácidos en un sistema que permite la regulación de los genes del desarrollo mediante el control intracelular de nitrógeno (Olsson, 1999; Watkinson, 1999). Bajo condiciones de represión de nitrógeno en *T. asperellum*, tanto el nitrógeno primario extraído del medio ambiente como las reservas intracelulares generadas a través de la reducción de nitratos se pueden trasladar a la periferia de la colonia, manteniendo así la NCR en el frente de la hifa, que a su vez promueve la fotoconidiación en anillo.

#### D) Señalización de calcio

En eucariotas, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  sirve como mensajero secundario universal cuya concentración intracelular está estrictamente regulada. Se han identificado múltiples proteínas como “blancos” de  $\text{Ca}^{2+}$  en eucariotas; estos incluyen la calmodulina, protein-quinasas y proteínas similares a la calcineurina. En los hongos, el calcio juega un papel importante durante la diferenciación (Krystofova et al., 1995; Roncal et al., 1993; Silverman-Gavrila y Lew, 2003). En *T. viride*, el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular induce conidiación en cultivos sumergidos después de 48 h de incubación (Simkovic et al., 2008). Se desconoce el mecanismo por el cual el calcio induce la conidiación en *T. viride*; sin embargo, se ha demostrado que el calcio induce la conidiación independientemente del estado nutricional y las condiciones de luz, lo que sugiere una vía alternativa para la formación de conidios en *Trichoderma* spp. (Simkovic et al., 2008).

#### D) Lesión micelial

Se ha demostrado que la lesión física del micelio induce la conidiación en distintas especies de *Trichoderma*, lo que se descubrió incidentalmente durante un estudio mutacional, en el que genes clave involucrados en la mediación de las respuestas a la luz azul fueron eliminados en *T. atroviride* (Casas-Flores et al., 2004). Estas mutantes fueron incapaces de responder a la luz, pero durante el crecimiento conidieron en los sitios en que los cultivos del mutante hubiesen sido dañados por bisturí. Los autores investigaron más a fondo este mecanismo de inducción en la cepa silvestre y nuevamente se observó conidiación en respuesta a la lesión. Las cepas se cultivaron en total oscuridad y se lesionaron con un bisturí bajo una luz roja segura. De manera similar a la fotoconidiación, se ha demostrado que tanto la fuente y concentración de nitrógeno como el pH ambiental tienen un efecto interactivo sobre la conidiación inducida por daño micelial (Steyaert et al., 2010). El nitrógeno primario promueve la conidiación inducida por lesiones en *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. pleuroticola*, y en *T. atroviride* y *T. hamatum*, la conidiación inducida por lesiones es estrictamente bajo pH dependiente de los medios tamponados.

### *E) Ritmos biológicos*

En respuesta a las modificaciones cíclicas de luz, temperatura y otras influencias ambientales, los organismos se han adaptado a anticipar los cambios diarios a través de la evolución de ritmos circadianos (Lakin-Thomas & Brody, 2004). Estos ritmos han sido bien caracterizados en *Neurospora crassa*, que produce múltiples bandas de conidios en la oscuridad en una moda circadiana después de una sola exposición al azul y/o luz UVA (Dunlap et al., 2002). Similar a *N. crassa*, *Trichoderma* spp. también conidia en la oscuridad siguiendo la exposición a la luz; sin embargo, esta respuesta generalmente se considera no circadiana y estrictamente inducible por la luz. Más recientemente, un ritmo de conidiación endógeno, posiblemente circadiano, se ha descrito en *Trichoderma pleuroticola* (Steyaert et al., 2010). En cultivos de crecimiento en oscuridad de *T. pleuroticola*, se producen múltiples anillos de conidios a intervalos de aproximadamente 24 h, y aunque la luz no induce los anillos, una simple exposición a la luz a las 48 h restringe e intensifica la banda asociada. Deitzer y col. (1988) observaron un ritmo endógeno, en la sensibilidad a la luz en *T. atroviride*, mediado por conidiación foto inducida, pero no se observó conidiación rítmica en la oscuridad, y la conidiación en anillos era solo inducible por luz. Estos estudios sugieren diferencias en los ritmos endógenos asociados con la conidiación entre *T. pleuroticola* y *T. atroviride*; sin embargo, es importante señalar que la conidiación rítmica no se observa en todas las condiciones en *T. pleuroticola* y es fuertemente dependiente de la composición del medio (Steyaert et al., 2010).

### *F) Competencia por espacio y nutrientes*

La competencia por espacio y nutrientes ha sido considerada uno de los mecanismos en el biocontrol dentro del género *Trichoderma*, la cual es definida como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato y/o nutrientes), siempre y cuando la utilización por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Infante et al., 2009). La ubicuidad en suelos y rápida tasa de desarrollo de las especies del género *Trichoderma*, les permite competir por espacio durante la colonización de la rizósfera. Asimismo, la producción de enzimas hidrolíticas les permite degradar eficiente y versátilmente la materia orgánica y utilizarlos como fuente de carbono

y nitrógeno, lo que posibilita colonizar el sustrato y evitar la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat. También se ha reportado que algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de producir sideróforos, los cuales quelan los iones hierro, generando un déficit de nutrientes para otros hongos p. ej. *Botrytis cinerea* (Blaszczyk et al., 2014). Otra característica recientemente reportada en cepas de *T. harzianum*, es la producción y actividad mejorada de hidrofobinas durante la colonización de la raíz de la planta, lo que permite la unión de filamentos miceliales a superficies de raíces hidrófobas. Además, las cepas de *Trichoderma* spp. son resistentes a fitoalexinas, flavonoides, terpenoides y fenoles que son compuestos tóxicos producidos por las plantas en respuesta a infecciones (Blaszczyk et al., 2014).

## II. 7 Germinación en *Trichoderma* spp.

La germinación en *Trichoderma* spp. depende de diversos factores ambientales que incluyen al pH del medio, la incidencia de luz y la limitación y el tipo de fuentes de C y N (Hjeljord y Tronsmo, 2003). Así, el pH del medio afecta la viabilidad de las conidias, como se ha observado en *T. atroviride*, en el cual se ha observado que conidias producidas a pH 4 mostraron un porcentaje de germinación menor en comparación con las producidas a pH 7 (Steyaert et al., 2017). También se ha documentado que conidias de productos de biocontrol de *T. harzianum* pueden germinar entre los 12 y los 25 °C, aunque con diferencias en el tiempo que inician el proceso a cada temperatura (Hjeljord et al., 2000). En el caso de conidias de *T. stromaticum*, estas germinan de manera óptima entre los 20 y los 30 °C, y a 15 °C lo hacen en bajo porcentaje, no observándose germinación a los 35 °C (Sanogo et al., 2002). En *T. atroviride* se ha documentado que la capacidad de germinación se ve influenciada por la temperatura a la cual se producen las conidias. En dicha especie, las conidias que se producen a 30°C tienen una mejor capacidad de germinación que las generadas a 20 y a 25°C (Daryaei et al., 2016a). Se ha postulado que esta variación obedece en parte a la capacidad para acumular a cada temperatura azúcares o ácidos grasos que son importantes para la germinación (Daryaei et al., 2016b). El medio de cultivo es un factor que influye en la germinación de conidias, ya que en *T. harzianum* se observa una mejor conidiación en medio papa-dextrosa agar, en comparación con caldo de extracto de malta (Harman et al., 1991).

## II. 8 Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en *Trichoderma* spp.

Como se ha mencionado previamente, *Trichoderma* es un género compuesto de especies con gran versatilidad metabólica, capaces de utilizar una amplia variedad de biomasa, oligosacáridos como sacarosa, rafinosa y polisacáridos como celulosa, inulina, quitina, pectina, y almidón (Sandle, 2014). Las especies dentro del género también aprovechan sustratos más complejos como suero de leche, hidrocarburos e incluso plaguicidas, contribuyendo potencialmente a su degradación (Guoweia et al., 2011). Además, son capaces de utilizar y degradar residuos lignocelulósicos con contenidos variables de celulosa (40-55%), hemicelulosa (25-50%), y lignina (10-40%), dependiendo de si la biomasa de procedencia es madera dura, madera blanda, o rastrojo (la Grange et al., 2010). En el proceso de hidrólisis de residuos lignocelulósicos se logra obtener productos como hexosas monoméricas (glucosa, manosa y galactosa), y pentosas (xilosa y arabinosa) (Dashbatan et al., 2009). Los organismos capaces de degradar celulosa secretan un complejo de celulasas con diferentes especificidades y modos de acción. Este complejo incluye endoglucanasas (endo-1,4-  $\beta$ -glucanasas), celobiohidrolasas o exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Castrillo et al., 2015). La lignina es degradada por la interacción de diversas enzimas extracelulares, principalmente fenoxidasas (lacasas) y peroxidasas (manganeso-peroxidasa y lignina-peroxidasa) (Barreto et al., 2011) produciendo compuestos fenólicos tales como ácido ferúlico, ácido vanílico, entre otros, y alcoholes como guaiacol y catecol (Ibraheem y Ndimba, 2013). El xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa, la  $\beta$ -1,4-endoxilanasas y la  $\beta$ -xilosidasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de la cadena principal y representan los principales componentes del sistema xilanolítico (Dashtban et al., 2009). La conversión biológica de biomasa lignocelulolítica a azúcares simples está constituida de dos pasos básicos, que constan de un pretratamiento físico o químico de los residuos, y de la hidrólisis enzimática de los mismos (Figura 2).

Debido a esta versatilidad metabólica de *Trichoderma* spp. basada en gran medida en la producción de distintas enzimas hidrolíticas y oxidativas extracelulares, las especies del género se han considerado como una fuente práctica de enzimas de relevancia industrial, incluyendo aquellas utilizadas en el área alimenticia, tales como celulasas, glucanasas, xilanasas, pectinasas, y laminarinasas (Sandle, 2014). En la Tabla 2 se presentan ejemplos de enzimas producidas por diversas especies de *Trichoderma*. Así, *T. reesei* es una de las

especies más utilizadas a nivel industrial para la producción de enzimas por su capacidad de degradar celulosa (Schuster y Schmoll, 2010), aunque el costo del medio de cultivo es la limitante primordial en estos procesos, por lo que para la producción de estas enzimas se han utilizado otros sustratos, que aportan la misma fuente de carbono, como lo son los residuos lignocelulolíticos tales como paja de trigo, bagazo, lodos de papel usado, residuos de papel periódico y madera de álamo (Guoweia et al., 2011).

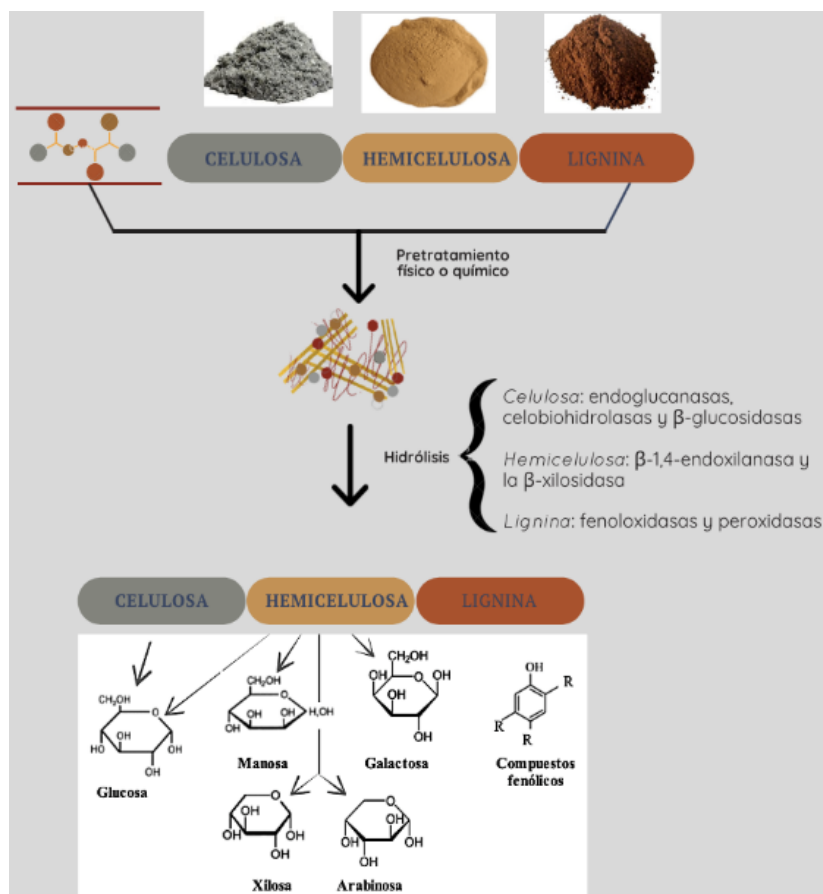
**Tabla 2.** Ejemplos de enzimas producidas por *Trichoderma* spp. empleando diferentes sustratos, se resalta en color morado las especies de *Trichoderma* que fueron de particular interés en el presente trabajo.

| Cepa de <i>Trichoderma</i>                       | Enzima                             | Sustrato  | Referencia                             |
|--|------------------------------------|---|--|
| <i>T. harzianum</i>                              | Quitinasas                         | Medio mineral   | Azin et al., 2007                      |
| <i>T. viride</i> ATCC                            | Celulasas                          | Salvado de trigo, medio líquido Mandel's  | Subramaniyam y Vimala, 2012            |
| <i>T. reesei</i>                                 | Celulasas, Hemicelulasas           | Medio mineral   | Sandle, 2014                           |
| <i>T. longibratum</i>                            | Xilanasas                          | Medio mineral   | Sandle, 2014                           |
| <i>T. asperellum</i>                             | Glucanasas, quitinasas             | Almidon, pared celular de <i>Rhizoctonia</i> (PCRS), quitina coloidal, laminarina                             | Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015 |
| <i>T. koningiopsis</i>                           | endo-1,4-β-glucanasas              | Aserrín de pino   | Castrillo et al., 2015                 |
| <i>T. longibrachiatum</i> /H. <i>sagamiensis</i> | celulasas, glucanasas e hidrolasas |   | Torres-De la Cruz et al., 2015         |
| <i>T. inhamatum</i> BOL 12 QD                    | Celulasas, Quitinasas, proteasas   | Quitina coloidal carboximetilcelulosa   | Garcia-Espejo et al., 2016             |
| <i>T. viride</i> EF-8                            | Pectinasas                         | Pieles de cebolla Egipcia ( <i>Allium cepa</i> L.)  | Abdel-Mohsen et al., 2016              |
| <i>T. viride</i> IR05                            | Xilanasas                          | Salvado de trigo, arroz pulido, cáscara de arroz, harina de soja, harina de girasol, bagazo de caña de azúcar | Soccol et al., 2017                    |
| <i>T. asperellum</i>                             | Hemicelulasas                      | Manojo de palma de aceite y frutos secos  | Ajjolakewu et al., 2017                |

Estudios previos han documentado la gran variabilidad entre especies y variantes geográficas de la misma especie de *Trichoderma*, con relación a la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares. En varios de estos trabajos se ha buscado establecer correlaciones entre la capacidad antagónica y la capacidad para producir enzimas hidrolíticas extracelulares, particularmente aquellas relacionadas con la degradación de la pared celular de microorganismos fitopatógenos. Recientemente, se han usado herramientas modernas para analizar las enzimas extracelulares en *Trichoderma* spp. Así, el análisis comparativo del secretoma de la cepa Rut C30 de *T. reesei* con el de la cepa S4F8 de *T. asperellum* muestra

que se produce un conjunto de enzimas lignocelulolíticas más completo por parte de la segunda especie, en comparación con la primera, con un mayor potencial para la hidrólisis de hemicelulosa y celobiosa (Marx et al., 2013).

