



---

---

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE ANTAGONISMO  
DE UNA CEPA SILVESTRE DE *Trichoderma atroviride***

**T E S I S**

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

PRESENTA

**Q.F.B. Karla Ivonne González Martínez**

**Asesor: Dra. Virginia A. Robinson Fuentes**

**Morelia, Michoacán; Mayo de 2020.**

---

---

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D.C. Virginia A. Robinson Fuentes y el D.C. Gerardo Vázquez-Marrufo. El presente trabajo recibió apoyo otorgado por CONACyT mediante la beca con registro No. 700985 para la realización de estudios de posgrado.

## ÍNDICE

|   | pp. |
|---|-----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 7   |
| 2.1 Características del género <i>Trichoderma</i> .....                                 | 7   |
| 2.2 Estilo de vida.....   | 9   |
| 2.3 Mecanismos de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp.....                            | 10  |
| 2.3.1 Inducción de resistencia en plantas .....   | 11  |
| 2.3.2 Producción de metabolitos secundarios .....                                       | 11  |
| 2.3.3 Competencia por nutrientes y espacio .....  | 13  |
| 2.3.4 Micoparasitismo .....   | 14  |
| 2.4 Enzimas extracelulares de <i>Trichoderma</i> spp. asociadas al micoparasitismo..... | 15  |
| 2.5 Inducción de enzimas líticas en <i>Trichoderma</i> spp.....                         | 18  |
| 2.6 Estructuras degradadas por glucanasas y quitinasas .....                            | 20  |
| 2.7 Aplicaciones industriales de glucanasas y quitinasas .....                          | 21  |
| 2.7.1 Glucanasas .....  | 21  |
| 2.7.2 Quitinasas .....  | 22  |
| 2.8 Antecedentes de Laboratorio .....   | 22  |
| 3. HIPÓTESIS.....   | 25  |
| 4. OBJETIVOS.....   | 25  |
| 4.1 Objetivo general .....  | 25  |
| 4.2 Objetivos específicos .....   | 25  |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 27  |
| 5.1 Cepas de estudio .....  | 27  |
| 5.2 Medios de cultivo .....   | 27  |
| 5.2.1 Agar papa y dextrosa (PDA) .....  | 27  |
| 5.2.2 Medio agar extracto de malta (AEM) .....  | 28  |
| 5.2.3 Medio mínimo Vogel (MMV) .....  | 28  |
| 5.2.4 Medio caldo de papa y dextrosa (PDB) .....  | 28  |
| 5.3 Viabilidad celular y obtención de inóculos.....                                     | 28  |
| 5.4 Cinéticas de crecimiento en medio líquido .....                                     | 29  |
| 5.5 Ensayos de antagonismo .....  | 29  |
| 5.6 Ensayos de inhibición .....   | 30  |

---

---

|  |    |
|--|----|
| 5.6.1 Inhibición por metabolitos no volátiles .....                                  | 30 |
| 5.6.2 Inhibición por metabolitos volátiles .....                                     | 31 |
| 5.7 Microscopía electrónica de barrido de los ensayos de confrontación .....         | 32 |
| 5.8 Obtención de micelio y pared celular de fitopatógenos.....                       | 32 |
| 5.9 Generación de las cinéticas de actividad enzimática extracelular.....            | 32 |
| 5.10 Ensayos de actividad enzimática .....   | 33 |
| 5.10.1 Actividad de $\beta$ -1,3 glucanasa.....                                      | 33 |
| 5.10.2 Actividad de quitinasa .....  | 33 |
| 5.11 Ensayos de qRT-PCR.....   | 34 |
| 5.11.1 Extracción de ARN total.....  | 34 |
| 5.11.2 Síntesis de ADNc.....   | 34 |
| 5.11.3 Ensayos de RT-PCR.....  | 35 |
| 5.11.4 Ensayos de qPCR.....  | 35 |
| 5.12 Análisis estadístico.....   | 36 |
| 6. RESULTADOS .....  | 37 |
| 6.1 Ensayos de antagonismo in vitro .....  | 37 |
| 6.2 Actividad enzimática de $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa de la cepa CMU-08 ... | 44 |
| 6.2.1 $\beta$ -1,3 glucanasa .....   | 44 |
| 6.2.2 Quitinasa.....   | 45 |
| 6.3 Análisis de la transcripción de genes de quitinasas y glucanasa .....            | 46 |
| 7. DISCUSIÓN.....  | 49 |
| 7.1 Ensayos de antagonismo .....   | 50 |
| 7.2 Ensayos de actividad enzimática .....  | 55 |
| 7.3 Ensayos de expresión de genes de quitinasas y glucanasas .....                   | 58 |
| 8. RESUMEN DE RESULTADOS.....  | 62 |
| 9. CONCLUSIÓN .....  | 63 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA .....   | 64 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Num. | Nombre   | Pag. |
|------|--|------|
| 1    | Mecanismos de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp.   | 12   |
| 2    | Estrategia experimental diseñada para el cumplimiento de los objetivos del proyecto  | 26   |
| 3    | Cinética de crecimiento de la cepa CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i>   | 37   |
| 4    | Ensayos de confrontación de la cepa CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i> contra microorganismos fitopatógenos   | 38   |
| 5    | Ensayos de inhibición de microorganismos fitopatógenos por metabolitos no volátiles de la cepa CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i>   | 40   |
| 6    | Ensayos de inhibición de microorganismos fitopátogenos por metabolitos volátiles de la cepa CMU-08 <i>Trichoderma atroviride</i>   | 41   |
| 7    | Enrollamiento y formación de apresorios del micelio de la cepa CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i> sobre el micelio de los cuatro fitopatógenos de prueba                    | 43   |
| 8    | Actividad enzimática $\beta$ -1,3 glucanasa de CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i>   | 44   |
| 9    | Actividad enzimática quitinasa de CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i>  | 45   |
| 10   | Patrón de transcripción de genes de quitinasas y glucanasa de la cepa CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i>  | 46   |
| 11   | Expresión relativa de genes que codificantes de enzimas degradadoras de pared celular de CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i> durante la interacción con hongos fitopatógenos | 47   |
| 12   | Cambio en la expresión de genes codificantes de quitinasas y una glucanasa en la cepa CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i> durante el micoparasitismo                         | 48   |

---

## ÍNDICE DE TABLAS

| <b>Num.</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Pag.</b> |
|-------------|--|-------------|
| 1           | Microorganismos fitopatógenos de prueba  | 27          |
| 2           | Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de quitinasas y glucanasa  | 36          |
| 3           | Antagonismo de la cepa CMU-8 <i>Trichoderma atroviride</i> contra microorganismos fitopatógenos en cultivos duales   | 38          |
| 4           | Inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos por metabolitos no volátiles de la cepa CMU-08 de <i>Trichoderma atroviride</i>  | 39          |
| 5           | Inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos por compuestos volátiles por parte de la cepa CMU-8 de <i>Trichoderma atroviride</i> en tres medios de cultivo distintos | 41          |
| 6           | Tipos de antagonismo con los diferentes mecanismos de CMU-08 <i>Trichoderma atroviride</i> contra fitopatógenos en tres medios de cultivo.   | 42          |

## ABREVIATURAS

|                    |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|
| ° C                | Grados centígrados                  |
| µg                 | Microgramos                         |
| µl                 | microlitros                         |
| ADN                | Ácido desoxirribonucleico           |
| ADNc               | ADN complementario                  |
| ARN                | Ácido ribonucleico                  |
| CMU                | Cepario Michoacano Universitario    |
| CT                 | Ciclo umbral                        |
| DEPC               | Dietil-pirocarbonato                |
| G                  | Gravedades                          |
| GH                 | Glicosil hidrolasas                 |
| g/L                | Gramos por litro                    |
| h                  | Horas                               |
| lb/in <sup>2</sup> | Libra por pulgada cuadrada          |
| M                  | Molar                               |
| AEM                | Agar extracto de malta              |
| mg                 | Miligramos                          |
| min                | Minutos                             |
| mL                 | Mililitros                          |
| mm                 | Milímetros                          |
| mM                 | Milimolar                           |
| MMV                | Medio mínimo Vogel                  |
| NaCl               | Cloruro de sodio                    |
| Nm                 | Nanómetros                          |
| ORF                | Marco de lectura abierta            |
| PCR                | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH                 | Potencial de hidrógeno              |
| RT-PCR             | PCR con transcriptasa reversa       |
| qPCR               | PCR cuantitativa                    |
| rpm                | Revoluciones por minuto             |

