



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“CARACTERIZACIÓN MULTI-ÓMICA DE LA CEPA
CMU-08 DE *Trichoderma atroviride*”.**

T E S I S

**Que para obtener el título de
Doctor en Ciencias Biológicas**

PRESENTA

M.C. Karla Ivonne González Martínez

1106943g@umich.mx

Asesor: Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

gerardo.marrufo@umich.mx

Morelia, Michoacán. Mayo de 2025.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología y Conservación Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la asesoría del D.C. Gerardo Vázquez Marrufo. Se contó con el apoyo de la SECIHTI mediante la beca otorgada para la realización de estudio de Doctorado (beca no. 790293).

COMITÉ TUTORAL

D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

D.C. Sylvia Patricia Fernández Pavia

D.C. John Larsen

D.C. Rafael Salgado Garciglia

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	2
1.2 Mecanismos de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp.....	3
1.2.1 Competencia por nutrientes y espacio	4
1.2.2 Antibiosis.....	5
1.2.3 Micoparasitismo	6
1.2.4 Inducción de respuesta de defensa en plantas	7
1.3 <i>Trichoderma</i> como agente de biocontrol.....	8
2 JUSTIFICACIÓN.....	10
3 HIPÓTESIS	11
4 OBJETIVOS.....	11
4.1 Objetivo general	11
4.2 Objetivos específicos.....	11
5 RESULTADOS.....	12
5.1 CAPÍTULO 1	12
5.1.1 Introducción.....	13
5.1.2 Materiales y métodos.....	15
5.1.3 Resultados.....	17
5.1.4 Discusión	19
5.1.5 Conclusión.....	21
5.2 CAPÍTULO 2	25
5.2.1 Introducción.....	26
5.2.2 Materiales y métodos.....	29
5.2.3 Resultados.....	33
5.2.4 Discusión	37
5.2.5 Conclusión	40

5.3	CAPÍTULO 3	45
5.3.1	Introducción.....	46
5.3.2	Materiales y métodos.....	48
5.3.3	Resultados.....	49
5.3.4	Discusión	53
5.3.5	Conclusión.....	55
5.4	CAPÍTULO 4	60
5.4.1	Introducción.....	61
5.4.2	Materiales y métodos.....	63
5.4.3	Resultados.....	66
5.4.4	Discusión	70
5.4.5	Conclusión.....	73
6	DISCUSIÓN GENERAL.....	77
7	CONCLUSIÓN	80
8	REFERENCIAS	81
9	ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 3

Tabla 5.3-1. Estadísticas del ensamble del genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*... 50

Tabla 5.3-2. Número de secuencias de genes ortólogos universales de copia única de evaluación comparativa (BUSCO)* del genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. 51

CAPÍTULO 4

Tabla 5.4-1. Condiciones de trabajo del espectrómetro de masas AB Sciex TripleTOF 6600.
..... 64

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1-1. Morfología de *Trichoderma atroviride*..... 3
Figura 1.2-1. Mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp..... 4

CAPÍTULO 1

- Figura 5.1-1. Crecimiento de *T. atroviride* en microplaca FF de Biolog®..... 17
Figura 5.1-2. Conidiación de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* en distintos sustratos. 18
Figura 5.1-3. Ensayos de inhibición de *Botrytis cinerea* en microplaca. 19

CAPÍTULO 2

- Figura 5.2-1. Medición de características morfológicas de plantas de jitomate (*S. lycopersicum*) tratadas con los filtrados extracelulares (FECs) y conidias de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. 34
Figura 5.2-2. Plantas de jitomate (*S. lycopersicum*) tratadas con los FECs y conidias de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. 35
Figura 5.2-3. Solubilización de fosfatos de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. 36
Figura 5.2-4. Producción de NH₃, sideróforos y IAA por parte de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. 37

CAPÍTULO 3

- Figura 5.3-1. Alineación del genoma de la cepa CMU-08 con el genoma de la cepa P1 de *T. atroviride*. 50
Figura 5.3-2. Número de genes anotados por categorías funcionales COG en el genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*..... 51
Figura 5.3-3. Número de genes codificantes para enzimas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios (SM). 52

CAPÍTULO 4

- Figura 5.4-1. Grupo de metabolitos presentes en el exometaboloma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*..... 66
Figura 5.4-2. Metabolitos secundarios producidos por la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*. 67
Figura 5.4-3. Volatiloma de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*. 68
Figura 5.4-4. Grupo de metabolitos encontrados en el volatiloma de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*. 68
Figura 5.4-5. Número de proteínas identificadas en el secretoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. 69
Figura 5.4-6. Proteínas encontradas en el secretoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. 70

RESUMEN

Trichoderma spp. es un hongo ascomiceto que presenta características muy particulares las cuales le confieren la capacidad de emplearse como agentes de biocontrol. Este género de hongos presenta una alta plasticidad fisiológica además de antagonizar de manera eficiente a microorganismos fitopatógenos mediante distintos mecanismos de acción, en los cuales la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares son parte importante. En el presente trabajo se evaluó la capacidad antagónica de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* nativa de Michoacán, perteneciente al Cepario Michoacano Universitario de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La cepa CMU-08 produce metabolitos secundarios en diferentes condiciones de cultivo, capaces de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*. Los filtrados extracelulares (FECs) recuperados de cultivos líquidos de la cepa CMU-08 en condición basal e inducida con paredes celulares de *B. cinerea* inhibieron significativamente el crecimiento de la misma cepa del fitopatógeno a una concentración de 750 µg/mL. Los FECs de ambas condiciones de cultivo disminuyeron en un 24-34% el daño foliar causado por *B. cinerea*, en ensayo en hojas de jitomate, mientras que los metabolitos volátiles (VOCs) producidos disminuyeron el daño hasta en un 50% en el mismo tipo de ensayos. Se evaluó la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de la cepa CMU-08, empleando plantas de jitomate en invernadero. En dichos ensayos se aplicaron los FECs y conidias (1×10^6 por maceta) de la cepa de estudio. La aplicación de conidias de la cepa CMU-08 incrementó el peso fresco (12.47%), la altura (147.98%), el número de hojas (133.80%) y longitud de las raíces (120.19%). Mientras que la aplicación de los FECs de la CI incrementó el peso fresco (9.56%), la altura (108.66%), el número de hojas (103.82%) y la longitud de las raíces (89.38%) de las plantas. Además, dicha cepa de *T. atroviride* produce metabolitos secundarios, como sideróforos, NH₃, ácido indol acético, conjuntando con la capacidad de solubilizar fosfatos, lo puede relacionarse con los resultados obtenidos. En el presente trabajo se realizó el ensamblaje y anotación de del genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. En el genoma se encontró la presencia de genes como NRPS y TPKS, los cuales son responsables de la síntesis de metabolitos secundarios, principalmente de péptidos no ribosomales y terpenos. Además, se analizó el exometaboloma, volatiloma y secretoma de la cepa CMU-08 en condición basal e inducida. En dicho análisis se encontró que la cepa de estudio produce una gran cantidad de metabolitos secundarios tanto solubles como volátiles

asociados a la inhibición del crecimiento, tales como nepectalona, 6PP, salicilamida y 2-heptanona. Respecto a las enzimas extracelulares se determinó la producción de 405 proteínas se producen en ambas condiciones de cultivo, aunque de manera diferencial se determinó un mayor número de enzimas en la condición inducida. Los resultados obtenidos en el presente estudio comprueban la capacidad de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* para ser empleada biotecnológicamente ya que dicha cepa posee la capacidad de ser antagonista de fitopatógenos y al mismo tiempo ser bioestimulante del crecimiento vegetal.

Palabras clave: antagonismo, crecimiento vegetal, exometaboloma, secretoma, genoma.

ABSTRACT

Trichoderma spp. is an ascomycete fungus with very specific characteristics that give it the ability to be used as a biocontrol agent. This genus of fungi presents a high physiological plasticity in addition to efficiently antagonizing phytopathogenic microorganisms through different mechanisms of action, in which the production of secondary metabolites and extracellular enzymes are an important part. In the present work, the antagonistic capacity of *Trichoderma atroviride* strain CMU-08, native to Michoacán and belonging to the Cepario Michoacano Universitario of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, was evaluated. The strain CMU-08 produces secondary metabolites capable of inhibiting the growth of *Botrytis cinerea* under different culture conditions. Extracellular filtrates (ECFs) obtained from liquid cultures of strain CMU-08 under basal and induced conditions with *B. cinerea* cell walls significantly inhibited the growth of the same strain of the phytopathogen at a concentration of 750 µg/mL. The ECFs from both growth conditions reduced leaf damage caused by *B. cinerea* by 24-34% in tomato leaf assays, while the volatile metabolites (VOCs) produced reduced damage by up to 50% in the same type of assays. The ability of the strain CMU-08 to promote plant growth was evaluated using tomato plants in greenhouses. In these trials, ECFs and conidia (1×10^6 per pot) of the study strain were applied. The application of conidia of strain CMU-08 (increased fresh weight (12.47%), height (147.98%), number of leaves (133.80%) and root length (120.19%). While the application of ECFs from induced condition increased the fresh weight (9.56%), height (108.66%), number of leaves (103.82%) and root length (89.38%) of the plants. In addition, this strain of *T. atroviride* produces secondary metabolites such as siderophores, NH₃, indoleacetic acid, along with the ability to solubilize phosphates, which can be related to the results obtained. In the present work, the genome of *T. atroviride* strain CMU-08 was assembled and annotated. In the genome we found the presence of genes such as NRPS and TPKS, which are responsible for the synthesis of secondary metabolites, mainly non-ribosomal peptides and terpenes. In addition, the exometabolome, volatilome and secretome of strain CMU-08 were analyzed in basal and induced conditions. In this analysis, it was found that the study strain produces a large amount of soluble and volatile secondary metabolites associated with growth inhibition, such as nepectalone, 6PP, salicylamide and 2-

heptanone. Regarding extracellular enzymes, the production of 405 proteins was determined in both culture conditions, although a greater number of enzymes was differentially determined in the induced condition. The results obtained in the present study prove the capacity of strain CMU-08 of *T. atroviride* to be used biotechnologically, since this strain has the capacity to be an antagonist of phytopathogens and, at the same time, as biostimulant of plant growth.

Keywords: antagonism, plant growth, exometabolome, secretome, genome.

1 INTRODUCCIÓN

Se espera que para el año 2050 la población mundial se incremente hasta 8 900 millones de habitantes, lo que genera la necesidad de aumentar la productibilidad y rendimiento en la producción de distintos cultivos para poder satisfacer las demandas alimentarias (That *et al.*, 2020). Uno de los principales factores que limita los rendimientos de la producción agrícola son las enfermedades de los cultivos ocasionados por distintos microorganismos, principalmente por bacterias, oomicetos y hongos (Li *et al.*, 2023). Este último grupo de fitopatógenos puede ocasionar diversas enfermedades con efectos devastadores en cultivos de relevancia económica como el trigo, arroz, maíz, jitomate, papas, tabaco y soja (Asad, 2022). A la fecha, los niveles de producción agrícola requieren el uso de intensivo de fertilizantes y pesticidas químicos. Sin embargo, estos agroquímicos tienen efectos nocivos en la salud humana, se van acumulando en los sistemas biológicos y son tóxicos para especies animales y vegetales de ecosistemas terrestres y acuáticos, además de afectar a la microbiota benéfica (Koli *et al.*, 2019).

Entre las consecuencias más graves del uso desmedido de pesticidas, se encuentra el desarrollo de microorganismos resistentes a dichos agroquímicos (Mahmood *et al.*, 2016). La resistencia puede definirse como “la disminución hereditaria de la sensibilidad de una población a una sustancia química a la que está expuesta durante generaciones sucesivas” (Baudrot *et al.*, 2023). Entre las estrategias para evitar el aumento de la resistencia a los agroquímicos por parte de los microorganismos fitopatógenos se ha intentado alternar su uso, así como reducir la frecuencia e intensidad en las aplicaciones, pero estas se implementan solo después de que se ha desarrollado la resistencia (Baudrot *et al.*, 2023). Además, algunos hongos fitopatógenos considerados como los principales fitopatógenos a nivel mundial, incluidos *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum* spp. (Gokul *et al.*, 2023), se encuentran entre los de alto y mediano riesgo para desarrollar resistencia a fungicidas (FRAC, 2019).

Por lo anterior, se ha potencializado la búsqueda de alternativas novedosas y sustentables al uso de agroquímicos. Una de esas alternativas es el uso de microorganismos beneficiosos, los cuales son enemigos naturales de los fitopatógenos y además producen

metabolitos y enzimas que estimulan el desarrollo el sistema inmune de las plantas, al mismo tiempo que garantiza la calidad y seguridad de los productos vegetales (Gokul *et al.*, 2023). El combate de microorganismos fitopatógenos con enemigos naturales ha recibido el nombre de control biológico o biocontrol, el cual puede definirse como “el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de población o el impacto de un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante o dañino de lo que sería de otro modo” (Eilenberg *et al.*, 2001). Los principales microorganismos empleados en procesos de biocontrol son las bacterias, levaduras y hongos, estos últimos son los mayormente estudiados y comercializados debido a sus atributos fisiológicos y ecológicos particulares (Palmieri *et al.*, 2022). Además, los hongos no necesitan ser ingeridos para infectar a sus huéspedes, sino que utilizan mecanismos de ataque directo (Abdul-Halim *et al.*, 2023).

1.1 *Trichoderma* spp.

Entre las especies fúngicas más estudiadas y empleadas en procesos de biocontrol, se encuentran las que pertenecen al género *Trichoderma*, las cuales se consideran anamorfos del género *Hypocreales*. Una característica relevante de estas especies es que presentan un crecimiento rápido y una abundante producción de conidios. Estas especies de hongos son ubicuos y se pueden encontrar en el suelo y la rizosfera, generalmente como saprofitos, degradando materia orgánica como en madera podrida contribuyendo a su descomposición. Además, algunas especies pueden encontrarse como endófitas y otras presentan un estilo de vida micoparasítico (Abdul-Halim *et al.*, 2023). Una de las características morfológicas de las cepas de *Trichoderma* es la producción de pigmentos en el medio de cultivo, que van de coloraciones amarillo verdoso hasta un tono rojizo, aunque hay cepas que presentan ausencia de pigmentación. Los conidios pueden tener diferentes tonalidades en color verde brillante, amarillas, gris o marrón (Abdul-Halim *et al.*, 2023). Respecto a las características microscópicas de *Trichoderma*, estos hongos presentan hifas septadas y hialinas; los conidióforos son ramificados, cortos, translúcidos; sus fiálides son en forma de ampulita un tanto alargada, estrechas en la base y de cuello corto cerca del ápice, mientras que las fiálides terminales son más alargadas y estrechas. Las conidias se aglomeran en pequeños grupos terminales en las puntas de las fiálides, presentando diferentes formas, incluyendo redonda,

elipsoidal, ovalada o cilíndrica corta. En diversas especies de *Trichoderma* se pueden observar clamidosporas, de forma redonda o elipsoidal, terminales e intercalares, algunas de ellas incoloras y/o en coloraciones amarillentas o verdosas (Abdul-Halim *et al.*, 2023).

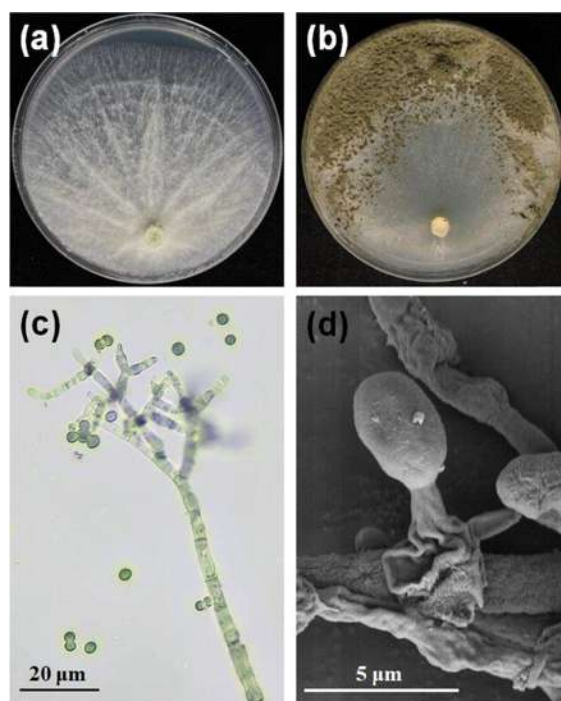


Figura 1.1-1. Morfología de *Trichoderma atroviride*. La imagen muestra las características morfológicas de la cepa LZ42 de *T. atroviride*. El panel a, muestra el crecimiento de la cepa en medio PDA cultivada por tres días. El panel b muestra el crecimiento de la cepa durante 14 días en medio CMD. El panel c, corresponde a la microfotografía de los conidióforos y conidios formados en medio CMD (tomada por microscopía óptica). El panel d, muestra los conidióforos y conidios formados en CMD (microfotografía tomada por SEM). (Rao *et al.*, 2022).

1.2 Mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp.

El éxito de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol se debe a los distintos mecanismos que presenta para antagonizar de manera eficiente a fitopatógenos de las plantas (Figura 1.2 1), los cuales incluyen la competencia por nutrientes y espacio, la inducción de la respuesta de defensa de la planta, el micoparasitismo y la antibiosis (Gupta y Bar, 2020), Siendo clave en estos últimos la producción de enzimas líticas y de metabolitos secundarios (Schuster y Schmoll, 2010). Estos mecanismos son complejos, actúan de manera directa o indirecta, e

interactúan entre sí para controlar satisfactoriamente a los microorganismos fitopatógenos (Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

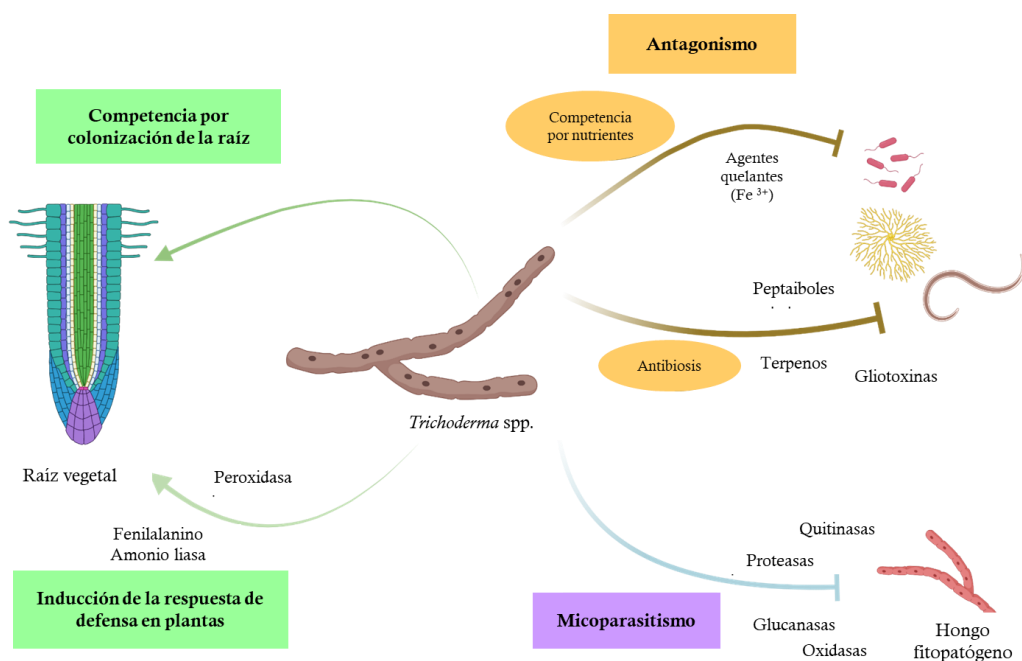


Figura 1.2-1. Mecanismos de antagonismo de *Trichoderma spp.* La imagen representa los diferentes mecanismos que las especies de *Trichoderma* utilizan para para antagonizar eficientemente a microorganismos fitopatógenos. La competencia por nutrientes espacio, al presentar una capacidad de crecer en diferentes condiciones ambientales y secreción de compuestos que le permiten quelar nutrientes impidiendo que los fitopatógenos los usen para su crecimiento; la antibiosis, mediante la producción de sustancias con actividad biológica; la inducción de resistencia en plantas, mediante fitohormonas y el micoparasitismo, por la actividad de enzimas líticas de la pared celular. (Tomado y modificado de Vázquez-Marrufo, 2021).

1.2.1 Competencia por nutrientes y espacio

La competencia por los nutrientes y el espacio es crucial entre las comunidades microbianas, ya que la disponibilidad de nutrientes, espacio y otros recursos físicos y químicos es limitada (Palmieri *et al.*, 2022). *Trichoderma spp.* es capaz de colonizar diferentes hábitats antes que los patógenos, lo que consigue privándolos de nutrientes y espacio (Tyśkiewicz *et al.*, 2022). Además, *Trichoderma spp.* presenta una rápida tasa de crecimiento y una alta versatilidad fisiológica, lo que le permite ser un buen competidor por nutrientes y espacio en diferentes compartimentos de los ecosistemas, particularmente en el suelo. Estas especies de hongos son capaces de utilizar exitosamente una amplia gama de sustratos como fuente de carbono y nitrógeno. Además, las especies de *Trichoderma* movilizan y absorben nutrientes del suelo

de manera más eficiente que otros microorganismos. Esto se debe a que tienen la capacidad de sintetizar ácidos orgánicos tipo glucónico, cítrico y fumárico, los cuales reducen el pH del suelo y aumentan la solubilización de fosfatos y microelementos como hierro, manganeso y magnesio (Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

La competencia por nutrientes en *Trichoderma* spp. está bien caracterizada en relación con la competencia por hierro, ya que producen compuestos de bajo peso molecular denominados sideróforos, los cuales son quelantes de alta afinidad por hierro (Fe). Este metal tiene una alta relevancia en procesos celulares, ya que es un cofactor de diversas enzimas clave en el crecimiento y desarrollo de plantas y microorganismos (Miethke, 2013). El hierro está presente en el suelo principalmente en forma de Fe^{3+} en condiciones con pH neutro y en presencia de oxígeno, que tiende a formar óxidos de hierro insolubles en un ambiente aeróbico, lo que lo hace no disponible para las plantas. Los sideróforos pueden unirse con el hierro insoluble (Fe^{3+}) para después transformarlo en una forma soluble de Fe^{2+} , lo que lo hace asimilable para las plantas y microorganismos (Tyśkiewicz *et al.*, 2022). Así, tanto la capacidad para asimilar diferentes compuestos como fuentes de carbono, como la captación y transporte de nutrientes en baja concentración, hacen de *Trichoderma* spp. exitosos competidores y colonizadores.

1.2.2 Antibiosis

El proceso de antibiosis está relacionado con la capacidad de las especies de *Trichoderma* para producir y secretar antibióticos y metabolitos secundarios que merman e inhiben el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, particularmente hongos y oomicetos. Los metabolitos que producen las diferentes especies de *Trichoderma* pueden clasificarse en dos grandes grupos, los metabolitos no volátiles (también llamados solubles) y los metabolitos volátiles (VOCs). Otra forma de clasificar a los metabolitos secundarios es de acuerdo su función, ya sea que participen en procesos de competencia o antagonismo (Vicente *et al.*, 2022).

A la fecha, se han caracterizado más de 180 metabolitos secundarios de distintas clases químicas producidos por diferentes especies de *Trichoderma* (Abdul-Halim *et al.*, 2023). Entre los grupos químicos que comprende esta diversidad de metabolitos secundarios

se encuentran alcoholes, cetonas, alcanos, furanos, mono- y sesquiterpenos, peptaiboles (péptidos no ribosomales), 6-pentil- α -pirona, viridina, gliovirina, glisopreninas, y gliotoxinas (Vicente *et al.*, 2022).

Es importante mencionar que el potencial como agente de biocontrol de una cepa de *Trichoderma* spp. está relacionado con la capacidad de producción y secreción de metabolitos secundarios; sin embargo, el efecto inhibitorio que puedan tener estas moléculas depende del tipo compuesto y del tipo de microorganismo objetivo a controlar (Vinale *et al.*, 2008).

Además de tener propiedades antibióticas, diferentes grupos de metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. desempeñan un papel importante como inductores de resistencia de las plantas, así como de promoción del crecimiento vegetal (Zeilinger *et al.*, 2016).

1.2.3 Micoparasitismo

El micoparasitismo, es el estilo de vida en el que un hongo parasita a otro. Este proceso es complejo y consiste en varias etapas que van desde el reconocimiento de la presa, al ataque, la penetración y la muerte del hongo blanco (Vinale *et al.*, 2008). En este fenómeno participan como herramientas clave enzimas líticas de la pared celular (CWDE, por sus siglas en inglés) secretadas por el micoparásito, como quitinasas, glucanasas (Vinale *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el proceso de micoparasitismo inicia con el reconocimiento del hongo blanco por parte de *Trichoderma* spp. Esto ocurre cuando las CWDEs secretadas de manera basal por parte de *Trichoderma* inician la hidrólisis de la pared celular del hongo blanco, liberando oligómeros que actúan como inductores para aumentar la producción de dichas enzimas (Vinale *et al.*, 2008). Posteriormente, *Trichoderma* dirige su crecimiento hacia el hongo blanco, y una vez establecido el contacto entre ambos hongos, se adhiere a su hospedero formando estructuras tipo apresorio y tipo papilas, en las cuales continúa la secreción de enzimas CWDEs, las cuales permiten que este proceso culmine con la digestión del contenido intracelular del hospedero, causando su muerte (Guzmán.Guzmán *et al.*, 2019).