El análisis de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. mostró que las tres cepas que presentaron los mayores valores de actividad extracelular de quitinasa,  $\beta$ -1-3 glucanasa y proteínasa, también fueron las que presentaron mejores niveles de antagonismo e inhibición del crecimiento de distintos hongos fitopatógenos (Islam et al., 2016). Dichas cepas fueron identificadas como *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. virens*. Una cepa de *T. harzianum*



**Figura 2.** Productos de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos (Zepeda-Vidales, hecha con Canva.com).

seleccionada entre 336 aislados de hongos silvestres mostró niveles altos de actividad extracelular de  $\beta$ -1-3 y  $\beta$ -1-6 glucanasa y quitinasa (Alamri et al., 2012). En concordancia con estos estudios, se documentó una correlación positiva entre aquellas cepas de *Trichoderma* que presentaron los mejores niveles de antagonismo contra *Sclerotium rolfssii*,

y el nivel de actividad extracelular de exoquitinasa, aunque en el caso de  $\beta$ -1-3 glucanasa, dicha correlación fue débil (John *et al.*, 2015); la cepa que mostró los mejores niveles de la primera enzima y antagonismo fue identificada como *T. harzianum*. En contraste, Gajera y Vakharia (2010) reportan una correlación positiva entre la producción de las tres enzimas hidrolíticas quitinasa,  $\beta$ -1-3 glucanasa y proteasa, con la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp. de diferentes especies contra *Aspergillus niger*. Esta correlación entre capacidad para producir enzimas extracelulares hidrolíticas que degradan la pared celular fúngica y el antagonismo o biocontrol de hongos fitopatógenos también ha sido reportada a nivel intra-específico, particularmente en el caso de *T. asperellum*, en el cual aquellas cepas con mayores niveles de actividad extracelular de quitinasa y glucanasa fueron las mejores antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (El-Komy *et al.*, 2015).

Recientemente, el estudio de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. mostró que las mejores productoras de N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa y  $\beta$ -1-3 glucanasa también mostraban mayor eficacia en campo para proteger al frijol común contra *Sclerotinia sclerotiorum*; el análisis de componentes principales en dicho estudio indica que los ensayos *in vitro* tanto de estas actividades enzimáticas como del micoparasitismo contra los esclerocios del fitopatógeno, son buenos predictores de cepas con potencial para el biocontrol (Geraldine *et al.*, 2013). Por otro lado, el análisis de 119 cepas de 12 especies distintas de *Trichoderma* spp. aisladas de madera en descomposición mostró que todas ellas eran capaces de degradar celulosa y presentaron actividad extracelular de xilanasas (Błaszczuk *et al.*, 2015). No obstante, dicho estudio mostró variaciones inter e intra-específicas estadísticamente significativas en la producción de celulosa, pero no mostró diferencias en la actividad de xilanasas. De la misma forma, el análisis de 193 cepas de *Trichoderma* spp., mostró que estas se acomodaban en 22 especies distintas y que cepas representativas de cada una de estas especies producía quitinasa, proteasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa extracelulares (Kamala *et al.*, 2015).

Como se puede apreciar, los estudios citados anteriormente, demuestran que existe una variación intra e interespecífica en la producción de enzimas de *Trichoderma* spp. Con el paso de los años se han identificado nuevos compuestos producidos por diversas especies de *Trichoderma*, cuyo interés en la agricultura y en la biotecnología ha incrementado; por ello es por lo que el aislamiento y la identificación de nuevas cepas de este género fúngico y la



caracterización y efectividad biológica de sus metabolitos resultan de interés para diversas industrias.

## II.9 *Trichoderma* spp. en agroecosistemas

En relación con áreas agrícolas, el análisis de rizósfera de plantaciones de café en Etiopía mostró la presencia de las especies *T. harzianum sensu lato*, *T. hamatum*, *T. asperelloides*, *T. spirale*, *H. atroviridis/T. atroviride*, *H. koningiopsis/T. koningiopsis*, *T. gamsii* y *T. longibrachiatum* (Belayneh-Mulaw et al., 2010). A nivel de planta, se ha encontrado que en hojas de cacao prácticamente la única especie presente es *T. asperellum* (Rosmana et al., 2015). Por otra parte, evidencia filogenética y ecológica indica que, dentro de un mismo ecosistema, a nivel global, existen especies de *Trichoderma* específicas de tejido foliar de las plantas, así como aquellas que son específicas de suelo (Chaverri y Samuels, 2013).

La evidencia anterior indica que, al analizar los compartimentos de un agroecosistema, se encontrará baja diversidad de especies de *Trichoderma* en cada compartimento analizado, pero las especies serán distintas entre éstos. Adicionalmente, cuando se realizan análisis para evaluar la comunidad de *Trichoderma* spp. en agroecosistemas, se estudia de manera independiente a las especies endófitas de raíz de las de tejido foliar y las de suelo, por lo que a la fecha no existe ningún estudio en el que de manera simultánea se estudie la diversidad de especies en los tres tipos de muestras. Dado lo anterior, no existen comparaciones de la eficiencia antagónica *in vitro* contra hongos fitopatógenos entre especies/cepas de *Trichoderma* provenientes de los tres compartimentos mencionados de un agroecosistema, evidencia que puede revelar diferencias ecofisiológicas inter-específicas en especies/cepas de un mismo ambiente.

### III. HIPÓTESIS

Las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. aisladas de un mismo compartimento de un agroecosistema de sorgo presentan características fisiológicas significativamente similares entre sí, pero distintas de las cepas provenientes de otros compartimentos del mismo agroecosistema.

### IV. OBJETIVOS

#### IV.1 Objetivo General

Realizar un estudio fisiológico comparativo entre cepas de *Trichoderma* spp. aisladas del mismo agroecosistema de sorgo.

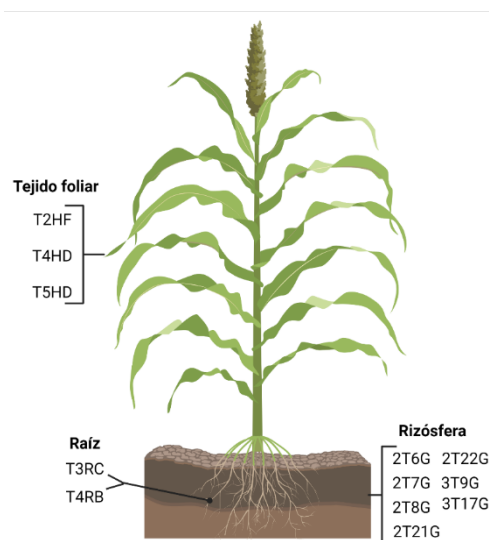
#### IV.2 Objetivos Particulares

- i. Evaluar el crecimiento del micelio vegetativo de las cepas de estudio en diferentes condiciones de incubación.
  
- ii. Analizar la capacidad de conidiación de las cepas de estudio en distintas condiciones de cultivo.
  
- iii. Realizar un análisis filogenético de las cepas de estudio no identificadas.
  
- iv. Comparar la capacidad de germinación de las conidias de las cepas de interés.
  
- v. Estudiar la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de relevancia en el micoparasitismo o industrial en las cepas de *Trichoderma* spp. de interés.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1 Cepas de estudio

Se analizaron un total de 12 aislados silvestres de *Trichoderma* spp. obtenidos en 2017 de un cultivo de *Sorghum* sp. del municipio de Tarímbaro, Michoacán, México (19° 48' N – 101°10'O), los cuales fueron depositados en el Cepario Michoacano Universitario (CMU), perteneciente al Laboratorio de Biotecnología y Conservación de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo del estado de Michoacán. A todos los aislados se les asignó una clave para indicar el sitio y tipo de muestra de procedencia de cada uno dentro del área de cultivo muestreada (Flores-Cervantes, 2019). La letra “T” seguida de un número representa el transecto de donde se obtuvo el aislado, la letra siguiente representa el compartimento de agroecosistema de donde se obtuvo el aislado, una H para tejido foliar/hojas y una R para raíz, y una G para suelo/rizósfera. La letra final en cada clave se asignó para diferenciar entre los aislados por transecto (A). Los aislados utilizados con su clave y compartimento del agroecosistema de proveniencia se muestra en la figura 3.



**Figura 3. Aislados de *Trichoderma* spp. estudiados en el presente trabajo.** Se muestra el código de cada aislado y la muestra de la cual se obtuvo del agroecosistema de sorgo (*Sorghum* sp.). Para detalles sobre los códigos ver texto (Vázquez-Marrufo, hecha con Biorender.com).

## V.2 Medios de cultivo

### *Medio Agar Papa Dextrosa (PDA)*

Este medio se empleó para mantener en crecimiento activo el micelio vegetativo de los aislados estudiados, así como para realizar cinéticas de crecimiento a distintas temperaturas de incubación y para realizar ensayos de germinación de conidias. Se empleó el medio comercial BD Bioxon (USA), preparado de acuerdo con las instrucciones del proveedor, disolviendo 39 g en 1 L de agua destilada y esterilizando en autoclave a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 minutos.

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

Este medio se utilizó para realizar cinéticas de crecimiento de los aislados de estudio a distintas temperaturas de incubación. Se empleó el medio comercial BD Bioxon (USA), preparado de acuerdo con las instrucciones del proveedor, disolviendo 39 g en 1 L de agua destilada y esterilizando en autoclave a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 minutos.

### *Medio Mínimo Vogel (MMV)*

Este medio se utilizó para la determinación semicuantitativa de la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares por parte de las cepas de estudio, así como para el mantenimiento del micelio vegetativo y la generación de inóculos para los ensayos de actividad enzimática. En la preparación del medio se utilizó una solución stock (50X) compuesta por (g/L): Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O, 150; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5; biotina a 5 mg/100 mL en etanol al 50% (v/v), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL. La solución de oligoelementos contiene (g/L): ácido cítrico·2H<sub>2</sub>O, 5; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 5; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.072; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.05. Para la siembra de las cepas, el stock se diluyó en agua destilada hasta la obtención de una concentración final 1X y se le adicionó 1.5 % (p/v) de glucosa y agar bacteriológico (15 g/L). Se esterilizó a 121°C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 minutos.

### V. 3 Obtención de inóculos

Las cepas fueron obtenidas de la colección de cultivos 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). Fue necesario confirmar su viabilidad celular, razón para lo cual se recuperó un inóculo de la periferia de cada una de las cepas conservadas en las placas Petri y se inocularon en Medio PDA (BD Bioxon, USA). Los cultivos se incubaron a 28°C y se realizó una evaluación del desarrollo del micelio. A partir de estos cultivos se realizó nuevamente una resiembra y se incubaron a 28°C hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica. Se tomaron inóculos de 6 mm de diámetro del borde del micelio vegetativo de la colonia en crecimiento activo de cada cepa y se colocaron en placas Petri en Medio PDA y se almacenaron en refrigeración.

De las cepas almacenadas se realizaron los cultivos para la obtención de inóculos. Las figuras cilíndricas con micelio se posicionaron al centro de placas Petri con medio PDA y se incubaron a 28°C hasta que el crecimiento micelial cubriera 2/3 partes de la caja, instante en el cual se obtuvieron inóculos del borde del micelio, con un sacabocados de 6 mm de diámetro los cuales sirvieron como inóculo en todos los experimentos realizados. Las resiembras fueron continuas y todos los inóculos fueron obtenidos mediante esta técnica.

### V. 4 Elaboración de cinéticas de crecimiento y registro de conidiación

La determinación de la capacidad de crecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp. se analizó en los medios PDA y AEM. Cajas Petri de 95 mm de diámetro con dichos medios se inocularon colocando un cilindro de 6 mm de diámetro en el centro obtenido del borde de una colonia en crecimiento activo de cada cepa. Los medios así inoculados se incubaron en oscuridad a temperaturas de 16°C, 28°C y 36°C, en experimentos independientes. El diámetro de las colonias se midió cada 24 horas durante 10 días, hasta que el medio fue totalmente cubierto por el micelio de cada aislado. Cada ensayo se realizó por triplicado. Adicionalmente, para cada aislado también se registró el inicio del desarrollo de conidias en cada condición de cultivo.

### **V. 5 Cosecha y conteo de conidias**

Una vez que el micelio de los aislados crecidos en medio PDA a una temperatura de 28°C cubrió el medio de cultivo y a simple vista se observaron colores característicos de conidiación en *Trichoderma* spp., se procedió a cosechar las conidias producidas. Para tal fin, se adicionaron 2 mL de agua destilada estéril a la placa con micelio y se frotó gentilmente la superficie de la colonia con una espátula de Drigalsky esterilizada para desprender a las conidias del conidióforo y suspenderlas en el agua agregada. Se recuperaron las conidias suspendidas en el agua y se transfirieron a tubos cónicos graduados de 10 mL. Las conidias así cosechadas se centrifugaron por 10 min a 250 x g, retirando el sobrenadante y se realizaron varios lavados, añadiendo 5 mL de agua destilada estéril agitando en vórtex durante 30 s, centrifugando por 10 min a 250 x g y retirando sobrenadante. Este procedimiento se repitió hasta que el agua sobrenadante se observó transparente, indicando la ausencia de medio de cultivo, restos celulares y micelio. Se realizó un conteo de la suspensión de conidias en una cámara de Neubauer, para determinar el número de conidias por mL en cada cepa de estudio.

### **V. 6 Determinación de porcentajes de germinación de conidias**

Para evitar efectos de almacenamiento sobre los resultados, los ensayos de germinación se realizaron en la misma semana en que se cosecharon las conidias. De acuerdo con la concentración de conidias obtenida para cada aislado, se realizaron diluciones para sembrar 50 conidias por placa en 1 mL de agua destilada estéril. Se tomó una alícuota de la suspensión conidial, la cual se agitó 15 s en vórtex para resuspensión del paquete conidial. Dicho volumen fue utilizado para esparcir de manera homogénea con una espátula de Drigalsky en toda la placa Petri con medio PDA. Las placas con medio así inoculadas se incubaron en experimentos independientes por triplicado a 28°C en oscuridad. Las cajas se analizaron cada 12 h para observar la aparición de colonias, indicando la germinación conidial.

### **V.7 Análisis genético molecular**

#### *Extracción de ADN*

El ADN genómico se extrajo de muestras de micelio recuperado de cultivos en medio PDA con 72 h de crecimiento. El micelio se cosechó y se transfirió a un microtubo de centrifuga de 1.5 mL al cual se le adicionaron 400 µL de buffer de lisis (SDS 0.5% p/v, NaCl 250 mM,

EDTA 25 mM, Tris-HCl 200 mM, pH 8.5). Se agregó la matriz de lisis C (MP Biomedicals) en un equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals), agitando durante 40 min. Posteriormente se agregaron 500 µL de una mezcla fenol-cloroformo (1:1 v/v) equilibrada a pH 8.0 y se agitó en vortex durante 1 minuto. Se centrifugó a 11,300 x g por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregó 1 µL de RNasa (0.5 U/ µL) incubando a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se agregó un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, centrifugando de la manera previamente descrita. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 300 µL de etanol al 70%. Después de que se evaporara por completo el etanol residual, la pastilla de ADN se disolvió en 50 µL de agua desionizada esterilizada y se almacenó a -20 °C para su posterior uso. La calidad del ADN obtenido se comprobó en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con Syber Safe (Invitrogen, USA) a una concentración final de 0.5 µg/mL.