---

---

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antagonica *in vitro* de una cepa de *Trichoderma atroviride* (CMU-08) contra distintos fitopatógenos, mediante ensayos de confrontación en cultivos duales, de inhibición por compuestos volátiles y antibiosis empleando agar extracto de malta (AEM), agar papa-dextrosa (PDA) y medio mínimo Vogel (MMV). El antagonismo de la cepa CMU-08 hacia *Fusarium* sp. en los ensayos de confrontación en los tres medios de cultivo fue Tipo 1, en el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* se encontró la mayor inhibición a través de la producción de metabolitos volátiles, siendo de 92.8% en MMV. *T. atroviride* antagonizó eficientemente mediante confrontación y antibiosis a *Phytophthora cinnamomi*, con 70.2% de inhibición en MMV; la inhibición por volátiles para *Botrytis cinerea* fue de 67.0% en AEM. No se encontró actividad basal de  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* en condición basal empleando medio mínimo Vogel (MMV) y de inducción en MMV suplementado con paredes celulares. La actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa inducida por paredes celulares (0.5% p/v) de *B. cinerea* (Bc) alcanzó el máximo (484.1 $\pm$ 223.9 U/ $\mu$ L) a las 18 h de incubación, mientras que en presencia de paredes celulares de *Fusarium* sp. (Fsp) mostró el máximo (721.0 $\pm$ 53.1 U/ $\mu$ L) a las 12 h. La actividad de quitinasa en medio suplementado con paredes celulares de Bc y Fsp se detectó desde las seis horas de incubación, alcanzando ahí el máximo en ambos casos, con 1625.6 ( $\pm$ 803.4) U/ $\mu$ L y 2671.3 ( $\pm$ 542.9) U/ $\mu$ L, respectivamente. En cultivos duales se observó que los tres genes de quitinasas, *ech42*, *chit33* y *chit36*, así como el gen *gluc18*, codificante de una endoglucanasa se expresan durante y después del contacto de CMU-08 con *Fusarium* sp. La expresión de estos genes es mayor después del contacto con el fitopatógeno. Estos resultados sugieren que la cepa CMU-08 de *T. atroviride* es una antagonista nivel 1 de microorganismos fitopatógenos del estado de Michoacán y que su principal mecanismo de acción es el micoparasitismo.

**Palabras clave:** Trichoderma, antagonismo, micoparasitismo, quitinasa, glucanasa.

---

---

## SUMMARY

*In vitro* antagonistic capacity of a strain of *Trichoderma atroviride* (CMU-08) against different phytopathogens was evaluated in this study, through assays of confrontation in dual cultures, of inhibition by volatile compounds and antibiosis using malt extract agar (AEM), potato-dextrose agar (PDA) and Vogel minimum media (MMV). The antagonism of strain CMU-08 towards *Fusarium* sp. in confrontation assays was Type 1 in the three culture media, in the case of *Colletotrichum gloeosporioides* the greatest inhibition was through the production of volatile metabolites, being 92.8% in MMV. *Phytophthora cinnamomi*, was efficiently antagonized by confrontation and antibiosis with 70.2% inhibition in MMV; volatile inhibition for *Botrytis cinerea* was 67.0% in AEM. No basal activity of  $\beta$ -1,3 glucanase and chitinase of the CMU-08 strain of *T. atroviride* was found in basal condition using minimal Vogel (MMV) and induction medium in MMV supplemented with cell walls. The activity of  $\beta$ -1,3 glucanase induced by cell walls (0.5% w / v) of *B. cinerea* (Bc) reached maximum ( $484.1 \pm 223.9$  U /  $\mu$ L) at 18 h of incubation, while in the presence of *Fusarium* sp. (Fsp) showed the maximum ( $721.0 \pm 53.1$  U /  $\mu$ L) at 12 h. Chitinase activity in medium supplemented with Bc and Fsp cell walls was detected from six hours of incubation, reaching the maximum in both cases, with  $1625.6 (\pm 803.4)$  U /  $\mu$ L and  $2671.3 (\pm 542.9)$  U /  $\mu$ L, respectively. In dual cultures it was observed that the three chitinase genes, *ech42*, *chit33* and *chit36*, as well as the *gluc18* gene encoding an endoglucanase are expressed during and after the contact of CMU-08 with *Fusarium* sp. The expression of these genes is greater after contact with the phytopathogen. These results suggest that the strain CMU-08 of *T. atroviride* is a level 1 antagonist of phytopathogenic microorganisms of the state of Michoacan, its main mechanism of action is mycoparasitism.

## 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura comprende un conjunto de técnicas, conocimientos y procesos necesarios para cultivar diferentes tipos de plantas, semillas y frutos, y conlleva el cambio de un ambiente natural a un sector de producción de alimentos para humanos y animales (Jácome y del Almo Rodríguez, 1999). Según la FAO (2006), el 42% de la humanidad depende de la agricultura, caza y pesca. No obstante, la agricultura es la actividad con mayor preponderancia en el desarrollo económico de países en desarrollo. En este marco, es relevante resaltar que el 47% de la población mundial radica en zonas rurales, en donde la agricultura sigue siendo la fuente directa de ingresos del 70% de la población rural, mayoritariamente de campesinos que producen a pequeña escala (FAO, 2006; Ortíz-Paniagua y Chávez, 2018).

México es uno de los principales países productores y exportadores de alimentos, lo cual se debe a un conjunto de características importantes que le permiten desarrollar dicho potencial, entre las que se encuentran la variabilidad de climas, que permiten el cultivo de una gran diversidad de especies vegetales (INEGI, 2014). Además, cuenta con aproximadamente 198 millones de hectáreas de territorio, de las cuales el 73.2% (145 millones) se dedican a la actividad agropecuaria; de éstas, alrededor del 20.7% (30 millones de hectáreas) son tierras de cultivo, en las que se siembra maíz, frijol, garbanzo, trigo y arroz, representando los cultivos de mayor importancia en México por razones nutricionales, económicas y sociales (Osorio-Torres, 2014).

En el caso particular de Michoacán, éste se encuentra entre los principales estados del país en producción agrícola en el cual se cultivan aproximadamente 157 especies vegetales, destacando por su volumen la producción de aguacate, fresa, zarzamora, lenteja, durazno y ciruela (SAGARPA, 2018; SIAP, 2017b). La entidad presenta varias características favorables para la actividad agrícola, como una diversidad de climas, buena disponibilidad de agua y suelo fértil, que le permiten una producción agrícola con altos niveles de rendimiento, permitiendo su desarrollo (SAGARPA, 2017; Ortíz-Paniagua *et al.*, 2018). De las cosechas agrícolas del estado de Michoacán destacan el aguacate y la zarzamora,

ocupando el primer lugar en producción nacional, con un 84% en el primer caso; en el caso del maíz, el estado se posiciona en el quinto lugar nacional. Michoacán produce también otros cultivos como sorgo, caña de azúcar, frijol, trigo, fresa, melón, sandía, limón, mango, garbanzo, plátano, guayaba, ajonjolí y diversas hortalizas. Es importante resaltar que en los últimos años se ha incrementado la extensión de tierra destinada a la producción de frutillas, como la zarzamora y la frambuesa, entre otros (Ortíz-Paniagua *et al.*, 2018).

La producción agrícola depende de diversos factores que pueden afectar de manera negativa sus rendimientos. Un factor relevante para el presente trabajo son las enfermedades de las plantas causadas por microorganismos fitopatógenos, así como la proliferación de plagas, causantes de pérdidas significativas en la producción. Las pérdidas ocasionadas por problemas fitosanitarios, animales y malezas oscilan entre el 20 y el 40% de las cosechas del mundo (Savary *et al.*, 2012). Sin embargo, los patógenos y plagas afectan también en pos-cosecha, causando una pérdida adicional del 10 al 20%. Así, las pérdidas globales por enfermedades y plagas oscilan de un 40 a un 50%, y para el caso de México estas representan alrededor del 78% (Fernández-Pavía *et al.*, 2012; Dieleman, 2016).