Entre las especies de *Trichoderma* que destacan por presentar un estilo de vida micoparasitario están *T. virens* y *T. atroviride*, los cuales se encuentran entre los mejores agentes de biocontrol (*Zeilinger et al.*, 2016).

1.2.4 Inducción de respuesta de defensa en plantas

En este mecanismo de antagonismo, *Trichoderma* actúa afectando indirectamente a los fitopatógenos mediante la activación de los mecanismos de defensa de las plantas, utilizando diferentes rutas de señalización (*Tyśkiewicz et al.*, 2022).

La inducción de la resistencia vegetal está dada por elicitores, que actúan como inductores de la respuesta de defensa, los cuales pueden ser exolicitores, cuando son liberados de los microorganismos y endolicitores, cuando son liberados por los propios tejidos vegetales. Algunos de los elicitores que se han caracterizado incluyen a oligosacáridos, como glucanos y quitinas; proteínas y péptidos, como la endoxilanasas; algunos glicopéptidos y glicoproteínas, como los fragmentos de glicopéptidos de la invertasa; glicolípidos, como los lipopolisacáridos, y compuestos lipófilos, como los ácidos grasos (*Tyśkiewicz et al.*, 2022). Los elicitores permiten la activación de distintas vías de transducción de señales, que derivan en cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos de la planta. Dichos cambios incluyen la creación de barreras que previenen la propagación de fitopatógenos y la síntesis de diferentes compuestos y moléculas que permitan la activación de los mecanismos de defensa de la planta como fitoalexinas, compuestos orgánicos volátiles y fitohormonas (*Abdul-Halim et al.*, 2023).

Trichoderma es capaz de modificar el equilibrio hormonal de la planta ante factores bióticos y abióticos. El primer mecanismo de resistencia activado por las especies del género es la sistémica adquirida (SAR), eficaz contra patógenos biotróficos. La SAR está mediada por la expresión de genes codificantes de proteínas asociadas con la patogénesis (PR) y la producción de ácido salicílico (SA) como molécula de señalización. El segundo mecanismo activado es la resistencia sistémica inducida (ISR), la cual es eficaz contra patógenos necrotrofos y se encuentra mediada por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). Finalmente se activa la resistencia inducida (IR), eficaz en la defensa contra patógenos biotróficos y necrotrofos, y hacia factores de estrés abiótico, la cual es activada por el ácido β -

aminobutírico (BABA) e involucra al ácido abscísico (ABA) como molécula de señalización (Tyśkiewicz et al., 2022).

Es importante mencionar que la inducción de la resistencia sistemática y local en una planta depende de la especie misma, las especies fitopatógenas, los factores ambientales y la relación entre la rizosfera y el simbionte (Abdul-Halim *et al.*, 2023).

1.3 *Trichoderma* como agente de biocontrol

Todas las características fisiológicas, bioquímicas y moleculares anteriormente mencionadas hacen de las especies de *Trichoderma* un recurso natural de gran relevancia para su uso en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas útiles en el sector, agrícola, pero también en el área ambiental e industrial (Abdul-Halim *et al.*, 2023).

Se han descrito los mecanismos de antagonismo de distintas especies de *Trichoderma* hacia diferentes patógenos. Así, en el caso de *T. harzianum sensu lato* se ha observado el control hacia los fitopatógenos *B. cinerea*, *Pseuoperonospora cubensis*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sphaerotheca fusca*, mediante mecanismos como la competencia por nutrientes o la inducción de la ISR de la planta hospedera. Mientras que en el caso de *T. viride*, *T. harzianum* y *T. koningii*, se ha observado el biocontrol de *Lasiodiplodia theobromae* y *Colletotrichum musae* mediante el micoparasitismo y la antibiosis. Además, *T. atroviride* es capaz de antagonizar a *B. cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Neofusicoccum batangarum*, *Neofusicoccum parvum*, *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora cinnamomi* mediante antibiosis y la competencia por nutrientes y espacio (Fan *et al.*, 2023).

Globalmente, ya se encuentran diferentes productos usados en el biocontrol de fitopatógenos en campo, elaborados con distintos géneros de hongos, sin embargo, entre el 50 y 60 % de estos productos son elaborados a base de *Trichoderma* spp. (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2023). Estos productos son aplicados con la finalidad aumentar el crecimiento vegetal y producción agrícola; así como de proteger distintos cultivos vegetales y grupos de plantas (Woo *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que el estudio de nuevos aislados de *Trichoderma* spp., es crucial para identificar nuevas cepas con potencial para el biocontrol. Ya que se ha

documentado que el uso de cepas de *Trichoderma* endémicas, pueden presentar una mayor eficiencia para combatir a microorganismos fitopatógenos locales, debido a que las cepas antagonistas se encuentran mejor adaptadas a las características ambientales en donde se pretende utilizar (Sánchez y Cota, 2006). Además, es importante mencionar que la capacidad biocontroladora que pueda tener una cepa, está directamente relacionada con el microorganismo blanco. En ese sentido, es necesario evaluar el potencial de las cepas de *Trichoderma* que se pretenda utilizar en procesos biotecnológicos como el biocontrol, ya que una cepa puede ser un excelente agente de biocontrol, pero también puede tener otros beneficios como ser un inductor de la respuesta inmune o promotor del crecimiento en las plantas donde se realice su aplicación (Woo *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICACIÓN

Para tratar las enfermedades de los cultivos ocasionadas por distintos microorganismos fitopatógenos se han empleado diferentes clases de agroquímicos que tienen repercusiones nocivas en los ecosistemas y la salud humana. Además, el uso inadecuado de estas sustancias ha desencadenado que los microorganismos fitopatógenos desarrollen mecanismos de resistencia a los agroquímicos que habitualmente eran efectivas para su control y combate.

Por ello, es relevante la búsqueda de alternativas al uso de plaguicidas, que sean más amigables con el medio ambiente. En ese sentido, una de las opciones viables es el uso de microorganismos de biocontrol, que son enemigos naturales de los fitopatógenos. Dentro de estos antagonistas naturales destacan los hongos del género *Trichoderma*, ya que sus especies utilizan distintos mecanismos que les permiten antagonizar satisfactoriamente a distintos agentes fitopatógenos.

El análisis y caracterización de nuevos aislados de *Trichoderma* spp. con potencial para el biocontrol contribuye a generar conocimiento básico sobre los mecanismos de variación intraespecífica, al mismo tiempo que sienta las bases para el desarrollo de productos de biocontrol. Además, el uso de nuevos aislados permite la generación de productos y procesos de biotecnología local y regional eficaces contra variantes de fitopatógenos presentes en una región o cultivo particular, y que tienen un efecto positivo en el crecimiento vegetal y el incremento en los rendimientos de los cultivos de relevancia agronómica.

Por lo anterior, en el presente trabajo fue de interés la caracterización de la capacidad de las proteínas y metabolitos extracelulares producidos por la cepa CMU-08 de *T. atroviride* contra una cepa resistente del fitopatógeno *B. cinerea* y su efecto sobre el crecimiento vegetal.

3 HIPÓTESIS

La cepa CMU-08 posee características genómicas y fisiológicas particulares que reflejan la variación intraespecífica de *Trichoderma atroviride*, presentando diferencias significativas en los procesos de antagonismo y promoción del crecimiento vegetal con respecto a otros aislados geográficos de la misma especie.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar una caracterización genómico-fisiológica de la cepa CMU-08 asociada a sus mecanismos de antagonismo y promoción del crecimiento vegetal.

4.2 Objetivos específicos

- i. Comparar la actividad antifúngica de los filtrados extracelulares de cultivos basales e inducidos de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.
- ii. Evaluar el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la fisiología de la cepa CMU-08.
- iii. Contrastar la respuesta de crecimiento vegetal generada entre los filtrados extracelulares de distintas condiciones de cultivo y el micelio de la cepa de interés.
- iv. Determinar las diferencias en la composición de metabolitos y proteínas de los filtrados extracelulares de la cepa fúngica de interés crecida en distintas condiciones de cultivo.
- v. Identificar los genes y *clusters* de genes asociados a la capacidad antagónica y de promoción del crecimiento vegetal en el genoma de la cepa CMU-08.

5 RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1

Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la fisiología de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.

Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la fisiología de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.

Resumen

La caracterización fisiológica de cepas fúngicas es importante para optimizar su aprovechamiento biotecnológico, al mismo tiempo que proporciona información básica para entender la versatilidad fisiológica de un grupo taxonómico en particular. En el presente trabajo se analizó el crecimiento de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* en 95 fuentes de carbono y nitrógeno diferentes empleando microplacas Biolog® FF. La cepa CMU-08 pudo crecer en 80 de los sustratos analizados, mostrando un crecimiento eficiente en D-rafinosa, β -metil-D-glucósido, sacarosa, maltotriosa, manitol y α -D-lactosa, mientras que el ácido sebácico el sustrato menos empleado. Los sustratos en los que la cepa de estudio presentó mayores niveles de conidiación fueron el β -metil-D-galactósido, y la L-sorbosa. Los filtrados extracelulares de los micropozos con N-acetil-D-galactosamina y D-psicosa en los que creció la cepa CMU-08 mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento del fitopatógeno *Botrytis cinerea*, lo que indica la inducción de la síntesis y secreción de metabolitos extracelulares con actividad antifúngica en la cepa de estudio. La cepa CMU-08 muestra particularidades fisiológicas con respecto a otras cepas de *T. atroviride* analizadas a la fecha con microplacas FF de Biolog®.

5.1.1 Introducción

Las especies del género de hongos ascomycetes *Trichoderma* son ubicuas, presentando una distribución geográfica global en diferentes ecosistemas, incluidos aquellos con condiciones climáticas extremas (Al-Ani, 2018). Dentro de estos ecosistemas *Trichoderma* spp. se puede aislar de suelo, rizósfera, madera, mantillo y como endófito de plantas en los ambientes terrestres, así como en corales, esponjas y plantas en los ambientes acuáticos (de Padua and de la Cruz, 2021). Esta variedad de hábitats que puede ocupar *Trichoderma* spp. se asocian con diferentes estilos de vida, como el saprofitismo, participando en la degradación de materia orgánica, así como con distintos tipos de biotrofismo, incluyendo el endofitismo, asociado a plantas terrestres y acuáticas, y el micoparasitismo como depredador de otras especies fúngicas (Jangir *et al.*, 2017). El éxito de las especies de *Trichoderma* para colonizar una variedad de sustratos en distintos hábitats, y presentar transiciones en sus estilos de vida está dado en gran medida por su notable plasticidad

fisiológica, que les permite el desarrollo micelial y la conidiación en diferentes condiciones ambientales en presencia de diversas fuentes de carbono y nitrógeno (Woo *et al.*, 2023). A su vez, el aprovechamiento de fuentes de carbono y nitrógeno simples y complejas por parte de *Trichoderma* spp. reside en la amplia maquinaria de enzimas extracelulares hidrolíticas y oxidativas, así como en la capacidad de transportar hacia el interior celular los productos de degradación de sustratos complejos y canalizarlos a rutas del metabolismo primario y secundario (Kubicek *et al.*, 2019).

Las enzimas hidrolíticas extracelulares secretadas por *Trichoderma* spp. incluyen a celulasas, quitinasas, glucanasas y proteasas, entre otras, que le permiten degradar y asimilar los diferentes sustratos encontrados en su entorno (Wang y Zhuang *et al.*, 2020). La capacidad para producir y secretar dichas enzimas juega un papel relevante en el saprofitismo, pero algunas de éstas también están involucradas en el proceso de antagonismo hacia otros microorganismos (Woo *et al.*, 2023). Así, esta maquinaria de enzimas extracelulares participa en dos de los mecanismos de antagonismo hacia microorganismos fitopatógenos, permitiéndole a las especies de *Trichoderma* competir eficientemente por nutrientes con agentes fitopatógenos (Oszust *et al.*, 2020), y el ataque directo a las paredes celulares de hongos y oomicetes mediante el micoparasitismo (Woo *et al.*, 2023). Otro de los mecanismos asociados a la capacidad antagónica hacia microorganismos fitopatógenos de *Trichoderma* spp. es la antibiosis, el cual involucra la producción y secreción de metabolitos secundarios como peptaiboles, terpenos, pironas, policétidos, gliotoxinas y derivados de aminoácidos, los cuales pueden reducir o inhibir el crecimiento de distintos hongos y oomicetes fitopatógenos (Mukhopadhyay y Kumar, 2020). Al igual que la síntesis y secreción de enzimas extracelulares, la producción de metabolitos secundarios esta influenciada por diferentes factores ambientales que regulan la expresión de los *clusters* de genes del metabolismo secundario, destacando particularmente en ese sentido las fuentes de carbono y de nitrógeno (Brakhage, 2013).

Los estudios iniciales de fisiología en *Trichoderma* spp. documentaron la utilización preferencial de dextrosa, fructosa y manosa como fuentes de carbono, así como de distintos L-aminoácidos y amonio como fuentes de nitrógeno (Danielson y Davey, 1973). Posteriormente, el patrón de utilización de fuentes de carbono se propuso como una herramienta de clasificación taxonómica para *Trichoderma* spp. (Kubicek *et al.*, 2003). Los estudios fisiológicos y bioquímicos

enfaticaron el análisis del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, sin considerar el efecto sobre el crecimiento vegetativo o la producción de metabolitos secundarios (Juhász *et al.*, 2005). Recientemente se ha retomado la caracterización fisiológica relacionada con la utilización de distintos sustratos como fuente de carbono y nitrógeno de cepas de *Trichoderma* spp. mediante el empleo de microarreglos fenotípicos (Phenotype MicroArray System; Biolog, Hayward, California). La caracterización de la versatilidad metabólica y fisiológica de *Trichoderma* spp. mediante el empleo de microplacas FF de Biolog® ha sido de utilidad para la diferenciación entre especies, pero también posibilita la evaluación de la variación intraespecífica, la caracterización fenotípica de mutantes, la identificación de cepas con propiedades catalíticas relevantes, el análisis de la regulación metabólica, y el establecimiento de hipótesis ecológicas relacionadas con la ocupación de hábitats y la evolución del estilo de vida (Wang y Zhuang, 2020).

En el presente trabajo se emplearon las microplacas FF de Biolog® para evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la conidiación de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* aislada en la región central de México, la cual tiene un alto potencial para el biocontrol en campo. Además, el sobrenadante de todos los pozos de las microplacas FF en las que creció la cepa CMU-08 se empleó para evaluar la inhibición del crecimiento del fitopatógeno *Botrytis cinerea*, lo cual puede indicar que fuente de carbono y nitrógeno induce la síntesis y secreción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica por parte de la cepa de estudio.

5.1.2 Materiales y métodos

5.1.2.1 Cepas utilizadas

Se analizó la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*, la cual forma parte del Ceparario 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). Dicha cepa fue aislada del Parque Nacional “José Ma. Morelos”, del municipio de Charo, Michoacán, en un tipo de vegetación de bosque de pino-encino (Cázares-García *et al.*, 2016; González-Martínez *et al.*, 2024). Como fitopatógeno de prueba se empleó una cepa de *Botrytis cinerea*, aislada de un cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa*), en el municipio de Uruapan, Michoacán.

5.1.2.2 Versatilidad metabólica y patrones de conidiación de la cepa de la cepa CMU-08

Los inóculos de estos ensayos se obtuvieron de colonias en crecimiento logarítmico en placas de Petri de 95 mm con medio agar extracto de malta (MEA) con una cubierta de papel celofán, incubadas a 28 °C. El micelio se recuperó removiendo la cubierta de papel celofán y se transfirió a un tubo de ensayo de borosilicato con 16 mL de IF-FF (0.25% Phytigel (Sigma, USA), 0.03% Tween 40 (Sigma, USA) y H₂O_{dde}). La suspensión se ajustó a un valor de 75 (+/- 2) de transmitancia a una longitud de onda de 590 nm. Se adicionaron 100 µL del inóculo así preparado en cada uno de los pozos de la MicroPlaca FF Biolog® (Biolog, Inc., Hayward, CA.), incubándose en oscuridad a 28°C. Durante cuatro días se realizaron mediciones cada 24 h, determinando la absorbancia a 490 nm (actividad mitocondrial) y 750 nm (crecimiento micelial) utilizando el lector de microplacas Biolog MicroStation™ Reader (Biolog, Inc., Hayward, CA.). Además, se documentó la capacidad de conidiación en las distintas fuentes de carbono de la MicroPlaca FF Biolog®, continuando la incubación durante los 10 días posteriores a la inoculación. Las conidias formadas encada pozo se cosecharon de manera independiente y se contaron empleando una cámara de Neubauer.

5.1.2.3 Capacidad de inhibición de metabolitos bioactivos provenientes de cultivos en 95 sustratos diferentes

Se inoculó a la cepa CMU-08 de *T. atroviride* en una MicroPlaca FF Biolog® (Biolog, Inc., Hayward, CA.) como se describió anteriormente y se incubó durante tres días de la manera previamente descrita. Transcurrido el tiempo de incubación se recuperaron los sobrenadantes de los pozos de la microplaca, los cuales se centrifugaron dos veces a 2500 x g durante 15 minutos, con la finalidad de eliminar los restos celulares.

De manera independiente, se creció la cepa de *B. cinerea* en medio MEA, durante siete días a 28 °C, recuperando el micelio con IF-FF. La suspensión se ajustó a un valor de 75 (\pm 2) de transmitancia a una longitud de onda de 590 nm. Se añadieron 90 µL de inóculo del fitopatógeno a microplacas de 96 pozos, así como 10 µL de los sobrenadantes provenientes de los diferentes sustratos en los que previamente había crecido la cepa CMU-08. Las microplacas así inoculadas se incubaron a 28 °C y se determinó el crecimiento con relación a las lecturas de absorbancia a 750 nm en el equipo MicroStation (Biolog, USA), a las 48 h de incubación utilizando el programa Microlog3™ Release 4.20.

5.1.2.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron empleando pruebas de ANOVA con una prueba post hoc Tukey, con un valor de significancia de $P < 0.05$. Los datos se muestran como media error estándar (E.S.). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa jmp® (USA).

5.1.3 Resultados

La cepa CMU-08 de *T. atroviride* creció y asimiló de manera diferencial los 95 sustratos ($P < 0.05$) presentes en las microplacas FF de Biolog®. Los sustratos que esta cepa aprovechó más eficientemente para el crecimiento micelial incluyeron al glucógeno, D-rafinosa, β -metil-D-glucósido, sacarosa, maltotriosa, manitol y α -D-lactosa, con valores de densidad óptica (D.O.) entre 1.53 – 1.82 (Figura 5.1 1).

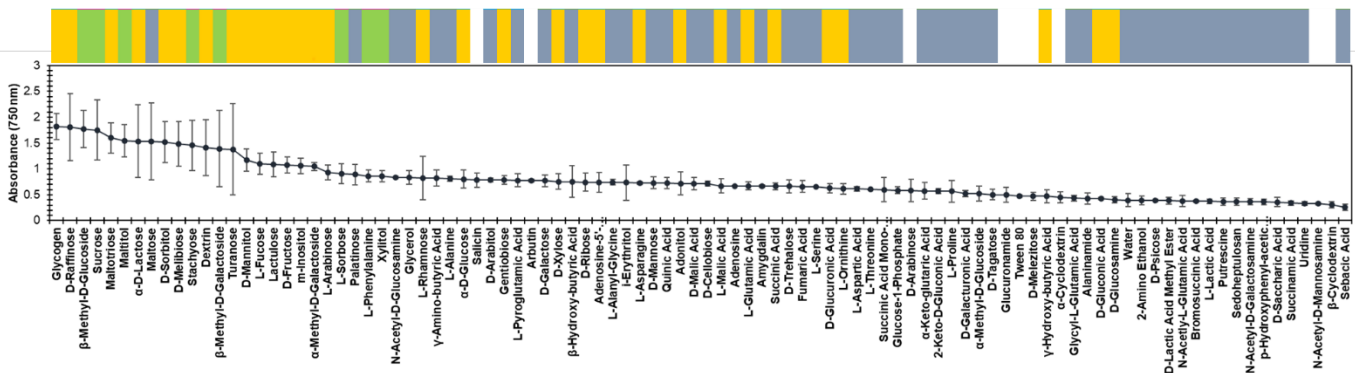


Figura 5.1-1. Crecimiento de *T. atroviride* en microplaca FF de Biolog®. La gráfica muestra la densidad óptica a 750 nm, correspondiente al crecimiento micelial de la cepa CMU-08 en 96 sustratos distintos de las microplacas FF de Biolog®. En la parte superior aparece un código de colores que corresponden a la conidiación en cada uno de los sustratos, el color verde representa los sustratos donde hubo una mayor conidiación, el amarillo conidiación intermedia, azul conidiación escasa y en blanco los sustratos no se observaron conidias. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizaron tres replicaciones independientes.

Los sustratos en donde se observó a simple vista una mayor conidiación de la cepa fueron L-fenilalanina, L-sorbose, β -metil-D-galactósido, estaquiosa, sacarosa, β -metil-D-glucósido, malitol y xilitol (Figura 5.1 2). El análisis cuantitativo mostró que los sustratos en los que se presentó una mayor conidiación fueron β -metil-D-galactósido, seguido de L-sorbose, en los cuales las concentraciones fueron 6 166 670 y 2 846 670 conidias/mL. En el resto de los sustratos en los

cuales se observó conidiación se produjeron entre 2 660 000 y 413 333 conidias/mL (Figura 5.1 2.).

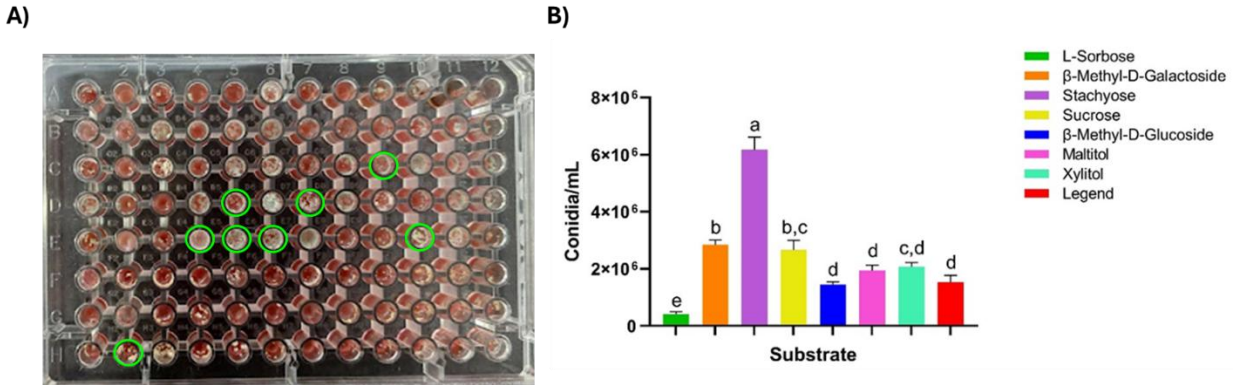


Figura 5.1-2. Conidiación de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* en distintos sustratos. El panel A muestra la conidiación sobre la placa de FF de Biolog®, indicando con un círculo verde los pozos en los que se observó a simple vista la aparición de conidias evidenciada por la coloración verde sobre toda la superficie del pozo. El panel B muestra la cantidad de conidias recuperadas de los pozos de la placa FF de Biolog® en los sustratos en donde se observó mayor conidiación. Las barras representan la desviación estándar de tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de Tukey, $P < 0.05$).

Los ensayos de inhibición en microplaca con los sobrenadantes provenientes de 95 sustratos diferentes mostraron diferencias significativas en la inhibición de *B. cinerea*. El 44% de los 95 sobrenadantes recuperados del cultivo de *T. atroviride* logró inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, aunque solo el 10% de los sobrenadantes presenta los mayores niveles de inhibición con relación al control, mostrando un valor de D.O. de 0.0 – 0.09 nm (Figura 5.1 3). Los metabolitos extracelulares producidos por la cepa CMU-08 de *T. atroviride* en los sustratos N-acetil-D-galactosamina (79.18 %) y D-psicosa (78.92%) fueron los que inhibieron más eficientemente el crecimiento del fitopatógeno. El 41% de los sobrenadantes provenientes de los distintos sustratos no inhiben el crecimiento del fitopatógeno, mostrando con un crecimiento similar al control (D.O: 0.2 – 0.29 nm). El 15 % de los sobrenadantes promueve el crecimiento del fitopatógeno en relación con el control (D.O: 0.3 – 0.39 nm).