#### *Ensayos de PCR*

El ensayo de la amplificación de la región ITS (*ITS1-5.8-ITS2*) de la Unidad Ribosomal Nuclear de los hongos aislados se llevó a cabo utilizando el par de oligonucleótidos ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC -3') (White et al., 1990). Para la amplificación del gen del factor de elongación de la traducción 1α (*tef1*), se utilizaron los primers específicos para *Trichoderma* spp.: *tef1fw* (5'-GTGAGCGTGGTATCACCATCG-3') y *tef1rev* (5'-GCCATCCTTGGAGACCAGC-3') (Kullnig-Gradinger et al., 2002). La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: Buffer Tris-HCl (10 mM, pH 8.0), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), dNTP's (0.25 mM de cada uno), 0.5U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, USA) y 2.5 ng totales de ADN. El volumen final se ajustó a 25 µL con agua desionizada esterilizada. El protocolo de amplificación fue el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, con una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa 2% teñidos con Syber Safe (Invitrogen, USA), y fueron secuenciados por Elim Biopharmaceuticals, Inc. (USA).

#### *Análisis de filogenético*

Las secuencias se editaron de manera manual para remover los extremos con posiciones indeterminadas. Ninguna de las secuencias presentó posiciones ambiguas en la región interna. Las secuencias se compararon de manera con las ya existentes registradas en las bases de datos de GenBank por medio del algoritmo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias con mayor porcentaje de similitud con respecto a las obtenidas en este trabajo se seleccionaron creando un archivo Fasta tanto para las secuencias ITS como para las  $1\alpha$  (*tef1*). Con el archivo fasta generado para cada conjunto de secuencias se realizó un alineamiento múltiple empleando el servidor MAFFT (Kato et al., 2019). El archivo Fasta obtenido del alineamiento generado se utilizó para determinar el mejor modelo evolutivo empleando el servidor IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). Empleando el mismo servidor, se generaron los árboles filogenéticos mediante el criterio de Máxima Verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*) empleando los modelos evolutivos TIM2e+I+G4 y HKY+F+G4 para las regiones ITS y parcial del gen  $1\alpha$  (*tef1*), respectivamente, de acuerdo con el Criterio de Información Bayesiano (BIC, *Bayesian Information Criterion*). Los árboles filogenéticos generados se editaron empleando el servidor iTOL (Letunic y Bork, 2021).

### **V.8 Secuenciación y análisis filogenético**

El alineamiento de las secuencias se realizó empleando el servidor MAFFT con los parámetros por default (Kato et al., 2017) y se optimizó utilizando GUIDANCE2 empleando 100 árboles alternativos (Sela et al., 2015). Las secuencias fueron editadas de forma manual para suprimir los extremos en los cuales no era posible adicionar los nucleótidos correspondientes. El alineamiento obtenido se utilizó para obtener modelo evolutivo empleando el software ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Los árboles filogenéticos se generaron empleando el modelo bayesiano para calcular las distancias genéticas. El árbol generado mediante el criterio de ML se construyó empleando el paquete IQ-TREE (Nguyen et al., 2015; Trifinopoulos et al., 2016) obteniendo los valores de SH-aLRT support (%)/ aBayes support/ultrafast bootstrap (UFBoot) support para cada bifurcación (Hoang et al., 2018), después de 1000 iteraciones. La edición del árbol filogenético obtenido se realizó empleando el software FigTree (Rambaut, 2009).



## V. 9 Detección de actividad enzimática hidrolítica extracelular

### *Protocolo para la detección de proteasas*

Se detectó la actividad proteolítica mediante el método de Hankin y Anagnostakis (1975), empleando gelatina de piel porcina (Sigma, USA) al 0.4 % (p/v) como sustrato en agar al 1.6 % (p/v), a pH 6. El medio se esterilizó a 121°C (15 lbf/in<sup>2</sup>) por 15 min y se adicionó en placas de Petri de 9 cm de diámetro, y las cepas de estudio se inocularon en el centro de la placa con inóculos de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. Las placas con medio así inoculadas se incubaron a 28 °C durante 1 a 3 días, dependiendo del aislado de estudio, hasta que la colonia alcanzó 30 mm de diámetro. Al término del periodo de incubación se añadió al medio con la colonia desarrollada como agente revelador una solución saturada de sulfato de amonio, la cual precipita la proteína no degradada opacando el medio de cultivo. La reacción positiva se determina observándose una zona clara alrededor de la colonia debida a la hidrólisis de la proteína, contra un fondo opaco en el resto del medio, en donde no hubo precipitación. Para la determinación semicuantitativa de la actividad enzimática se estableció una escala de acuerdo con el diámetro del halo: clase 1 = Alta actividad enzimática, diámetro del halo 2.1 – 3.0 cm, clase 2 = Actividad enzimática intermedia, diámetro del halo 1.1 – 2.0 cm, clase 3 = Actividad enzimática baja, diámetro del halo 0 - 1 cm.

### *Protocolo para la detección de xilanasas*

El método utilizado para la detección de esta actividad enzimática fue el de Pointing (1999), el cual se describe brevemente a continuación. Los inóculos para este ensayo fueron obtenidos de la manera previamente descrita. Dichos inóculos crecieron en Medio Basal Xilanólisis (MBX) compuesto por (g/L): C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; extracto de levadura, 0.1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.001; peptona, 0.1. El medio se solidificó con agar bacteriológico (Bioxon, USA) al 1.6% (p/v), y se suplementó con 0.4 % (p/v) de glucosa. Para la detección de xilanasas, se le añadió al MBX xilana (Sigma, USA) al 4%(p/v) y 1.6% de agar. Los dos medios se esterilizaron de la manera previamente descrita y después de inocularse, se incubó a 28 °C en oscuridad. Las placas se revelaron cuando el diámetro de la colonia alcanzó los 50 mm (1-3 días, dependiendo de la cepa). Para el revelado se añadieron 3 mL de solución de Lugol (I<sub>2</sub>/KI) para cubrir totalmente la superficie del medio, permitiendo

a dicho revelador actuar durante 5 minutos en reposo, enjuagando posteriormente con agua destilada. La degradación de xilano alrededor de las colonias aparece como un área de color amarillo opaco. De acuerdo con la bibliografía del método utilizado, una reacción positiva indica la degradación del sustrato por actividades enzimáticas de endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas. La actividad de xilanasas se determinó semicuantitativamente por la intensidad de la coloración y el diámetro del halo, usando la siguiente escala: clase 1 = actividad enzimática alta, diámetro del halo 4.1 – 5.5 cm, clase 2 = actividad enzimática intermedia, diámetro del halo 2.1 – 4.0 cm, clase 3 = actividad enzimática baja, diámetro del halo 0 - 2 cm.

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

Las actividades enzimáticas de la celulasa y quitinasa se realizaron en un medio basal compuesto por (g/L):  $C_4H_{12}N_2O_6$ , 5;  $KH_2PO_4$ , 1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5; extracto de levadura, 0.1;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.001, esterilizado de la manera previamente descrita. Se añadieron 6 mL de medio basal a tubos de ensayo de 15 mL con una inclinación de 45°, al gelificarse se agregó una cubierta de 0.6 mL del medio compuesto por (g/L): extracto de levadura, 2; azure-celulosa (Sigma, USA) o azure-quitina (Sigma, USA), 4.38 g para cada uno en medios independientes y agar, 15 g. Una vez gelificado el medio de cobertura con el sustrato se colocaron inóculos obtenidos de la manera previamente descrita. La presencia de cada actividad enzimática fue monitoreada durante 12 días, la coloración en el medio basal se relacionó a la actividad enzimática, y los ensayos de ambas enzimas se realizaron por triplicado. El fundamento de esta técnica indica que cuando la cepa en estudio posee la actividad buscada, se libera o precipita al colorante (azure) del resto de la molécula, el cual se disemina al medio basal cambiando su coloración. La escala semicuantitativa de actividad que se utilizó fue: clase 1= actividad enzimática alta (color violeta); clase 2= actividad enzimática intermedia (color azul claro); clase 3= actividad enzimática baja (sin cambio de coloración).

#### **V. 10 Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces por triplicado, calculando el promedio y la desviación estándar. En el caso de las cinéticas de crecimiento y los

experimentos de germinación de conidias, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías y una prueba de Tukey para la comparación de medias y determinar las diferencias significativas con valor de significancia de  $P < 0.05$ . Todos los experimentos se realizaron en Minitab Statistical Software perteneciente a un sistema operativo macOS Big Sur en una máquina con CPU Intel Core i5 de dos núcleos 1.4GHz, GPU Intel HD Graphics 5000.

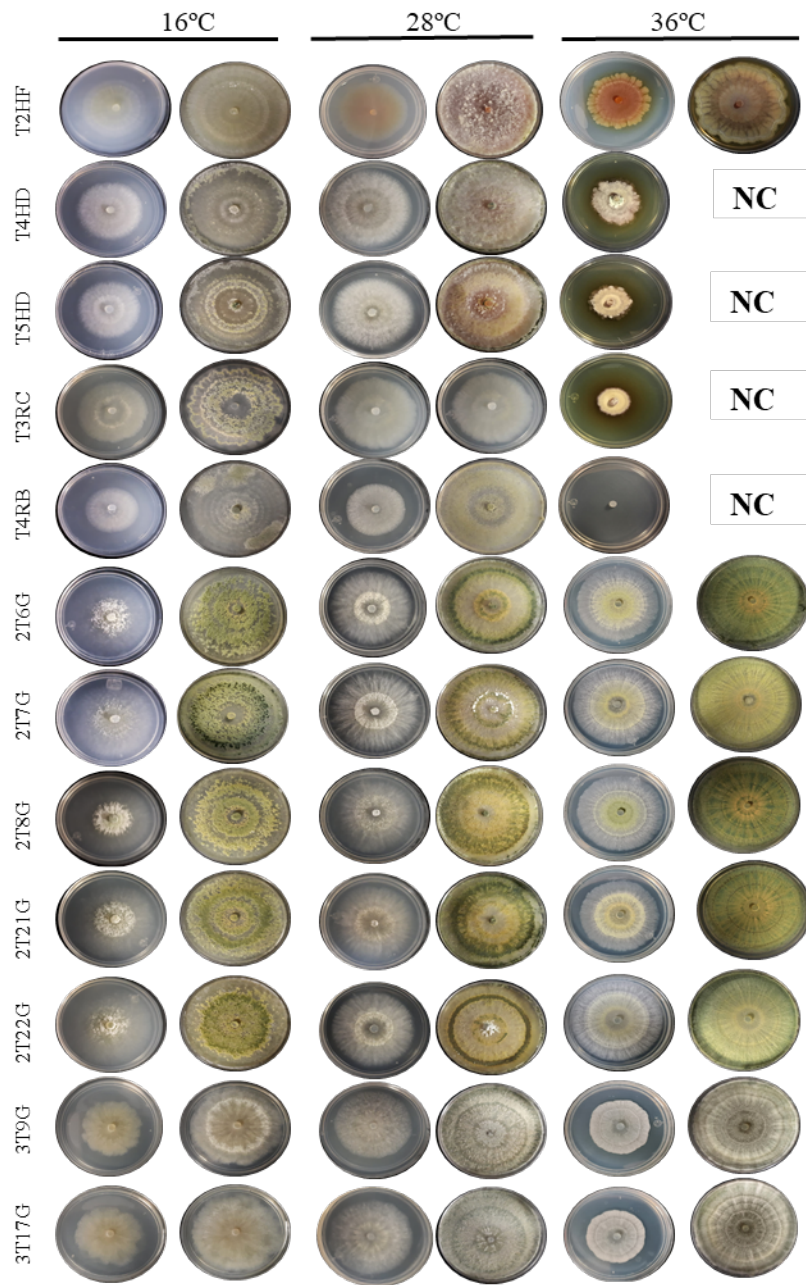
## VI. RESULTADOS

### VI. 1 Viabilidad celular de las cepas de estudio

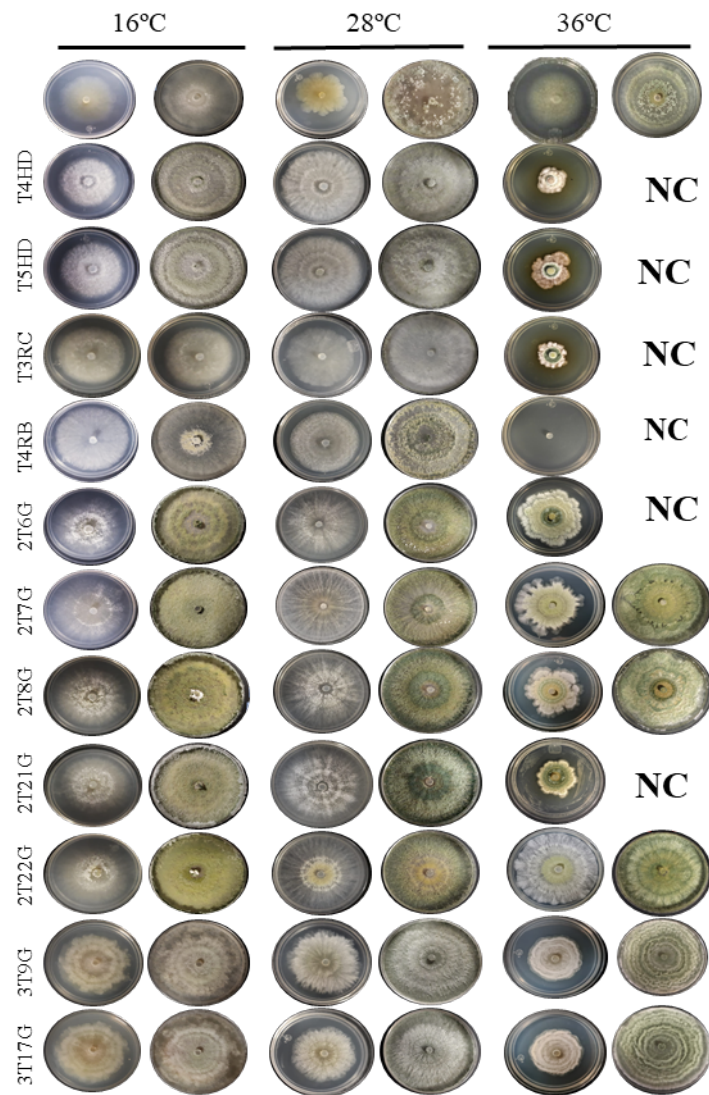
Las doce cepas analizadas se encontraban almacenadas en medio PDA a temperatura ambiente, resguardadas en el Cepario Michoacano Universitario (CMU), por lo que tuvieron que recuperarse y fue necesario comprobar su viabilidad. Al ser recuperadas inoculándolas en PDA, todas las cepas mostraron viabilidad, iniciando el crecimiento de micelio sobre la superficie del medio de cultivo. Al prolongarse la incubación por varios días, las colonias desarrollaron micelio aéreo de aspecto algodonoso-aterciopelado, con borde regular y mostrando anillos hialinos delgados, dependiendo del aislado (Figuras 4 y 5). La conidiación fue evidente a nivel macroscópico ya que en las cepas mostraron coloración amarilla-verde que con el tiempo oscurecía el color a uno más fuerte, dependiendo del aislado. El aislado T2HF mostró una pigmentación de medio amarilla-roja muy peculiar a 36 °C en medio PDA (Figura 4) . De las colonias que se obtuvieron en los cultivos de recuperación, se utilizó micelio empleado para las re-siembras semanales con la finalidad de mantener el crecimiento activo y como fuente de inóculo para los ensayos posteriores.

### VI. 2 Cinéticas de crecimiento de las cepas de estudio

Se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas de estudio a diferentes temperaturas en los medios PDA y AEM, con la finalidad de evaluar su capacidad de desarrollo micelial y el potencial de conidiación en ambos medios a distintas temperaturas de incubación. A la temperatura de incubación de 28 °C, todos los aislados de estudio cubrieron la superficie del medio a los tres días de incubación en ambos medios de cultivo, siendo la temperatura óptima de crecimiento, de las tres temperaturas evaluadas, para todos los aislados. Así, a dicha temperatura no se observaron diferencias significativas en el desarrollo de micelio de las cepas de estudio, salvo en la cepa T43B que en medio PDA requirió un día adicional de cultivo para llenar la placa (Figura 5). En general, los aislados mostraron una mayor capacidad de crecimiento a los 16°C que a los 32°C, aunque varias de las cepas mostraron retraso significativo a la primera temperatura con respecto a la de 28°C, todos lograron cubrir la superficie del medio. Por lo anterior, se destacarán únicamente las diferencias entre las dos temperaturas extremas en las cepas de estudio.