Las enfermedades que afectan los cultivos de relevancia agrícola son diversas, pero el caso de los fitopatógenos fúngicos y de oomicetes que dañan varios de los principales cultivos de Michoacán, es de particular relevancia para el presente trabajo. Así, en el caso del aguacate, se pueden mencionar como enfermedades de importancia, la pudrición de la raíz ocasionada por *Armillaria mellea*, la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, el anillado del pedúnculo y la pudrición de la raíz por *Fusarium* sp., la tristeza y marchitez rápida causada por *Phytophthora cinnamomi*, así como el cancro por *Phytophthora parasitica* y la roña ocasionada por *Sphaceloma perseae* (Fernández-Pavía *et al.*, 2015). Mientras que el cultivo del maíz puede presentar la enfermedad de diente de caballo, causada por *Claviceps gigantea* y la pudrición del grano almacenado, por *Rhizopus* sp. También puede manifestar la enfermedad del carbón cubierto o Cuitlacoche, por *Ustilago maydis* y la roya por *Puccinia sorghi* (Fernández-Pavía *et*

*al.*, 2015). Una de las enfermedades fúngicas de importancia en zarzamora es el mildiu ocasionado por *Peronospora sparsa*. Para el caso de la fresa, esta puede manifestar enfermedades causadas por *Phytophthora cactorum*, que ocasiona pudrición coriácea del fruto, así como la pudrición de la raíz por *Rhizoctonia solani* (Fernández-Pavía *et al.*, 2015), entre otras.

Un problema creciente en el combate a los hongos y oomicetes fitopatógenos es el incremento constante de la resistencia a los agroquímicos o pesticidas empleados para combatirlos. La OMS define un pesticida como “compuestos químicos que se usan para matar plagas, incluidos insectos, roedores, hongos y plantas no deseadas (malezas)... se usan en la salud pública para matar vectores de enfermedades, como los mosquitos, y en la agricultura, para matar las plagas que dañan los cultivos” (FAO, 2020). Mientras que para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA, por sus siglas en inglés), una de las definiciones legalmente aceptadas de pesticida es la de cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar a cualquier plaga (EPA, 2020). En la misma fuente se establece que en el concepto de plaga se incluyen diversos tipos de organismos como insectos, roedores, nematodos, hongos, hierbas, así como virus, bacterias u otros microorganismos. Los pesticidas pueden clasificarse mediante distintos criterios, uno de los cuales es de acuerdo al organismo blanco, estableciéndose las categorías de herbicidas, insecticidas, fungicidas y raticidas, entre otros. En la clasificación de acuerdo a su naturaleza química, se encuentran pesticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, los ácidos carboxílicos, los piretroides, las amidas, las anilinas, los derivados alquil de urea, los compuestos heterocíclicos con nitrógeno, los fenoles, las imidas y los compuestos inorgánicos, entre otros. Debido a sus características químicas, estos productos presentan problemas de contaminación en los ecosistemas y afectaciones a la salud pública (Costa *et al.*, 2008; Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). En el caso de los compuestos organoclorados son potentes inhibidores de la colinesterasa y la pseudocolinesterasa, y dicha inhibición conduce a una acumulación de la acetilcolina en la sinapsis, teniendo como resultado algunos síntomas

muscarínicos y nicotínicos en mamíferos y en el ser humano. Los compuestos organofosforados son estructuralmente diversos y su reactividad varía en función de su estructura química. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), una serina esterasa ampliamente distribuida y presente en el sistema nervioso central y periférico de los vertebrados. La función de esta enzima es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (ACh). Los efectos de la acumulación de ACh son la alteración de la función del sistema nervioso autónomo, las neuronas somáticas motoras y el cerebro por acción en los receptores nicotínicos y muscarínicos (Özkara et al., 2016). Los azoles constituyen un grupo de compuestos que tienen como blanco la estero 14 $\alpha$ -desmetilasa (CYP51), una enzima regulatoria en el proceso de la biosíntesis de ergosterol. De esta manera se forma el complejo CYP51-azol, el cual inhibe la desmetilación del lanosterol y eburicol, además de evitar la producción de ergosterol, molécula importante para que la membrana fúngica mantenga su fluidez y permeabilidad. Al encontrarse interrumpida la estructura de la membrana, algunos procesos biológicos como el transporte activo, puede resultar en fungistasis (Price *et al.*, 2015).

En el caso particular de los fungicidas, el FRAC (2019, por sus siglas en inglés: *Fungicide Resistance Action Committee*) los clasifica considerando su mecanismo bioquímico de acción, al participar en procesos metabólicos como la síntesis de ácidos nucleicos. También se considera el sitio blanco específico de algunas rutas metabólicas; o de acuerdo al grupo químico basado en consideraciones químicas y su nomenclatura es de acuerdo a la IUPAC. Algunos de los fungicidas que son empleados actualmente son benomil, metalaxil, ciprodinil, boscalid, tiabendazol, azoxystrobin y compuestos de cobre, entre otros.

El uso de estos pesticidas puede tener consecuencias como afectaciones a la microbiota benéfica, bioacumulación en tejidos vegetales y por ende en lo largo de la cadena trófica, toxicidad a especies animales y problemas de salud a seres humanos (FAO, 2018). Debido al aumento de la resistencia de microorganismos fitopatógenos a los compuestos químicos empleados como pesticidas, se ha potencializado la búsqueda y el uso de biocontroladores (Fravel, 2005). Los

biocontroladores, son aquellos organismos que logran desarrollar mecanismos de defensa y/o competencia contra los distintos fitopatógenos. Estos biocontroladores pueden emplearse en conjunto con distintos plaguicidas; resultando en un antagonismo y control de estos organismos patógenos, además de evitar la generación de resistencia a dichos agroquímicos (Fravel, 2005; Stenberg *et al.*, 2015). Existen diversos microorganismos biocontroladores, destacando entre ellos algunas bacterias y hongos. Sin embargo, son los hongos los que se han estudiado y comercializado como biopesticidas, debido a sus muy particulares características (Diáñez-Martínez *et al.*, 2015).

*Trichoderma* es un género de hongos ascomicetos que posee gran relevancia en relación al control biológico. Las especies del género *Trichoderma* presentan características que las hacen antagonistas eficientes contra distintos microorganismos fitopatógenos. En particular, los mecanismos que desarrolla *Trichoderma* spp. para ser un antagonista eficiente son la competencia directa por nutrientes y/o espacio; la producción de metabolitos con actividad biológica, que pueden ser volátiles o no volátiles (antibiosis), y el micoparasitismo con la participación de enzimas que degradan la pared celular del hospedero. Adicionalmente, las especies de *Trichoderma* inducen la respuesta de defensa de las plantas (Diáñez-Martínez *et al.*, 2015; Benítez *et al.*, 2004).

Por su potencial para el control de enfermedades de cultivos de relevancia socioeconómica, al posibilitar la disminución o evitar completamente el uso de agroquímicos nocivos para los ecosistemas y la salud humana, es necesario evaluar la capacidad antagónica de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. Esto permitirá conocer las características fisiológicas para el óptimo desarrollo de la cepa en el campo. Estos aspectos son importantes para desarrollar un buen producto para su aplicación en el biocontrol. Sin embargo, se debe considerar que el tipo de antagonismo por parte de *Trichoderma* puede variar dependiendo del microorganismo blanco, por lo cual se debe considerar la acción sinérgica de los mecanismos por parte de *Trichoderma*. Adicionalmente, algunos estudios han documentado que el uso de organismos endémicos puede ofrecer una mayor eficiencia para combatir a microorganismos fitopatógenos locales, esto es debido

a que las cepas antagonistas se encuentran mejor adaptadas a las características ambientales en donde se pretende utilizar (Sánchez y Cota, 2006).

En el presente trabajo se pretende analizar los distintos mecanismos de antagonismo de una cepa silvestre de *Trichoderma atroviride* (CMU-08), contra distintos hongos y oomicetes fitopatógenos que atacan los principales cultivos del estado de Michoacán. Es importante mencionar que los microorganismos fitopatógenos empleados en este trabajo, presentan resistencia a algunos fungicidas, además que algunas de las especies de estos patógenos empleados, según el FRAC (2019) se consideran de riesgo alto y mediano, como el caso de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente, para desarrollar resistencia en condiciones agronómicas específicas. Los resultados de dicho estudio permitirán determinar cuál es el mecanismo por el que esta cepa antagoniza de mejor manera, para posteriormente evaluar el desarrollo de algún producto de biocontrol.