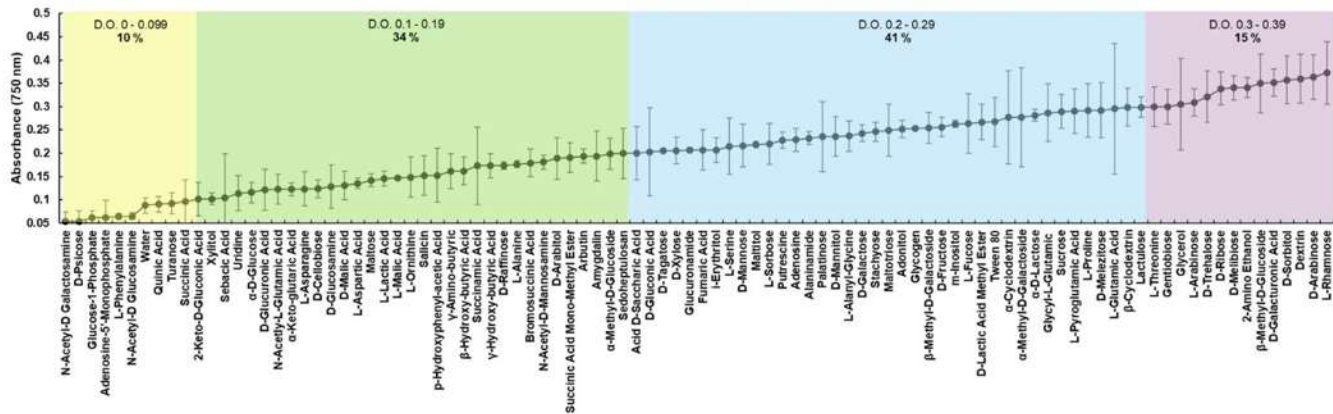


Figura 5.1-3. Ensayos de inhibición de *Botrytis cinerea* en microplaca. La gráfica muestra crecimiento de *B. cinerea* determinado a 750 nm, empleando los sobrenadantes de 95 sustratos diferentes de la microplaca FF de Biolog® en los que previamente creció la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizaron tres réplicas experimentales.

5.1.4 Discusión

En el presente trabajo se evaluó el crecimiento y metabolismo de la cepa CM-08 en 95 fuentes de carbono distintas empleando las placas FF de Biolog®. Además, se evaluó la conidiación y la actividad antifúngica de la cepa de estudio creciendo en los sustratos de dichas placas. Trabajos previos de otras cepas de *T. atroviride* analizadas con la misma metodología presentan similitudes y diferencias con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El análisis de 96 cepas aisladas de distintas regiones geográficas mostró patrones de agrupamiento con las especies identificadas mediante análisis filogenético, y permitió la descripción de tres nuevas especies. En dicho estudio se encontró las fuentes de carbono en las que todas las cepas de las distintas especies analizadas crecieron bien fueron D-manitol, N-acetil-D glucosamina, L-eritritol, glicerol, fructosa, fucosa, L-arabinosa, D-galactosa y xilitol (Kubicek *et al.*, 2003). En contraste, aquellos sustratos en los que todas las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas mostraron un crecimiento limitado fueron glicil-L- ácido glutámico, ácido succinámico, L-prolina, ácido α -hidroxibutírico, α -cetoglutarato, ácido hidroxifenil áctico, L-tiamina, putrescina, uridina, ácido málico, psicosa, y turanosa (Kubicek *et al.*, 2003). De igual forma, en varios de sustratos la cepa CMU-08 también presenta un bajo desarrollo micelial, principalmente en uridina y ácido succinámico. En particular, dos cepas de *T. atroviride* incluidas en estudio citado mostraron las tendencias de utilización antes mencionadas, y crecieron en lactulosa, maltotriosa y

sacarosa, no empleados por las otras especies del género analizadas (Kubicek *et al.*, 2003). Al igual que la mayoría de las especies del género, las dos cepas de *T. atroviride* no pudieron utilizar tagatosa, sustrato que solo fue asimilado por *Trichoderma virens*. Un estudio posterior evaluó la capacidad de crecimiento en placas FF de *Hypocrea atroviridis*, el telemorfo de *T. atroviride* (Dodd *et al.*, 2003), encontrando un crecimiento óptimo en sustratos como el glicerol, D-fructosa, D-xilosa y D-manitol, y en algunos de estos la velocidad de crecimiento se incrementó con un patrón de iluminación constante (Friedl *et al.*, 2008). Al analizar las cepas genómicamente idénticas LU132 y LU140, aisladas de la misma región geográfica, se encontraron diferencias significativas en el crecimiento o metabolismo de L-asparagina, ácido L-piroglutámico, L-alanilglicina, salicina, D-glucosa, N-acetil-D-glucosamina (Lange *et al.*, 2016).

La cepa CMU-08 presenta patrones similares de aprovechamiento de sustratos a los descritos en los estudios previamente citados para *Trichoderma* spp. en general, y de *T. atroviride*/*H. atroviridis* en particular. Así, la cepa CMU-08 crece eficientemente en D-manitol, D-fructosa y fucosa. Algunos de los sustratos en los que la cepa aquí estudiada presentó buen desarrollo micelial y no se reportan como tales en estudios previos de la misma especie son glucógeno, D-rafinosa y β -metil-D-glucósido. También en concordancia con estudios previos de *T. atroviride*, la cepa CMU-08 presentó escaso desarrollo micelial en uridina, ácido succinámico y ácido hidroxifenilacético, siendo el ácido sebácico en donde menor crecimiento mostró. Estas comparaciones muestran que la cepa CMU-08 presenta similitudes con relación a la utilización de sustratos con otras cepas de *T. atroviride*, pero también características de asimilación particulares. Las razones de las diferencias encontradas pueden estar asociadas a procesos de adaptación a condiciones ecológicas particulares, no obstante tener el mismo estilo de vida. Dichas condiciones ecológicas que tienen influencia sobre las diferencias metabólicas de las cepas de *T. atroviride* de distintas regiones geográficas necesitan ser estudiadas y definidas.

La cepa CMU-08 conidió diferencialmente en los 95 sustratos de la placa FF. Previamente se observó que las cepas de las cepas LU132 y LU140 conidieron de manera diferente en la placa FF, siendo la cepa LU140 la que produjo conidias en una mayor cantidad de sustratos, aunque no se especifica en cuáles (Lange *et al.*, 2016). También se ha documentado la capacidad de conidiación de *Hypocrea atroviridis* de manera abundante en ocho sustratos de las placas FF, entre ellos la estaquiosa y β -metil-D-glucósido (Friedl *et al.*, 2008), en los cuales la cepa CMU-08

también conidió óptimamente. Estudios posteriores sobre la combinación de factores ambientales como luz temperatura y pH en combinación con la fuente de carbono y nitrógeno permitirían optimizar la conidiación de la cepa CMU-08 para su producción a escala industrial, y conocer cómo se desempeñaría en campo en ese sentido.

Otro proceso fisiológico de los hongos que también se encuentra bajo la influencia de la fuente de carbono y nitrógeno, son la síntesis y secreción de metabolitos secundarios con actividad biológica (Brakhage, 2013). Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción y secreción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, al evaluar el efecto de los sobrenadantes de cada pozo de las placas FF de Biolog® en los que creció la cepa CMU-08 sobre el crecimiento del fitopatógeno *B. cinerea*. La influencia del sustrato en el efecto inhibitorio del sobrenadante hacia el fitopatógeno de prueba fue evidente, encontrando que los sobrenadantes del crecimiento de la cepa CMU-08 en N-acetil-D-galactosamina y D-psicosa provocaron la mayor inhibición en el desarrollo micelial del fitopatógeno, por lo que a futuro será interesante caracterizar el exometaboloma de dicha cepa en presencia de estos sustratos, para encontrar los posibles metabolitos responsables de la actividad antifúngica. Hasta donde he podido documentar, el único estudio previo utilizando la misma estrategia es el de los sobrenadantes de *Phomopsis* sp. crecido en las placas Biolog® FF, algunos de los cuales mostraron inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, hongo dimórfico patógeno de humano (Singh, 2009). Ninguno de los sustratos de dicho estudio previo que mostraron inhibición de *C. albicans* por parte de los filtrados de *Phomopsis* sp. resultaron en inhibición significativa de *B. cinerea* de la cepa CMU-08. Los resultados obtenidos con la cepa CMU-08 son interesantes ya que permiten optimizar procesos fisiológicos de la cepa CMU-08 en relación con una de las estrategias del micoparasitismo, que es la antibiosis.

5.1.5 Conclusión

La caracterización de la cepa CMU-08 con microplacas Bilog® FF muestra diferencias de crecimiento y conidiación con otras cepas de la misma especie, lo que contribuye a conocer la variación fisiológica intraespecífica de *T. atroviride*. Los sustratos N-acetil-D-galactosamina y D-psicosa inducen la síntesis y secreción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica por

parte de la cepa CMU-08. Estos resultados refuerzan estudios previos que muestran el potencial de la cepa CMU-08 para su inclusión en un producto de biocontrol.

Referencias

- Al-Ani, L. K. T. 2018. *Trichoderma* from extreme environments: physiology, diversity, and antagonistic activity. In D. Egamberdieva, N.-K. Birkeland, H. Panosyan, W.-J. Li (Editors), *Extremophiles in Eurasian ecosystems: ecology, diversity, and applications*. Singapore. Springer Nature Pte Ltd. pp. 389–403.
- Brakhage, A. A. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*. 11(1): 21–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Danielson, R. M., Davey, C. B. 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biology and Biochemistry*. 5(5): 505–515. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(73\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(73)90040-0)
- De Padua, J. C., de la Cruz, T. E. E. 2021. Isolation and characterization of nickel-tolerant *Trichoderma* strains from marine and terrestrial environments. *Journal of Fungi*. 7(8): 591. <https://doi.org/10.3390/jof7080591>
- Dodd, S. L., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*. 95(1): 27–40. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833129>
- Friedl, M. A., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. 2008. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(1): 245–250. <https://doi.org/10.1128/AEM.02068-07>
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S. 2017. *Trichoderma* and its potential applications. Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: *Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts*. 323–339. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_13

- Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*. 40(11): 3519–3525. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.057>
- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*. 38(3): 310–319. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00583-2](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00583-2)
- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarrocco, S., Ferreira-Noronha, E., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I. V., Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics*. 20: 485. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Lange, C., Weld, R. J., Cox, M. P., Bradshaw, R. E., McLean, K. L., Stewart, A., Steyaert, J. M. 2016. Genome-scale investigation of phenotypically distinct but nearly clonal *Trichoderma* strains. *PeerJ*. 4: e2023. <https://doi.org/10.7717/peerj.2023>
- Mukhopadhyay, R., Kumar, D. 2020. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 30(1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Oszust, K., Cybulska, J., Frąc, M. 2020. How do *Trichoderma* genus fungi win a nutritional competition battle against soft fruit pathogens? A report on niche overlap nutritional potentiates. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(12): 4235. <https://doi.org/10.3390/ijms21124235>
- Singh, M. P. 2009. Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi. *Journal of Microbiological Methods*. 77(1): 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.014>
- Wang, C., Zhuang, W.-Y. 2020. Carbon metabolic profiling of *Trichoderma* strains provides insight into potential ecological niches. *Mycologia*. 112(2): 213–223. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1698246>

Woo, S. L., Hermosa, R., Lorito, M., Monte, E. 2023. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5): 312–326. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>

5.2 CAPÍTULO 2

Evaluación de la promoción del crecimiento vegetal por parte de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Evaluación de la promoción del crecimiento vegetal por parte de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Resumen

Análisis previos han mostrado la capacidad de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* para inhibir *in vitro* el crecimiento de hongos y oomicetes fitopatógenos. En este trabajo se evaluó la capacidad de dicha cepa para promover el crecimiento vegetal. La aplicación de conidias de la cepa CMU-08 aumentó la altura de las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) un 147.98%. Se aplicaron también filtrados extracelulares basales (CB) obtenidos del crecimiento de la cepa en caldo papa dextrosa (PDB) y de dicho medio suplementado con paredes celulares de *Botrytis cinerea* (CI), incrementando la altura de las plantas un 108.66 % y 95.10 %, respectivamente. El número de hojas de las plantas mostró incrementos de 133.80, 103.82 y 91.34 % con la aplicación de las conidias y filtrados CI y CB, respectivamente. Las conidias de la cepa CMU-08 indujeron un aumento del 81.75 % en la longitud de las raíces, mientras que los filtrados CB lo hicieron en un 81.75 %. La cepa de estudio mostró un índice de solubilización de fosfatos de PSI 1.9 %, y una producción de ácido indol acético (AIA) de 102.6 µg/mL en PDB suplementado con triptófano. Además, la cepa CMU-08 es capaz de sintetizar sideróforos y produce NH₃. Los resultados muestran que la cepa CMU-08 es capaz de inducir el crecimiento vegetal por distintos mecanismos que incluyen la producción de hormonas vegetales y la facilitación del acceso a macro y micronutrientes.

5.2.1 Introducción

Entre las especies del género *Trichoderma* que se distinguen por su antagonismo hacia microorganismos fitopatógenos, *Trichoderma atroviride* destaca como una especie ancestral que ha conservado el micoparasitismo como su estilo de vida (Kubicek *et al.*, 2011). El genoma de dicha especie presenta una expansión de genes asociados al micoparasitismo, particularmente de aquellos que codifican para enzimas hidrolíticas de los polisacáridos y proteínas que conforman la pared celular de hongos y oomicetos (Kubicek *et al.*, 2011). El análisis bioinformático generado a partir del genoma de la cepa de referencia IMI206040 de *T. atroviride* ha permitido encontrar otros genes asociados tanto al micoparasitismo como a la promoción del crecimiento vegetal y la

inducción de la respuesta de defensa en plantas. Estos genes incluyen putativos codificantes de enzimas asociadas a la síntesis de fitohormonas y de moléculas de señalización que intervienen en la regulación de las respuestas de defensa en plantas (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019).

A la evidencia genómica se ha sumado una gran cantidad de evidencia experimental sobre la capacidad de *T. atroviride* para promover el crecimiento vegetal y promover la respuesta inmune en plantas. Entre las características asociadas a la promoción del crecimiento vegetal por parte de *T. atroviride* y otras especies del género se encuentran su capacidad para producir solubilizar fosfatos y secretar sideróforos, amonio, fitohormonas, ácidos orgánicos, metabolitos solubles y volátiles, y enzimas que hacen más disponible algunos de los nutrientes que se encuentran limitados en el ambiente de la rizosfera o promueven el desarrollo de la raíz (Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

En particular, se ha estudiado en detalle el efecto de la cepa de referencia IMI206040 de *T. atroviride* sobre el crecimiento, la morfología de la raíz, y la protección contra fitopatógenos de *Arabidopsis thaliana*, cuya interacción es un modelo de estudio de relevancia agrícola para el intercambio de señales microorganismo-planta. En este modelo de interacción la cepa fúngica promueve el crecimiento vegetal mediante la producción de ácido indol acético (IAA) (Salas-Marina *et al.*, 2011), y regula la arquitectura de la raíz induciendo la producción de raíces laterales mediante la producción del metabolito volátil 6-pentilpirona (6-PP) (Garnica-Vergara *et al.*, 2016). Además, la interacción del hongo con las raíces le confiere a la planta protección contra la infección del tejido foliar por parte de *Botrytis cinerea*, mediante la activación de la respuesta inmune mediada por ácido siálico (SA) y ácido jasmónico (JA) (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011). El efecto promotor del crecimiento de la cepa IMI206040, también se ha demostrado *in vitro* en plantas de jitomate, promoviendo la longitud del hipocótilo y de la raíz primaria durante el estado inicial de la interacción (Macías-Rodríguez *et al.*, 2018).

Al igual que la cepa de referencia IMI206040, cepas de *T. atroviride* de distinto origen geográfico han mostrado efecto promotor del crecimiento hacia distintas especies de plantas. Así, una cepa obtenida de la rizosfera de ruibarbo (*Rheum palmatum*) promovió la germinación de semillas de col china (*Brassica chinensis* L.) y el crecimiento de la planta, asociados a la capacidad de producción de IAA y sideróforos por parte del hongo (Chen *et al.*, 2021). Sin embargo, la cepa de *T. atroviride* evaluada no fue capaz de solubilizar fosfato. La cepa TaID20G aislada del suelo

de un cultivo de té en Turquía incrementó el peso fresco y seco de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) sometidas a estrés hídrico, activando la respuesta a estrés oxidativo (Guler *et al.*, 2016). De manera similar, la cepa HN082102.1 de origen marino, incrementó significativamente el peso seco y fresco de plantas de pepino, mejoró el contenido de proteína foliar y activó enzimas asociadas a la resistencia del estrés oxidativo, en condiciones de estrés salino (Zhang *et al.*, 2022). En el caso de una cepa de *T. atroviride* aislada de la rizosfera de plantas de jitomate, esta presentó un efecto promotor del crecimiento y mejoró la calidad del fruto de plantas de la misma especie, y dichos efectos se asociaron con la producción de IAA por parte del hongo (Gravel *et al.*, 2007). La cepa fúngica evaluada en dicho estudio no mostró capacidad para la solubilización de fosfatos.

Estudios recientes han evaluado la promoción del crecimiento vegetal por parte de filtrados extracelulares de cultivos líquidos de *Trichoderma* spp. Así, los filtrados extracelulares de cepas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *T. atroviride* incrementaron la altura y el peso de la planta, el número de hojas y de ramificaciones de plantas de jitomates, además de mejorar el contenido de flavonoides en la hojas y la protección contra el estrés oxidativo (Imran *et al.*, 2023). También, los filtrados extracelulares de la cepa CCTCCSBW0199 de *T. atroviride* aislada en China aplicada en combinación con el esteroide Brassinolida (BR), inhiben significativamente la infección de hojas de tomate por parte de *B. cinerea* e inducen actividades enzimáticas asociadas a la respuesta de defensa en plantas, incluidas peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa (Li *et al.*, 2020).

El estudio de nuevas cepas de *T. atroviride* permitirá establecer la variación fisiológica intraespecífica de dicha especie y definir qué tan conservados son los mecanismos de promoción de del crecimiento vegetal, información valiosa para estudiar adaptaciones a condiciones ambientales específicas y conocer procesos microevolutivos. Adicionalmente, la caracterización de cepas locales permitirá el desarrollo de productos de biocontrol y estimulación del crecimiento vegetal propios para variantes de cultivos específicas y cultivadas en condiciones agroecológicas particulares. En el presente trabajo se evaluó el efecto sobre el crecimiento de plantas de jitomate por parte de la cepa CMU-08, la cual es antagonista y micoparasítica eficiente de distintas especies de hongos y oomicetos fitopatógenos (González-Martínez *et al.*, 2024). En ensayos de invernadero, se aplicaron a plantas de jitomate tanto conidias como filtrados extracelulares de distintas condiciones de cultivo de la cepa de estudio, bajo la hipótesis de que el contenido de

metabolitos solubles extracelulares de dichos filtrados tiene un efecto positivo en el crecimiento vegetal. Además, se determinó la capacidad de la cepa CMU-08 para solubilizar fosfatos y producir IAA, sideróforos, amonio, características fisiológicas relevantes en una cepa fúngica con potencial estimular el crecimiento vegetal.

5.2.2 Materiales y métodos

5.2.2.1 Cepas utilizadas

Se empleó a la cepa CMU-08 de *T. atroviride*, perteneciente al Cepario Michoacano Universitario (CMU), el cual pertenece 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). Dicha cepa fue aislada del Parque Nacional “José Ma. Morelos”, del municipio de Charo, Michoacán, en un tipo de vegetación de bosque de pino-encino y mostró capacidad in vitro para su uso en biocontrol (Cázares-García *et al.*, 2016; González-Martínez *et al.* 2024). Además, se empleó una cepa del fitopatógeno necrotrófico *Botrytis cinerea*, aislada de un cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa*), en Uruapan, Michoacán.

5.2.2.2 Obtención del micelio de Botrytis cinerea

Se inocularon matraces de 1 L que contenían 250 mL de caldo papa dextrosa (PDB, BD USA) con 30 cilindros de 6 mm de diámetro de agar con micelio del borde de colonias en crecimiento activo en medio agar papa dextrosa (PDA, BD Difco, USA) de la cepa de *B. cinerea*. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación. La biomasa (micelio) se recuperó mediante filtración, se lavó tres veces con agua destilada estéril, se congeló y posteriormente se liofilizó.

5.2.2.3 Obtención de filtrados extracelulares (FECs)

Se realizaron cultivos líquidos en medio mínimo Vogel (MMV) (Cázares-García *et al.*, 2016) como condición de cultivo basal (CB), y en dicho medio suplementado con micelio inactivo de *B. cinerea* al 1% (p/v) como condición de cultivo inducido (CI), los cuales se esterilizaron durante 15 min a 15 lb/in² de presión. Se inocularon matraces de 1 L con 250 mL de la manera previamente descrita con la cepa CMU-08 y se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación durante seis días.

Transcurrido el tiempo de incubación, el micelio se separó del medio extracelular por filtración en condiciones de esterilidad.

5.2.2.4 Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en invernadero

5.2.2.4.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Los ensayos de promoción del crecimiento vegetal se realizaron durante junio a agosto del 2023 empleando semillas de jitomate, var. Río Grande (*Solanum lycopersicum*, Hit semillas, USA). La metodología empleada para la germinación de las semillas se basó en Cornejo-Ríos *et al.* (2021). Las semillas se germinaron en charolas de seis cavidades con peat moss (Sunshine mezcla 3, SunGro Horticulture; Agawam City, Massachusetts USA). Después de 14 días desde la germinación, 60 plántulas se trasladaron a macetas de plástico de cuatro litros. Para tener dos grupos de plantas, 30 de estas se trasladaron a sustrato fertilizado (N- 16 %, P₂O₅ – 8 %, K₂O – 12 %, MgO – 2 %, S – 5 %, B – 0.02 %, Fe – 0.4 %, Zn – 0.02 %, Mn – 0.06 %, Mo – 0.015 %, Cu – 0.05 %) y 30 se trasladaron a sustrato sin fertilizar. Ambos grupos de plantas se mantuvieron en el invernadero en condiciones naturales de luz, temperatura y humedad (31.83 °C, 38.25 % de humedad relativa). Se aplicó riego cada tercer día antes y durante la aplicación de los tratamientos.

5.2.2.4.2 Aplicación de los tratamientos

Con la finalidad de evaluar si los FECs presentaban algún efecto en el crecimiento vegetal, se realizó un experimento que consistió en seis tratamientos con cinco repeticiones cada uno, considerando cada planta como una unidad experimental en cada grupo de plantas. Los tratamientos fueron FECs provenientes de cultivos de la CB y CI; así como una suspensión de conidias (1×10^6 UFC/mL) de la cepa CMU-08. Se utilizaron tres tratamientos control, dos de los cuales fueron medio de cultivo de la CB y CI que no habían sido inoculados con la cepa CMU-08 de *T. atroviride* y un tratamiento con agua. Se aplicaron 50 mL de los FECs y controles a las plantas, tres veces durante el desarrollo del experimento en un intervalo de 15 días. Transcurridos 15 días posteriores a la aplicación del último tratamiento se registraron las siguientes variables: peso fresco y seco de las plantas, se midió la altura y longitud de las raíces y se contó el número de hojas.

Se determinó el incremento de las variables en las plantas tratadas con relación a sus respectivos controles con la siguiente fórmula:

$$\text{incremento (\%)} = \frac{\text{valor control}}{\ln \text{valor tratamiento}} * 100$$

En donde:

Valor control: es el promedio de las plantas a las que se aplicaron los tratamientos controles.

ln valor tratamiento: se refiere al logaritmo natural del valor de cada planta en las distintas condiciones experimentales.

5.2.2.5 Solubilización de fosfatos

5.2.2.5.1 Solubilización de fosfato en medio sólido

Para determinar la capacidad de solubilización de fosfato en medio sólido se empleó el medio Pikovskaya modificado con BPB (MPA+BPB) que contiene (g/L): 2.5 de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 13 de glucosa, 0.5 de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0.2 de NaCl, 0.1 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002 de KCl, 0.5 de extracto de levadura, 0.0002 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 15 de agar (Promwee *et al.*, 2014). Se añadió al medio de cultivo 0.0024 g azul de bromofenol (Gupta *et al.*, 1994). Las placas Petri fueron inoculadas como se menciona anteriormente en incubadas a 28 °C. Se analizaron las placas cada 24 h durante siete días para observar la solubilización de fosfato, considerando una reacción positiva el desarrollo de un halo claro alrededor de la colonia. El índice de solubilización de fosfato (PSI) se calculó utilizando la fórmula: $\text{PSI} = (\text{diámetro de la colonia} - \text{diámetro del halo}) / \text{diámetro de la colonia}$ (Alam *et al.*, 2002).