**Figura 4. Desarrollo micelial y conidiación de las cepas de estudio en medio PDA.** En la parte superior se especifica la temperatura, el código de las cepas de estudio aparece del lado izquierdo. En cada temperatura se muestra el aspecto de las colonias en fase logarítmica media (placa del lado izquierdo) y etapa de conidiación (placa del lado derecho). Se muestra la conidiación a los 10 días de incubación. Las siglas NC, indican que la cepa no conidió.



**Figura 5. Desarrollo micelial y conidiación de las cepas de estudio en medio AEM.** En la parte superior se especifica la temperatura, el código de las cepas de estudio aparece del lado izquierdo. En cada temperatura se muestra el aspecto de las colonias en fase logarítmica media (placa del lado izquierdo) y etapa de conidiación (placa del lado derecho). Se muestra la conidiación a los 10 días de incubación. Las siglas NC, indican que la cepa no conidió.

Para la cepa T2HF en medio PDA a 28 °C se observa aparición de conidias en montículos blanco-amarillos dispersos por toda la colonia, es visible al octavo día de incubación (Figura 4). A 16°C se presentó un retraso significativo en el crecimiento de dicha cepa, llenando la placa de medio hasta el séptimo día de incubación y sin conidiar (Figuras 5 y 7); sin embargo, en el último día de monitoreo se observaron zonas de conidiación sobre el

micelio. A 36°C la cepa redujo significativamente su capacidad de crecimiento, llenando la placa de medio al noveno día de su incubación, siendo la temperatura que más afectó el crecimiento del micelio (Figuras 4 y 5). En las tres temperaturas se observó pigmentación color amarillo fuerte, esta característica tan particular la diferenció de todas las demás cepas de estudio. En medio AEM la cepa T2HF conidió hasta el noveno día de cultivo (Figura 6). A 16°C, esta cepa cubrió la superficie del medio de cultivo al cuarto día de incubación, pero solo se pudo observar un color de micelio más opaco, con escasa conidiación aparente en el último día de monitoreo. A 36°C la cepa redujo considerablemente su capacidad de crecimiento, cubriendo el medio al noveno día de incubación. En esta temperatura se observaron cambios particulares en la apariencia colonial, presentando una forma de flor, y una pigmentación amarilla desde el primer día de incubación.

La cepa T4HD cultivada en medio PDA mostró a 16°C un retraso de cuatro días en el crecimiento con relación al crecimiento a 28 °C, mientras que a 36°C el micelio no cubrió totalmente el medio (Figura 4). Con relación a la conidiación de dicha cepa, a 16°C se presentó una ligera pigmentación amarilla al octavo día de incubación, conidiando sobre el inóculo. A 36°C las conidias aparecieron al tercer día en forma de flor, así como una ligera pigmentación amarilla clara sobre el medio. En medio AEM la cepa T4HD mostró a 16°C un retraso de tres días para alcanzar el crecimiento observado a 28°C (Figura 5). A 36°C la cepa mostró una capacidad de crecimiento limitada, sin cubrir el área del medio. Con relación a la conidiación de esta cepa en dicho medio, a 28°C comenzó la conidiación al tercer día en forma de un círculo color blanco, también se observó una pigmentación amarilla ligera (Figura 5). A 16°C la conidiación se presentó hasta el séptimo día de incubación, con conidias blancas localizadas sobre el micelio aéreo. A 36°C se observó pigmentación amarilla ligera, observándose conidias blancas sobre el inóculo al tercer día.

El diámetro del micelio de la cepa T5HD en medio PDA no superó los 34 mm a 36°C, mientras que a 16°C el micelio cubrió el medio al sexto día de incubación (Figura 4). A 28°C dicha cepa conidió al séptimo día en forma circular amarilla alrededor del inóculo y verde en la periferia, con una pigmentación naranja-amarilla al medio. Con relación a la conidiación de esta cepa en medio PDA, a 16°C se observó al octavo día, iniciando en forma de tres anillos blancos distribuidos simétricamente en la colonia, y las conidias presentaron un color verde sobre el inóculo, además de desarrollarse un pigmento amarillo muy ligero en el medio.

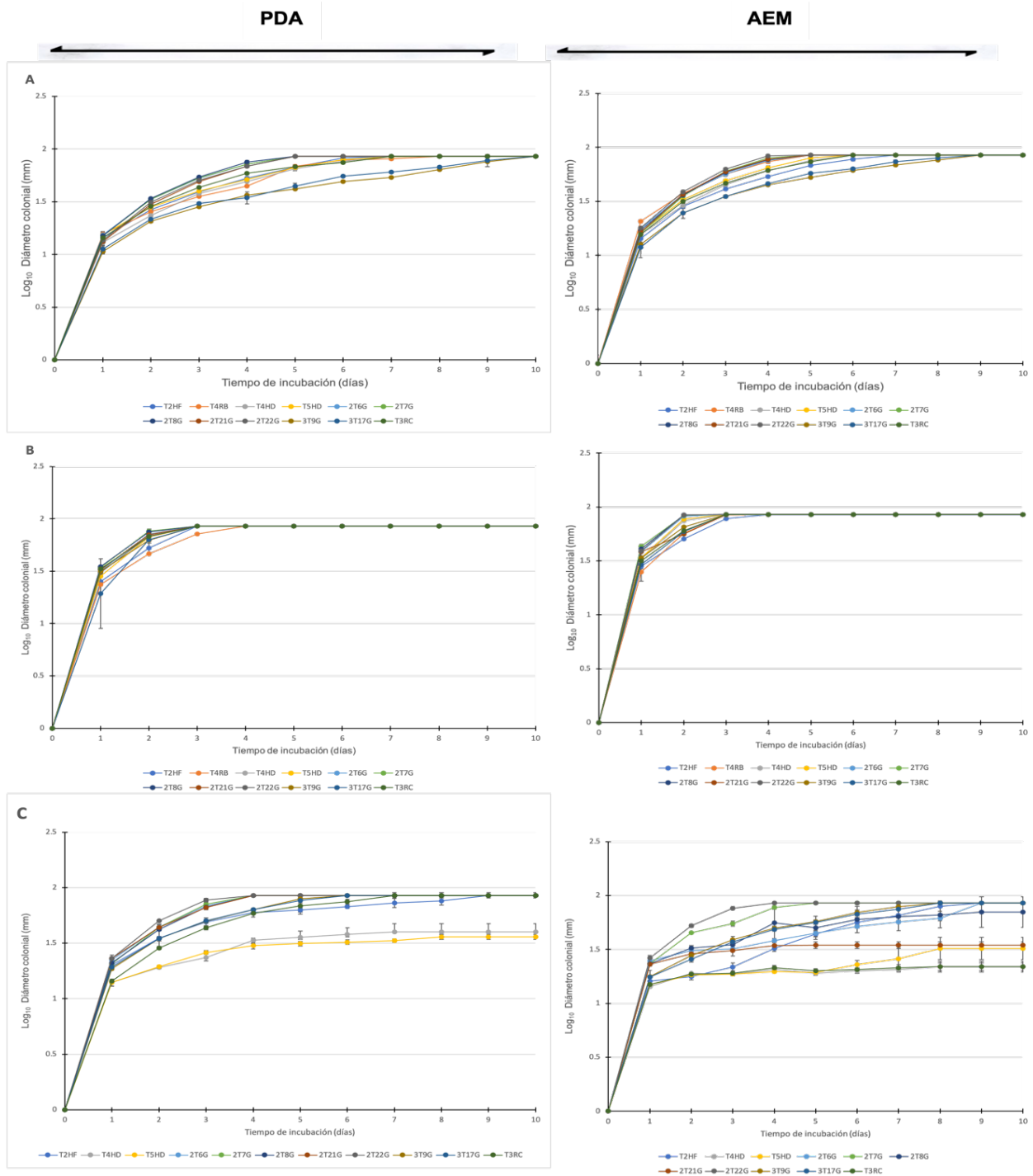
En este medio, a 36°C la conidiación inició al tercer día en forma de flor, con un anillo color beige-anaranjado con blanco rodeando al inóculo. La conidiación de la cepa T5HD en medio AEM inició al octavo día de incubación a 16°C, presentándose de forma circular blanca con un anillo amarillo (Figura 5). A 28°C la producción de conidias se presentó de abundantemente al séptimo día, con un color blanco en el centro de la placa y color verde en la periferia; también se presentó una pigmentación naranja-amarilla en el medio. A 36°C la conidiación en medio AEM se observó al tercer día de incubación, con la particularidad apariencia de flor color rojo-beige con anillo blanco en el centro, con conidias verdes, rodeando al anillo blanco y conidias amarillas distribuidas sobre el inóculo.

Para el caso de la cepa T4HD el crecimiento en medio AEM mostró un retraso de tres días para que el micelio cubriera el medio de cultivo a 16°C, con relación a la temperatura de 28°C (Figura 5). A 36°C la cepa mostró una capacidad de crecimiento limitada, ya que no cubrió completamente el medio de cultivo en la placa. Con relación a la conidiación de esta cepa, a 28°C las conidias aparecieron al tercer día de incubación en círculo color blanco que predominó en la periferia y en centro, rodeando al inóculo. A 16°C la conidiación se presentó hasta el séptimo día de incubación, con conidias blancas ubicadas sobre el micelio aéreo, mientras que a 36°C se observó pigmentación amarilla ligera y al tercer día se observaron conidias blancas sobre el inóculo.

En los ensayos de crecimiento en medio PDA para la cepa T3RC, a 16°C el micelio cubrió el medio al séptimo día, observándose una morfología colonial de flor irregular, mientras que a 36°C el micelio formó una colonia pequeña de borde regular que no cubrió completamente la superficie después de diez días de incubación (Figuras 4 y 5). A 16°C se observó una pigmentación amarilla en la colonia, y hacia el tercer día se observó micelio aéreo sobre el inóculo. A 28°C se desarrolló una pigmentación amarillo-naranja del micelio, apareciendo conidias verdes prominentes en el centro y en la periferia rodeadas por conidias amarillas, al quinto día de incubación. A 36°C se observó pigmentación amarilla ligera al segundo día de incubación y crecimiento de forma de flor, con micelio aéreo sobre el inóculo al tercer día. Al incubarse en AEM la cepa T3RC cubrió el medio de cultivo a los seis días de incubación a 16°C, mientras que a 36°C no cubrió totalmente el área del medio de cultivo.



A 28°C las conidias se observaron al tercer día, de color verde dispersas en el medio, y hasta el séptimo día se presentaron en un patrón circular colonial con conidias amarillas en la periferia



**Figura 6. Cinéticas de crecimiento en distinto medio de cultivo.** Las cepas se inocularon en medios PDA (columna de la izquierda) y AEM (columna de la derecha), incubándose a 16°C (panel A, superior), 28°C (panel B, en medio) y a 36°C (panel C, inferior). Se muestra en escala logarítmica en el eje vertical la medición del diámetro colonial cada 24 h.

(Figura 5). A 16°C solo se observó el crecimiento de micelio aéreo. A 36°C fue posible observar conidiación al segundo día, las conidias de color verde, blanco y amarillo, se encontraron al centro de la pequeña colonia en forma de flor del hongo.

Al crecer en medio PDA la cepa T4RB cubrió el medio de cultivo al sexto día de incubación a 16°C, y a 36°C no mostró crecimiento (Figura 4). En la temperatura óptima de crecimiento de 28°C se observó la presencia de conidias al tercer día, con una coloración distribuida en tres anillos de color verde en su interior y amarilla en los bordes (Figura 5). A 16°C al séptimo día de incubación inició la conidiación de coloración blanca en forma circular dispersa en la periferia y sobre el inóculo. En medio AEM la cepa T4RB cubrió el medio al quinto día de incubación a 16°C, y a 36°C la cepa no creció. En su temperatura óptima de 28°C, en este medio la conidiación inició al segundo día, mostrando conidias verde olivo con amarillo y blanco distribuidas desde el centro del inóculo hasta la periferia (Figura 5). A 16°C la conidiación inició al octavo día, observándose conidias blancas en el inóculo y periferia distribuidas en forma circular.

En medio PDA la cepa 2T6G cubrió el medio de la caja al quinto día de incubación a 16°C, mientras que a 36°C lo hizo en cuatro días (Figura 4). Con respecto a la conidiación de esta cepa en dicho medio, a 28°C las conidias aparecieron al segundo día con la formación de dos anillos, uno en el centro de la colonia y otro en la periferia color amarillo en sus bordes y verde en su interior (Figura 4). A 16°C la conidiación se presentó en el octavo día, y a 36°C ocurrió al segundo día de incubación. Mientras que en el primer caso la coloración de conidias desde el inicio hasta su final fue verde con presencia de una pigmentación verde brillante en el medio, en el segundo caso la conidiación fue color amarillo desde el centro del inóculo, difuminándose hacia la periferia. Esta cepa cubrió la superficie del medio AEM a los cinco y nueve días de incubación a las temperaturas de 16°C y 36°C, respectivamente. En este medio, a la temperatura óptima de crecimiento de 28°C, las conidias de coloración inicialmente verde- amarillo y blanco en menor proporción, aparecieron el mismo día que el micelio cubrió la superficie, justo en el centro de la colonia con dirección a la periferia (Figura 5). A 16°C, la conidiación inició un día antes de cubrir el medio, presentándose conidias blancas con una ligera pigmentación amarilla en el medio de cultivo. A 36°C la conidiación inició al segundo día de incubación, formando un anillo con coloración inicial

verde oliva, tornándose verde oscuro un día después, y conidias blancas dispersas en el inóculo y a su alrededor.

En medio PDA, a 16°C la cepa 2T7G cubrió la superficie al quinto día de incubación, y a 36°C hacia el cuarto día (Figura 4). A 28°C las conidias aparecieron al segundo día con la formación de dos anillos, uno en el centro de la colonia y otro en la periferia de color amarillo en sus bordes y verde en su interior. La conidiación de la cepa 2T7G a 16°C inició al cuarto día de incubación y a 36°C al tercer día (Figura 4). Mientras que en el primer caso la coloración de conidias desde el inicio hasta su final fue blanca, combinada con una pigmentación amarilla del medio, en el segundo caso la conidiación se presentó en forma de anillo color amarillo-verde. En medio AEM tanto a 16°C como a 36°C la cepa 2T7G cubrió el medio de cultivo al quinto día de incubación. El inicio de la conidiación a 28 °C coincidió con el día que terminó de cubrir la superficie del medio, formando dos anillos verdes-amarillo, uno central y otro en la periferia (Figura 5). A 16°C, las conidias observadas al cuarto día de incubación se presentaron de color blanco, con pigmentación amarilla del medio. A 36°C la conidiación fue más acelerada, presentándose al segundo día de incubación, las conidias de color verde con amarillo se observaron alrededor del inóculo en forma circular, incluyendo micelio aéreo incipiente; al tercer día se observó una colonia de borde irregular en forma de flor y las conidias permanecieron en el centro, mientras que en la periferia predominaron exclusivamente conidias de color blanco.