## 2. ANTECEDENTES

En la actualidad se reconocen al menos 254 especies dentro del género *Trichoderma* (Bissett *et al.*, 2015). Este taxón fue descrito por primera vez por Persoon en 1794 y ya en 1865 se sugirió una relación del estado sexual con una especie de *Hypocrea*. Debido a la dificultad para identificar mediante características morfológicas a las diferentes especies del complejo *Trichoderma/Hypocrea* se propuso reducir la taxonomía a una sola especie, *Trichoderma viride*. No fue hasta 1969 que se inició el trabajo taxonómico detallado de las especies dentro del género. No obstante la incorporación de caracteres fisiológicos, bioquímicos y genéticos, aún persiste en la identificación y el reporte erróneo de especies dentro de *Trichoderma*. Por ejemplo, con el nombre *Trichoderma harzianum* se han descrito una gran variedad de cepas alrededor del mundo, aunque en la actualidad se sabe que es un complejo conformado por 15 especies distintas (Chaverri *et al.*, 2015). No obstante, continuamente se describen nuevas especies del género provenientes de aislados obtenidos de distintas regiones geográficas o nuevos nichos, previamente no analizados. Para 2006, el género ya incluía más de 100 especies definidas filogenéticamente (Chen y Zhuang, 2016; Samuels, 2006; Qin y Zhuang, 2016; Schuster y Schmoll, 2010). La clasificación completa del género *Trichoderma* es: Reino Fungi, Subreino Dikarya, Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales y familia Hypocreaceae (Hibbett *et al.*, 2007; Kubicek y Druzhinina, 2014).

### 2.1 Características del género *Trichoderma*

En general, las especies del género *Trichoderma* son de crecimiento rápido y muestran la presencia de micelio aéreo. También se observan gránulos de conidias de color verde brillante, amarillas, gris o marrón. Las colonias de micelio vegetativo producen pigmentos que varían desde color amarillo verdoso brillante a color rojizo, aunque algunos también son incoloros (Bissett, 1991; Schuster y Schmoll, 2010). Algunas cepas de *Trichoderma viride* y de *Trichoderma atroviride*

producen un olor característico semejante a coco (Kubicek y Harman, 1998), lo que ha sido utilizado como criterio taxonómico para dichas especies.

Microscópicamente estos hongos presentan conidióforos ramificados repetidamente en un número indefinido de niveles, las ramificaciones primarias forman ramificaciones secundarias más pequeñas que también pueden ramificarse. Sus fiálides son en forma de ámpula un tanto alargada, comúnmente estrecha en la base, más o menos hinchada cerca del centro y de cuello corto cerca del ápice (Bissett, 1991). Generalmente las fiálides terminales tienden a ser más alargadas y estrechas. Las células subterminales del conidióforo pueden producir conidias que presentan diferentes formas, incluyendo redonda, elipsoidal, obovada o cilíndrica corta. En muchas especies de *Trichoderma* es común observar clamidosporas, que tienden a ser de forma redonda o elipsoidal, terminales e intercalares, de paredes lisas, incoloras, amarillentas o verdosas y de 6-15  $\mu\text{m}$  de diámetro en la mayoría de los casos (Kubicek y Harman, 1998).

La mayoría de las especies del género son aeróbicas, con una gran versatilidad para utilizar fuentes de carbono y nitrógeno, aunque les favorece la presencia de materia orgánica de origen vegetal. Con relación al entorno fisicoquímico, la mayoría de las cepas de *Trichoderma* son mesófilas, y el crecimiento vegetativo es más afín a una alta humedad y temperaturas entre los 20 y 28 °C. Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad, siendo esto una de sus características más importantes (Jackson *et al.*, 1991; Kredics *et al.*, 2003).

El desarrollo de *Trichoderma* spp. se ve afectado por diversos factores, entre los que se incluye la temperatura, la cual influye en el crecimiento del micelio, germinación de las esporas y el crecimiento del tubo germinal, habilidades competitivas y la producción de metabolitos volátiles y no volátiles (Kedrics *et al.*, 2003). Mientras que el pH tiene influye en los aspectos de conidiación y el crecimiento, aunque la mayoría de las especies de *Trichoderma*, llegan a crecer en un intervalo de pH de entre 2 a 6, éstas tienen como condición óptima de crecimiento un pH de 4. Además, el pH juega un papel importante en la producción de enzimas extracelulares (Jackson *et al.*, 1991; Kedrics *et al.*, 2003,

2004). En relación con los aspectos nutricionales, se ha reportado que la esporulación asexual de *Trichoderma* spp. depende primordialmente del tipo y la disponibilidad de la fuente de carbono (Friedl *et al.*, 2008) y llega a ser modulada por parámetros tales como la iluminación, la privación de nutrientes, un pH bajo y el daño mecánico (Steyaert *et al.*, 2010; Schmoll *et al.*, 2010; Carreras-Villaseñor *et al.*, 2012). En condiciones de luz alterna (fotoperiodo), se desarrollan colonias que suelen ser blancas y algodonosas al inicio y después con zonación concéntrica, alternando una banda delgada hialina con otra ancha de color verde oscuro y uniformemente de color verde oscuro bajo la luz continua, indicando conidiación (Schmoll *et al.*, 2010). La luz influye, además, en la producción de metabolitos secundarios (Purschwitz *et al.*, 2006; Schmoll *et al.*, 2010).

## **2.2 Estilo de vida**

Algunas especies del género *Trichoderma* se consideran oportunistas exitosos, ya que logran colonizar diversos hábitats, presentando una notable versatilidad de estilos de vida, ya sea en ambientes acuáticos, en el suelo de ecosistemas terrestres, o como parte de la microbiota que coloniza restos vegetales (Atanasova, 2014; Kubicek y Druzhinina, 2014). Sus estilos de vida se basan en dos modos principales de nutrición, que son el saprotrofismo y la biotrofia (Atanasova, 2014). El saprotrofismo de algunas especies del género se debe en buena medida a su capacidad para producir una gran diversidad de enzimas hidrolíticas extracelulares, varias de las cuales están relacionadas con la degradación de polisacáridos de la pared celular vegetal (Strakowska *et al.*, 2014). Las interacciones biotróficas de las especies del género se presentan con una amplia gama de grupos biológicos, siendo el micoparasitismo una de las mejor documentadas. Entre sus interacciones con otras especies de hongos, *Trichoderma* spp. coloniza superficialmente tejidos y micelio de otras especies fúngicas, de tal forma que su comportamiento ecológico en ese sentido oscila entre el micotrofia, en la que no mata a su hospedero, hasta el hiperparasitismo necrotrofico, en donde la interacción entre el micelio del micoparásito y el hospedero culmina con la lisis de la pared celular y la digestión de los contenidos

celulares de este último, mediada por las enzimas hidrolíticas secretadas, causando su muerte (Druzhinina *et al.*, 2011; Leeder *et al.*, 2011). No obstante, las relaciones con otras formas de vida (biotrofia) abarcan más allá del micoparasitismo, e incluyen interacciones como endófito en tejido foliar y raíces de plantas, como parásito de nematodos y como agente infeccioso de humanos (Mukherjee *et al.*, 2013; Schuster y Schmoll, 2010).

Una característica importante de *Trichoderma* spp. es su capacidad para antagonizar a microorganismos fitopatógenos a través de diferentes mecanismos de acción que incluyen el micoparasitismo, la antibiosis mediante la producción de enzimas o metabolitos secundarios, la competencia por nutrientes y espacio (Benítez *et al.*, 2004). De manera interesante, estos mecanismos actúan sinérgicamente, obteniendo una mayor eficacia en la eliminación del agente infeccioso. Además de la capacidad que *Trichoderma* spp. posee para atacar o inhibir directamente el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, también pueden inducir la resistencia en plantas, de manera sistémica como localmente, contra un amplio número de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus (Benítez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

### **2.3 Mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp.**

Como se mencionó anteriormente, diversas especies del género *Trichoderma* presentan diferentes mecanismos para antagonizar a microorganismos fitopatógenos, lo que permite su empleo en estrategias de biocontrol. Entre los organismos antagonistas de hongos y oomicetes fitopatógenos, destacan las especies de *Trichoderma* como biocontroladores eficientes (Berini *et al.*, 2018).