5.2.2.5.2 Solubilización de fosfato en medio líquido

La solubilización de fosfato en medio líquido se determinó empleando el medio NBRI-BPB (Mehta *et al.*, 2001), en el que la reacción positiva consiste en una decoloración de azul de bromofenol (BPB). A matraces de 250 mL se añadieron 15 mL de medio NBRI-BPB que contiene (g/L): 10 de sacarosa, 5 de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

y 0.025 de BPB. Se ajustó el pH del medio a 7 y se esterilizó de la manera anteriormente descrita. Los matraces con medio NBRI-BPB se inocularon añadiendo dos discos de agar de 6 mm de diámetro con micelio en crecimiento activo de la cepa de CMU-08. Se utilizó un control negativo que contenía medio de cultivo sin inocular. Los matraces así inoculados se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 96 h. Al término de la incubación, se determinó la decoloración de medio midiendo la absorbancia a 600 nm. Un resultado positivo de solubilización de fosfatos muestra valores de absorbancia negativos.

5.2.2.6 Producción de NH_3

La producción de NH_3 se determinó empleando el método descrito por Abdenaceur *et al.* (2022). Se utilizaron matraces de 125 mL con 25 mL de agua peptonada. Dichos matraces se inocularon con 3 discos de agar con micelio en crecimiento activo de la cepa CMU-08. Los cultivos se incubaron 28 °C y 120 rpm por 3 días. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 2 mL de los medios de cultivo y centrifugó a 1500xg. Se recuperó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 1 mL de reactivo de Nessler. Se considera una reacción positiva el cambio de color del sobrenadante de amarillo a naranja.

5.2.2.7 Producción de sideróforos

Estos ensayos se realizaron empleando la metodología descrita por Andrews *et al* (2016). Se emplearon placas Petri con capas de agar combinadas con medio acetato y levadura (AY) con (g/L): 0.27 de $C_2H_3NaO_2$, 0.15 de extracto de levadura y 15 de agar. El medio AY + solución de cromo azurol S (AY + CAS), que contiene 900 mL de medio AY esterilizado en autoclave durante 30 min y enfriado a 60 °C antes de añadir 1 mL de solución de oligoelementos esterilizada por filtración (10 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 44 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, y 13 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ por litro) y 100 mL de una solución CAS 10X (20 mL de 10 mM $Fe(NO_3)_3$, 40 mL de 10 mM cromo azurol S y 100 mL de 10 mM N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanesulfonato, DDAPS) esterilizado en autoclave por separado. Las placas se inocularon colocando un disco de agar proveniente de una colonia en crecimiento activo de la cepa CMU-08 y se incubaron a 28 °C por 5 días. La producción de sideróforos se consideró positiva cuando se observó un cambio en la coloración del medio de cultivo pasando de un color azul intenso a tonalidades que van del verde al amarillo.

5.2.2.8 Producción de IAA

Para la determinación de la producción de IAA se empleó el método descrito por Abdenaceur *et al.* (2022). Se utilizaron matraces de 250 mL con 50 mL de caldo papa dextrosa (PDB) y PDB suplementado con L-triptófano (1 g/L), los cuales fueron inoculados con tres discos de agar con micelio activo de la cepa CMU-08. Dichos cultivos se incubaron a 28 °C y 150 rpm durante 7 días. Como control negativo se empleó el medio sin suplementar con el aminoácido. Para determinar la producción de AIA se tomó una alícuota de 2.5 mL del cultivo en condiciones de esterilidad, dicha alícuota se centrifugó (1500xg) y se tomaron 2 mL del sobrenadante los cuales se mezclaron con 2 mL de solución de Salkowski (FeCl₃ 0.5 M y HClO₄ 35 % (v/v)). La reacción se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 530 nm. Además, se determinó la producción de IAA en los FECs empleados en los ensayos de promoción del crecimiento vegetal.

5.2.2.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron empleando pruebas de ANOVA con una prueba post hoc Tukey, con un valor de significancia de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa jmp® (USA).

5.2.3 Resultados

5.2.3.1 Promoción del crecimiento de plantas de jitomate

Los ensayos realizados en invernadero muestran que la aplicación de los FECs y las conidias de la cepa CMU-08 tienen un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas de jitomate, y que dicho efecto es mayor en las plantas que se encontraban en sustrato sin fertilizar ($P < 0.05$).

Respecto al peso fresco, la aplicación de los FECs mostró un efecto positivo en las plantas sembradas en ambos tipos de sustratos, ya que se presentó un incremento de 9.56 y 10.44 % en las plantas a las que se adicionó el FECS de la CB y CI, respectivamente (Figura 5.2 1). La aplicación de los FECs de la CB y la aplicación de conidias de la cepa de *T. atroviride* tienen un mayor efecto en las plantas que se encontraban en sustrato sin fertilizar, presentando incrementos del 9.95 y 12.47 %, respectivamente.

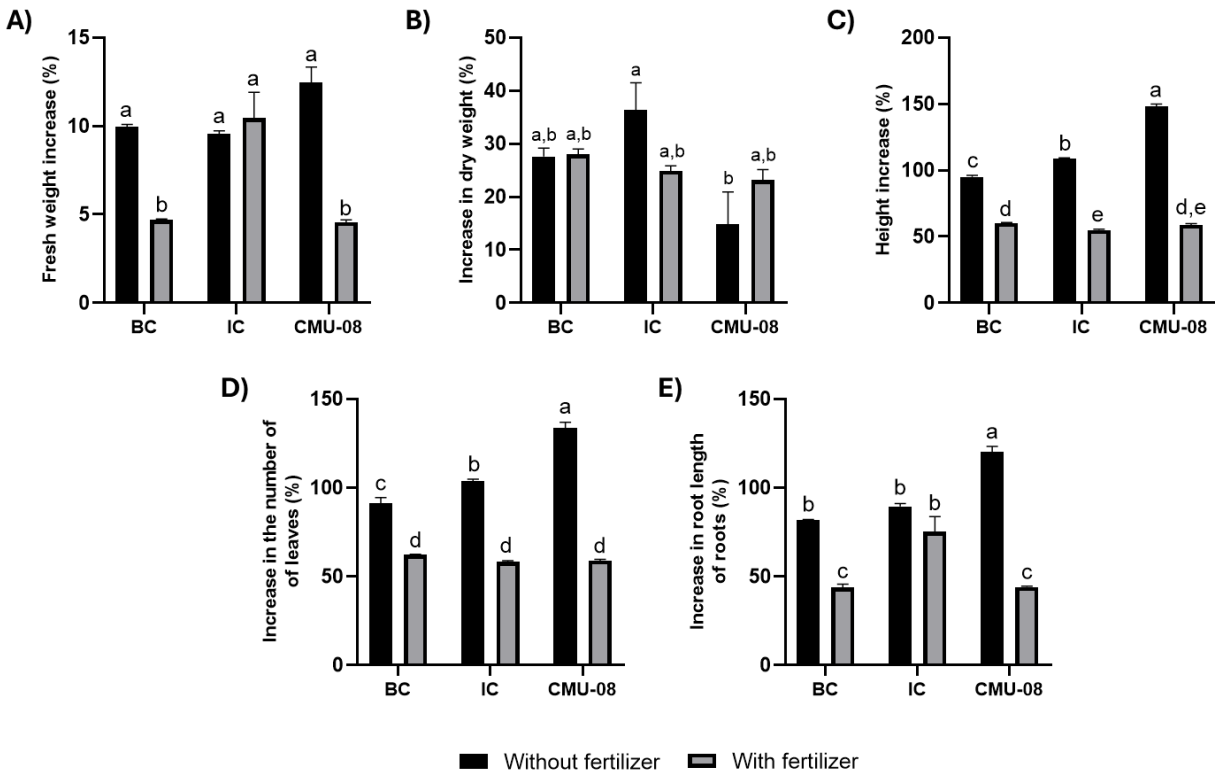


Figura 5.2-1. Medición de características morfológicas de plantas de jitomate (*S. lycopersicum*) tratadas con los filtrados extracelulares (FECs) y conidias de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. Las imágenes muestran el incremento del peso fresco (A), peso seco (B), altura (C), número de hojas (D) y longitud de las raíces (E) de plantas de jitomate tratadas con los FECs y conidias de la cepa CMU-08 con respecto a sus controles. Las barras representan el error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey, $P < 0.05$).

Aunque en el peso seco de las plantas no se encontraron diferencias significativas, las plantas a las que se les adicionó el FEC de la CI fueron aquellas que presentaron un mayor porcentaje del incremento de dicho factor (Figura 5.2 1).

Con relación a la altura, el incremento fue mayor en las plantas que se encontraban en sustrato no fertilizado (Figura 5.2 1). Además, hubo una diferencia significativa respecto a la adición de los tratamientos, ya que la aplicación de las conidias aumentó la altura de las plantas un 147.98 %, y la aplicación de los FECs de la CI y CB la aumentaron un 108.66 % y 95.10 %, respectivamente. Este mismo efecto se observó en el número de hojas de las plantas (Figura 5.2

2), donde los incrementos fueron de 133.80, 103.82 y 91.34 % con la aplicación de las conidias y los FECs de la CI y CB, respectivamente (Figura 5.2 1).

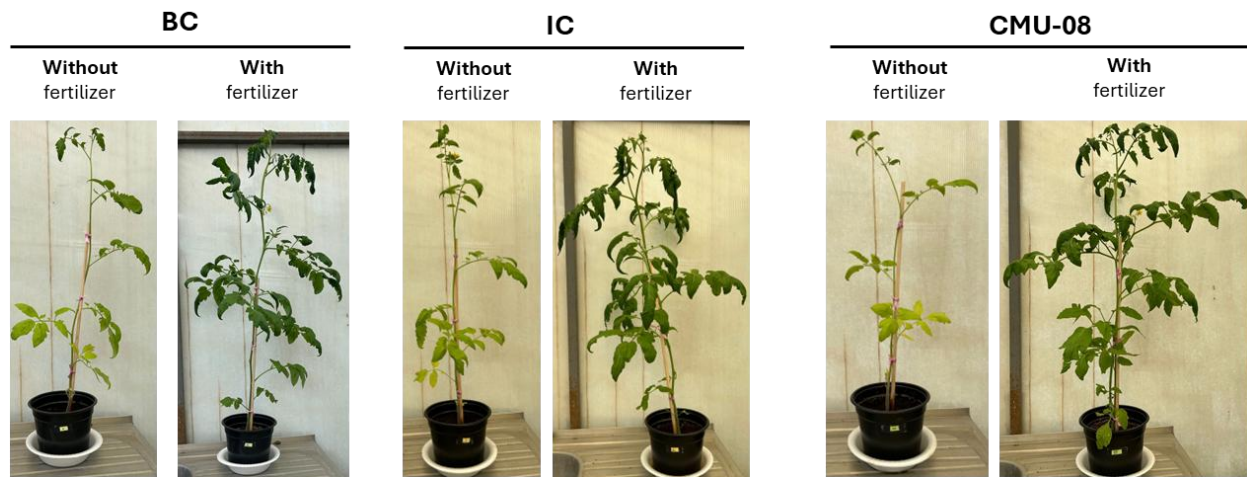


Figura 5.2-2. Plantas de jitomate (*S. lycopersicum*) tratadas con los FECs y conidias de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. Las imágenes muestran el desarrollo de las plantas tras la aplicación de los tratamientos. En la parte superior aparece el tratamiento aplicado, así como el tipo de sustrato en el que las plantas crecieron.

La aplicación de las conidias mostró el mayor incremento (120.19 %) en la longitud de las raíces, en plantas sembradas en suelo sin fertilizantes. Esta tendencia también se observó en las plantas tratadas con el FEC de la CB al incrementarse la longitud de las raíces 81.75 %. No se observó diferencia significativa en las plantas crecidas en ambos sustratos y tratadas con el FEC de la CI.

5.2.3.2 Solubilización de fosfatos

La cepa CMU-08 de *T. atroviride* mostró capacidad para solubilizar fosfatos en medio líquido y medio. La solubilización de las sales de fosfato en medio líquido es detectable a partir del cuarto día de incubación (Figura 3). En medio sólido, se observó la solubilización de fosfatos generando el halo de decoloración característico de dicha actividad, obteniendo un índice de solubilización de 1.92 % (Figura 5.2 3).

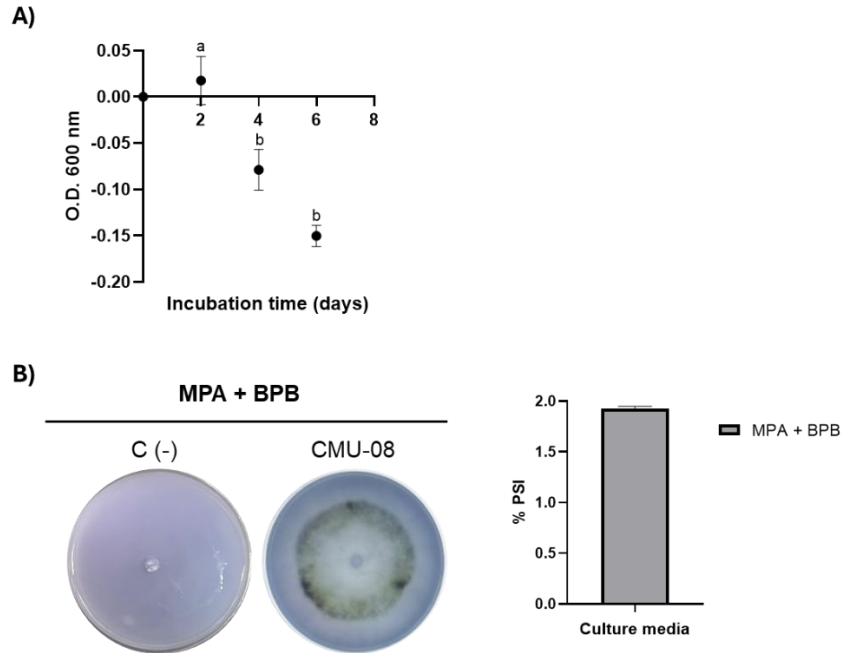


Figura 5.2-3. Solubilización de fosfatos de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. El panel A muestra la capacidad de solubilización de fosfatos en medio líquido, observándose la disminución de la densidad óptica medida a 600 nm (O.D.). El panel B muestra de lado derecho la solubilización de fosfatos en medio sólido; en la parte superior hace referencia con C(-) al control de negativo, que fueron placas en donde no se inoculó a la cepa de *T. atroviride*. De lado derecho la gráfica muestra el índice de solubilización de fosfatos.

5.2.3.3 Producción de NH_3 , sideróforos y IAA

La cepa CMU-08 de *T. atroviride* mostró capacidad para la producción de amoníaco y sideróforos (Figura 5.2 4A y 5.2 4B), los cuales participan en la promoción del crecimiento vegetal. En el ensayo empleado para la determinación de producción de amonio, se observó una coloración amarilla. Mientras que en el ensayo en donde se evaluó la producción de sideróforos, se observó el cambio de coloración del medio de cultivo a un amarillo claro, lo que indica una alta producción de sideróforos. Respecto a la producción de IAA, la cepa CMU-08 mostró ser una buena productora de esta fitohormona. En los cultivos donde se suplemento con triptófano, se observó una mayor producción de dicho compuesto (5.2 4C).

Existen diferencias significativas respecto a la cantidad de IAA producido en diferentes tiempos de incubación, ya que al quinto día de incubación se produjeron 102.16 $\mu\text{g/ml}$ de IAA, seguido del séptimo día de incubación al producir 70.77 y finalmente en el tercer día de incubación se obtuvieron 34.46 $\mu\text{g/ml}$ de IAA (Figura 5.2 4C). Se determinó la producción de esta

fitohormona en los FECs empleados en los ensayos de promoción del crecimiento vegetal en invernadero. En dichos ensayos la cepa de estudio produjo IAA mayoritariamente en la CI al producir 2.701 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en la CB se produjeron 1.981 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5.2 4D).

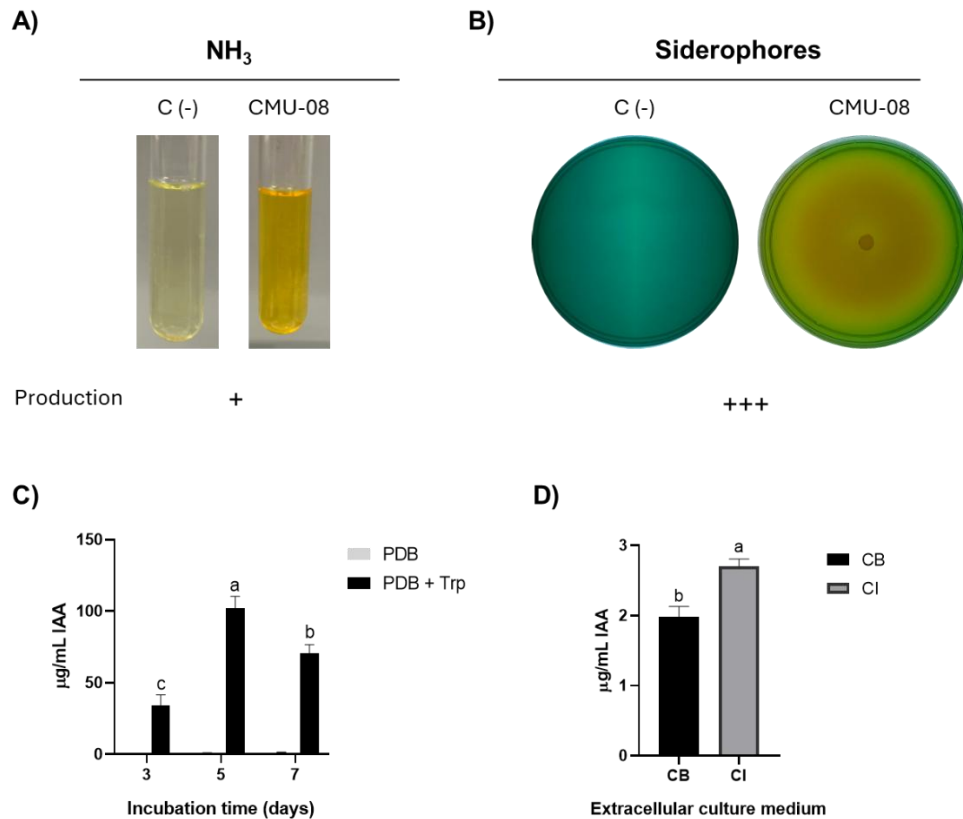


Figura 5.2-4. Producción de NH₃, sideróforos y IAA por parte de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. Panel A. Reacción positiva para la producción de amoníaco, en la parte inferior se indica la capacidad de producción dada por cruces: +: cambio a coloración amarilla, ++: cambio a coloración naranja y +++: cambio a coloración rojiza. Panel B. Cambio de coloración de las placas de medio AY + CAS cuando son inoculadas con la cepa CMU-08, en la parte inferior se indica la capacidad de producción con una escala que indica el cambio de color observado, +: cambio tenue de color, ++: cambio de color a verdoso y +++: cambio de color a amarillo. Panel C. Producción de IAA en distintos días de incubación en medio PDB y medio suplementado con triptófano (PDB + Trp). Panel D. Producción de IAA en los filtrados extracelulares (CB y CI) empleados en los ensayos de promoción del crecimiento vegetal. Letras distintas representan diferencias significativas (ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey, $P < 0.05$).

5.2.4 Discusión

Los agentes biológicos promotores del crecimiento vegetal forman parte de estrategias integrales para el mantenimiento o aumento de los rendimientos en los cultivos en la producción agrícola

(Zhou *et al.*, 2024). Las especies del género *Trichoderma* poseen el doble atributo de promover el crecimiento vegetal y al mismo tiempo ser un agente biológico (Woo *et al.*, 2023), por lo que su uso contribuye considerablemente a disminuir o eliminar agentes químicos que, no obstante ayudar a incrementar la producción agrícola, se acumulan en los ecosistemas alterando las cadenas tróficas y afectan la salud del ser humano (Devi *et al.*, 2022). La cepa CMU-08 de *T. atroviride* tiene capacidad antagónica y micoparasítica *in vitro* hacia distintos fitopatógenos (González-Martínez *et al.*, 2024). Por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad de dicha cepa para promover el crecimiento vegetal, empleando el jitomate como planta de prueba. Se analizó el efecto de la aplicación de conidias y de filtrados extracelulares recuperados de dos condiciones de incubación. También se analizaron características fisiológicas de la cepa de estudio asociadas a la promoción del crecimiento vegetal.

Tanto la aplicación de conidias como la de los filtrados extracelulares de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*, indujeron significativamente el crecimiento y el desarrollo de las plantas de jitomate, en comparación con las plantas control. Ambos tratamientos incrementaron la altura, el peso fresco, el número de hojas y la longitud de las raíces. Además, se observaron diferencias significativas en dichas variables entre los dos tipos de FEC evaluados. Evidencia previamente publicada muestra que cepa CMU-08 produce metabolitos secundarios solubles y volátiles capaces de inhibir el crecimiento del fitopatógeno *B. cinerea* (González-Martínez *et al.*, 2024). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los filtrados extracelulares (FECs) de la cepa CMU-08 también contienen metabolitos secundarios que promueven el crecimiento vegetal, posiblemente IAA y otras fitohormonas. Además, es probable que la síntesis de dichos metabolitos sea inducida por la presencia de micelio, específicamente las paredes celulares, de *B. cinerea*. Los cambios en la composición del metaboloma extracelular de acuerdo con la presencia de este tipo de inductores están siendo analizados en la cepa CMU-08.

El efecto estimulador en el crecimiento y el desarrollo de plantas de jitomate por parte de las conidias parece estar asociado a varias características fisiológicas de la cepa CMU-08. El fósforo es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo vegetal, sin embargo, este nutriente se encuentra poco disponible para su utilización por parte de las plantas (Rawat *et al.*, 2021). Esta baja disponibilidad del fósforo está relacionada a su escasa solubilidad en suelos, lo que impide su absorción por las raíces. La cepa CMU-08 mostró la capacidad de solubilizar

fosfatos, presentando un PSI 1.9 %, un valor de solubilización similar al reportado en la literatura para otras cepas de *Trichoderma* spp., con PSIs entre 1.55 y 3%, mientras que algunas otras especies presentan bajos PSI menores a 1.41 % (Abdenaceur *et al.*, 2022;). Aún más, algunas cepas que promueven el crecimiento vegetal no presentan capacidad para solubilizar fosfatos (Chen *et al.*, 2021) Existen diferentes mecanismos para la solubilización de fosfato orgánico e inorgánico por parte de microorganismos (Rawat *et al.*, 2021). En particular, la solubilización de fosfato por *Trichoderma* spp. está asociada con la producción de ácidos orgánicos, enzimas fitasas o fosfatasas y sideróforos (Bononi *et al.*, 2020), por lo que la cepa CMU-08 debe de estar uno o varios de estos mecanismos, algo que debe de evaluarse detalladamente a futuro.

Además del fósforo, nutrientes inorgánicos esenciales para el crecimiento vegetal como el Fe^{3+} y otros iones metálicos también se encuentran poco biodisponibles para su absorción en raíces, debido a la baja solubilidad de los óxidos de Fe en el suelo (Rengel, 2015).). Los sideróforos producidos por *Trichoderma* spp., presentan una alta afinidad por el hierro, quelándolo lo hacen disponible para su absorción por parte de las raíces de la planta, al mismo tiempo que lo limitan para microorganismos fitopatógenos (Tyśkiewicz *et al.*, 2022). Así, la cepa CMU-08 también promueve el crecimiento vegetal mediante este mecanismo, al mismo tiempo que se suma a su arsenal de herramientas previamente descritas de dicha cepa para antagonizar a fitopatógenos (González-Martínez *et al.*, 2024).

El amonio es útil para las plantas tanto de manera directa e indirecta, ya que contribuye al suministro de nitrógeno y es precursor en la síntesis de fitohormonas (Abdenaceur *et al.*, 2022). La cepa CMU-08 mostró ser buena productora de este compuesto, con niveles comparables o superiores a las de otras cepas de *Trichoderma* spp. empleadas en la promoción del crecimiento vegetal (Abdenaceur *et al.*, 2022;). La síntesis de fitohormonas por parte de *Trichoderma* spp. es un mecanismo empleado por varias especies del género (Tyśkiewicz *et al.*, 2022). La cepa CMU-08 produjo entre 34 y 102 $\mu\text{g/mL}$ de IAA en las condiciones de incubación empleadas. Dichos niveles son superiores a otras cepas de *T. atroviride*, en las que se han reportado valores de entre 18 y 21 $\mu\text{g/mL}$ de IAA (Abdenaceur *et al.*, 2022).

En el presente trabajo documentamos la capacidad de la cepa CMU-08 para estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas cuando no se empleó fertilización. Este resultado es interesante ya que se ha reportado que mediante la producción de fitasas *Trichoderma harzianum*

compite por el P con plantas de jitomate en cultivos hidropónicos deficientes en dicho nutriente, inhibiendo el desarrollo de la raíz, lo que resulta en una disminución del 82% de la biomasa vegetal en relación con las plantas que no se inocularon con *T. harzianum* (Li *et al.*, 2015). Esto sugiere que la cepa CMU-08 puede ser empleada en campo disminuyendo la aplicación de fertilizantes químicos, una práctica que ha demostrado ser útil en el rendimiento de los cultivos, disminuyendo los costos de producción (Vyas & Bansal, 2023).