El micelio de la cepa 2T8G cultivada en medio PDA cubrió la superficie hacia el quinto y cuarto día de incubación a 16°C y 36°C, respectivamente (Figura 4). A 28°C se observó la producción de conidias al tercer día de incubación, formando dos anillos verdes con amarillo bien delimitados en el centro de la colonia y la periferia (Figura 4). La conidiación a 16°C ocurrió al cuarto día de incubación, con una tonalidad blanca-verde y pigmentando el medio de color amarillo. A 36°C la conidiación fue rápida, presentándose al segundo día de incubación, en forma de anillo con predominio de los colores verde, blanco y amarillo. En medio a AEM a 28°C, la producción de conidias se inició hacia el tercer día, de forma circular con una tonalidad verde-amarilla y pocas conidias dispersas blancas. A 16°C en medio AEM la cepa 2T8G cubrió la superficie del medio al cuarto día de incubación, iniciando la conidiación al mismo tiempo, con una tonalidad blanca. A 36°C se redujo significativamente el crecimiento micelial, formando una pequeña colonia de borde irregular

en forma de flor con doble anillo de tono verde, incluyendo conidias blancas en el centro de la colonia.

En PDA, la cepa 2T21G a una temperatura de 36°C cubrió el medio de cultivo al cuarto día y a 16°C al quinto día de incubación (Figura 5). En relación con la conidiación, a 16°C inició al cuarto día con un patrón circular y color blanco-verde, pigmentando el medio de color amarillo (Figura 5). A la temperatura de 28°C la conidiación inició al tercer día de incubación, como anillo de color verde con amarillo y algunas conidias dispersas blancas. A 36°C la conidiación se observó al segundo día de incubación en forma de círculo color amarillo fuerte, difuminándose claro hacia la periferia. En medio AEM, esta cepa incubada a 16 °C cubrió el medio al quinto día (Figura 5). A 36°C el crecimiento micelial no logró cubrir toda la superficie del medio, observándose una colonia incipiente. Con relación a la conidiación, a 16°C inició al cuarto día de incubación, mostrando conidias de tonalidad blanco (Figura 5). A la temperatura de 28°C la conidiación inició al tercer día de incubación, en forma circular y de color verde con amarillo y algunas conidias blancas dispersas. A 36°C la conidiación se observó al segundo día de su incubación, en forma de flor color verde fuerte en el centro de la pequeña colonia y blancas únicamente en los bordes.

En el caso de la cepa 2T22G cultivada en medio PDA, logró cubrir la superficie del medio al quinto y cuarto día de incubación a 16°C y 36°C, respectivamente (Figura 7). La conidiación a 16°C inició un día antes de que el micelio cubriera el medio, con una tonalidad verde en el centro de la colonia y blanca a sus extremos (Figura 5). A 28°C la conidiación se visualizó como dos anillos bien delimitados de color verde oscuro con amarillo, acompañada de una pigmentación amarilla del medio de cultivo. A 36°C la conidiación inició al segundo día de incubación, en forma de un anillo de color amarillo próximo al inóculo. En medio AEM la cepa 2T22G inició la producción de conidias en doble anillo, con una tonalidad verde oscuro y una pigmentación amarilla en el medio (Figura 5). A 16°C se presentó un retraso en el crecimiento micelial, cubriendo el medio hacia el quinto día e iniciando la conidiación al cuarto día, con conidias verdes en el centro de la colonia y blancas en la periferia (Figuras 4 y 5). A 36°C, la cepa 2T22G cubrió el medio al cuarto día de incubación, con un crecimiento en forma de flor e iniciando la producción de conidias al segundo día, con una tonalidad verde claro en forma circular y producción de micelio aéreo.

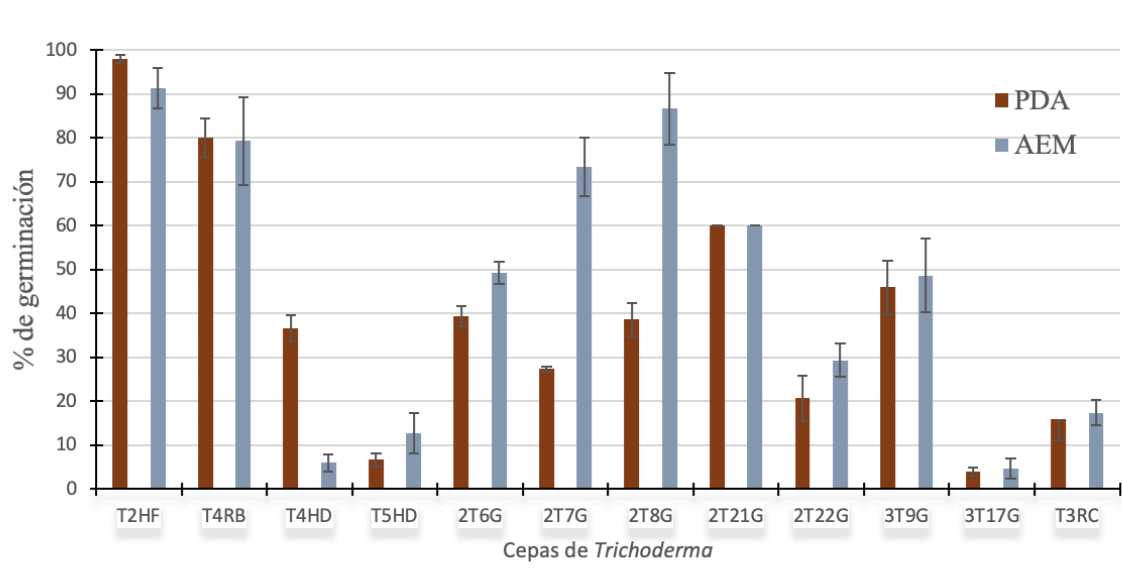
Durante la realización de los ensayos de cinéticas de crecimiento en medio PDA, la cepa 3T9G incubada a 16°C cubrió el medio hasta el último día de monitoreo, y a 36°C el micelio lo hizo en el sexto día de incubación (Figura 4). A 16°C se observó una colonia de color beige, y el octavo día de incubación se observó la producción de conidias blancas en forma de anillo al centro de la colonia (Figura 4). A 28°C se observó una conidiación circular de color verde oscuro al séptimo día de incubación. A 36°C se observó crecimiento micelial blanquecino con dos anillos de conidiación tenues al tercer día de incubación. Al incubarse a 16°C en AEM, la cepa 3T9G cubrió el medio al noveno día y a 36°C hacia el octavo día de incubación (Figura 5). A 28°C las conidias se observaron al tercer día de incubación, siendo éstas de color blanco de forma circular en el medio (Figura 5). A 16°C se observó micelio aéreo abundante, el crecimiento de la cepa fue muy lento y la coloración fue color beige, sin producción de conidias. A 36°C fue posible observar conidiación al segundo día, las cuales presentaron un color blanco inicial para luego tornarse color verde en forma de flor.

En medio PDA la cepa 3T17G e incubada a 36°C cubrió el medio a los seis días de incubación e inició el proceso de conidiación desde tercer día, con una coloración inicial blanca para luego extenderse a la periferia de color verde (Figuras 4 y 5). A 16°C fue la condición en la que se observó un retraso de crecimiento micelial significativo, ya que cubrió el medio hasta el décimo día de incubación, presentando micelio aéreo incipiente, sin conidiación. A 28°C, la aparición de conidias verdes en una simetría circular fue visible desde el tercer día (Figura 4). En medio AEM y a 16°C, el micelio de la cepa 3T17G presentó un retraso significativo en el crecimiento micelial, cubriendo el medio hasta el penúltimo día de su incubación, con abundante producción de micelio aéreo y observación de conidias blancas con verde claro en forma de un anillo justo en el centro de la colonia (Figuras 4 y 5). En dicho medio y a 28°C la aparición de conidias blancas se presentó desde el tercer día de incubación. A 36 °C la cepa 3T17G cubrió la superficie del medio al octavo día de incubación, la colonia presentó una forma irregular de aspecto coralino, iniciando la producción de conidias al tercer día, de tonalidad inicialmente blanca y aspecto esponjoso, al final del monitoreo éstas adquirieron un color verde.

### VI. 3 Evaluación de la capacidad de germinación de las cepas de *Trichoderma* spp.

Para la elaboración de un producto de biocontrol con *Trichoderma* spp., es necesario que la cepa utilizada tenga una alta producción de conidios, y que estos germinen en altos porcentajes en distintas condiciones ambientales. Por lo anterior, se realizaron pruebas de germinación de las cepas de estudio. En medio PDA, la cepa T2HF presentó un 98% de germinación a 28°C, mientras que en AEM alcanzó un 91.3%, siendo la cepa con el más alto porcentaje germinación de todas, seguida de la cepa T4RB, que presentó un 80% en germinación en ambos medios de cultivo y de la cepa 2T21G con 60% en ambos medios (Figura 7). Las cepas 2T8G y 2T7G presentaron un comportamiento de germinación muy particular, ya que mostraron una diferencia significativa en lo porcentajes de germinación entre los medios de cultivo empleados, con 86.6% en PDA y 38.6% en AEM para el primer caso, y de 73.3% en AEM y 27.3% en PDA, para el segundo caso. El resto de las cepas mostraron porcentajes de germinación bajos en los dos medios de cultivo empleados en los ensayos.

El grupo de cepas de bajo porcentaje de germinación puede dividirse en tres subgrupos. En el primero estarían las cepas que mostraron lo porcentajes relativos más altos de germinación, e incluiría a la cepa 3T9G con 46% en PDA y 48.6% en AEM, y a la cepa 2T6G con 39.33% en PDA y 49.33% en AEM (Figura 8). Después estarían las cepas con valores de germinación más bajos y similares en ambos medios de cultivo, como 2T22G con un 20.6% de germinación en PDA y un 29.3% en AEM, junto con la cepa T3RC con 16% en PDA y 17.3% en AEM. Finalmente estarían las cepas que en uno a ambos medios de cultivo mostraron valores de germinación por debajo del 10%. Aquí estarían la cepa T4HD con 36.6% en PDA y 6% en AEM; la cepa T5HD con 6.66% en PDA, y del 12.6% AEM. Finalmente, la cepa 3T17G que presentó los porcentajes de germinación más bajos, con 4% en PDA y 4.6% en AEM.



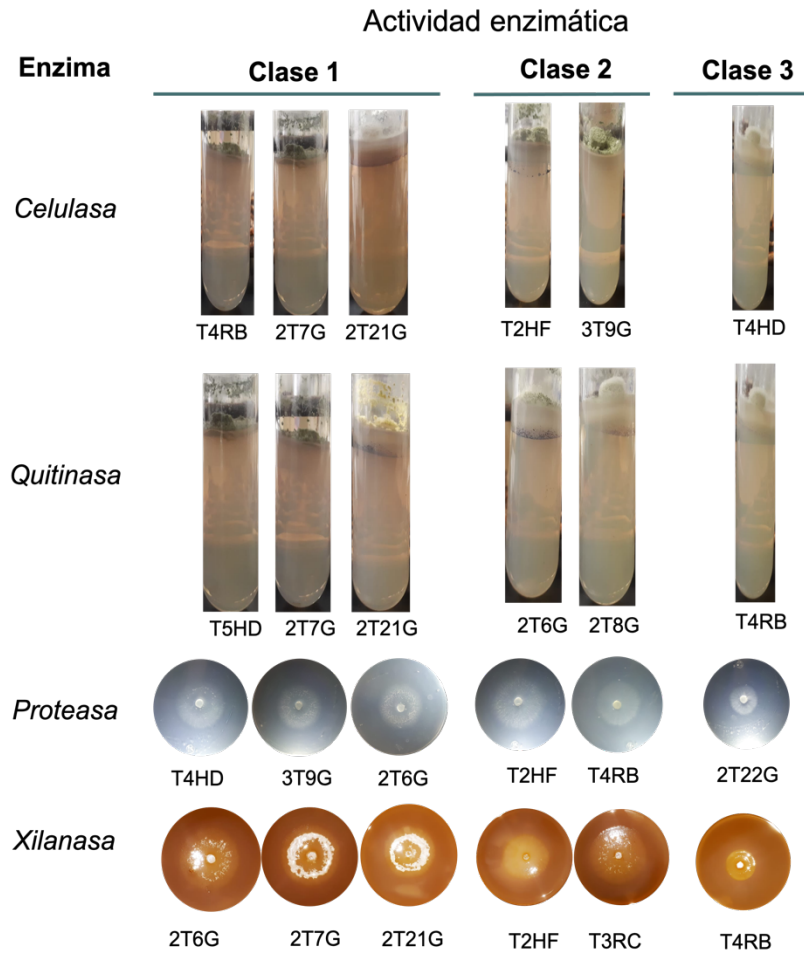
**Figura 7. Porcentaje de germinación de las cepas de *Trichoderma* spp. estudiadas.** Se inocularon 50 conidias en placas Petri con medios PDA y AEM, incubándose a 28 °C. Las placas se analizaron a las 12, 18 y 24 horas para evaluar la presencia de colonias aisladas, indicando germinación. Los datos graficados son correspondientes a 24 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### VI. 4 Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares en cepas silvestres de *Trichoderma* spp.

Se estudió de manera semicuantitativa la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de 12 cepas silvestres de *Trichoderma* spp. con los sustratos y las escalas de actividad especificadas en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se describen a continuación, de acuerdo con la actividad enzimática evaluada.

##### *Detección de celulasa extracelular*

De acuerdo con la escala de actividad enzimática utilizada para este caso, el 50% de las cepas presentó actividad alta, ubicándose en la clase 1, mientras que el 41.6% se clasificó con actividad intermedia (Figura 8). Solo la cepa T3RC presentó un bajo nivel de actividad, ubicándose en la clase 3.



**Figura 8. Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de las cepas de *Trichoderma* spp.** Para los ensayos de celulasa y quitinasa se consideró la cantidad de colorante azul liberada al medio base. En el caso de los ensayos de proteasa se consideró el diámetro del halo blanco alrededor de la colonia. El indicio de actividad de xilanasa fue la presencia y extensión de un halo amarillo en el medio de cultivo. En la parte inferior de cada imagen se muestra la clave de cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. y a la izquierda se especifica la actividad enzimática evaluada en cada línea. Solo se muestran algunos resultados representativos de cada actividad.

#### *Detección de quitinasa extracelular*

En los ensayos de detección de actividad enzimática de quitinasa extracelular, el 58% de las cepas presentaron actividad enzimática de clase 1, un 25% clase 2 y un 17% la clase 3 (Figura 8). Interesantemente, las cepas que presentaron el nivel más alto de producción enzimática fueron en su mayoría aislados de suelo.