El “control biológico” o “biocontrol” se define de manera simple como “el control de un organismo por parte de otro” (Narayanasamy, 2013). De manera más específica, el biocontrol puede considerarse como “el uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir los efectos de organismos no deseados (patógenos) y favorecer organismos deseables como cultivos, árboles, animales, insectos y microorganismos” (Narayanasamy, 2013).

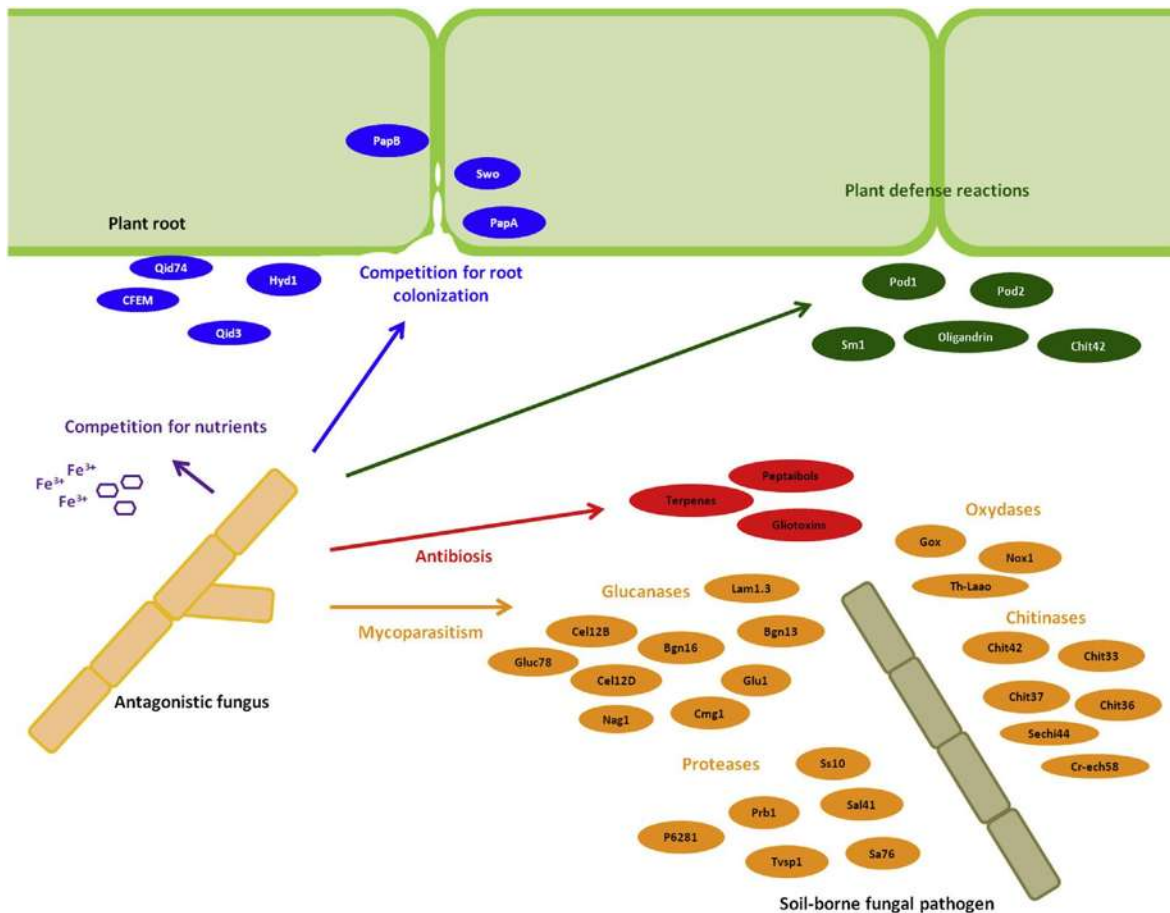
El desarrollo de un microorganismo que controla a otro depende de diversos factores que favorecen una actividad antagonista.

### 2.3.1 Inducción de resistencia en plantas

Este mecanismo de antagonismo de *Trichoderma* es el menos estudiado, en comparación con los mecanismos que se describen más adelante. Un primer mecanismo denominado resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés), ha mostrado que la inducción de resistencia sistémica en plantas por parte de *Trichoderma* spp. está mediada por las fitohormonas ácido jasmónico y etileno, con las cuales la planta reconoce al hongo (Fig. 1) (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). En un segundo mecanismo denominado resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) y mediado por ácido salicílico, *Trichoderma* spp. induce en la planta la expresión de genes relacionados con patogénesis. La inducción de resistencia contra fitopatógenos ha sido probada experimentalmente en diversos sistemas planta-patógeno que incluyen *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol, *Alternaria solani* en tomate y *Phytophthora parasitica* en tabaco, tanto mediante la aplicación de inóculos como de extractos de *Trichoderma* spp. (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014).

### 2.3.2 Producción de metabolitos secundarios

Las especies del género *Trichoderma* producen una gran diversidad de metabolitos secundarios con distintos tipos de actividad biológica (Fig. 1) (Hermosa *et al.*, 2012; Zeilinger *et al.*, 2016). Los peptaiboles o peptaibióticos, un grupo de péptidos no ribosomales, han sido particularmente estudiados (Hermosa *et al.*, 2012; Zeilinger *et al.*, 2016). Actualmente se tienen registradas aproximadamente 317 estructuras de peptaiboles, de las cuales aproximadamente el 80% provienen del género *Trichoderma*, particularmente de las especies *T. viride*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. brevicompactum* y *T. parceramosum*, *T. ghanense* (Hermosa *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016). En particular, peptaiboles



**Figura 1. Mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp.** Representación de los mecanismos de *Trichoderma* para antagonizar eficientemente a microorganismos fitopatógenos. La antibiosis, mediante la producción de sustancias con actividad biológica. 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 inducción de resistencia en plantas, mediante fitohormonas y el micoparasitismo, por la actividad de enzimas líticas de la pared celular. Tomado de Daguerre *et al*, 2014.

denominados tricoconias obtenidos de *T. koningii* tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro, inhibiendo el crecimiento *in vitro* de bacterias Gram positivas y hongos (Xiao-Yan *et al.*, 2006).

A las tricofuminas obtenidas de *Trichoderma* spp. se les ha encontrado actividad morfogénica en hongos fitopatógenos y propiedades neurolépticas en ratones de laboratorio (Berg *et al.*, 2003). Además, peptaiboles producidos por *T. harzianum* tienen actividad contra larvas de insectos (Shakeri y Foster, 2007). Un

grupo de peptaiboles se ha relacionado con funciones auto-regulatorias en *Trichoderma* spp., participando en la regulación de procesos como la germinación de conidias, el desarrollo del micelio y la reproducción sexual y asexual (Hermosa *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016). Otro tipo de metabolitos secundarios identificados en *Trichoderma* spp. incluyen a los epipolítidioxopiperazinas, los policétidos, sideróforos, terpenoides y la 6-pentil pirona (Hermosa *et al.*, 2014; Zeilinger *et al.*, 2016).

El proceso de antibiosis está relacionado con la capacidad de las especies de *Trichoderma* spp. para producir antibióticos, enzimas y metabolitos secundarios por parte de los hongos que resulta en un antagonismo eficiente hacia microorganismos fitopatógenos, particularmente hongos y oomicetes (Fig. 1) (Daguerre *et al.*, 2014). Se han descrito diversas moléculas producidas por especies del género que están involucradas en la supresión del crecimiento de varios patógenos de plantas causantes de enfermedades transmitidas por el suelo, incluyendo alcoholes, cetonas, alcanos, furanos, mono- y sesquiterpenos, peptaiboles (péptidos no ribosomales), 6-pentil- $\alpha$ -pirona, viridina, gliovirina, glisopreninas, gliotoxinas y otros (Daguerre *et al.*, 2014; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). La secreción de estas sustancias se ha visto claramente correlacionada con la capacidad de biocontrol, ya que la purificación y aplicación del antibiótico tiene los mismos efectos sobre el fitopatógeno que los observados en ensayos en los que se utiliza al hongo; sin embargo, la toxicidad depende del compuesto y del tipo de microorganismo objetivo a controlar. El modo de acción de la mayoría de los antibióticos identificados en *Trichoderma* spp. se desconoce.