5.2.5 Conclusión

Tomados en su conjunto, los resultados del presente trabajo muestran que la cepa CMU-08 de *T. atroviride* es capaz de estimular el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos que incluyen una mejora en la disponibilidad de nutrientes como el fósforo, el nitrógeno y el hierro, así como la estimulación directa mediante la producción de IAA y posiblemente otras fitohormonas. Estas tres características fisiológicas de la cepa CMU-08 no es común encontrarlas en una misma cepa de *T. atroviride*. Aún más, dichos resultados y los de el análisis de antagonismo evaluados previamente por nuestro grupo de trabajo (González-Martínez *et al.*, 2024), muestran que la cepa CMU-08 es un excelente candidato para su aplicación en un producto para el biocontrol en campo, ya que tiene una función dual de promotor-micoparásito.

Referencias

- Abdenaceur, R., Farida, B.T., Mourad, D., Rima, H., Zahia, O., Fatma, S.H. (2022). Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. *International Microbiology*. 25(4): 817-829. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00263-8>
- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., Rashid, M. (2002). *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture & Biology*. 4(4): 454-458.
- Andrews, M. Y., Santelli, C. M., Duckworth, O. W. (2016). Layer plate CAS assay for the quantitation of siderophore production and determination of exudation patterns for fungi. *Journal of Microbiological Methods*. 121: 41-43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.12.012>

- Bononi, L., Chiaramonte, J.B., Pansa, C.C., Moitinho, M.A., Melo, I.S. (2020). Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Scientific Reports*. 10(1): 2858. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>
- Cázares-García, S. V., Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Marrufo, G., Soledad Vázquez-Garcidueñas, M., Robinson-Fuentes, V. A., Gómez-Reyes, V. M. (2016). Typing and selection of wild strains of *Trichoderma* spp. producers of extracellular laccase. *Biotechnology Progress*. 32(3): 787–798. <https://doi.org/10.1002/btpr.2237>
- Chen, D., Hou, Q., Jia, L., Sun, K. (2021). Combined use of two *Trichoderma* strains to promote growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Agronomy*. 11(4): 726. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040726>
- Colla, G., Rouphael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95(8): 1706-1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., López-Bucio, J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal-and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*. 6(10): 1554-1563. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17443>
- Cornejo-Ríos, K., Osorno-Suárez, M. D. P., Hernández-León, S., Reyes-Santamaría, M. I., Juárez-Díaz, J. A., Pérez-España, V. H., Peláez-Acero, A., Madariaga-Navarrete, A., Saucedo-García, M. (2021). Impact of *Trichoderma asperellum* on chilling and drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Horticulturae*. 7(10): 385. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100385>
- Devi, P. I., Manjula, M., Bhavani, R. V. (2022). Agrochemicals, environment, and human health. *Annual Review of Environment and Resources*. 47(1): 399-421. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-120920-111015>.
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L.F., López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2 H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytologist*. 209:1496-1512. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>
- González-Martínez, K. I., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Herrera-Estrella, A., Fernández-Pavía, S. P., Salgado-Garciglia, R., Larsen, J., Ochoa-Ascencio, S., Rodríguez-Alvarado, G., Vázquez-Marrufo, G. (2024). Polyphasic Characterization of the Biocontrol Potential of a Novel Strain of *Trichoderma atroviride* Isolated from Central Mexico. *Journal of Fungi*. 10(11): 758. <https://doi.org/10.3390/jof10110758>

- González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., Bautista, E., Douterlungne, D., Jiménez-Bremont, J. F. (2018). The *Arabidopsis-Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific Reports*. 8(1): 16427. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34500-w>
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*. 39(8): 1968-1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>
- Guler, N. S., Pehlivan, N., Karaoglu, S. A., Guzel, S., Bozdeveci, A. (2016). *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38: 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2153-3>
- Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., Saxena, R. K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 40(3): 255-260. <https://doi.org/10.2323/jgam.40.255>
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*. 109(1): 6-16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Imran, M., Abo-Elyousr, K. A., Mousa, M. A., Saad, M. M. (2023). Use of *Trichoderma* culture filtrates as a sustainable approach to mitigate early blight disease of tomato and their influence on plant biomarkers and antioxidants production. *Frontiers in Plant Science*. 14: 1192818. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1192818>.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., et al. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*. 12: 1–15. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
- Li, R. X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q. R., Li, R., Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PloS One*. 10(6): e0130081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130081>
- Li, T. T., Zhang, J. D., Tang, J. Q., Liu, Z. C., Li, Y. Q., Chen, J., Zou, L. W. (2020). Combined use of *Trichoderma atroviride* CCTCCSBW0199 and brassinolide to control *Botrytis cinerea* infection in tomato. *Plant Disease*. 104(5): 1298-1304. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1568-RE>
- Macías-Rodríguez, L., Guzman-Gomez, A., García-Juárez, P., Contreras-Cornejo, H. A. (2018). *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS Microbiology Ecology*. 94(9): fiy137. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy137>

- Mehta, S., Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*. 43: 51–56. <https://doi.org/10.1007/s002840010259>
- Promwee, A., Issarakraisila, M., Intana, W., Chamswarnng, C., Yenjit, P. (2014). Phosphate solubilization and growth promotion of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by *Trichoderma* strains. *Journal of Agricultural Science*. 6(9): 8. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v6n9p8>
- Rao, Y., Zeng, L., Jiang, H., Mei, L., Wang, Y. (2022). *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings. *BMC Microbiology*. 22(1): 88. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02511-3>
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 21(1): 49-68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>.
- Rengel, Z. (2015). Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 15(2): 397-409. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000036>.
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*. 131: 15-26. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9782-6>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(4): 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>.
- Vyas, P., Bansal, R. (2023). Challenges in the compatibility of microbial inoculants with agrochemicals. In S. Kaur et al. (eds.), *Metabolomics, Proteomes and Gene Editing Approaches in Biofertilizer Industry*. Singapore, Springer Nature Singapore. pp. 139-155. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3561-1_8.
- Woo, S. L., Hermosa, R., Lorito, M., Monte, E. (2023). *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*. 21(5): 312-326. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>.
- Zhang, C., Wang, W., Hu, Y., Peng, Z., Ren, S., Xue, M., Liu, Z., Hou, J., Xing, M., Liu, T. (2022). A novel salt-tolerant strain *Trichoderma atroviride* HN082102. 1 isolated from marine habitat alleviates salt stress and diminishes cucumber root rot caused by *Fusarium oxysporum*. *BMC Microbiology*. 22(1): 67. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02479-0>

Zhou, W., Arcot, Y., Medina, R. F., Bernal, J., Cisneros-Zevallos, L., Akbulut, M. E. (2024). Integrated pest management: an update on the sustainability approach to crop protection. *ACS Omega*. 9(40): 41130-41147. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c06628>

5.3 CAPÍTULO 3

Ensamble y anotación del genoma de la cepa mexicana CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.

ENSAMBLE Y ANOTACIÓN DEL GENOMA DE LA CEPA MEXICANA CMU-08 DE *Trichoderma atroviride*

Resumen

Las especies del género *Trichoderma* poseen gran relevancia ecológica, biotecnológica y científica, por lo que es importante la secuenciación y anotación de genomas de dicho grupo taxonómico. El análisis genómico comparativo entre especies de *Trichoderma* ha permitido definir especies ancestrales, establecer trayectorias evolutivas relacionadas con el estilo de vida, e identificar procesos de expansión/pérdida de familias de genes. Además de su relevancia para el conocimiento de la biología básica, la obtención de genomas de nuevas especies, o de nuevos aislados geográficos de especies bien caracterizadas del género *Trichoderma*, tiene una gran relevancia biotecnológica. La presencia de genes codificantes de enzimas hidrolíticas en especies saprofitas es de interés en distintos tipos de industria, mientras que otros genes en especies ancestrales asociados al micoparasitismo tienen relevancia agronómica, ya que permiten identificar cepas con potencial para su uso en formulaciones de biocontrol. En particular, en las bases de datos públicas se encuentran disponibles a la fecha las secuencias de 11 genomas de *Trichoderma atroviride*. Sin embargo, todavía no se cuenta con genomas de cepas provenientes de México, un país con una amplia diversidad de cepas de dicha especie. En este trabajo se obtuvo la secuencia y se realizó la anotación del genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* aislada en el centro de México, la cual ha mostrado un buen potencial para su uso en formulaciones de biocontrol. Se compara la anotación con la de otros genomas de *T. atroviride*.

5.3.1 Introducción

El género de hongos ascomicetes *Trichoderma* se caracterizan por incluir especies ubicuas, con una distribución global en diferentes hábitats que van desde bosques templados y tropicales, hasta áreas desérticas, campos agrícolas y ambientes acuáticos (Singh *et al.*, 2020). Esta amplia distribución geográfica se debe en parte a la diversidad de estilos de vida de las especies de *Trichoderma*, que incluyen el saprofitismo, el micoparasitismo y el parasitismo de nemátodos, así como sus asociaciones biotróficas con especies vegetales, en las que se establecen como endófitos de raíz o tejido foliar (Mukherjee *et al.*, 2013). Además, algunas especies del género llegan a ser agentes infecciosos oportunistas del ser humano.

En varias especies del género *Trichoderma* se ha descrito y estudiado ampliamente su capacidad para antagonizar eficientemente a microorganismos fitopatógenos, característica que se atribuye a distintos mecanismos que incluyen la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la competencia por nutrientes y espacio, y su capacidad micoparasítica. Adicionalmente, las especies de *Trichoderma* promueven el crecimiento vegetal optimizando la disponibilidad de nutrientes inorgánicos, y pueden mejorar la tolerancia al estrés abiótico e inducir las respuestas de defensa de las plantas (Mukherjee *et al.*, 2013). Por lo anterior, especies como *T. harzianum sensu lato*, *T. virens* y *T. atroviride*, entre otras, se emplean desde hace varias décadas en formulaciones para el biocontrol y la promoción del crecimiento vegetal, en sustitución de agroquímicos (Martínez *et al.*, 2023). Esta estrecha relación entre la protección contra plagas y patógenos y la promoción del desarrollo vegetal, hacen de *Trichoderma* spp. un buen modelo para el estudio del micoparasitismo y las interacciones multi-reino planta-patógeno-hongo (Li *et al.*, 2021).

La relevancia ecológica, biotecnológica y como modelo experimental de *Trichoderma* spp. ha promovido el interés en la realización de análisis genómico funcional, con la finalidad de tener un conocimiento fisiológico y evolutivo más preciso de las especies del género (Li *et al.*, 2021; Priest *et al.*, 2020). El incremento en el catálogo de genomas fúngicos permite evaluar las variaciones en tamaño y organización estructural, así como analizar a un nivel muy detallado los procesos evolutivos y de adaptación asociados a un estilo de vida y la ocupación de nichos ecológicos, además de generar información bioquímica y metabólica de relevancia biotecnológica (Priest *et al.*, 2020). El primer genoma secuenciado del género *Trichoderma* fue el de *T. reesei/H. jecorina*, una especie saprófita y productora relevante de enzimas hidrolíticas como celulasas y hemicelulasas (Martínez *et al.*, 2008). Posteriormente se secuenciaron los genomas de *T. atroviride* (IMI 206040) y *T. virens* (Gv29-8), especies consideradas como micoparasitarias y excelentes agentes de biocontrol (Kubicek *et al.*, 2011).

El análisis genómico comparativo de los tres primeros genomas de *Trichoderma* spp. permitió dilucidar similitudes y diferencias en procesos básicos como el ciclo celular, la respuesta a estímulos ambientales, y la reducción asexual, entre otros (Schmoll *et al.*, 2016). También, se demostró que *T. atroviride* es una especie ancestral a *T. virens* y *T. reesei*, por lo que se considera que el micoparasitismo, representado en la actualidad por las primeras dos especies, precedió el estilo de vida saprofítico (Kubicek *et al.*, 2011). Además, se observó una expansión de varias

familias de genes en las especies micoparasíticas, y la pérdida de funciones asociadas al micoparasitismo en *T. reesei* en su conversión al saprofitismo. La comparación de genomas entre las especies de *Trichoderma harzianum* y *T. atroviride* con capacidad para el biocontrol, permitió encontrar diferencias en el mecanismo de síntesis de ácido indol acético, así como su participación diferencial en el metabolismo del fósforo y del nitrógeno en suelo (Ji *et al.*, 2024).

Actualmente en las bases de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el portal MycoCosm (<http://jgi.doe.gov/fungi>) se encuentran depositados 11 genomas de *T. atroviride* de distintas regiones geográficas. Sin embargo, a la fecha no existe un genoma ensamblado y anotado de una cepa de dicha especie aislada en México, país con una amplia diversidad de *Trichoderma* spp. (Ahedo-Quero *et al.*, 2024). El ensamble y anotación de genomas de distintos aislados geográficos de *T. atroviride*, posibilita la realización de estudios comparativos para evaluar procesos microevolutivos y de adaptación en la especie. Por ello, el objetivo del presente trabajo es presentar el ensamble y anotación del genoma de una cepa de *T. atroviride* aislada en el estado de Michoacán, centro de México, que posee un amplio potencial para el biocontrol en campo (González-Martínez *et al.*, 2024).

5.3.2 Materiales y métodos

5.3.2.1 Material biológico

Se estudió la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*, aislada del Parque Nacional “José Ma. Morelos”, del municipio de Charo, Michoacán, en un tipo de vegetación de bosque de pino-encino (Cázares-García *et al.*, 2016; González-Martínez *et al.*, 2024). Esta cepa forma parte del Ceparío 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).

5.3.2.2 Análisis genómico

5.3.2.2.1 Secuenciación del genoma

La secuenciación del genoma de la cepa CMU-08 la realizó la empresa SEQCENTER, mediante la construcción de bibliotecas con los kits Illumina DNA Prep e índices UDI de 10 pb de IDT y con el kit de código de barras nativo 24 V14 (SQK-NBD114.24) de Oxford Nanopore

Technologies (ONT). Estas bibliotecas fueron secuenciadas mediante Illumina (NovaSeq 6000) y MinION Oxford Nanopore (Mk1B), respectivamente. Para demultiplexar las muestras se utilizaron los programas bcl-convert v4.0.3. para las secuencias generadas por Illumina y Guppy para las secuencias originadas mediante MinION.

5.3.2.2.2 Ensamble y anotación del genoma

Para el ensamble y anotación del genoma de la cepa CMU-08 se realizó el análisis de control de calidad y el recorte de adaptadores empleando los programas FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), bcl-convert 4.0.3 (<https://support.illumina.com/downloads/bcl-convert-v4-0-3-installer.html>) y Porechop 0.2.3_seqan2.1.1 (<https://github.com/rrwick/Porechop>) para la secuenciación de Illumina y ONT, respectivamente. El ensamblaje de lecturas ONT se realizó con el programa Flye 2.9.1 (Kolmogorov *et al.*, 2019). Se realizó un alineamiento de las secuencias Illumina y el archivo de salida de Flye empleando la herramienta minimap2 (Li, 2018). Con el alineamiento y el ensamblado obtenido por Flye, se pulió el ensamble con Pilon 1.23 (Walker *et al.*, 2014). Se eliminaron del ensamblaje los contigs de lectura larga con una cobertura de lectura corta promedio de 15x o menos. Se realizó un ordenamiento empleando el genoma de la cepa P1 de *T. atroviride* (<https://github.com/tfwangasimb/Trichoderma-biocontrol/releases>) con la herramienta RagTag (Alonge *et al.*, 2022). Este mismo genoma de referencia se empleó para calcular la cobertura del genoma ensamblado. Se evaluó la calidad del ensamblado con QUAST 5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013) y en BUSCO 5.5.0 comparándolos con la base de datos hypocreales_odb10 (OrthoDB; <https://www.orthodb.org>). La anotación del genoma se realizó con funannotate 1.8.15 (Palmer, 2017), y se empleó antiSMASH 7.0 (Medema *et al.*, 2011) para la identificación de genes asociados a la síntesis de metabolitos secundarios.

5.3.3 Resultados

El ensamble del genoma ordenado (Fig. 5.3 1) de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* a partir de las lecturas generadas por la combinación de las plataformas de secuenciación Illumina (NovaSeq 6000) y Oxford Nanopore (MinION Mk1B) generó 16 scaffolds y un tamaño de 38 173 264 pb, con un porcentaje de GC de 47.98 % (Tabla 5.3 1).

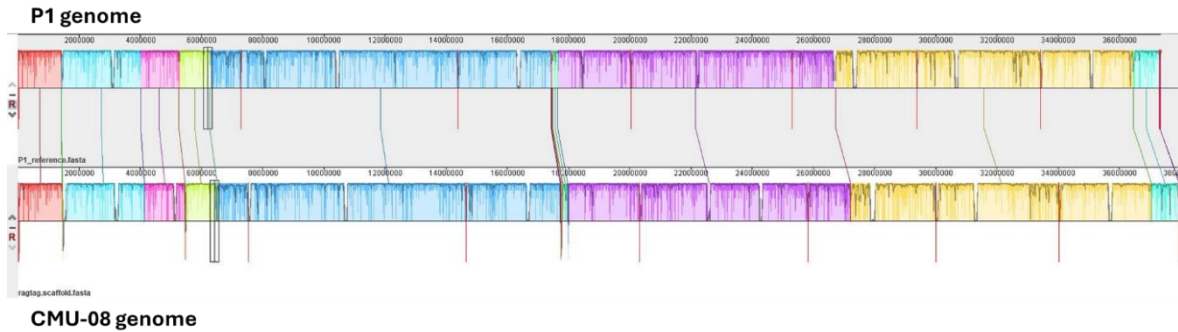


Figura 5.3-1. Alineación del genoma de la cepa CMU-08 con el genoma de la cepa P1 de *T. atroviride*. La imagen muestra en alineamiento entre el genoma de referencia, la cepa P1, y el genoma de la cepa de estudio, CMU-08. El alineamiento se realizó usando el borrador del ensamblaje del genoma a nivel scaffolds y empleando la herramienta ragtag. Para visualizar el ordenamiento se empleó el programa Mauve.

Tabla 5.3-1. Resultados estadísticas del ensamblaje del genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*.

No. de contigs	23
No. de <i>scaffolds</i>	16
No. de <i>scaffolds</i> (≥ 1000 pb)	16
<i>Scaffold</i> más grande (pb)	7 523 333
Longitud total (pb)	38 173 264
GC (%)	47.98
N50 (Mpb)	5.668
No. N's por cada 100 kpb	1.83
Fracción del genoma (%)*	93.88

* La fracción del genoma se refiere al total de bases alineadas en el genoma de referencia, dividido entre el tamaño del genoma.

La evaluación de la calidad del ensamblado del genoma de la cepa CMU-08 empleando la herramienta BUSCO para la búsqueda de genes ortólogos y sus copias, mostró la presencia de 4 494 secuencias de genes, de los cuales 4 460 se encuentran completos y de copia única, mientras que seis secuencias se encuentran completas y duplicadas (Tabla 5.3 2).

Tabla 5.3-2. Número de secuencias de genes ortólogos universales de copia única de evaluación comparativa (BUSCO)* del genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*.

Tipo de secuencias BUSCO	No. de secuencias
Secuencias totales	4 494
Secuencias completas (C)	4 466 (99.3 %)
Completas y de una simple copia (S)	4 460 (99.2 %)
Secuencias completas y duplicadas (D)	6 (0.01 %)
Secuencias fragmentadas (F)	2 (0 %)
Secuencias faltantes (M)	26 (0.7 %)

* La anotación de estos genes fue realizada empleando como herramienta el predictor de genes augustus (v.3.5.0). Entre paréntesis se indican la abreviación del tipo y porcentajes de cada uno de los tipos de secuencias.

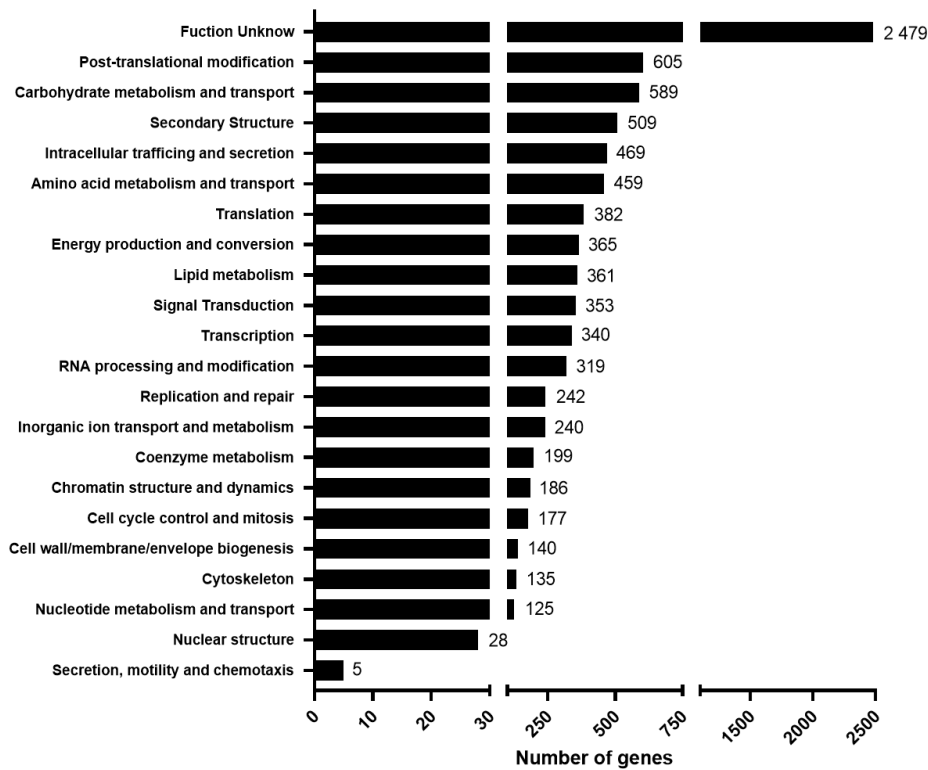


Figura 5.3-2. Número de genes anotados por categorías funcionales COG en el genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. El gráfico muestra el número de genes en los genomas en los que se obtuvo una clasificación COG.

La anotación funcional de los genes de la cepa CMU-08 indicó la presencia de 10053 genes asociados a diferentes funciones. Una de las herramientas empleadas para realizar la anotación funcional fue la búsqueda de homologías, evaluando la distribución de categorías funcionales en relación con los grupos de proteínas ortólogas (COG) (Tatusov *et al.*, 2000). Mediante esta herramienta se identificó una mayor cantidad de genes que están asociados a procesos celulares como la realización de modificaciones postraduccionales, metabolismo y transporte de carbohidratos, estructuras secundarias, tráfico intracelular y secreción (Fig. 5.3 2). Cabe mencionar que se identificaron un total de 2 479 secuencias de genes asociadas a funciones desconocidas.

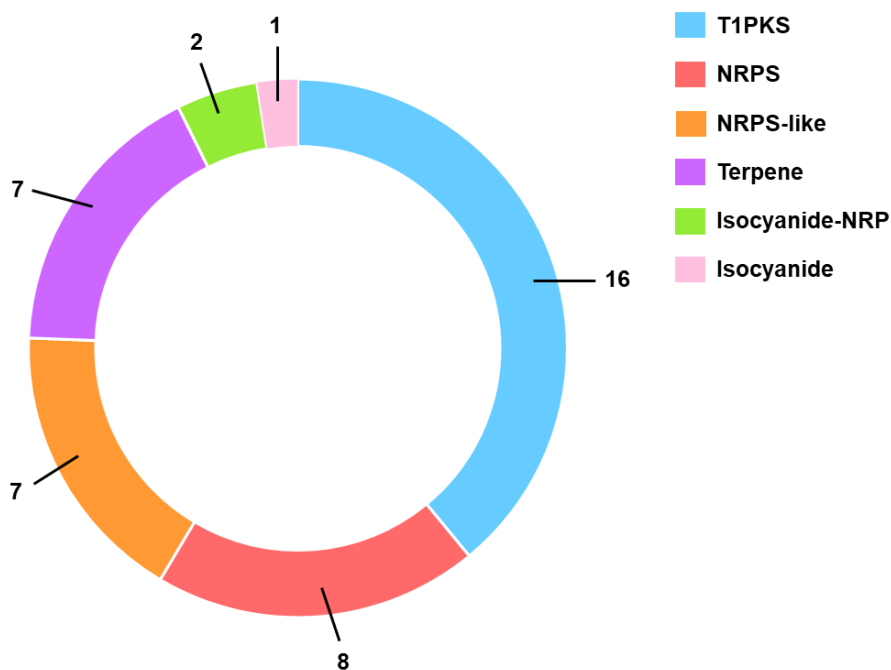


Figura 5.3-3. Número de genes codificantes para enzimas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios (SM). Los genes se identificaron empleando AntiSMASH en el genoma de la cepa CMU-08. Los nombres de las claves son las siguientes T1PKS: policétido sintasa de tipo I, NRPS: sintetasa de péptidos no ribosomales, NRPS-like: tipo sintetasa de péptidos no ribosomales, Terpene: terpeno sintasa, Isocyanide-NRP: péptido no ribosomal con isocianuro, Isocyanide: isocianuro.