#### *Detección de actividad de xilanasa extracelular*

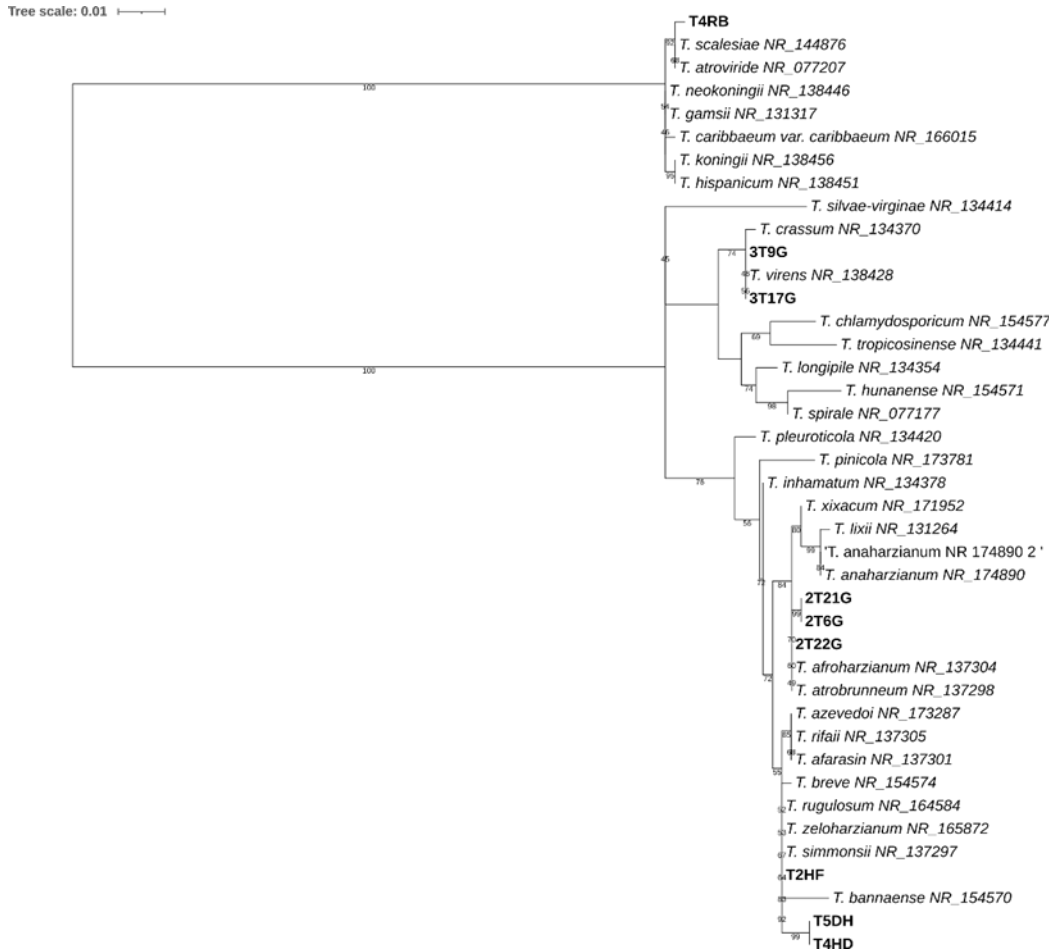
Para esta actividad enzimática se encontró que el 83.3% de las 12 cepas analizadas mostraron altos niveles de producción enzimática, ubicándose en la clase 1 de la escala (Figura 8). Solo las cepas T2HF y T4RB se ubicaron en la clase 2, y la cepa T4RB fue la única ubicada en la clase 3.

#### *Detección de actividad de proteasa extracelular*

Con relación a la actividad de proteasa extracelular, se presentó una actividad enzimática clase 1 (alta) correspondiente al 58% de las cepas de estudio (Figura 8), otro 25% corresponde a la clase 2 (intermedia), mientras que las cepas 2T7G y 2T22G fueron las únicas que se ubicaron en la clase 3.

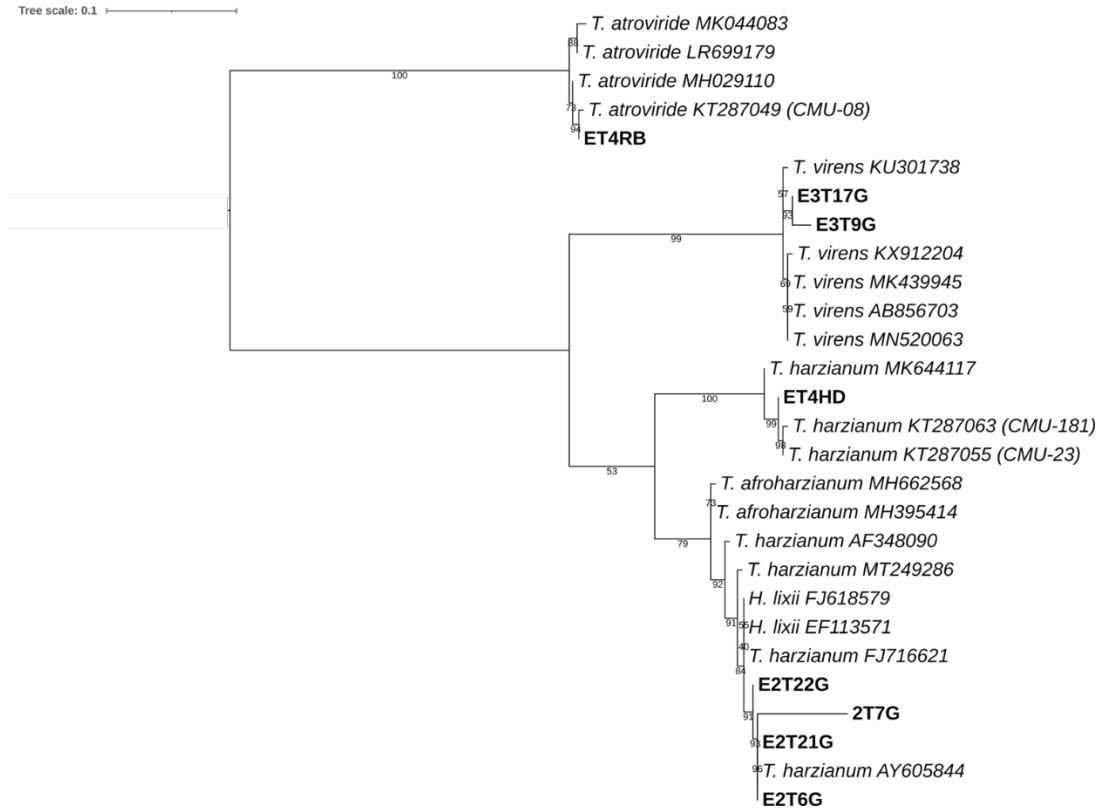
### **VI. 5 Análisis filogenético**

El análisis filogenético realizado empleando la región ITS distribuyó a las cepas de estudio en distintos grupos terminales. La cepa T4RB se agrupó en un clado junto con cepas de las especies *T. scalesiae* y *T. atroviride* (Figura 9), aunque dicho grupo incluyó a otras especies con una baja resolución en la separación. Las cepas 3T9G y 3T17G se agruparon junto con cepas de las especies *T. crassum* y *T. virens*, mientras que las cepas 2T21G, 2T6G y 2T22G se agruparon junto con cepas de la especie *T. afroharzianum*, aunque las dos primeras en un clado independiente de alto valor bootstrap (Figura 9). La cepa T2HF aparece en el árbol junto con cepas de las especies *T. rugulosum*, *T. zeloharzianum* y *T. simonsii*, aunque con valores Bootstrap superiores al 50%, las ramas terminales de este grupo no están bien definidas. Por último, las cepas T5DH y T4HD aparecen juntas en un clado terminal que tiene como vecino a la especie *T. bannaense* (Figura 9).

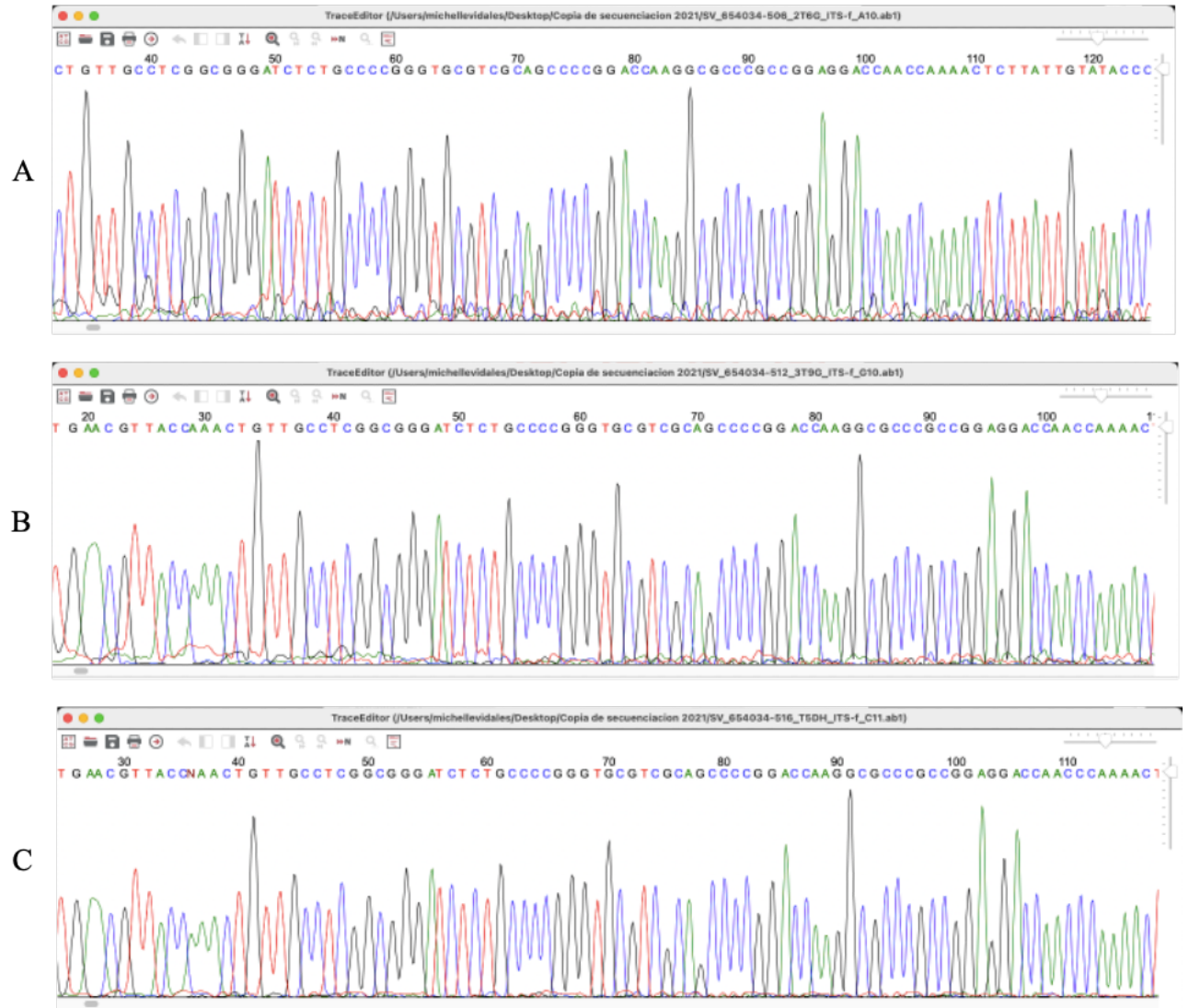


**Figura 9. Relaciones filogenéticas de las cepas de estudio de *Trichoderma* spp.** empleando la región ITS. El árbol filogenético se obtuvo mediante el criterio ML. En cada bifurcación se muestran los valores bootstrap iguales o superiores al 45% obtenidos después de 1000 iteraciones. Para detalles ver Materiales y Métodos.

Cuando se realizó la reconstrucción filogenética con la secuencia parcial del gen  $1\alpha$  (*tefl*) la cepa ET4RB se agrupó con distintos aislados de *T. atroviride* (Figura 10), incluida una cepa aislada previamente en el estado de Michoacán (KT287049-CMU08). Las cepas E3T17G Y E3T9G se agruparon con distintos aislados de *T. virens*, mientras que la cepa ET4HD con distintos aislados de *T. harzianum* (Figura 10). Por su parte, las cepas E2T22G, 2T7G, E2T21G y E2T6G aparecen también agrupadas con cepas de *T. harzianum* pero en un clado más amplio que incluye a *T. afroharzianum* e *Hypocrea lixii* (Figura 10).



**Figura 10. Relaciones filogenéticas de las cepas de estudio de *Trichoderma* spp.** Empleando la secuencia parcial del gen  $1\alpha$  (*tefl*). El árbol filogenético se obtuvo mediante el criterio ML. En cada bifurcación se muestran los valores bootstrap iguales o superiores al 45% obtenidos después de 1000 iteraciones. Para detalles ver Materiales y Métodos.



**Figura 11.** Electroferogramas de las secuencias del gen ITS de la cepa 2T6G (A), 2T22G (B) y T5HD (C). Se exponen como ejemplos de la calidad de los electroferogramas de las secuencias obtenidas. El programa utilizado para el análisis fue MEGAX.

## VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron las variaciones de crecimiento y conidiación de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de un cultivo de sorgo. Además, se determinó la capacidad de germinación de las cepas de estudio, así como la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares relacionadas con el biocontrol.

El análisis fisiológico realizado en el este trabajo consideró relevante el medio de cultivo empleado, ya que se ha documentado que este puede influir en el crecimiento micelial a diferentes temperaturas. Por ejemplo, cepas de *T. atroviride* crece bien en medio AEM que le aporta los nutrimentos necesarios para su crecimiento; no obstante, el evaluar distintas cepas para la selección para formulaciones de biocontrol, la composición del medio en el que crece *in vitro* *Trichoderma* spp. debe ser similar nutricionalmente a la futura ubicación del hongo donde actuará como agente de control biológico (Schubert et al, 2009). Aunque dicha condición ideal es difícil de alcanzar, se espera que una cepa adicionada en un producto de biocontrol actúe en la mayor diversidad posible de condiciones ambientales y ecológicas. La temperatura más baja probada en el presente trabajo a la cual las cepas pudieron crecer fue a 16 °C. En dicha condición de cultivo las cepas de estudio mostraron un crecimiento heterogéneo, con algunas cubriendo totalmente el área del medio de cultivo en cinco o seis días, mientras que otras lo hicieron hasta los nueve o diez días. En general, en esta temperatura las cepas crecieron mejor en medio AEM que en medio PDA. En contraste, a 36 °C las cepas crecieron mejor en medio PDA que en medio AEM, aunque varias de ellas no crecieron a dicha temperatura. El resultado de las cinéticas a 28 °C de las cepas aquí estudiadas concuerda en lo general, con lo reportado previamente para distintas especies del género *Trichoderma*, en el cual la mayoría de las cepas son mesófilas (Kedrics et al., 2003). Sin embargo, las especies de *Trichoderma* spp. se pueden adaptar a temperaturas extremas y los rangos de temperatura en los que pueden crecer están asociados a la región geográfica y ambiente de aislamiento, como se comenta a continuación.

Los primeros estudios fisiológicos básicos en *Trichoderma* spp. documentan el crecimiento a bajas temperaturas, encontrando que cepas de *T. polysporum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. harzianum* crecen a 7 °C (Danielson y Davey, 1973) y algunas incluso a 5°C (Jackson et al., 1991). En el caso de altas temperaturas, se encuentra documentado que algunas cepas de *T. asperellum* crecen óptimamente a 30°C (Begoude et al., 2007), mientras

que *T. atroviride* también lo hace a dicha temperatura, de manera dependiente del medio de cultivo (Schubert et al., 2009). Al analizarse nuevas regiones geográficas con distintos tipos de condiciones climáticas, o nuevos ambientes de muestreo, se ha ido documentado una gran variación en el crecimiento a diferentes temperaturas entre cepas de *Trichoderma* spp. Así, al estudiar 12 cepas aisladas en Italia y asociadas a distintas especies vegetales o madera en descomposición, la mayoría mostró un crecimiento óptimo entre 25 y 30°C cultivada en medio PDA (Úrbez-Torres et al., 2020). Solo cinco de las cepas identificadas mediante filogenia molecular como *T. harzianum* (*sensu lato*) (n=2), *T. guizhouense* (n=2) y *T. longibrachiatum* (n=1) pudieron crecer a 35°C, y solo esta última mostró un crecimiento óptimo a dicha temperatura. En otro estudio reciente, cepas de *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* (*sensu lato*) y *T. viride* provenientes de distintas localidades de Egipto, fueron capaces de crecer a 35°C en PDA y agar de harina de maíz, aunque se observó una disminución aparentemente significativa con relación a la incubación a 25°C en ambos medios de cultivo (Hewedy et al., 2020). En general, en ambas temperaturas las cepas mostraron un mejor crecimiento en PDA que en el agar a base de harina de maíz. En el otro extremo, cepas psicrófilas de *Trichoderma*, capaces de crecer a 4-5°C, han sido aisladas de la región del Himalaya (Shanmugam et al., 2015; Rafiq et al., 2020).