### 2.3.3 Competencia por nutrientes y espacio

Este mecanismo es posible debido a que las distintas especies del género *Trichoderma* poseen una gran versatilidad fisiológica, en comparación con otros taxa fúngicos, lo que les permite ser un buen competidor por nutrientes y espacio en diferentes compartimentos de los ecosistemas, particularmente en el suelo. Tanto la gran variedad de enzimas extracelulares que producen, que les permiten degradar diferentes tipos de biopolímeros, como la capacidad para capturar

nutrientes en baja concentración en el entorno y transportarlos al interior celular, son cualidades de las especies del género que contribuyen a su éxito como colonizadores. Por ejemplo, el hierro en suelo se encuentra comúnmente en formas insolubles, poco biodisponibles, lo que lo hace escaso para los microorganismos. Algunas cepas de *Trichoderma* spp. sintetizan y secretan sideróforos y péptidos capaces de quelar dicho metal y transportarlo al interior de la célula (Fig. 1). Se ha propuesto que la competencia por hierro es un mecanismo por el cual *Trichoderma* spp. puede suprimir el crecimiento de *Fusarium* spp., aunque dicho mecanismo no parece ser igual de eficiente para suprimir otros fitopatógenos (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). En el caso de nutrientes orgánicos, se ha propuesto que *Trichoderma* spp., particularmente *T. harzianum*, puede competir en ambientes de baja concentración de glucosa por su capacidad para transportar al interior celular eficientemente dicho monosacárido. En esta especie se ha descrito un transportador con alta afinidad para la glucosa, denominado Gtt1, que se expresa solamente en ambientes donde la glucosa está presente en muy baja concentración (Benitez *et al.*, 2004).

#### 2.3.4 Micoparasitismo

Las relaciones antagónicas entre microorganismos se han clasificado en dos grupos principales, atendiendo al nivel de agresividad hacia el hospedero. En el primer grupo se encuentran las interacciones de tipo biotrófico, en las cuales el micoparásito se alimenta del hongo blanco sin matarlo. En el segundo grupo se encuentran las interacciones necrotóficas, en las cuales el hongo micoparasítico ataca a su presa, primero detectándola y después orientando el crecimiento en dicha dirección. Una vez producido el contacto, *Trichoderma* spp. se adhiere al huésped enrollándose alrededor del micelio formando apresorios; esta interacción culmina, con la lisis de la pared celular mediante la acción de enzimas hidrolíticas que digieren los contenidos celulares del hospedero, causando su muerte (Fig. 1) (Leeder *et al.*, 2011). La producción de enzimas líticas y la formación de los apresorios, son procesos activados químicamente por componentes estructurales o extracelulares del hongo huésped, que se clasifican como respuesta inducida.

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

#### **2.4 Enzimas extracelulares de *Trichoderma* spp. asociadas al micoparasitismo**

Como ya se mencionó anteriormente, varias especies del género secretan enzimas hidrolíticas extracelulares, las cuales además de participar de manera determinante en el estilo de vida de cada taxón, son de relevancia biotecnológica. Por ejemplo, las xilanasas que participan en la degradación controlada de la pared celular vegetal durante el establecimiento de relaciones endofíticas de raíz en *Trichoderma* spp., han sido asociadas a la inducción de la respuesta de defensa sistémica en plantas contra patógenos (Druzhinina et al., 2011). Las aplicaciones industriales de las xilanasas secretadas por especies del género *Trichoderma* abarcan la producción de sustancias químicas como el xilitol, el tratamiento de alimento para animales de granja, el bioblanqueo de pulpa para la elaboración de papel, como aditivos en la industria de los alimentos, o como componentes de fórmulas detergentes (Juturu y Wu, 2012). Las proteasas extracelulares también han sido estudiadas en *Trichoderma* spp., de tal forma que el análisis comparativo del secretoma predicho mediante herramientas bioinformáticas de *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei* indica la secreción de 81, 63 y 61 proteasas, respectivamente; principalmente de los grupos aspartil y serin proteasas, proteasas parecidas a subtilisina (*subtilisin-like*), así como dipeptidil y tripeptidil peptidasas (Druzhinina et al., 2012). Esta gran cantidad y variedad de proteasas extracelulares ha sido asociada al proceso de micoparasitismo y al ataque a nemátodos. Evidencia experimental muestra la activación de la transcripción de genes de proteasas

extracelulares de las tres especies antes mencionadas cuando se confrontan con *Rhizoctonia solani* (Seidl *et al.*, 2009). Las proteasas fúngicas tienen una gran variedad de aplicaciones en la industria de alimentos, como aditivos en detergentes y en la industria de la curtiduría, entre otras (Souza *et al.*, 2015).

Un grupo de enzimas hidrolíticas extracelulares producidas por *Trichoderma* spp. de relevancia para el presente trabajo son las quitinasas, las cuales degradan a la quitina, polímero estructural de la pared celular de hongos y del exoesqueleto de insectos. Las quitinasas son un grupo de enzimas que presentan variación en su estructura molecular, especificidad hacia el sustrato y en el mecanismo catalítico (Hamid *et al.*, 2013; Daguerre *et al.*, 2014). Estas enzimas pertenecientes a la familia glicosil-hidrolasas (GH), se clasifican en tres familias de acuerdo a su secuencia de aminoácidos: GH 18, GH 19, GH 20. Las quitinasas de la familia GH18 tienen una estructura que incluye cinco dominios, el primero de los cuales es el dominio catalítico, el segundo es un péptido señal N-terminal, el tercero es el de unión a quitina, el cuarto consiste en una región rica en serina-treonina, y el quinto es una región de extensión C-terminal. Sin embargo, las quitinasas fúngicas pueden no presentar las regiones ricas en serina-treonina, los dominios de unión a quitina y la región de extensión C-terminal, sin afectar la actividad enzimática (Hamid *et al.*, 2013).

Las quitinasas GH18 se subclasifican en los subgrupos A, B y C, en las que se incluyen a las endo y exoquitinasas. Las endoquitinasas escinden la quitina en los sitios internos en forma de quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa. Las exoquitinasas se subdividen en quitobiosidasas y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasas, mientras que las primeras catalizan la liberación progresiva y de forma gradual de diacetilquitobiosa, las segundas dividen la diacetilquitobiosa en monómeros de N-acetil-glucosamina (Daguerre *et al.*, 2014).

Las especies mayormente estudiadas con actividad quitinolítica son *T. harzianum* y *T. atroviride*, cuyos genomas presentan genes codificantes para más de seis enzimas quitinolíticas, que incluyen dos N-acetilhexosaminidasas y diversas endoquitinasas. Se sabe que la expresión de dos quitinasas (*ech42* y *chit33*) es importante durante la interacción antagónica de *Trichoderma* spp.

Además, se ha reportado que la expresión de *ech42* no requiere que *Trichoderma* haga contacto con el hongo blanco, en este caso *Rhizoctonia solani*, para la secreción de quitinasas (Kullnig *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha reportado que los genes codificantes de quitinasas *ech42* (*chi18-5*), *chi33* (*chi18-12*), *nag1* y *chi18-13*, tienen una participación importante en el proceso de micoparasitismo (Hamid *et al.*, 2013). Se sabe que los productos generados por la actividad de Nag1 actúan como inductores para la expresión de *ech42* (Brunner *et al.*, 2003). Además el papel de Ech42 aún no se encuentra bien definido, sin embargo se ha reportado que la expresión de *ech42*,a se ve regulada por la presencia de quitina así como por la inanición de carbono (Carsolio *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2003) . Mientras que las quitinasas *chi33* y *chi18-13*, se inducen durante diferentes etapas del micoparasitismo, además que una sobre expresión de estas, mejora la capacidad micoparasitaria de *Trichoderma* (de las Mercedes *et al.*, 2001; Viterbo *et al.*, 2001).