Se identificaron 41 genes codificantes para diferentes tipos de metabolitos secundarios. Los genes de terpenos sintasas (T1PKS) fueron aquellos que se encuentran en mayor proporción encontrando un total de 16 en el genoma de la cepa CMU-08, el otro grupo mayoritario fueron los genes codificantes de sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) con un total de ocho genes (Fig. 5.3 3). Además, se encontraron siete genes tipo-sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS-

like) y de terpeno sintasa (Terpene), así como tres genes codificantes para la síntesis de compuestos de cianuro (Isocyanide-NRP, Isocyanide).

5.3.4 Discusión

La secuenciación de genomas completos de especies del género *Trichoderma* ha permitido la reconstrucción de procesos celulares, así como la identificación de cambios genómicos asociados con procesos microevolutivos y adaptativos dentro de dicho grupo taxonómico. En el presente trabajo se realizó la secuenciación y anotación del genoma de la cepa CMU-08, aislada en la región central de México.

El análisis BUSCO corroboró la integridad del ensamble genómico de la cepa CMU-08, al obtener un 99.3 % de secuencias completas, únicamente dos secuencias fragmentadas, 26 secuencias faltantes (0.7 %) y seis secuencias duplicadas (0.01 %), todos los cuales son valores indicativos de un ensamble genómico de buena calidad (Seppey *et al.*, 2019). Los genomas fúngicos secuenciados más grandes dentro de Ascomycota se encuentran en el subphylum Pezizomycotina, dentro de la cual está el género *Trichoderma* (Stajich, 2017). El tamaño del genoma obtenido de la cepa CMU-08 aquí estudiada fue de 38 173 264 bp, el cual es similar al tamaño del genoma de otras cepas de *T. atroviride*, los cuales oscilan entre los 36 y 37 000 000 bp (JGI MycoCosm). Además del tamaño del genoma, el contenido de GC de la cepa CMU-08 presenta un porcentaje similar al de otras cepas de la misma especie (Li *et al.*, 2021). En Ascomycota, el porcentaje de GC es mayor en Pezizomycotina, en relación con el subphylum Saccharomycotina, lo cual parece estar asociado con procesos de recombinación que favorecen la transmisión de alelos GC sobre alelos AT (Shen *et al.*, 2020). En la medida en que se cuente más genomas de cepas/especies de *Trichoderma* spp., se podrán establecer con mayor precisión las tendencias en el tamaño y arquitectura del genoma dentro del género, y su relación con procesos de variación y adaptación.

La anotación por homología de genes COG del genoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*, mostró la presencia de 10 053 genes codificantes para proteínas que participan en diferentes procesos celulares. La distribución de las funciones de estos genes es similar a la reportada en otras cepas de *T. atroviride*. La mayoría de estos genes están asociados a funciones desconocidas (2 479 genes), los grupos de genes mayoritarios identificados en el genoma de la cepa de estudio son genes asociados a modificaciones postraduccionales (605 genes), metabolismo

y transporte de carbohidratos (589 genes), estructura secundaria (509 genes) y tráfico intracelular y secreción (469 genes). Los genes asociados a funciones desconocidas son comunes en las especies de *Trichoderma* spp., en las que se han reportado 2, 701 genes en dicha categoría (Kubicek *et al.*, 2019), un número similar al reportado en este trabajo. En particular, la distribución de funciones aquí reportada concuerda con la del genoma de la cepa Ta0020 de *T. atroviride*, en el cual se encuentran mayoritariamente (2 298) genes con funciones desconocidas, y se anotan 536, 529, 441 y 425 genes asociados con el metabolismo y transporte de carbohidratos, modificaciones postraduccionales, tráfico intracelular y estructuras secundarias, respectivamente (Rosolen *et al.*, 2023).

Las cepas de *Trichoderma atroviride* se consideran excelentes candidatas para su uso como agentes de control biológico, debido a los distintos mecanismos que presentan para antagonizar eficientemente a una gran variedad de microorganismos fitopatógenos (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2023). Uno de estos mecanismos es la antibiosis, que está asociado con la producción y secreción de metabolitos secundarios con actividad biológica. Así, por su relevancia en el antagonismo y la promoción de crecimiento vegetal, es relevante realizar la caracterización y anotación de los genes y *clusters* de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios en los genomas de *T. atroviride*. En el genoma de la cepa CMU-08, se identificaron 41 genes codificantes para diferentes tipos de metabolitos secundarios, siendo mayoritarios los que codifican para T1PKS, en concordancia con la anotación de los genes de metabolismo secundario de las cepas P1 y Ta0020 de *T. atroviride* (Li *et al.*, 2021; Rosolen *et al.*, 2023). El otro grupo mayoritario de genes identificados en la cepa de estudio fueron de NRPS, con un total de 8 genes, también similar a los identificados en el genoma de la cepa P1 (Li *et al.*, 2021).

No obstante, esta similitud entre los genomas de las cepas de *T. atroviride*, en relación con el número de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios, es factible que se presenten diferencias fisiológicas y el tipo de metabolitos sintetizados sea distinto entre dichas cepas, dependiendo de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, el análisis genómico comparativo mostró la presencia de un único polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) entre las cepas LU132 y LU140 de *T. atroviride*, pero la fisiología es contrastante, presentando diferencias en su capacidad antagónica, el crecimiento y la asimilación de nutrientes (Lange *et al.*, 2016). Por lo anterior, es importante la realización de experimentos fisiológicos y el empleo de herramientas ómicas complementarias en el estudio de las cepas de *T. atroviride* cuyos genomas se encuentran

disponibles, como la metabolómica y la proteómica. Adicionalmente, es importante evaluar la síntesis de metabolitos secundarios de las distintas cepas de *T. atroviride* en respuesta a los procesos de señalización, la competencia y la autodefensa, para conocer el posible papel ecofisiológico de dichos metabolitos (Vicente *et al.*, 2022). Esto permitirá evaluar la correspondencia entre los genes caracterizados y la síntesis de metabolitos secundarios en distintas condiciones de cultivo, y saber si a la similitud genómica corresponde una similitud fisiológica, particularmente en la síntesis de metabolitos secundarios.

Además de los genes asociados a la producción de metabolitos secundarios, el análisis genómico de *T. atroviride* posibilita una mejor selección de cepas con potencial para el biocontrol, permite evaluar genes relacionados con la capacidad antagónica hacia hongos fitopatógenos específicos, generar huellas para el monitoreo en campo de las cepas incluidas en productos de biocontrol, y es una guía valiosa para evaluar la posibilidad de las cepas para la producción de enzimas hidrolíticas y otras aplicaciones biotecnológicas (Abbas *et al.*, 2022). La secuenciación, ensamble y anotación de genomas de *Trichoderma* spp., y la disponibilidad de genomas de variantes geográficas de *T. atroviride* permitirá comprender los cambios genómicos asociados a la variación intraespecífica y los procesos de adaptación, y la relación de estos con la fisiología de la especie. Es de esperar que en el futuro cercano se cuente con más genomas ensamblados de alta calidad de *T. atroviride* para continuar los estudios de genómica comparativa de la especie y un mejor aprovechamiento de su potencial biotecnológico.

5.3.5 Conclusión

El análisis genómico de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*, demuestra que dicha cepa posee los genes necesarios para producir diferentes tipos de metabolitos secundarios. Estos resultados sientan una base para comprender el potencial que posee la cepa CMU-08 como un posible agente de control biológico.

Referencias

Abbas, A., Mubeen, M., Zheng, H., Sohail, M. A., Shakeel, Q., Solanki, M. K., Iftikhar, Y., Sharma, S., Kashyap, B.K., Hussain, S., Zuñiga-Romano, M.C., Moya-Elizondo, E.A., Zhou, L. (2022). *Trichoderma* spp. genes involved in the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani*. *Front. Microbiol.* 13: 884469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.884469>

- Ahedo-Quero, H. O., Aquino-Bolaños, T., Ortiz-Hernández, Y. D., García-Sánchez, E. (2024). *Trichoderma* Diversity in Mexico: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diversity*. 16(1): 68. <https://doi.org/10.3390/d16010068>
- Alonge, M., Lebeigle, L., Kirsche, M., Jenike, K., Ou, S., Aganezov, S., Wang, X., Lippman, Z. B., Schatz, M. C., Soyk, S. (2022). Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. *Genome Biol.* 23(1): 258. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02823-7>
- Cázares-García, S. V., Arredondo-Santoyo, M., Vázquez-Marrufo, G., Soledad Vázquez-Garcidueñas, M., Robinson-Fuentes, V. A., & Gómez-Reyes, V. M. (2016). Typing and selection of wild strains of *Trichoderma* spp. producers of extracellular laccase. *Biotechnology Progress*. 32(3), 787-798. <https://doi.org/10.1002/btpr.2237>
- González-Martínez, K. I., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Herrera-Estrella, A., Fernández-Pavía, S. P., Salgado-Garciglia, R., Larsen, J., Ochoa-Ascencio, S., Rodríguez-Alvarado, G., Vázquez-Marrufo, G. (2024). Polyphasic Characterization of the Biocontrol Potential of a Novel Strain of *Trichoderma atroviride* Isolated from Central Mexico. *Journal of Fungi*. 10(11): 758. <https://doi.org/10.3390/jof10110758>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 29(8): 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de Los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadiji, A. E., Hyder, S., Babalola, O.O., Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. *Plants*. 12(3): 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>
- Ji, S., Liu, B., Han, J., Kong, N., Yang, Y., Wang, Y., Liu, Z. (2024). Decrypting biocontrol functions and application modes by genomes data of three *Trichoderma* Strains/Species. *Fungal Genet. Biol.* 172: 103889. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2024.103889>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., *et al.* (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life tyle of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12:R40. <https://doi.org/10.1038/10.1186/gb-2011-12-4-r40>

- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarroco, S., Ferreira-Noronha, E., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I. V., Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics*. 20, 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Lange, C., Weld, R. J., Cox, M. P., Bradshaw, R. E., McLean, K. L., Stewart, A., Steyaert, J. M. (2016). Genome-scale investigation of phenotypically distinct but nearly clonal *Trichoderma* strains. *PeerJ*. 4: e2023. <https://doi.org/10.7717/peerj.2023>
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 34(18): 3094-3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
- Li, W. C., Lin, T. C., Chen, C. L., Liu, H. C., Lin, H. N., Chao, J. L., Hsieh, C. H., Ni, H. F., Chen, R., S., Wang, T. F. (2021). Complete genome sequences and genome-wide characterization of *Trichoderma* biocontrol agents provide new insights into their evolution and variation in genome organization, sexual development, and fungal-plant interactions. *Microbiol. Spectr.* 9(3): e00663-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00663-21>
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Brettin, T. S. *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol.* 26(5): 553-560. <https://doi.org/10.1038/nbt1403>
- Martinez, Y., Ribera, J., Schwarze, F. W., De France, K. (2023). Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. *Appl. Microbiol. Biotech.* 107(18): 5595-5612. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12687-x>
- Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M.A., Weber, T., Takano, E., Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 39: W339–346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- JGI, MycoCosm. *Trichoderma atroviride*. <https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home/releases?flt=Trichoderma+atroviride>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). Cited 2024 Jun 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Palmer, J. (2017). Funannotate: Fungal genome annotation scripts. <https://github.com/nextgenusfs/funannotate>
- Priest, S. J., Yadav, V., & Heitman, J. (2020). Advances in understanding the evolution of fungal genome architecture. *F1000Research*, 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.25424.1>
- Rosolen, R. R., Horta, M. A. C., De Azevedo, P. H. C., Da Silva, C. C., Sforca, D. A., Goldman, G. H., De Souza, A. P. (2023). Whole-genome sequencing and comparative genomic analysis of potential biotechnological strains of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, and *Trichoderma reesei*. *Mol. Genet. Genomics*. 298(3): 735-754. <https://doi.org/10.1007/s00438-023-02013-5>
- Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I (2016) The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80: 205–327. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-15>
- Sepepe, M., Manni, M., Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Gene prediction: methods and protocols*. 227-245. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14
- Shen, X. X., Steenwyk, J. L., LaBella, A. L., Opulente, D. A., Zhou, X., Kominek, J., Li, Y., Groenewald, M., Hittinger, C. T., Rokas, A. (2020). Genome-scale phylogeny and contrasting modes of genome evolution in the fungal phylum Ascomycota. *Sci Adv.* 6(45): eabd0079. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd0079>
- Singh, R., Tomer, A., Prasad, D., Viswanath, H. S. (2020). Biodiversity of *Trichoderma* species in different agro-ecological habitats. *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond. Soil Biology*. 21-40. Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5_2
- Stajich, J. E. (2017). Fungal genomes and insights into the evolution of the kingdom. *Microbiology Spectrum*. 5(4): 10-1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0055-2016>
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., Koonin, E.V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28:33–36. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>
- Vicente, I., Baroncelli, R., Hermosa, R., Monte, E., Vannacci, G., Sarrocco, S. (2022). Role and genetic basis of specialised secondary metabolites in *Trichoderma* ecophysiology. *Fungal Biol Rev.* 39: 83-99. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.12.004>

Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Earl, A. M. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PloS One*. 9(11): e112963. <https://doi.org/10.1128/mra.01280-23>

5.4 CAPÍTULO 4

Análisis multiómico de una nueva cepa de *T. atroviride*.

ANÁLISIS MULTIOMICO DE UNA NUEVA CEPA DE *T. atroviride*.

Resumen

Las especies del género de hongos *Trichoderma* se caracterizan por ser empleados como especies biocontroladoras, esto debido a que poseen distintos mecanismos que le confieren dicho potencial. De los mecanismos que posee *Trichoderma* spp. se encuentra la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis, el micoparasitismo y la inducción de respuesta de crecimiento de las plantas. En dichos mecanismos la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares desempeñan un papel fundamental. En el presente estudio se evaluó el exometaboloma y secretoma, es decir la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares, respectivamente; de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* en dos condiciones de cultivo. Los resultados obtenidos muestran que la cepa CMU-08 produce diversos metabolitos secundarios de distintos grupos químicos, tales como nepelactona, salicilamida, 6-pentil- α -pirona (6PP) y 2-heptanona. En cuanto a la producción de enzimas extracelulares la cepa CMU-08 produjo una mayor cantidad de enzimas líticas en la condición inducida con micelio inactivo de *B. cinerea*, las enzimas mayoritarias fueron las proteasas seguidas de las quitinasas. Estos resultados confirman que la cepa CMU-08 es capaz de producir diferentes tipos de compuestos asociados a su potencial biocontrolador, por lo que convierte a dicha cepa como un buen candidato para su uso en futuras aplicaciones biotecnológicas.

5.4.1 Introducción

Las especies del género de hongos *Trichoderma* presenta características muy particulares que la hacen biotecnológicamente muy interesante. Dichas características van desde su capacidad como agente de biocontrol en la agricultura (BCA), el mejoramiento del crecimiento de las plantas, como agente de producción de enzimas para diferentes industrias, la desintoxicación de compuestos tóxicos y la degradación de materia orgánica de desecho (Poveda, 2021). Como se ha mencionado, distintas especies de *Trichoderma* son empleadas como BCA, esto es debido a que presentan diversos mecanismos que las hacen exitosas antagonistas (Ghazanfar *et al.*, 2018).

Los mecanismos que presenta *Trichoderma* spp., para antagonizar eficientemente a una gran plétora de microorganismos fitopatógenos, son el micoparasitismo, la antibiosis mediante la

secreción de metabolitos secundarios, la competencia por nutrientes y espacio, así como la inducción del sistema de defensa y la promoción del crecimiento de la planta (Manzar *et al.*, 2022). Por estas características distintas cepas de *Trichoderma* spp. son empleadas como una alternativa ecológica al uso de agroquímicos (Kidwai y Nehra, 2017). Sin embargo, es necesario realizar una caracterización del potencial que posee una cepa para emplearse como BCA, ya que la eficacia del efecto biocontrolador puede aumentarse al elegir una cepa que tenga un efecto antagonista de amplio espectro, al utilizar los distintos mecanismos de antagonismo (Ferrerira y Musumeci, 2021).

Para realizar la caracterización de cepas de *Trichoderma* spp. con potencial para el biocontrol, se realiza principalmente una identificación molecular y morfológica, además de evaluar la capacidad antagonista mediante distintos ensayos que evalúan la capacidad de ataque directo al fitopatógeno y de antibiosis realizando cultivos duales y ensayos de inhibición respectivamente; así como la producción de enzimas extracelulares y la capacidad de inducción de respuesta de defensa y crecimiento de las plantas (Olowe *et al.*, 2022). Aunque estos ensayos proveen de información muy importante sobre el potencial biotecnológico de cepas de *Trichoderma* spp. para emplearse como BCA, es necesario tener un panorama más amplio para comprender de manera profunda la funcionalidad y el potencial de una cepa en particular, por lo que el uso de herramientas ómicas, tales como genómica, proteómica y metabolómica, proveen de información detallada sobre el perfil genético, la expresión de genes, la producción de proteínas y metabolitos secundarios de distintas cepas de *Trichoderma* spp. en diferentes condiciones de cultivo, así como durante distintas interacciones con plantas (Abdullah *et al.*, 2024).

Para obtener un panorama más claro de un individuo o sistema de estudio, se ha empleado la combinación de distintos datos ómicos, denominados datos multiómicos. Los enfoques multiómicos, permiten comprender un sistema biológico a través de diversas ramas ómicas y de esta manera poder visualizar procesos de variabilidad (Shahrajabian y Sun, 2023). En ese sentido, el presente estudio se evaluó el exometaboloma y secretoma de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* en dos condiciones de cultivo, así como el volatimola de dicha cepa, con la finalidad de analizar el potencial de producción de metabolitos secundarios y proteínas extracelulares importantes para el biocontrol y la promoción del crecimiento vegetal.

5.4.2 Materiales y métodos

5.4.2.1 Cepas utilizadas

Se empleó a la cepa CMU-08, identificada como *T. atroviride* (Cázares-García *et al.*, 2016), perteneciente al Cepario Michoacano Universitario (CMU), el cual pertenece 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). Dicha cepa fue aislada del Parque Nacional “José Ma. Morelos”, del municipio de Charo, Michoacán, en un tipo de vegetación de bosque de pino-encino. Además, se empleó una cepa del fitopatógeno necrotrófico *B. cinerea*, aislada de un cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa*), en Uruapan, Michoacán.

5.4.2.2 Obtención de filtrados extracelulares (FECs)

Se realizaron cultivos líquidos tanto en medio mínimo Vogel (MMV) (Cázares-García *et al.*, 2016) como condición de cultivo basal (CB), como en dicho medio suplementado con micelio inactivo de *B. cinerea* al 1% (p/v) como condición de cultivo inducido (CI). Siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3. Una vez recuperados los FECs se liofilizaron y se almacenaron a -4 °C hasta su análisis.

5.4.2.3 Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los FECs (exometaboloma)

5.4.2.3.1 Solubilización de los FECs liofilizados

Las muestras se homogeneizaron en un molino de bolas a 30 Hz durante 20 segundos. Se mezclaron 150 µL de una solución Metanol:Agua en una proporción 7:3 (v/v) que contenía el estándar interno con la muestra molida, se mezclaron agitando a 2 500 rpm durante 5 minutos. La mezcla se colocó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se tomaron 150 µL del sobrenadante y se colocaron a -20 °C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó la muestra a 12 000 rpm por 3 minutos a 4 °C. Se utilizó una alícuota de 120 µl del sobrenadante para el análisis UPLC-MS/MS.

Tabla 5.4-1. Condiciones de trabajo del espectrómetro de masas AB Sciex TripleTOF 6600.

Parámetro	ESI +	ESI –
Duración (minutos)	14	14
Voltaje de pulverización de iones (V)	5 500	-4 500
Temperatura (°C)	550	450
Fuente de gas de iones 1 (psi)	50	50
Fuente de gas de iones 2 (psi)	60	60
Gas de cortina (psi)	35	35
Potencial de desagrupación (V)	60	-60
Energía de colisión MS1 (V)	10	-10
Energía de colisión MS2 (V)	30	-30
Propagación de energía de colisión (V)	15	15
Masas TOF MS1 (Da)	50 ~ 1 000	50 ~ 1 000
Masas TOF MS2 (Da)	25 ~ 1 000	25 ~ 1 000
Tiempo de acumulación MS1 (s)	0.2	0.2
Tiempo de acumulación MS2 (s)	0.05	0.05
Iones candidatos	12	12

5.4.2.3.2 Cromatografía líquida de alta precisión acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS)

Se empleó un sistema de cromatografía líquida compuesto por ACQUITY Premier HSS T3 (100 mm × 2.1 mm × 1.8 µm) (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas AB Sciex TripleTOF 6600. La fase móvil estuvo compuesta por disolvente A (agua ultrapura con 0.1% de ácido fórmico añadido) y disolvente B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico añadido) con una elución en gradiente (0 min, 95 % A, 5 % B; 11 min, 10 % A, 90 % B; 12 min, 10 % A, 90 % B; 12,1 min, 95 % A, 5 % B; 14 min, 95 % A, 5 % B). El caudal de la fase móvil fue de 0.40 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C y el volumen de inyección de muestra fue de 2 µL. Las condiciones del espectrómetro de masas aparecen en la Tabla 5.4 1.

5.4.2.4 Análisis proteómico (Proteoma)

5.4.2.4.1 Extracción y digestión de las proteínas

Se utilizó buffer SDT (4 % SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.6) para la lisis de la muestra y la extracción de proteínas. La cantidad de proteína se cuantificó con el kit de ensayo de proteínas

BCA (Beyotime). Se mezclaron 20 µg de proteína de cada muestra con tampón de carga 5x respectivamente y se hirvieron durante 5 min. Las proteínas se separaron en gel SDS-PAGE al 4 - 20 % (voltaje constante a 180 V durante 45 min). Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie R-250. La digestión de proteínas con tripsina se realizó de acuerdo con el procedimiento de preparación de muestras asistida por filtración (FASP) descrito por Matthias Mann. Los péptidos de digestión de cada muestra se desalinizaron en cartuchos C18 (Empore™ SPE Cartridges C18 (densidad estándar), diámetro interior del lecho 7 mm, volumen 3 ml, Sigma), se concentraron por centrifugación al vacío y se reconstituyeron en 40 µl de ácido fórmico al 0.1 % (v/v).

5.4 2.4.2 Análisis LC-MS/MS

Este análisis se realizó en un espectrómetro de masas timsTOF Pro (Bruker) acoplado a un sistema de cromatografía líquida Evosep One (Dinamarca). Los péptidos se cargaron en una columna analítica de fase reversa C18 (15 cm de largo, 150 µm de diámetro interno, 1.9 µm de resina) en tampón A (0.1 % de ácido fórmico en agua) y se separaron con un gradiente lineal de tampón B (99.9 % de acetonitrilo y 0.1 % de ácido fórmico) a una velocidad de flujo de 220 nL/min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de iones positivos. El voltaje de electrospray aplicado fue de 1.6 kV. Los precursores y fragmentos se analizaron en el detector TOF en un rango de masas de m/z 100-1700. El timsTOF Pro se utilizó en modo de fragmentación serial de acumulación paralela (PASEF). La recopilación de datos en modo PASEF se realizó en función de los siguientes parámetros: el valor del coeficiente de movilidad iónica (1/K0) se estableció de 0.75 a 1.35 Vs cm²; escaneos PASEF de 1 MS y 8 MS/MS. La exclusión activa se habilitó con un tiempo de liberación de 24 s.

5.4.2.4.3 Identificación de las proteínas

Los datos brutos de MS de cada muestra se combinaron y se buscaron utilizando el software MaxQuant (v. 1.6.14) empleando la base de datos uniprotkb_*Trichoderma_237472*.

5.4.2.5 Volatiloma

Para la obtención del volatiloma de la cepa CMU-08 se inoculó una placa de medio PDA y se incubó por tres días en oscuridad. Se utilizó un sistema de cromatografía líquida acoplada a masas

mediante GC-MS empleando un cromatógrafo de gases 6850 Series II Network GC System acoplado a un espectrómetro de masas 5973 Network (Agilent Technologies). Se empleó una columna HP-FFAP usando como fase móvil helio de alta pureza. La temperatura inicial de la columna fue 40 y posteriormente se incrementó 5 °C hasta alcanzar 180 °C, mientras que la temperatura del detector fue de 250 °C.

5.4.3 Resultados

En el exometaboloma de la CB y CI de la cepa CMU-08 se identificaron un total de 6 313 compuestos, en ambos tipos de ESI. De los cuales se seleccionaron 625 metabolitos de acuerdo con el cambio en no. de veces (FC) ≥ 2 o FC ≤ 0.5 entre la CB y CI. Estos metabolitos se agrupan entre 23 grupos de compuestos, en donde la mayor cantidad de metabolitos secundarios encontrados son aminoácidos y sus derivados, seguidos de bencenos y compuestos heterocíclicos (Figura 5.4 1).