Los resultados sugieren que varias de las cepas de estudio, particularmente las provenientes de la rizósfera, pueden crecer a temperaturas tanto más bajas como más altas que las analizadas en el presente estudio, ya que nunca se obtuvo una inhibición total del crecimiento. Los resultados son positivos en términos de la producción de biomasa, ya que las cepas analizadas pueden crecer sin requerimientos especiales de incubación con relación a la temperatura. En términos de posibles aplicaciones al biocontrol, los resultados de incubación a distintas temperaturas indican que varias de las cepas aquí estudiadas pueden desarrollar micelio entre los 16 y 36°C, un intervalo considerable que les permitiría competir bien en el suelo de cultivos agrícolas. Por otra parte, el uso de medios de cultivo completos, como el PDA y AEM en los ensayos de crecimiento cinético y conidiación de las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. estudiadas, confirma que medios relativamente baratos cubren las demandas nutricionales requeridas para los procesos fisiológicos que se evaluaron, ya que siendo PDA el medio más rico en carbohidratos derivados del almidón de la papa y el AEM más rico en fuente de nitrógeno proveniente de los aminoácidos de la peptona que incluye el

medio, es de esperar que se presenten diferencias fisiológicas básicas del hongo en ambos medios.

En general, las observaciones cualitativas muestran que las cepas estudiadas conidieron mejor en medio PDA que en medio AEM. Además de la conidiación a 28 °C, las cepas conidieron mejor a 36 °C que a 16 °C y aquellas provenientes de la rizósfera lo hicieron mejor que las provenientes de tejido foliar o los endófitos de la raíz. La conidiación eficiente de varias de las cepas de estudio en medios comerciales, particularmente en PDA, es importante debido a que se ha reportado diferencias en la eficiencia de conidiación en dicho medio, dependiendo de la casa comercial. Así, cepas de *T. harzianum* (*sensu lato*), *T. atroviride*, *T. virens* y *T. asperelloides* mostraron variaciones intra e interespecíficas significativas en la producción de conidias, dependiendo de la marca comercial de medio PDA en la que se realizaron las observaciones, incluyendo marcas en las que algunas cepas no conidieron (Mukherjee et al., 2014). Otro factor que influye en la conidiación no analizado en el presente trabajo es el pH. Se ha observado que *Trichoderma* spp. conidia mejor a pH ácido-neutro, aunque el pH óptimo de conidiación varía entre cepas y especies (Steyaert et al., 2016, 2017). En particular, la conidiación de *T. hamatum* en agar extracto de malta, medio empleado en este trabajo, disminuye significativamente al incrementar el pH de 3 hasta 6, mientras que en *T. atroviride* incrementa (Steyaert et al., 2010). A futuro sería interesante evaluar el efecto combinado de pH y temperatura en el crecimiento y conidiación de las cepas aquí analizadas, con la finalidad de tener una idea más precisa de su posible comportamiento en campo. A nivel molecular, solo en pocas especies se han evaluado los genes/proteínas que participan en el proceso de conidiación, encontrándose que en *T. reesei* participan en dicho proceso las proteín-cinasas *Sch9* y *Yak1*, así como la proteína fotoreceptora VEL1 y la proteína reguladora ENV1 (Lv et al., 2015; Bazafkan et al., 2017). En dicha especie, el análisis transcriptómico de la mutante M7 deficiente en conidiación sugiere también la participación del gen *con6* en dicho proceso (Pachauri et al., 2020). En *T. virens* se ha involucrado al sideróforo intracelular ferricrocina en el proceso de conidiación (Mukherjee et al., 2018). En la especie *T. atroviride* es quizá en la que más se han descrito genes asociados al proceso de conidiación, incluyendo el gen *tgal* codificante para una proteína G $\alpha$  (Rocha-Ramírez et al., 2002), el gen *Eng18B* codificante de una glucosaminidasa (Dubey et al., 2012), el gen *lox1* codificante de una lipooxigenasa (Speckbacher et al., 2020)

y el gen *agl1* codificante de una aegerolisina (proteínas formadoras de poros en membrana) (Dubey et al., 2021), entre otros. Debido a su participación en diversas rutas de señalización, control transcripcional o procesos fisiológicos, todos estos genes/proteínas tienen efectos pleiotrópicos en *Trichoderma* spp. A futuro sería interesante extender el análisis de factores asociados a la conidiación y desarrollo a otras especies de *Trichoderma* spp. y particularmente a cepas con potencial biotecnológico para el biocontrol, como las aquí evaluadas.

El análisis de los factores microclimáticos y ambientales que influyen en la germinación de las conidias de distintas especies y cepas del género *Trichoderma* tiene relevancia en el diseño de inóculos que son utilizados para el bicontrol de fitopatógenos y en el éxito en campo de dichos inóculos. Así, se sabe que en ambientes ricos en nutrientes y con alta humedad la eficacia en el biocontrol de inóculos de *Trichoderma* spp. con una alta densidad de conidias se debe a que la germinación sincronizada de estas 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, incrementando el crecimiento y optimizando la competencia por recursos, inhibiendo así al fitopatógeno (Hjeljord y Tronsmo, 2003).

Los ensayos de germinación mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de estudio, y en algunos casos entre una misma cepa, dependiendo del medio de cultivo. En general, los datos muestran que las cepas germinan mejor en medio AEM que en medio PDA, las cepas T2HF y T4RB endófitos foliar y de raíz respectivamente, presentaron los porcentajes de germinación más altos en ambos medios de cultivo; mientras que la cepa 3T17G de rizósfera presentó los porcentajes de germinación más bajos en ambos medios. La temperatura de los ensayos de germinación entra en las temperaturas reportadas como óptimas para dicho proceso fisiológico en *Trichoderma* spp. En ese sentido, 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 sus 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.

También se analizó semicuantitativamente la producción de enzimas extracelulares en las cepas de *Trichoderma* spp. de interés. Las enzimas hidrolíticas analizadas son de relevancia en el micoparasitismo o en otras aplicaciones biotecnológicas a nivel industrial. Las celulasas y xilanasas son enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal (Giovannoni et al., 2020), mientras que las quitinasas y algunas proteasas están asociadas al proceso de micoparasitismo (Silva et al., 2019), y las cuatro actividades enzimáticas tienen diversas aplicaciones industriales (Da Silva, 2017; Halder et al., 2019; Giovannoni et al., 2020). De manera interesante, las principales productoras de las cuatro enzimas hidrolíticas extracelulares evaluadas fueron las cepas obtenidas de la rizósfera, aunque endófitos de raíz también mostraron ser buenos productores de varias de las enzimas analizadas. A la fecha, no existe un estudio comparativo sobre las diferencias en la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares entre cepas/especies de *Trichoderma* spp. provenientes de distintos componentes de un mismo agroecosistema, por lo que es difícil plantear una hipótesis sobre las diferencias entre las cepas aquí analizadas. Adicionalmente, se analizó una mayor cantidad de cepas provenientes de rizósfera con relación a las endófitas de raíz y de tejido foliar, lo que puede influir en los resultados obtenidos.

Los resultados de actividad enzimática extracelular aquí obtenidos concuerdan con diversos reportes sobre caracterización de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. aisladas de distintos compartimentos de un sistema vegetal en agroecosistemas y ecosistemas silvestres. Así, cepas endófitas foliares de *Trichoderma* spp. aisladas de distintas especies vegetales de Brasil producen xilanasas cuando se cultivan en distintos sustratos vegetales (Robl et al., 2013). También, la cepa PQ34 *T. asperellum* aislada de la rizósfera de un cultivo de Chile en Vietnam, produce una quitinasa extracelular termoestable con capacidad para inhibir *in vitro* e *in planta* a los hongos fitopatógenos *Colletotrichum* sp. y *Sclerotium rolfsii* (Loc et al.,

2020). De la misma forma, seis cepas de las especies *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. erinaceum*, *T. gamsii*, *T. afroharzianum* y *T. harzianum* aisladas de a rizósfera de un cultivo de frijol son eficientes productoras de quitinasa, celulasa y proteasas extracelulares (Bedine-Boat et al., 2020). Además, dichas cepas muestran antagonismo *in vitro* contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Pythium ultimum*, ya sea por metabolitos volátiles o no volátiles. De manera interesante, se ha documentado que cepas endófitas foliares de *Trichoderma* spp. aisladas de especies vegetales del género *Theobroma* (cacao) inducen la expresión de genes de diversas enzimas hidrolíticas, incluidas algunas actividades de xilanasas y proteasa en la interacción con la planta (Bailey et al., 2006).

En este trabajo se realizó un análisis filogenético preliminar para evaluar la diversidad de especies de *Trichoderma* asociadas al cultivo de sorgo. Dicho análisis realizado con la región ITS sugiere para nueve de las cepas de estudio sugiere que éstas se distribuyen por lo menos en cinco especies distintas. Así, la cepa T4RB es cercana a las especies *T. scalesiae*/*T. atroviride*, mientras que las cepas 3T9G y 3T17G se estarían asociadas a *T. crassum*/*T. virens*. Las cepas 2T21G, 2T6G y 2T22G podrían pertenecer a la especie *T. afroharzianum* y la cepa T2HF estaría cercana a *T. rugulosum*/*T. zeloaharzianum*/*T. simonsii*. Por último, las cepas T5DH y T4HD estarían relacionadas con la especie *T. bannaense*. De la misma manera, las ocho cepas analizadas filogenéticamente con la secuencia parcial del gen *tefl* están asociadas a tres especies distintas. El árbol generado sugiere que la cepa ET4RB es *T. atroviride* y que las cepas E3T17G Y E3T9G son de la especie *T. virens*. Las cepas ET4HD, E2T22G, 2T7G, E2T21G y E2T6G pertenecen a *T. harzianum sensu lato*.

El género *Trichoderma* incluye a 379 especies con nombres aceptados (Cai et al., 2022), por lo que la identificación es compleja, aun empleando herramientas de filogenia molecular. Para la identificación certera de especies dentro del género se recomienda el uso de tres secuencias genéticas, incluyendo la región ITS, el gen *rpb2* y el gen *tefl*, por lo que el análisis filogenético realizado en el presente trabajo representa una aproximación a la identificación plena de las cepas de estudio. No obstante, por la resolución de los clados en los que se encuentran, es factible asegurar que la cepa ET4RB es *T. atroviride*, y que las cepas E3T17G Y E3T9G son de la especie *T. virens*. Por su parte, la cepa ET4HD se agrupa con cepas previamente identificadas por el mismo laboratorio en el que se realizó el presente

trabajo, identificadas como *T. harziuanum*, lo que indica que dicha cepa pertenece a esta especie. El complejo *T. harzianum* incluye a por lo menos 14 especies distintas, incluyendo a *T. afroharzianum* y *T. lixii* (Chaverri et al., 2015). Mientras que la primera especie es de amplia distribución geográfica, la segunda parece estar restringida a Asia, particularmente Tailandia. Por lo que la filogenia con el gen *tefl* sugiere que las cepas E2T22G, 2T7G, E2T21G y E2T6G son de la especie *T. harzianum*, lo cual también podría ser cierto para las cepas 2T21G, 2T6G y 2T22G, de acuerdo con la filogenia de la región ITS.

Aunque para el resto de cepas analizadas con la región ITS es difícil establecer la identidad taxonómica, los datos aquí encontrados sugieren que se presentan al menos siete especies asociadas al cultivo de trigo.

Con base en los antecedentes mencionados, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas del agroecosistema de sorgo aquí estudiadas son buenas candidatas para su inclusión en productos de biocontrol, pero también para la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de relevancia biotecnológica. No obstante, es necesario realizar estudios fisiológicos, bioquímicos y de biología molecular que permitan una mejor caracterización de dichas cepas para un aprovechamiento biotecnológico integral. La inclusión de herramientas ómicas, como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, son necesarias para un desarrollo biotecnológico moderno de las cepas nativas de *Trichoderma* aquí evaluadas.

## VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Las cepas de *Trichoderma* spp. de estudio mostraron un crecimiento óptimo a 28°C, y crecieron y conidieron mejor en medio PDA que en medio AEM.
2. Las cepas *Trichoderma* spp. provenientes de rizósfera crecieron y germinaron mejor a temperaturas extremas de 16°C y 36 °C que las cepas endófitas de tejido foliar y de raíz. Aunque esto puede ser debido a el análisis de un mayor número de cepas de rizósfera que las endófitas.
3. En general, las cepas de estudio germinaron mejor en agar extracto de malta (AEM) que en agar de papa dextrosa (PDA), posiblemente por ser un medio nutricionalmente más rico.
4. Dos cepas endófitas de raíz y tejido foliar mostraron los porcentajes de germinación más altos en ambos medios de cultivo, mientras que las cepas de suelo mostraron una variación significativa en la capacidad de germinación.
5. Las cepas provenientes de suelo presentaron una mejor producción de enzimas hidrolíticas extracelulares que las cepas endófitas.
6. Se observó una heterogeneidad fisiológica entre las cepas provenientes de un mismo compartimento del agroecosistema, aun entre las endófitas foliares y de raíz cuyo número analizado fue bajo.

## IX. CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada se rechaza, ya que las cepas silvestres de *Trichoderma* spp. estudiadas presentan diferencias significativas en relación al crecimiento micelial, conidiación, germinación y la producción enzimática en las condiciones experimentales evaluadas.

Sin embargo los resultados obtenidos permiten afirmar el cumplimiento con los objetivos planteados inicialmente.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Altomare, C., W.A. Norvell, T. Björkman y G.E. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7): 2926-2933.
- Alamri, S., Hashem, M., Mostafa, Y. S. (2012). In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*. 17(4): 155-167.
- 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
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., et al. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*. 224(6): 1449-1464.
- Bazafkan, H., Dattenböck, C., Stappler, E., Beier, S., Schmoll, M. (2017). Interrelationships of VEL1 and ENV1 in light response and development in *Trichoderma reesei*. *PLoS One*. 12(4): e0175946.
- Bedine-Boat, M. A., Sameza, M. L., Iacomi, B., Tchameni, S. N., Boyom, F. F. (2020). Screening, identification and evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol potential of common bean damping-off pathogens. *Biocontrol Science and Technology*. 30(3): 228-242.
- Begoude, B. A. D., Lahlali, R., Friel, D., Tondje, P. R., Jijakli, M. H. (2007). Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology*. 103(4): 845-854.
- 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.
- Bellwood, P. (2012). How and why did agriculture spread? In P Gepts, TR Famula, RL Bettinger et al. (edits) *Biodiversity in agriculture: domestication, evolution, and sustainability*. New York (USA), Cambridge University Press. pp. 160-189.

- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology*. 74(4): 249-260.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., Samuels, G.J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*. 6(2): 263-295.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*. 69: 2357-2359
- Błaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jedryczka M. (2014). *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research*. 54, 309-317.
- Bourguet, D., Guillemaud, T. (2016). The hidden and external costs of pesticide use. In E. Lichtfouse (edit) *Sustainable Agriculture Reviews Vol 19*. Switzerland, Springer. pp. 35-120.
- Börkman, T., L. Blanchard y G. Harman. 1998. Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn by *Trichoderma harzianum*: effect of environmental stress. *Journal of American Society for Horticultura Science*. 23(1), 295-322.
- Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- Cai F, Dou K, Wang P, Chenthamara K, Chen J, Druzhinina IS. (2022). The current state of taxonomy and species identification. In N. Amaresan et al. (eds.), *Advances in Trichoderma Biology for Agricultural Applications*. Springer, Cham. pp. 3-35.
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., Picó, Y. (2018). Pesticide residues in honeybees, pollen and beeswax: assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*. 241: 106-114.
- Carreras-Villaseñor, N. Sánchez-Arreguín, J.A., Herrera-Estrella, A.H. (2012). *Trichoderma*: sensing the enviroment for survival and dispersal. *Microbiology*. 158 (1): 3-16
- Castrillo, M., G. Bich, G.Kramer, J.Velazquez, M. Rodriguez, P. Zapata, et al., (2015) Evaluation of synthetic and semi- synthetic culture media for endo-1,4- $\beta$ - glucanases secretion by *Trichoderma koningiopsis*. *Procedia Materials Science* 8: 786-792.

- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Degenkolb, T., Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex including the identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- Chaverri, P. & Samuels, G.J. (2013). Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*. 67(10): 2823-2837.
- Chovanec, P., Hudecova, D. & Varecka, L. (2001). Vegetative growth, aging-and-light-induced conidiation of *Trichoderma viride* cultivated on different carbon sources. *Folia Microbiol (Praha)* 46, 417-422.
- Consolo, V. F., Mónaco, C. I., Cordo, C. A., Salerno, G. L. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4): 1389-1398.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Val, E. K., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 92(4): fiw036.
- 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., Ghazalibiglar, H., Glare, T. R., Falloon, R. E. (2016a). Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. *Journal of Applied Microbiology*. 120(4): 999-1009.
- Daryaei, A., Jones, E. E., Alizadeh, H., Glare, T. R., Falloon, R. E. (2016b). Biochemical characteristics of *Trichoderma atroviride* associated with conidium fitness for biological control. *Biocontrol Science and Technology*. 26(2): 189-205.
- Da Silva, R. R. (2017). Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 183(1): 1-19.
- Dashtban, M., H. Schraft, and W. Qin. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences* 5(6): 578-595.
- Debbi, A., Bouregghda, H., Monte, E., Hermosa, R. (2018). Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in Algeria and a

- biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. *Frontiers in Microbiology*. 9: 282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00282>.
- Deitzer, G. F., Horwitz, B. A. & Gressel, J. (1988). Rhythms in blue light-induced conidiation of wild-type and mutant strain of *Trichoderma harzianum*. *Photochem Photobiol* 47, 425-431.
- Dos Reis Almeida, F. B., Cerqueira, F. M., do Nascimento Silva, R., Ulhoa, C. J., Lima, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 29(8): 1189-1193.
- Dubey, M., Jensen, D. F., Karlsson, M. (2021). Functional characterization of the AGL1 aegerolysin in the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* reveals a role in conidiation and antagonism. *Molecular Genetics and Genomics*. 296(1): 131-140.
- Dubey, M. K., Ubhayasekera, W., Sandgren, M., Funck Jensen, D., Karlsson, M. (2012). Disruption of the *Eng18B* ENGase gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* affects growth, conidiation and antagonistic ability. *PLoS One*. 7(5): e36152.
- El-Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A., Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium wilt*. *Plant Pathology Journal*. 31(1): 50-60.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2021 <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>. Consultado el 22 de febrero del 2021.
- Druzhinina, I.S., Shelest, E., Kubicek, C.P. (2014). Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters*. 337(1): 1-9.
- Dunlap, J. C., Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297, 815-819.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2021. <https://www.who.int/topics/pesticides/en/>. Consultado el 22 de febrero del 2021.
- Fried, M.A. & Druzhinina, I. S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*. 158: 69-83.



- Fróna, D., Szenderák, J., Harangi-Rákos, M. (2019). The challenge of feeding the world. Sustainability. 11(20): 5816. <https://doi.org/10.3390/su11205816>.
- Gajera, H. P., Vakharia, D. N. (2010). Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74(3): 274-282.
- Geraldine, A. M., Lopes, F. A. C., Carvalho, D. D. C., Barbosa, E. T., Rodrigues, A. R., Brandão, R. S., Ulhoa, C. J., Junior, M. L. (2013). Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*. 67(3): 308-316.
- George, H (2019) *Trichoderma* Improves Plant Growth and Kills Fungal Pathogens: a website publication posted on: Gardener's Path. <https://gardenerspath.com/how-to/organic/trichoderma/>
- Giovannoni, M., Gramegna, G., Benedetti, M., Mattei, B. (2020). Industrial use of cell wall degrading enzymes: the fine line between production strategy and economic feasibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8: 356.
- Gomes, H. D. O., Menezes, J. M. C., da Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., Teixeira, R. N. P., do Nascimento, R. F. (2020). Evaluating the presence of pesticides in bananas: an integrative review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 189: 110016. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110016>.
- González, M., I. Torres y H. Guzmán. (2002). Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. En: Proc. 16th Intl. Pepper Conf. 10 de noviembre de 2002. Tampico y Tamaulipas, México.
- Guoweia, S., H. Man, W. Shikai, and C. He. (2011). Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Enviromental Sciences* 8:357-361.
- Guzmán-Guzmán, P., Porrás-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*. 109(1): 6-16.
- Halder S. K., Pal S., Mondal, K. C. (2019). Biosynthesis of fungal chitinolytic enzymes and their potent biotechnological appliances. In A. N. Yadav et al. (eds.), Recent advancement in white biotechnology through fungi; Volume 1, Diversity and enzymes perspectives. Fungal Biology Series. *Springer Nature*, Switzerland AG. pp. 281-298.

- Hanking L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology* 67(3):597–607
- Harman, G. E., Jin, X., Stasz, T. E., Peruzzotti, G., Leopold, A. C., Taylor, A. G. (1991). Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological Control*. 1(1): 23-28.
- Hewedy, O. A., Abdel Lateif, K. S., Seleiman, M. F., Shami, A., Albarakaty, F. M., M El-Meihy, R. (2020). Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. *Biology*. 9(8): 189.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509-547.
- Hjeljord, L. G., Tronsmo, A. (2003). Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. *Phytopathology*. 93(12): 1593-1598.
- 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.
- Hoang, D.T, Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh, L. S. 2018. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. 35(2): 518-522.
- Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease Journal*. 87, 4-10.
- Ibraheem, O., and B. K. Ndimba (2013). Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose derived inhibitory compounds. *International Journal of Biological Sciences* 9(6): 598-612.
- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24. 14-21.
- 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.

- John, N. S., Anjanadevi, I. P., Nath, V. S., Sankar, S. A., Jeeva, M. L., John, K. S., Misra, R. S. (2015). Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus*—a polyphasic approach. *Biological Control*. 90: 164-172.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermin, L.S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14:587–589.
- Kamala, T., Devi, S. I., Sharma, K. C., Kennedy, K. (2015). Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. *BioMed Research International*. 1-21.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. 20(4): 1160-1166.
- Kim, K. H., Kabir, E., Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*. 575: 525-535.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*. 106(7): 757-767.
- 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.
- Krystofová, S., Varecka, L. & Betina, V. (1995). The  $45\text{Ca}^{2+}$  uptake by *Trichoderma viride* mycelium. Correlation with growth and conidiation. *Gen Physiol Biophys* 14, 323-327.
- Kubicek, C.P., Harman, G.E. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. *Taylor and Francis Ltd*. 1: 6-7.
- La Grange, D.C., R. den Haan, and W.H van Zyl. 2010. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:1195-1208
- Lakin-Thomas, P. L. & Brody, S (2004). Circadian rhythms in microorganisms: new complexities. *Annu Rev Microbiol* 58, 489-519.
- 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.Q., Song, K., Li, Y.C., Chen, J. (2016). Statistical culture-based strategies to enhance chlamyospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 17(8): 619-627.
- Letunic I, Bork P. (2021). Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*. 49(W1): W293-W296.
- Loc, N. H., Huy, N. D., Quang, H. T., Lan, T. T., Thu Ha, T. T. (2020). Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. *Mycology*. 11(1): 38-48.
- Lv, X., Zhang, W., Chen, G., Liu, W. (2015). *Trichoderma reesei* Sch9 and *Yak1* regulate vegetative growth, conidiation, and stress response and induced cellulase production. *Journal of Microbiology*. 53(4): 236-242.
- Marx, I. J., Van-Wyk, N., Smit, S., Jacobson, D., Vijoën-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.
- Marzluf, G.A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* (61): 17-32.
- Mukherjee, A. K., Kumar, A. S., Kranthi, S., Mukherjee, P. K. (2014). Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *3 Biotech*. 4(3): 275-281.
- Mukherjee, P. K., Hurley, J. F., Taylor, J. T., Puckhaber, L., Lehner, S., Druzhinina, I., et al. (2018). Ferricrocin, the intracellular siderophore of *Trichoderma virens*, is involved in growth, conidiation, gliotoxin biosynthesis and induction of systemic resistance in maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 505(2): 606-611.
- Moreno-Sarmiento, N., L. Moreno-Rodríguez y D. Uribe-Vélez. (2007). Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. pp. 38-45. En: Izaguirre-Mayoral, M.L., C. Labandera y J. Sanjuán (eds.). Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. Imprenta Denad Internacional, Montevideo.
- Narayanasamy, P. (2013). Biological Management of Diseases of Crops, Vol. 1: Characteristics of Biological Control Agents. Progress in Biological Control Vol. 15. 673 pp.

- Nguyen, L.T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., Minh, B. Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 32:268-274.
- 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. Tuony (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Heidelberg, Elsevier. pp. 429-453.
- Olsson, S. (1999). Nutrient translocation and electrical signaling. In *The Fungal Colony*, pp. 25-48. Edited by N. A. R. Gow, G. D. Robson & G. M. Gadd. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Pachauri, S., Sherkhane, P. D., Kumar, V., Mukherjee, P. K. (2020). Whole genome sequencing reveals major deletions in the genome of M7, a gamma ray-induced mutant of *Trichoderma virens* that is repressed in conidiation, secondary metabolism, and mycoparasitism. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1030.
- Pointing SB (1999) Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers* 2:17–33
- Popp, J., Pető, K., Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security. a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 33(1): 243-255.
- Rafiq, M., Hassan, N., Hayat, M., Ibrar, M., Sajjad, W., Haleem, A., et al. (2021). Geochemistry and insights into the distribution of biotechnological important fungi from the Third Pole of the world, Karakoram Mountains Range. *Geomicrobiology Journal*. 38(5): 395-403.
- Rambaut, A. (2009). FigTree v1. 3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ramankutty, N., Mehrabi, Z., Waha, K., Jarvis, L., Kremen, C., Herrero, M., Rieseberg, L. H. (2018). Trends in global agricultural land use: implications for environmental health and food security. *Annual Review of Plant Biology*. 69: 789-815.
- Robl, D., da Silva Delabona, P., Mergel, C. M., Rojas, J. D., dos Santos Costa, P., Pimentel, I. C., et al. (2013). The capability of endophytic fungi for production of hemicelluloses and related enzymes. *BMC Biotechnology*. 13(1): 1-12.

- Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A. (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein  $\alpha$ -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryotic Cell*. 1(4): 594-605.
- Roncal, T., Ugalde, U. O. & Irastorza, A. (1993). Calcium-induced conidiation in *Penicillium cyclopium*: calcium triggers cytosolic alkalinization at the hyphal tip. *J Bacteriol* 175, 879-886.
- Rosmana, A., Samuels, G. J., Ismaiel, A., Ibrahim, E. S., Chaverri, P., Herawati, Y. & Asman, A. (2015). *Trichoderma asperellum*: a dominant endophyte species in cacao grown in Sulawesi with potential for controlling vascular streak dieback disease. *Tropical Plant Pathology*. 40(1): 19-25.
- Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopatology*. 96(2): 195-206.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides?—a brief review. *Environment International*. 89: 7-11.
- Sandle, T. (2014) *Trichoderma* species. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt & M. L Tortorello (eds) pp. 644-646.
- Sanogo, S., Pomella, A., Hebbar, 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 perniciosus* on cacao. *Phytopathology*. 92(10): 1032-103.
- Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M., Baker, S., Brown, C., Cervantes-Badillo, M., et al. (2016). The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1): 205-327.
- Schubert, M., Mourad, S., Fink, S., Schwarze, F. W. M. R. (2009). Ecophysiological responses of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* (T-15603.1) to combined environmental parameters. *Biological Control*. 49(1): 84-90.
- Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C.P., Schmoll, M. (2009). Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(33): 13909-13914

- Seidl, V., Gamauf, C., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., Hartl, L., Kubicek, C.P. (2008). The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics*. 9(1): 327.
- Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., Pupko, T. 2015. GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research*. 43(W1): W7-W14.
- 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.
- Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., Singh G., Barnwala, R. P., Singla, N. (2020). Global trends in pesticides: a looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 201:110812. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110812>.
- Silva, R. N., Monteiro, V. N., Steindorff, A. S., Gomes, E. V., Noronha, E. F., Ulhoa, C. J. (2019). *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biology*. 123(8): 565-583.
- Silverman-Gavrila, L. B. & Lew, R. R. (2003). Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* Hyphal growth. *Microbiology* 149, 2475-2485
- Simkovic, M., Ditte, P., Kurucova, A., Lakatos, B. & Varecke, L (2008) Ca<sup>2+</sup> -dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Can J Microbiol* 54, 291-298.
- Speckbacher, V., Ruzsanyi, V., Martinez-Medina, A., Hinterdobler, W., Doppler, M., Schreiner, U., et al. (2020). The lipoxygenase *lox1* is involved in light-and injury-response, conidiation, and volatile organic compound biosynthesis in the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in Microbiology*. 11: 2004.
- 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*. 57(5): 419-427.
- 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.
- Suárez, C., R. Fernández, N. Valero, R. Gámez y A. Páez. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(2), 35-43.
- Sutton, J. y G. Peng. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology*. 83, 615-621.
- Ter Schure, E. G., van Riel, N. A. W. & Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies* (24): 67-83.
- Tomah, A. A., Alamer, I. S. A., Li, B., Zhang, J. Z. (2020). Mycosynthesis of silver nanoparticles using screened *Trichoderma* isolates and their antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Nanomaterials*. 10(10): 1955. <https://doi.org/10.3390/nano10101955>.
- Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*. 44(W1): W232-W235.
- Uhl, P., Brühl, C. A. (2019). The impact of pesticides on flower-visiting insects: a review with regard to European risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 38(11): 2355-2370.
- Úrbez-Torres, J. R., Tomaselli, E., Pollard-Flamand, J., Boule, J., Gerin, D., Pollastro, S. (2020). Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*. 59(3): 425-439.
- Valencia, H., J. Sánchez, D. Vera, N. Valero y M. Cepeda. (2007). Microorganismos solubilizadores de fosfatos y bacterias fijadoras de nitrógeno en páramos y región cálida tropical (Colombia) pp. 169-183. En: Sánchez, J. (ed.). Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.



- Valencia, H., J. Sánchez y N. Valero. (2005). Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfato presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del Páramo el Granizo. pp. 177-193. En: Bonilla, M. (ed.). Estrategias adaptativas de plantas de páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Unibiblos, Bogotá.
- Van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*. 63(1): 39-59.
- Van Peij, N.N., Visser, J. and de Graaff, L.H. (1998). Isolation and analysis of xlnR, encoding a transcriptional activator coordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*. 27, 131-142.
- 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.
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*. 101: 31-38.
- Watkinson, S. (1999). Metabolism and hyphal differentiation in large basidiomycete colonies. In *The Fungal Colony*, pp. 126-156. Edited by N. A. R. Gow, G. D. Robson & G. M. Gadd. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Wiame, J.M., Grenson, M. & Arst, H. N., Jr (1985) Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv Microb Physiol* 26, 1-88.
- White, T. J., Bruns T., Lee, S. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322, In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J., White, T.J. Academic Press, Inc., New York.
- Zambrano, C. (1989). Efecto de la concentración de inóculo de *Trichoderma harzianum* sobre el desarrollo de *Macrophomina phaseolina*. p. 56. En: Resúmenes XI Seminario Nacional de Fitopatología. Sociedad Venezolana de Fitopatología. 19 al 23 de noviembre 1989. Trujillo, Venezuela.