Además de su participación en el micoparsitismo las quitinasas, están involucradas en la división y diferenciación celular de hongos, así como en los hábitos nutricionales, ya que ayudan en la degradación de sustratos complejos para que *Trichoderma* los asimile como nutrientes (El-Katatny *et al.*, 2001).

Las glucanasas son las enzimas que se encargan de la lisis de glucanos, los cuales son polisacáridos de glucosa que entrecruzan los polímeros de quitina o quitosano en la pared fúngica. Existen dos tipos de glucanos según el tipo de enlace entre las subunidades de glucosa; los  $\beta$ -glucanos, que presentan enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,6 y proporcionan rigidez a la pared celular, y los  $\alpha$ -glucanos, que se caracterizan por los enlaces  $\alpha$ -1,3 y/o  $\alpha$ -1,4 y funcionan como parte de la matriz celular. Las glucanasas hidrolizan particularmente a los  $\beta$ -glucanos. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas pertenecen a las familias GH 16, 55, 64 y 81; mientras que las  $\beta$ -1,6-glucanasas se encuentran agrupadas en las familias GH 5 y 30. En general, las glucanasas se dividen en dos grandes grupos, exo- $\beta$ -glucanasas y endo- $\beta$ -glucanasas (Mouyna *et al.*, 2013), cuya acción sinérgica está implicada en la degradación de los  $\beta$ -glucanos. Se han caracterizado diferentes glucanasas con actividad micoparasítica, siendo principalmente  $\beta$ -1,3 glucanasas. Tal es el caso

de Gluc78, una glucanasa de *T. atroviride*, la cual presenta actividad contra diversos hongos y oomicetes, que actúa sinérgicamente con otras enzimas que degradan la pared celular (Daguerre *et al.*, 2014). Las glucanasas y las quitosanas colaboran con las quitinasas en el proceso de degradación de la pared celular fúngica, ya que además de las glucanas, la quitosana constituye otro de los polímeros importantes en la estructura de la pared celular fúngica (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012).

## **2.5 Inducción de enzimas líticas en *Trichoderma* spp.**

Entre las enzimas que *Trichoderma* spp. secreta para degradar la pared celular de un hongo fitopatógeno, las quitinasas y glucanasas son de particular relevancia. Algunas cepas de *Trichoderma* spp. secretan dichas enzimas de forma constitutiva, lo que le permite la liberación de moléculas para sensor la presencia del hongo que va a atacar (Vinale *et al.*, 2008; Sarma *et al.*, 2014). No obstante, el reconocimiento y las rutas de señalización que conducen a un antagonismo eficiente, son poco conocidas (Daguerre *et al.*, 2014; Sarma *et al.*, 2014).

Se han analizado regiones no traducidas 5' (UTR) de genes de quitinasa de *Hypocrea atroviridis*, encontrándose sitios consenso para la unión de factores de transcripción que están asociados a la regulación tanto de quitinasa, como de otras enzimas degradadoras de polisacáridos. Los sitios consenso son cajas TATA, cajas CAAT y otros que incluyen a AbaA, BrIA, Acel, AreA, Cre1, PacCy elementos STRE. Además, se sabe de la presencia de MYC1-4, sitios putativos relacionados al estilo de vida micoparásito de *Trichoderma* spp. (Seidl *et al.*, 2005), que son necesarios para la expresión de del gen de *ech42* (Cortés *et al.*, 1998) . En el caso de genes codificantes de glucanasas, se caracterizó en *Trichoderma virens* al gen *Tvbgn3* codificante de una  $\beta$ -1,6-glucanasa extracelular, el cual presenta una gran similitud con las mismas enzimas de otros hongos filamentosos. Este gen contiene una secuencia de un péptido señal, el marco de lectura (ORF) codifica para un polipéptido de 429 aminoácidos, y posee un único intrón en las posiciones -176 a -236. El análisis de la región de 740 pb “río arriba” de *Tvbgn3* muestra presuntas cajas TATA en las posiciones -16, -91 y -540 y las

cajas putativas de CAAT en -23, -104, -114, -445, y - 478 del codón ATG. Además, se identificaron dos sitios STRE (CCCCT) de respuesta a estrés, en posiciones -461 y -667. Dentro del ORF también se localizan elementos de respuesta al micoparasitismo, MYRE1 a MYRE4 que se han descrito en los genes *ech42* y *prb1* de *Trichoderma atroviride* (Djonović *et al.*, 2006).

Durante el reconocimiento del huésped, la liberación de moléculas por parte de este mediante la acción de enzimas secretadas por *Trichoderma spp.*, es el primer paso en el proceso micoparasitario. La percepción de estas moléculas mediante vías de transducción de señales, modula la producción de enzimas líticas (Sarma *et al.*, 2014). Las proteínas G heterotriméricas (compuestas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) participan en la transducción de señales de los receptores acoplados a la proteína G transmembranal. Según el entorno,  $G\alpha$  o  $G\beta\gamma$  transducen la señal mediante la estimulación de efectores como la adenilato-ciclase o la cascada de señalización por parte de la proteín-cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Daguerre *et al.*, 2014). Además, se han reportado diferencias significativas entre la señalización de la proteína G de *T. atroviride* y *T. virens*, lo cual es interesante tomando en consideración que ambas especies se encuentran relacionadas debido a su capacidad como agentes de control biológico (Sarma *et al.*, 2014).

La producción de enzimas líticas requiere de la expresión de distintos genes, habiendo o no contacto entre el hongo micoparásito y el hospedero. Algunas proteínas G, los receptores acoplados a proteínas G y la adenilato ciclase, son esenciales para la producción de enzimas extracelulares líticas de la pared celular, la secreción de metabolitos antifúngicos y la formación de estructuras de infección (Daguerre *et al.*, 2014). Por ejemplo, el gen *Gpr1*, codificante de un receptor acoplado a proteína G, regula positivamente dos genes de quitinasas (*nag1* y *ech42*) y uno de proteasa (*prb1*). El silenciamiento de *Gpr1*, evita la adhesión de la hifa de *T. atroviride* a *Rhizoctonia solani*, además de reducir la actividad de quitinasa (Omann *et al.*, 2012; Daguerre *et al.*, 2014; Sarma *et al.*, 2014).

Se han realizado estudios *in vitro* para analizar la secreción de las enzimas líticas asociadas al micoparasitismo. La inducción de dichas actividades se realiza empleando diferentes fuentes de carbono, desde fuentes relativamente simples como monosacáridos, algunos polisacáridos como la quitina, así como estructuras celulares de los hongos fitopatógenos que se desean combatir, incluyendo tejidos, paredes celulares y esclerocios (Kaur *et al.*, 2005; Gruber *et al.*, 2011; Guigón-López *et al.*, 2014). En el caso de enzimas hidrolíticas que atacan polímeros de pared celular de plantas, se han utilizado distintos tipos de biomasa vegetal para su inducción (Grigorevski-Lima *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017; Vinale *et al.*, 2008).

## **2.6 Estructuras degradadas por glucanasas y quitinasas**

La pared celular es una estructura dinámica, que experimenta diversos cambios asociados al desarrollo, la diferenciación y el entorno; por ejemplo, durante la expansión celular y la fisión en levaduras, durante la germinación de esporas, la ramificación de hifas y la formación de septos en hongos filamentosos. La pared celular está compuesta principalmente por quitina,  $\beta$ - 1, 3 y  $\beta$ - 1, 6 glucanos, mananos y proteínas. Sin embargo, dicha composición varía cualitativa y cuantitativamente entre las diferentes especies de hongos (Adams, 2004). No obstante, en términos generales, la composición de la pared celular en hongos filamentosos consiste en un 30 a 50 % de glicoproteínas, un 1 a 2% de quitina y en un 50 a 60% de glucanos, de los cuales los  $\beta$ -1,3-D- glucanos se encuentran en 65 a 90%. En el caso de las levaduras, las glicoproteínas se encuentran en 20 a 30% y la quitina en 10 a 20% (Latgé, 2007; Pontón, 2008).