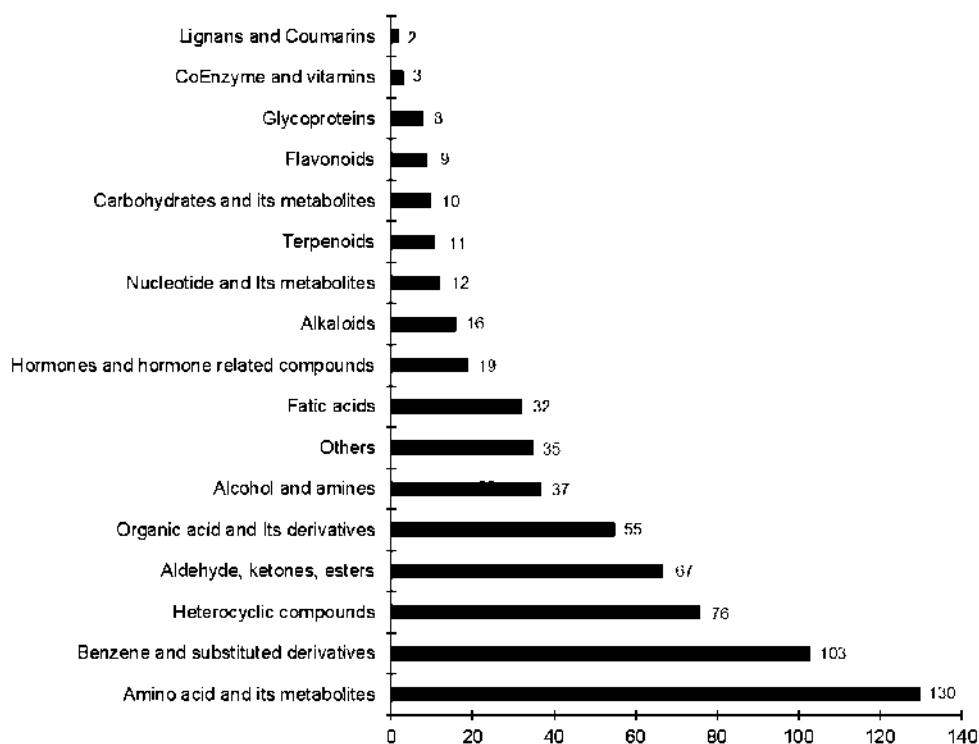


Figura 5.4-1. Grupo de metabolitos presentes en el exometaboloma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. La gráfica muestra la cantidad de metabolitos secundarios pertenecientes a los diferentes grupos de metabolitos presentes en el exometaboloma de la cepa CMU-08.

De este grupo de 625 metabolitos, se hizo una selección de aquellos que presentan actividad antimicrobiana, antifúngica y auxiliares en la promoción del crecimiento vegetal, así como de acuerdo a la abundancia para obtener los iones de fragmentación y realizar la descripción completa y requerida para datos de metabolómica (Anexo 1).

Los metabolitos seleccionados se encuentran en diferente abundancia en los medios extracelulares de ambas condiciones de cultivo (Figura 5.4 2). Los metabolitos más abundantes en la CB son nepetalactona, clausenacumarina, ácido kaínico y piperanina; mientras que los metabolitos menos abundantes fueron biochanina A 7-O-β-D-glucósido, 1-hidroxiantraquinona y salicilamida. En la CI los metabolitos con una mayor abundancia fueron shikonina, salicilamida, clausenacumarina y ácido artemisínico, en esta condición los metabolitos con menor abundancia fueron giberelina A25, 4-Hidroxi-6-metil-2-pirona, 1-hidroxiantraquinona y ácido jasmónico.

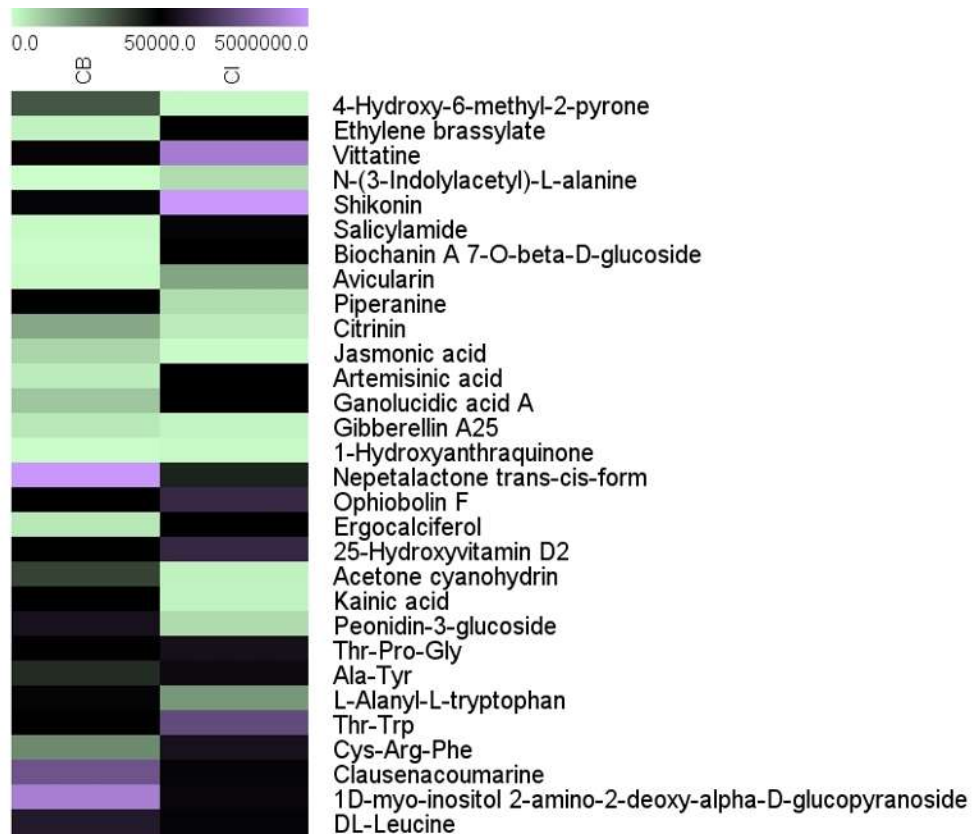


Figura 5.4-2. Metabolitos secundarios producidos por la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*. El mapa de calor muestra la abundancia relativa de los metabolitos secundarios producidos por la cepa CMU-08 en dos condiciones de cultivo. En la parte superior aparece el intervalo de la abundancia y las condiciones de cultivo evaluadas donde CB corresponde a la condición basal y CI a la condición inducida.

En el volatiloma de la cepa de estudio (Figura 5.4 3) se identificaron un total de 23 VOCs de cinco diferentes grupos de metabolitos, siendo los terpenos los que se encontraron en una mayor proporción (Figura 5.4 4). Los metabolitos más abundantes producidos por la cepa de estudio fueron 6-pentil- α -pirona (6PP) y 2-heptanona. Otros de los VOCs encontrados fueron 2-metil-1-butanol, 3-Octanona, 2-heptanol y D-Carvona (Anexo 2).

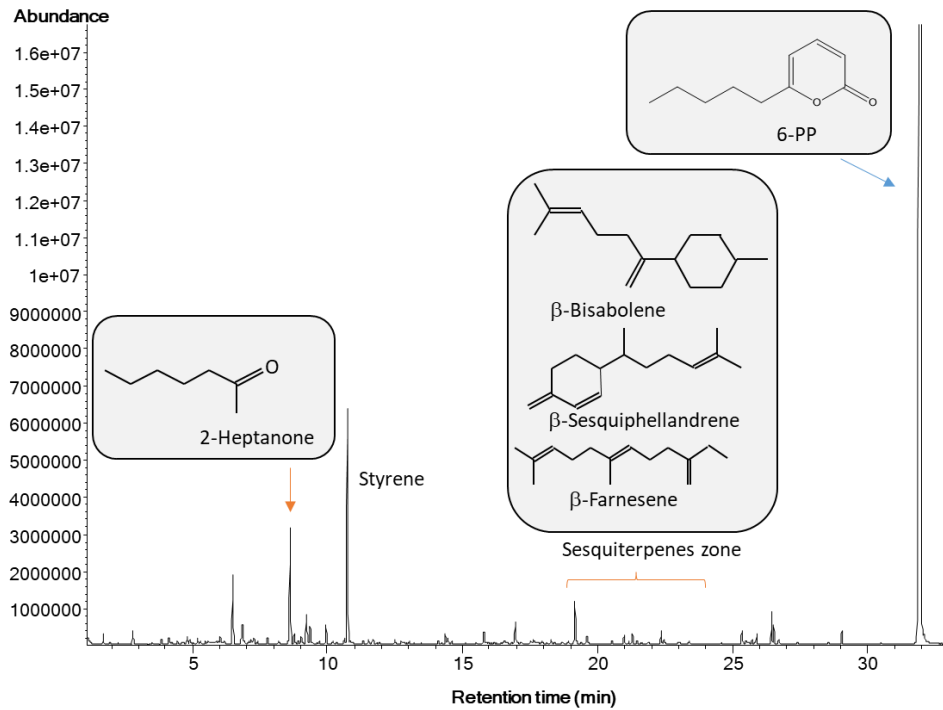


Figura 5.4-3. Volatiloma de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*. La figura muestra el cromatograma de los metabolitos orgánicos volátiles de la cepa CMU-08 creciendo en medio PDA.

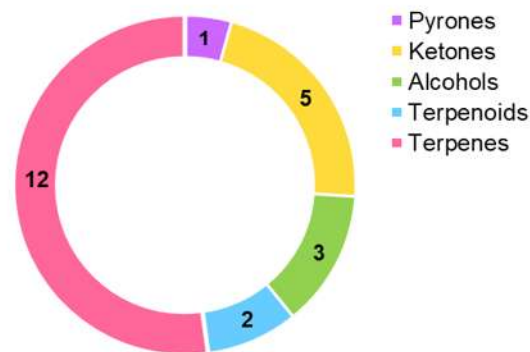


Figura 5.4-4. Grupo de metabolitos encontrados en el volatiloma de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*. La imagen muestra el tipo y numero de VOCs producidos por la cepa CMU-08 en medio PDA.

Respecto al secretoma de la cepa CMU-08, se identificaron un total de 559 proteínas, de las cuales 405 proteínas se producen en ambos FECs y en los FECs de la CB y CI se producen de manera diferencial 43 y 111 proteínas respectivamente (Fig. 5.4 5). Algunas de las proteínas extracelulares encontradas en el secretoma son quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales son de importancia para el proceso de micoparasitismo.

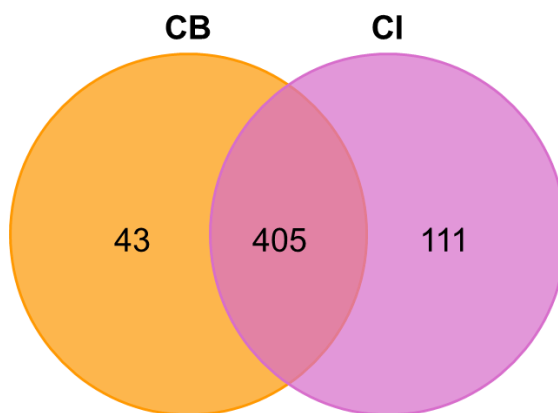


Figura 5.4-5. Número de proteínas identificadas en el secretoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. El diagrama de Venn muestra el número de proteínas producidas ambas condiciones de cultivo, así como las producidas únicamente en cada condición. En la parte superior aparecen las condiciones de cultivo evaluadas donde CB corresponde a la condición basal y CI a la condición inducida.

En el secretoma de la cepa CMU-08, se identificaron un total de siete quitinasas, de las cuales seis de encuentran en ambas condiciones de cultivo y únicamente una quitinasa se produce de manera diferencial en la CI.

Respecto a las glucanasas, se encontraron un total de seis proteínas, tres de ellas se encuentran en ambas condiciones y una de estas glucanasas se sobreproduce de manera diferencial en la CI. De manera diferencial, se producen dos glucanasas de manera única en la CI y una glucanasa en la CB.

Finalmente, en el secretoma se identificaron un total de 14 proteasas, de las cuales 9 se producen en ambas condiciones de cultivo, tres glucanasas se producen únicamente en la CI y dos glucanasas se producen en la CB (Anexo 3).

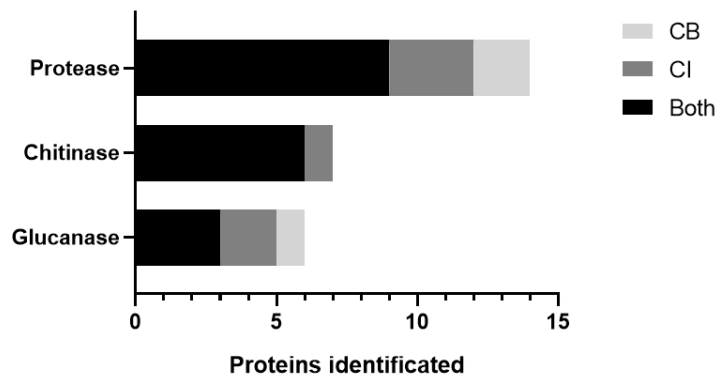


Figura 5.4-6. Proteínas encontradas en el secretoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. La gráfica muestra el tipo de proteína y las condiciones de cultivo en las cuales se producen.

5.4.4 Discusión

El uso de herramientas ómicas permite realizar un análisis holístico, en el cual se puede obtener una gran información de un sistema biológico, lo que permite un mejor entendimiento de este, en comparación a cuando se desarrolla un análisis con un enfoque tradicional. De manera global, las herramientas ómicas permiten medir simultáneamente el número de proteínas, genes y metabolitos de un sistema biológico, así como analizar cómo estas moléculas se influyen entre sí (Veenstra, 2021).

En el presente trabajo se evaluó el metaboloma y secretoma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*, creciendo en dos condiciones de cultivo, una condición basal y una condición inducida con micelio de *B. cinerea*. Estas condiciones de cultivo permiten evaluar las diferencias en la producción de metabolitos secundarios y proteínas extracelulares. Se ha reportado que, mediante modificaciones al medio de cultivo, se induce la producción diferencial de metabolitos secundarios por parte de un microorganismo, esto debido a que con la adición de algún tipo de inductor se encienden los clúster de genes que codifican para distintos compuestos y que en condiciones estándar de laboratorio se encuentran apagados (Tomm *et al.*, 2019).

La metabolómica es la herramienta ómica que estudia las moléculas de bajo peso molecular en un sistema biológico. Estas moléculas se denominan metabolitos, y algunos de ellos actúan como eductos, productos e intermediarios del metabolismo celular. Para analizar estas moléculas

se emplean diferentes técnicas analíticas como lo son la cromatografía acoplada a espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear (Zierer *et al.*, 2015). Es importante hacer mención a que dentro de la metabolómica se encuentra la exometabolómica, que es la rama encargada del estudio de los metabolitos secundarios liberados al medio extracelular circundante (Douglas, 2020).

En el exometaboloma de la cepa CMU-08 se identificaron compuestos de distintos grupos químicos, entre los metabolitos encontrados se encuentran ácidos orgánicos, aldehídos, cetonas, terpenoides, flavonoides y hormonas. Algunos de los metabolitos secundarios encontrados en el metaboloma fueron la salicilamida, que es un compuesto fenólico y presenta actividad antimicrobiana y defensa de la planta (Panichikkal *et al.*, 2021). Algunos otros de los metabolitos secundarios encontrados fueron 4-Hidroxi-6-metil-2-pirona, 1-Hidroxiantraquinona y Biochanina A 7-O- β -D-glucósido, los cuales se clasifican químicamente como pirona, policetido y cetona, respectivamente. El 4-Hidroxi-6-metil-2-pirona y 1-Hidroxiantraquinona, presentan actividad antimicrobiana y antifúngica (Vinale *et al.*, 2008); mientras que la Biochanina A 7-O- β -D-glucósido ha sido reportado como un intermediario en la producción de fitoalexinas (Kumar *et al.*, 2015). Además se identificaron en el exometaboloma, ácido jasmónico y Giberelina A25, compuestos clasificados como fitohormonas y que participan en la regulación de la resistencia sistémica inducida y en la promoción del crecimiento vegetal (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019).

Es importante mencionar que anteriormente se ha evaluado la capacidad inhibitoria del medio extracelular de la cepa CMU-08 en las mismas condiciones de cultivo, el medio extracelular que contiene los metabolitos secundarios extracelulares llegan a inhibir hasta 76 % el crecimiento de *B.cinerea* (González Martínez *et al.*, 2024). Conjuntando dicha información con los resultados de exometabolómica, se demuestra la capacidad que posee la cepa de estudio para producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

Es importante considerar que además de producir metabolitos secundarios de diversa naturaleza química, el número mayor de compuestos identificados son clasificados como aminoácidos y sus metabolitos, en donde podemos encontrar diferentes tipos de péptidos. Estos resultados son similares con lo reportado por Song y Ji (2024) en donde reportan que distintas cepas de *Trichoderma*, entre ellas *T. atroviride*, producen en abundancia este tipo de compuestos.

Además de evaluar el exometaboloma de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*, se evaluó su secretoma. El termino secretoma hace referencia a las proteínas que son secretadas al medio extracelular (Tjalsma *et al.*, 2004).

En este análisis se observó que se producen una mayor cantidad de proteínas en la CI, esto indica que el micelio de *B. cinerea* actúa como un buen inductor para la síntesis de dichos compuestos. Esto puede atribuirse a que *T. atroviride* posee un estilo de vida micoparasitario (Benitez *et al.*, 2004), por ende. el hecho que el medio de cultivo contenga micelio induce los genes para la producción de ciertas enzimas como quitinasas, glucanasas y proteasas; que participan en dicho proceso celular (Mukherjee *et al.*, 2022). Además, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por de Lima *et al.* (2016), en donde evaluaron el secretoma de la cepa T17 de *T. atroviride* en presencia del micelio inactivo del fitopatógeno *Guignardia citricarpa* como inductor, encontrando que en esta condición aumenta en número de proteínas encontradas en comparación al medio carente de dicho inductor.

De las enzimas encontradas en el secretoma de la cepa CMU-08, hay algunas que se han reportado que participan en diferentes procesos celulares, por ejemplo, la quitinasa chi18-5 (anteriormente ech42), la cual está involucrada en procesos de restructuración de la pared celular fúngica y también durante el proceso de micoparasitismo (Wang *et al.*, 2021). Sin embargo, de manera interesante la quitinasa que únicamente se induce en presencia del micelio inactivo de *B. cinerea*, es codificada por el gen 217415, el cual se ha reportado que su transcripción se induce cuando *T. atroviride* interacciona con *Fusarium* sp. y *B. cinerea*, sobreexpresándose después del contacto con *Fusarium* sp. (González-Martínez *et al.*, 2024). Dicha información refuerza los datos obtenidos en donde podemos tener una mayor seguridad de que la quitinasa codificada por el gen 214715, participa activamente durante el micoparasitismo.

Respecto al volatiloma, se identificaron un total de 23 VOCs. Dentro de los metabolitos encontrados se encuentran el D-carvone, 2-heptanona, 3-octanona, 2-heptanol, los cuales presentan actividad antifúngica (Thangaraj *et al.*, 2023). Cabe mencionar que el metabolito encontrado en una mayor abundancia fue el 6-pentyl-2H-pyran-2-one, compuesto que se caracteriza por presentar actividad antagónica, así como de crecimiento y defensa de la planta (Zeilinger *et al.*, 2016).

5.4.5 Conclusión

Los datos anteriormente mencionados nos permiten confirmar que la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y de promoción de crecimiento vegetal; es inducida por la presencia del micelio inactivo de *B. cinerea*. Lo cual, simula el comportamiento de dicha cepa en suelo, donde activa la producción de metabolitos y enzimas líticas de la pared celular fúngica como mecanismos eficientes de antagonismo.

Referencias

- Abdullah, N. S., Doni, F., Awal, M. A., Mispan, M. S., Saiman, M. Z., Mohd-Yusuf, Y., Suhaimi, N. S. M. (2024). Multi-omics tools for understanding *Trichoderma*-plant symbiosis: biotechnological developments and future directions. *Symbiosis*. 93(2): 125-138. <https://doi.org/10.1007/s13199-024-00996-2>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., and Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249–260.
- Blauth de Lima, F. B., Felix, C., Osorio, N., Alves, A., Vitorino, R., Domingues, P., Correia, A., da Silva-Ribeiro, R. T., Esteves, A. C. (2016). Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa*. *Biological Control*. 99: 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.009>
- Cázares-García, S.V.; Arredondo-Santoyo, M.; Vázquez-Marrufo, G.; Vázquez-Garcidueñas, M.S.; Robinson-Fuentes, V.A.; Gómez-Reyes, V.M. (2016). Typing and selection of wild strains of *Trichoderma* spp. producers of extracellular laccase. *Biotechnol. Prog.* 32: 787–798. <https://doi.org/10.1002/btpr.2237>
- Douglas, A. E. (2020). The microbial exometabolome: ecological resource and architect of microbial communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 375(1798): 20190250. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0250>
- Ferreira, F. V., Musumeci, M. A. (2021). *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 37(5), 90. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7>

- Ghazanfar, M. U., Raza, M., Raza, W., Qamar, M. I. (2018). *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*. 2(3).
- González-Martínez, K. I., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Herrera-Estrella, A., Fernández-Pavía, S. P., Salgado-Garciglia, R., Larsen, J., Ochoa-Ascencio, S., Rodríguez-Alvarado, G., Vázquez-Marrufo, G. (2024). Polyphasic Characterization of the Biocontrol Potential of a Novel Strain of *Trichoderma atroviride* Isolated from Central Mexico. *Journal of Fungi*. 10(11): 758. <https://doi.org/10.3390/jof10110758>
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*. 109(1), 6-16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Kidwai, M. K., Nehra, M. (2017). Biotechnological applications of *Trichoderma* species for environmental and food security. *Plant biotechnology: recent advancements and developments*. 125-156. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4732-9_7
- Kumar, Y., Dholakia, B. B., Panigrahi, P., Kadoo, N. Y., Giri, A. P., Gupta, V. S. (2015). Metabolic profiling of chickpea-*Fusarium* interaction identifies differential modulation of disease resistance pathways. *Phytochemistry*. 116, 120-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.04.001>
- Manzar, N., Kashyap, A. S., Goutam, R. S., Rajawat, M. V. S., Sharma, P. K., Sharma, S. K., Singh, H. V. (2022). *Trichoderma*: advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into mechanism of biocontrol potential. *Sustainability*. 14(19): 12786. <https://doi.org/10.3390/su141912786>
- Mukherjee, P. K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., Horwitz, B. A. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*. 39: 15-33. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>
- Olowe, O. M., Nicola, L., Asemoloye, M. D., Akanmu, A. O., Sobowale, A. A., Babalola, O. O. (2022). Characterization and antagonistic potentials of selected rhizosphere *Trichoderma* species against some *Fusarium* species. *Frontiers in microbiology*. 13, 985874. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.985874>

- Shahrajabian, M. H., Sun, W. (2023). Survey on multi-omics, and multi-omics data analysis, integration and application. *Current Pharmaceutical Analysis*. 19(4): 267-281. <https://doi.org/10.2174/1573412919666230406100948>
- Song, Y. P., Ji, N. Y. (2024). Chemistry and biology of marine-derived *Trichoderma* metabolites. *Natural Products and Bioprospecting*. 14(1): 14. <https://doi.org/10.1007/s13659-024-00433-3>
- Thangaraj, P., Subbiah, K. A., Sevugapperumal, N., Uthandi, S., Damodarasamy, A., Shanmugam, H. (2023). Activity of volatiles induced by microbes and natural plants stifled the growth of *Pythium aphanidermatum*-the damping off in Tomato. *BMC Plant Biology*. 23(1), 384. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04351-3>
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J. F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., Kuipers, O. P., Bron, S., Hecker, M., van Dijl, J. M. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(2): 207-233. <https://doi.org/10.1128/membr.68.2.207-233.2004>
- Tomm, H. A., Ucciferri, L., Ross, A. C. (2019). Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 46(9-10): 1381-1400. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02198-y>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., woo, S.L., Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72(1-3), 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Veenstra, T. D. (2021). Omics in systems biology: current progress and future outlook. *Proteomics*. 21(3-4): 2000235. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000235>
- Wang, C., Zeng, Z. Q., Zhuang, W. Y. (2021). Comparative molecular evolution of chitinases in ascomycota with emphasis on mycoparasitism lifestyle. *Microbial Genomics*. 7(9): 000646. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000646>

- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*. 6(5): 359-362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>
- Panichikkal, J., Krishnankutty, R. E. (2021). Root exudate components induced production of plant beneficial metabolites in rhizospheric *Pseudomonas* spp. *Rhizosphere*. 19, 100366. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100366>
- Poveda, J. (2021). *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biological Control*. 159: 104634. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>
- Zierer, J., Menni, C., Kastenmüller, G., Spector, T. D. (2015). Integration of ‘omics’ data in aging research: from biomarkers to systems biology. *Aging Cell*. 14(6): 933-944. <https://doi.org/10.1111/acel.12386>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30(2): 74-90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

6 DISCUSIÓN GENERAL

Las especies de hongos del género *Trichoderma* representan una alternativa al uso distintos agroquímicos, ya que estos hongos pueden emplearse como agentes biocontroladores de distintos microorganismos fitopatógenos y agentes de promoción de crecimiento vegetal (Martínez-Medina *et al.*, 2014).

El éxito de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico, es debido a los distintos mecanismos de acción que posee, en los cuales la producción de diversos compuestos como metabolitos secundarios y proteínas extracelulares, los cuales son clave en la actividad antagónica de *Trichoderma* y en el efecto beneficioso que ejerce sobre las plantas (Daguerre *et al.*, 2014).

La producción de estos compuestos esta mediada por grupos de genes biosintéticos (BGC) que pueden abarcar más de 10 000 pb, que comprenden enzimas centrales, tales como las sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS), policétido sintasas (PKS), terpenos sintasas y enzimas accesorias como citocromo P450, oxidorreductasas y metiltransferasas; así como genes de transportadores y factores de transcripción (Zeilinger *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que la producción de estos compuestos va a depender de la especie de *Trichoderma* spp., inclusive de la cepa, y de las condiciones del crecimiento del hongo, de ahí que en ocasiones se requiera de estímulos desencadenantes específicos (Zeilinger *et al.*, 2016). En un cultivo con condiciones estándar de crecimiento, los *clusters* de genes responsables de la producción de los metabolitos secundarios se encuentran apagados (Tomm *et al.*, 2019), por lo que para aumentar la producción o permitir la producción diferencial de metabolitos secundarios es necesario la aplicación de estímulos, que fungen como inductores, que permitan el encendido de dichos *clu*

sters responsables de la producción de metabolitos secundarios. De las estrategias empleadas para inducir la producción de metabolitos secundarios se encuentran primeramente la modificación de las condiciones de cultivo, desde la modificación de la fuente de carbono empleada, así como la adición de iones e inclusive el uso de soportes que simulen los distintos entornos naturales (Tomm *et al.*, 2019). En ese sentido, en el presente trabajo se empleo micelio inactivo de *B. cinerea* como fuente principal de carbono en cultivos inducidos, con la intención de

que los componentes de la pared celular de dicho fitopatógeno fungieran como inductores para la producción de metabolitos secundarios por parte de la cepa CMU-08 de *T. atroviride*.

La producción de metabolitos secundarios está regulada a distintos niveles. Primeramente, dicha regulación puede darse por factores ambientales, ya que los metabolitos secundarios son sumamente importantes para procesos de comunicación y competencia; de ahí la importancia en la producción de metabolitos secundarios específicos que le permitan a un hongo la capacidad de permanecer y competir por un nicho; por ejemplo, la producción de sideróforos, los cuales le confieren a un hongo la capacidad de asimilar y competir por Fe presente en el suelo (Zhgun, 2023). Esta información respalda el hecho de la cepa CMU-08 haya sido capaz de producir metabolitos secundarios tales como los sideróforos, los cuales permiten que se pueda competir por espacio y Fe, cabe mencionar que la producción de este tipo de compuestos también está asociado a capacidad antagonica, lo que confiere a dicha cepa capacidad biocontroladora.

El siguiente nivel de regulación de la producción de metabolitos secundarios es mediante factores de transcripción, algunos de estos factores forman parte de los mismos BGC que regulan; mientras que otros factores de la transcripción tienen sus genes en clústers de genes biosintéticos diferentes a los que controlan. Dicha información indica que los BGC pueden autorregularse y regular a otros, dependiendo de la organización genética, es decir si el factor de la transcripción se encuentra dentro o fuera del clúster que se enciende es una regulación (Zhgun, 2023).

Por encima de este nivel, se encuentran los reguladores globales de la transcripción, los cuales coordinan distintos procesos celulares, entre ellos la biosíntesis de metabolitos secundarios. Dichos factores presentan la capacidad para unirse a los promotores de múltiples genes. Estos reguladores responden a señales ambientales, tales como luz, temperatura, pH, o disponibilidad de nutrientes como carbono, nitrógeno o hierro. Algunos de los factores de la transcripción que responden a los estímulos mencionados se encuentran Cre1, AreA, complejo Velvet (LaeA, VeA, VelB), PacC y HapX (Zhgun, 2023).

Distintas especies de *Trichoderma*, pueden producir metabolitos secundarios que permitan establecer interacciones con plantas, además que algunas cepas de *Trichoderma* spp. presentan la capacidad de producir metabolitos benéficos para las plantas, así como algunas fitohormonas tales como 6-pentil-alfa-pirona (6PP), tricodieno, tricoharzinas, etileno, auxinas, giberelinas, ácido jasmónico y ácido salicílico; dichos compuestos están asociados a el desarrollo del crecimiento

de la planta, así como la inducción de la respuesta de defensa de las mismas (Zeilinger *et al.*, 2016; Guzmán-Guzmán, *et al.*, 2019). En ese sentido, al evaluar la capacidad bioestimulante del crecimiento de la cepa CMU-08, al aplicar tanto los metabolitos secundarios presentes en los sobrenadantes de cultivos basales e inducidos, como las conidias de la cepa, observamos que ambos tienen un efecto positivo sobre el crecimiento, sin embargo los resultados más sobresalientes se observaron con la aplicación de las conidias así como la aplicación de los sobrenadantes de la condición inducida, lo que indica que la cepa CMU-08 por sí misma y la inducción con micelio de *B. cinerea* es efectiva y permite una buena producción de metabolitos secundarios, no únicamente con capacidad antagonista, sino también de promoción del crecimiento vegetal.

Es importante mencionar que la producción de ciertos metabolitos secundarios puede darse de manera basal, es decir sin presencia de algún estímulo, al igual que algunas enzimas líticas de la pared celular fúngica, llamadas CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes, por sus siglas en inglés) (Zhgun, 2023). Tanto como los metabolitos como las enzimas van a tener un efecto sobre otros hongos, afectando principalmente su crecimiento al atacar directamente su pared celular. En ese sentido como resultado de dicho ataque, se liberan pequeñas moléculas que van a actuar como inductores para la producción de una mayor cantidad de CWDE tales como quitinasas, glucanas y proteasas que van a lisar la pared celular del hongo blanco (Vinale *et al.*, 2008). Esta información es concordante con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que en análisis del secretoma, demostró que la cepa CMU-08 produjo una mayor cantidad de enzimas extracelulares cuando se encontró creciendo en medio suplementado con micelio de *B. cinerea*. Cabe mencionar que la cepa CMU-08 es una cepa de *T. atroviride*, la cual se caracteriza por presentar un estilo de vida micoparasitario donde la producción de CWDE, es fundamental (Reithner *et al.*, 2011.).

Al conjuntar la información disponible en la bibliografía con los datos obtenidos en el presente trabajo, se puede deducir que la cepa CMU-08, presenta distintos mecanismos de biocontrol, desde los mecanismos principales como la antibiosis, micoparasitismo, competencia por nutrientes como mecanismos secundarios tal como la promoción del crecimiento vegetal. Estas características le confieren a dicha cepa un amplio espectro para hacer usada en distintos procesos biotecnológicos.

7 CONCLUSIÓN

La cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*, es una cepa que produce una gran plétora de metabolitos secundarios, tales como 6PP y distintas fitohormonas, los cuales pueden tener un efecto antagonista, pero al mismo tiempo capacidad bioestimulante del crecimiento vegetal. Dicha cepa es productora de distintas enzimas extracelulares, entre ellas quitinas, glucanasas y proteasas que le confieren el potencial para presentar el micoparasitismo como un mecanismo de antagonismo.

Por lo anterior la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*, es una excelente candidata para el desarrollo de un producto de biocontrol con efecto bioestimulante.

8 REFERENCIAS

- Abdul-Halim, A. M. A. A., Shivanand, P., Krishnamoorthy, S., Taha, H. 2023. A review on the biological properties of *Trichoderma* spp. as a prospective biocontrol agent and biofertilizer. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/JABB.2023.11504>
- Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases-A review. *Ecological Complexity*. 49: 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978>
- Baudrot, V., Schouten, R., Umina, P. A., Hoffmann, A. A., Bird, L., Miles, M., Maino, J. L. 2023. Managing pesticide resistance in *Spodoptera frugiperda*: A spatially explicit framework for identifying optimal treatment strategies. *Ecological Modelling*. 483: 110416. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2023.110416>
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46: 387-400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., Steinberg, C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biology Reviews*. 28(4): 97-125. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.11.001>
- Fan, Q., Lin, H., Hu, Y., Jin, J., Zhang, R., Yan, H. 2023. Biocontrol of strawberry *Botrytis* gray mold and prolong the fruit shelf-life by fumigant *Trichoderma* spp. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2868489/v1>
- Gokul, A., Mabaso, J., Henema, N., Otomo, L., Bakare, O. O., Klein, A., ... & Keyster, M. (2023). Sustainable Agriculture through the Enhancement of Microbial Biocontrol Agents: Current Challenges and New Perspectives. *Applied Sciences*. 13(11): 6507.
- Gupta, R., Bar, M. 2020. Plant Immunity, Priming, and Systemic Resistance as Mechanisms for *Trichoderma* spp. Biocontrol. In: Sharma, A., Sharma, P. (eds) *Trichoderma. Rhizosphere Biology*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_5

- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*. 109(1): 6-16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de Los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., Santoyo, G. 2023. *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. *Plants*. 12(3): 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>
- Khan, B. A., Nadeem, M. A., Nawaz, H., Amin, M. M., Abbasi, G. H., Nadeem, M., Ali, M., Ameen, M., Javaid, M. M., Maqbool, R., Ikram, M., Ayub, M. A. (2023). Pesticides: impacts on agriculture productivity, environment, and management strategies. In *Emerging Contaminants and Plants: Interactions, Adaptations and Remediation Technologies* (pp. 109-134). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-22269-6_5
- Koli, P., Bhardwaj, N. R., Mahawer, S. K. 2019. Agrochemicals: Harmful and Beneficial Effects of Climate Changing Scenarios. *Climate Change and Agricultural Ecosystems*. 65–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816483-9.00004-9>
- Li, Y., Zhang, P., Li, M., Shakoor, N., Adeel, M., Zhou, P., Guo, M., Jiang, Y., Zhao, W., Lou, B., Rui, Y. 2023. Application and mechanisms of metal-based nanoparticles in the control of bacterial and fungal crop diseases. *Pest Management Science*. 79(1): 21-36. <https://doi.org/10.1002/ps.7218>
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K. R. 2016. Effects of pesticides on environment. *Plant, soil and microbes: volume 1: implications in crop science*. 253-269. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13
- Martínez-Medina, A., Del Mar Alguacil, M., Pascual, J. A., Van Wees, S. C. (2014). Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *Journal of Chemical Ecology*. 40: 804-815. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0478-1>

- Miethke, M. (2013). Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. *Metallomics*. 5(1): 15-28. <https://doi.org/10.1039/c2mt20193c>
- Palmieri, D., Ianiri, G., Del Grosso, C., Barone, G., De Curtis, F., Castoria, R., Lima, G. 2022. Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticulturae*. 8(7): 577. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070577>
- Rao, Y., Zeng, L., Jiang, H., Mei, L., Wang, Y. 2022. *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing Fusarium wilt disease in tomato seedlings. *BMC Microbiology*. 22(1): 88. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02511-3>
- Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L., Herrera-Estrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(13): 4361-4370. <https://doi.org/10.1128/AEM.00129-11>
- Schuster, A., Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3): 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- Tahat, M. M., Alananbeh, K. M., Othman, Y. A., Leskovar, D. I. 2020. Soil health and sustainable agriculture. *Sustainability*. 12(12): 4859. <https://doi.org/10.3390/su12124859>
- Tomm, H. A., Ucciferri, L., Ross, A. C. (2019). Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 46(9-10): 1381-1400. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02198-y>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Jaroszuk-Ściseł, J. 2022. *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(4): 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

- Vicente, I., Baroncelli, R., Hermosa, R., Monte, E., Vannacci, G., Sarrocco, S. 2022. Role and genetic basis of specialised secondary metabolites in *Trichoderma* ecophysiology. *Fungal Biology Reviews*. 39: 83-99. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.12.004>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*. 8(1). <https://doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K., Nayak S, C. 2016. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*. 40(2): 182-207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*–chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30(2): 74-90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- Zhgun, A. A. (2023). Fungal BGCs for production of secondary metabolites: main types, central roles in strain improvement, and regulation according to the piano principle. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(13): 11184. <https://doi.org/10.3390/ijms241311184>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>

9 ANEXOS

Anexo 1. Metabolitos secundarios producidos por la cepa CMU-08 de *T. atroviride*.

CLASE DEL METABOLITO	NOMBRE	FORMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	MASA	TIEMPO DE RETENCIÓN	m/z TEORICO	m/z ENCONTRADO	m/z ERROR (ppm)	MS/MS ES(+/-) FRAGMENTOS	MS/MS ES(+/-) CE (Ev)	NIVEL DE IDENTIFICACIÓN (A-D)
Ácidos orgánicos y derivados	Ácido artemisínico	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.1620	234.1620	7.0933	257.1513	257.1512	0.7000	M+Na	15	B
	Ácido kainico	C ₁₀ H ₁₅ NO ₄	213.1001	213.1001	1.5887	258.0983	258.0978	2.7827	M+HCOO	15	B
	Gibberelina A25	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	362.1729	362.1729	7.4986	447.1415	447.1424	-	M+K+HCOOH	15	B
Aldehídos, cetonas y esteres	Cianohidrina de acetona	C ₄ H ₇ NO	85.0528	85.0528	2.5898	108.0421	108.0436	3.8500	M+Na	15	B
	Brasilato de etileno	C ₁₅ H ₂₆ O ₄	270.1831	270.1831	6.2140	269.1758	269.1747	2.6712	M-H	15	B
	4-Hidroxi-6-metil-2-pirona	C ₆ H ₆ O ₃	126.0317	126.0317	1.0559	270.0973	270.0945	6.9682	2M+NH ₄	15	B
Alcaloides	Vittatina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271.1208	271.1208	3.6243	272.1281	272.1468	0.8500	M+H	15	B
Alcoholes y aminas	1D-miinositol 2-amino-2-desoxi-alfa-D-glucopiranosido	C ₁₂ H ₂₃ NO ₁₀	341.1322	341.1322	0.8053	342.1395	342.1393	0.7500	M+H	15	B
	Ergocalciferol	C ₂₈ H ₄₄ O	396.3392	396.3392	11.3303	397.3465	397.3366	24.8013	M+H	15	B
Aminoácidos y metabolitos	Ala-Tyr	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄	252.1110	252.1110	1.7237	253.1183	253.1179	2.3384	M+H	15	B
	DL-leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.0946	131.0946	1.3114	132.1019	132.1013	1.7077	M+H	15	B
	Cys-Arg-Phe	C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O ₄ S ₁	424.1893	424.1893	2.1025	425.1966	425.1908	8.9175	M+H	15	B
	L-alanil-L-triptófano	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	275.1270	275.1270	2.7682	276.1343	276.1335	0.9630	M+H	15	B
	N-(3-indolilacetil)-L-alanina	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	246.1004	246.1004	4.6000	331.0690	331.0704	-	M+K+HCOOH	15	B

CLASE DEL METABOLITO	NOMBRE	FORMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	MASA	TIEMPO DE RETENCIÓN	m/z TEORICO	m/z ENCONTRADO	m/z ERROR (ppm)	MS/MS ES(+/-) FRAGMENTOS	MS/MS ES(+/-) CE (Ev)	NIVEL DE IDENTIFICACIÓN (A-D)
Aminoácidos y metabolitos	Thr-Pro-Gly	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₅	273.1325	273.1325	4.5349	274.1398	274.1439	10.2925	M+H	15	B
	Thr-Trp	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₄	305.1376	305.1376	2.7711	305.1376	306.1429	3.1715	M+	15	B
Benceno y derivados sustituidos	Salicilamida	C ₇ H ₇ NO ₂	137.0477	137.0477	4.4119	118.0298	118.0293	1.2750	M-H ₂ O-H	15	B
	Shikonina	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	288.0998	288.0998	2.2864	306.1337	306.1338	0.1693	M+NH ₄	15	B
CoEnzimas y vitaminas	25-Hidroxitamina D2	C ₂₈ H ₄₄ O ₂	412.3341	412.3341	11.3294	395.3308	395.3316	0.1075	M+H-H ₂ O	15	B
Compuestos heterocíclicos	Citrinina	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250.0841	250.0841	1.7386	251.0914	251.1020	24.6400	M+H	15	B
	Clausenacoumarine	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	366.1103	366.1103	2.2419	430.1261	430.1273	3.3403	M+CH ₃ CN+Na	15	B
	Piperanina	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287.1521	287.1521	3.3047	288.1594	288.1595	2.2378	M+H	15	B
Flavonoides	Avicularina	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	434.0849	434.0849	3.1425	433.0776	433.0711	11.5716	M-H	15	B
	biocanina A 7-O-beta-D-glucósido	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.1213	446.1213	3.0285	467.0960	467.0933	5.6745	M+Na-2H	15	B
	Peonidina-3-glucósido	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ +	463.1130	463.1240	4.2443	463.1240	463.1136	20.3338	M+	15	B
Hormonas y compuestos relacionados	Ácido jasmónico	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	210.1256	210.1256	4.1227	287.0447	287.0478	-	M-H+2K	15	B
Terpenoides	Nepetalactone trans-cis-form	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166.0994	166.0994	7.1814	167.1067	167.1069	0.3983	M+H	15	B
	Ofiobolina F	C ₂₅ H ₄₂ O	358.3236	358.3236	9.2819	395.2722	395.2629	6.9250	M+K-2H	15	B
Otros	1-Hidroxiانtraquinona	C ₁₄ H ₈ O ₃	224.0473	224.0473	2.7420	447.0874	447.0881	0.4410	2M-H	15	B

Anexo 2. Listado de quitinasas, glucanasas y proteasas de *T. atroviride*.

TIPO DE PROTEÍNA	NOMBRE DEL GEN	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	No. DE PROTEÍNAS	No. DE PEPTIDOS	COVERTURA	PESO MOLECULAR	INTENSIDAD EN CB	INTENSIDAD EN CI
Quitinasas	<i>ech42</i>	Quitinasa (fragmento)	215	2	9.8	26.216	3983500	888350
	<i>TRIATDRAFT_54365</i>	Endoquitosanasa	2	1	7.3	23.828	561310	536860
	<i>TGAM01_v206606</i>	Quitinasa	20	2	11.9	36.366	785410	2689500
	<i>TGAMA5MH_09269</i>	Quitinasa	27	5	32.3	34.22	3162000	2098700
	<i>TRIATDRAFT_216890</i>	Endoquitosanasa	17	3	17	31.437	1264600	919640
	<i>TAC6</i>	Quitinasa	8	17	16.4	174.8	7134600	2879100
	<i>CHI18-5</i>	Quitinasa	106	9	41.5	46.298	2584600	2464900
	<i>TRIVIDRAFT_217392</i>	Proteína de la familia 1 del módulo de unión a carbohidratos	17	1	12	10.301	590570	170890
<i>TRIATDRAFT_217415</i>	Proteína de la familia 18 de las glicosil hidrolasas	2	1	6.9	39.362	-	56327	
Glucanasas	<i>cell2A</i>	Endoglucanasa	3	2	9.4	24.964	-	417450
	<i>TRIATDRAFT_37969</i>	Proteína de la familia 16 de las glicosil hidrolasas	4	2	11.6	30.18	27880	2628800
	<i>TRIATDRAFT_161168</i>	Proteína de la familia 55 de las glicosil hidrolasas	7	1	2.1	79.081	35350	42769
	<i>bg12.4</i>	Exo-beta-1,3-glucanasa 2.4	1	1	1	82.03	1949300	-
	<i>TRIATDRAFT_279684</i>	Proteína de la familia 64 de las glicosil hidrolasas	1	3	13	39.433	103010	691460
	<i>TRIATDRAFT_41194</i>	Proteína de la familia 64 de las glicosil hidrolasas	3	6	32.6	46.433	-	1034600
Proteasas	<i>TRIRERAFT_58698</i>	Serin proteasa	4	1	1.8	41.962	33654	-
	<i>TGAM01_v200792</i>	Proteasa vacuolar A	22	12	48.4	42.239	27647000	5551900
	<i>TGAMA5MH_09680</i>	Proteína que contiene el dominio de metaloproteasa de la familia M6	2	7	16.5	69.16	39123	-
	<i>TRIATDRAFT_137451</i>	Proteína que contiene el dominio peptidasa A1	3	1	2.6	49.23	-	29078
	<i>THARTR1_00617</i>	Proteasa extracelular menor vpr	8	3	7.3	92.58	1969800	344250
	<i>TARUN_10350</i>	Vacuolar protease a	1	3	8.9	42.564	30835	4350.6
	<i>TRIATDRAFT_297887</i>	Proteína que contiene el dominio peptidasa A1	6	4	12.3	42.541	-	4428000
TIPO DE PROTEÍNA	NOMBRE DEL GEN	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	No. DE PROTEÍNAS	No. DE PEPTIDOS	COVERTURA	PESO MOLECULAR	INTENSIDAD EN CB	INTENSIDAD EN CI
Proteasas	<i>TRIATDRAFT_298118</i>	Proteína que contiene el dominio peptidasa A1	4	5	19.7	37.209	32392000	31994000
	<i>TRIATDRAFT_298699</i>	M6 metaloproteasa	14	10	20	75.164	9943800	3641700
	<i>TRIATDRAFT_291037</i>	Serin proteasa	20	11	30	57.315	19643000	10804000
	<i>TRIATDRAFT_36337</i>	Proteasa neutral 2	17	5	19.9	36.149	24419000	19246000
	<i>TRIATDRAFT_33651</i>	Proteína que contiene el dominio peptidasa A1	1	1	7.2	39.781	-	125420
	<i>TRIATDRAFT_321810</i>	Proteína sin caracterizar	9	14	21	93.315	8895900	1878400

	TRIATDRAFT_302157	Aspartil aminopeptidasa vacuolar Lap4	8	5	9.2	60.597	1018400	1052900
	BBK36DRAFT_1136508	Proteína similar a la serina proteasa	2	5	16.6	57.928	-	33029

Anexo 3. VOCs producidos por la cepa CMU-08 de *T. atroviride*.

Compuesto	Tiempo de retención	% abundancia
a- felandreno	7.77	0.20
Terpinoleno	8.21	0.09
2-Heptanona	8.61	3.42
b- felandreno	9.02	0.24
2-Metil-1-butanol	9.35	0.63
g-Terpineno	10.18	0.12
3-Octanona	10.62	0.17
2-Octanona	11.51	0.17
2-Heptanol	12.48	0.13
2-Nonanona	14.36	0.29
a- Bergamoteno	19.15	0.61
2-undecanona	19.61	0.31
p-Mentan-3-ol	20.52	0.10
b-Farneseno	21.14	0.12
b-Curcumeno	21.28	0.27
3-Carene	21.45	0.08
a-Cedreno	21.63	0.07
a-Zingibereno	21.87	0.08
b-Bisaboleno	22.49	0.15
D-Carvona	22.76	0.05
a-Camigrene	23.04	0.38
b-Sesquifellandreno	23.39	0.10
6,10-Dimetil-5,9-undecadien-2-ona	25.33	0.22
6-PP	31.97	92.02

Karla Ivonne González Martínez

CARACTERIZACIÓN GENÓMICO-FISIOLÓGICA DE LA CEPA CMU-08 DE *Trichoderma atroviride*.pdf

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:459162987

Fecha de entrega

14 may 2025, 8:05 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

14 may 2025, 8:10 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

CARACTERIZACIÓN GENÓMICO-FISIOLÓGICA DE LA CEPA CMU-08 DE *Trichoderma atroviride*.pdf

Tamaño de archivo

2.3 MB

109 Páginas




31.276 Palabras

178.025 Caracteres

42% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Top Sources

- 39%  Internet sources
- 31%  Publications
- 0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

0 Integrity Flags for Review

No suspicious text manipulations found.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Caracterización multi-ómica de la cepa CMU-08 de Trichoderma atroviride	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Karla Ivonne González Martínez	karla.ivonne.gonzalez@umich.mx
Director	D.C. Gerardo Vázquez Marrufo	gerardo.marrufo@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	D.C. Omar Chassin Noria	omar.chassin@umich.mx

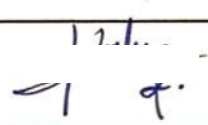
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	NO	
Traducción a otra lengua	NO	
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Karla Ivonne González Martínez 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán a 08 de mayo de 2025