Las enzimas encargadas de la biosíntesis de quitina y glucano fabrican largas cadenas lineales de N-acetilglucosamina ligada por enlaces  $\beta$ -1,4 y glucosa ligada por enlaces  $\beta$  -1,3, respectivamente. La pared celular fúngica contiene ramificaciones de glucano  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 , además de existir una ramificación y reticulación extensa entre quitina, glucano y otros componentes de la pared. Esta ramificación y reticulación de sus componentes, permiten el mantenimiento de la plasticidad de la pared durante la morfogénesis, la cual depende de las actividades de distintas enzimas hidrolíticas como las quitinasas, glucanasas y

algunas enzimas con actividad transglicosilasa, que rompen los enlaces entre los polímeros, permitiendo la formación de nuevas uniones; esto lleva en consecuencia a una remodelación de la pared celular en el crecimiento y morfogénesis del hongo (Adams, 2004).

Las quitinasas también hidrolizan la quitina presente en el exoesqueleto de los insectos y algunos artrópodos. Además, pueden atacar la matriz peritrófica de insectos, que es una delgada vaina acelular compuesta por fibrillas de quitina asociadas con glicoproteínas y proteoglicanos, las cuales recubren el epitelio del intestino medio. Los huevecillos de nematodos pueden ser hidrolizados por quitinasas, ya que en la estructura de la cáscara se encuentra una fracción de quitina (Berini *et al.*, 2018).

## **2.7 Aplicaciones industriales de glucanasas y quitinasas**

Como se ejemplificó anteriormente, además de su participación en el proceso micoparasítico y de defensa de plantas, las quitinasas y glucanasas extracelulares de *Trichoderma* spp. tienen una gran variedad de aplicaciones industriales. Por lo que el estudio de dichas enzimas hidrolíticas, además de revelar aspectos de biología básica sobre el estilo de vida de cepas silvestres, es de relevancia biotecnológica.

### **2.7.1 Glucanasas**

Las glucanasas se emplean en la industria vitivinícola, auxiliando en la clarificación de procesos, así como en la calidad y rendimiento de los productos fermentados (Giorno y Diorli, 2000; Kuhad *et al.*, 2011). Mientras que en la industria cervecera las glucanasas participan en la producción de la malta, mediante la hidrólisis parcial de los  $\beta$ -glucanos de la cebada, la cual comienza con la germinación de las semillas (Celestino *et al.*, 2006). Otro sector en el que las glucanasas tienen una participación importante es en el sector agrícola, en donde las  $\beta$ -glucanasas se han aplicado en alimentos a base de cereales para animales monogástricos. Además, estas enzimas pueden eliminar factores antinutricionales en los granos de alimentación, permitiendo que los nutrientes se absorban de mejor manera y

mejorando la digestión de pollos y lechones; resultando en un aumento de peso de estos animales (Kirk *et al.*, 2002; Kuhad *et al.*, 2011).

### 2.7.2 Quitinasas

Estas enzimas pueden emplearse en el manejo de residuos de la industria marítima, como residuos de pesca, al degradar compuestos quitinosos en componentes más simples, que incluso puedan llegar a utilizarse como biofertilizantes. También tienen aplicaciones médicas, al combinarse con antifúngicos para tratar y diagnosticar infecciones fúngicas en humanos. Algunos quitooligosacáridos presentan un elevado potencial para ser usados en la formulación de fármacos con actividad antitumoral, sanación de heridas y actividad hipertensivas; mientras que el monómero N-acetilglucosamina (GlcNAc) tiene propiedades antiinflamatorias. Se ha reportado que la GlcNAc, al ser administrada por vía oral, intravenosa (IV) e intramuscular (IM), tiene un efecto antiinflamatorio y llega a ser útil en el tratamiento de la colitis ulcerosa y otros trastornos de la inflamación gastrointestinal (Hamid *et al.*, 2013; Rathore y Gupta, 2015).

## 2.8 Antecedentes de Laboratorio

En el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UMSNH, se ha establecido un cepario de especies silvestres del estado Michoacán que incluye 23 cepas de las especies *T. harzianum*, *T. olivascens*, *T. trixiae*, *T. viridialbum*, *T. tomentosum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. viride* y *T. gamsii* (Cázares-García *et al.*, 2016). La caracterización de dichas cepas mostró que la cepa CMU-08 de *T. atroviride* es un buen candidato para la generación de un producto para su uso agrícola como herramienta de biocontrol, debido a su capacidad antagonica *in vitro* y de inhibición de distintos microorganismos fitopatógenos, así como a la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, evaluadas de manera cualitativa (datos no publicados). En relación a la capacidad antagonica, los ensayos de confrontación por cultivos duales y ensayos de inhibición en Medio Mínimo Vogel, contra *Fusarium pseudocircinatum*,

*Fusarium mexicanum*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora capsici*, mostraron el nivel más alto de antagonismo (clase 1) contra los cuatro fitopatógenos, en comparación con el resto de cepas de *Trichoderma* spp., que mostraron variaciones en el tipo de antagonismo hacia cada fitopatógeno. En los ensayos de inhibición, CMU-08 inhibió en un 100% el crecimiento de *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *P. cinnamomi* y *P. capsici*, en un 80.8% a *F. pseudocircinatum*, y con menos eficiencia a *F. mexicanum*, y pudo inhibir un 25% su crecimiento.

También evaluó de manera semicuantitativa la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares de las 23 cepas silvestres de *Trichoderma* spp. Los resultados obtenidos mostraron una correlación parcial con los ensayos de antagonismo, ya que la cepa CMU-08 de *T. atroviride*, no presentó actividad de proteasa, sin embargo, mostró niveles intermedios en la actividad de celulasa y quitinasa, y solo presentó el valor máximo de actividad de xilanasas. Estos resultados sugieren que la cepa CMU-08 utiliza como mecanismo de antagonismo principalmente la antibiosis y el micoparasitismo, esto último debido al presentar los altos niveles de antagonismo. Adicionalmente, la cepa CMU-08 puede crecer y conidiar óptimamente en los medios papa dextosa agar (PDA) y agar extracto de malta (AEM) a 16, 20 y 32 °C, mostrando un patrón de conidiación en forma de anillos, aunque desarrolla crecimiento micelial a 36 °C. Finalmente, al analizar la capacidad de CMU-08 para crecer en medio PDA a condiciones de pH de 4, 7 y 9, la cepa creció en las cuatro condiciones, inclusive en pH 9, que es una condición poco probada.

Desde que se le atribuyó a *Trichoderma* spp. su capacidad como un agente biocontrolador en 1930, hasta ahora es utilizado para antagonizar enfermedades ocasionadas por diversos patógenos en la agricultura (Schubert *et al.*, 2008a). Actualmente las distintas especies de *Trichoderma* representan una gran alternativa en diversos procesos biotecnológicos, por ejemplo, en la biotecnología verde y blanca, en donde es de importancia la producción de manera sustentable de enzimas y antibióticos que puedan ser aplicados en el sector agrícola o en el sector salud (Schuster y Schmoll, 2010).

Por otra parte, con el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva en paralelo, en la actualidad se cuenta con la secuencia genómica de distintas cepas de *T. atroviride*. Esto es útil ya que se han documentado variaciones entre aislados geográficos de *T. atroviride* en características como el antagonismo *in vitro* contra hongos fitopatógenos y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares (Kaur *et al.*, 2005; Anita *et al.*, 2012). Aún más, cepas de *T. atroviride* genómicamente idénticas presentan variaciones fenotípicas significativas, como el patrón de esporulación y la capacidad de crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Lange *et al.*, 2016). Esto sugiere que es difícil predecir con base en estudios previos de otras cepas las características bioquímicas y genéticas de un nuevo aislado geográfico de *T. atroviride*. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se plantea evaluar el proceso de antagonismo de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* contra microorganismos fitopatógenos de cultivos de relevancia para el estado de Michoacán. En particular, se analizará la actividad y regulación transcripcional de enzimas quitinasas y glucanasas extracelulares asociadas a micoparasitismo.

### 3. HIPÓTESIS

La cepa CMU-08 de *T. atroviride* es un antagonista Nivel 1 de microorganismos fitopatógenos del estado de Michoacán, que durante el micoparasitismo induce significativamente la actividad extracelular de quitinasa y glucanasa, con patrones de transcripción distintos a los actualmente reportados.

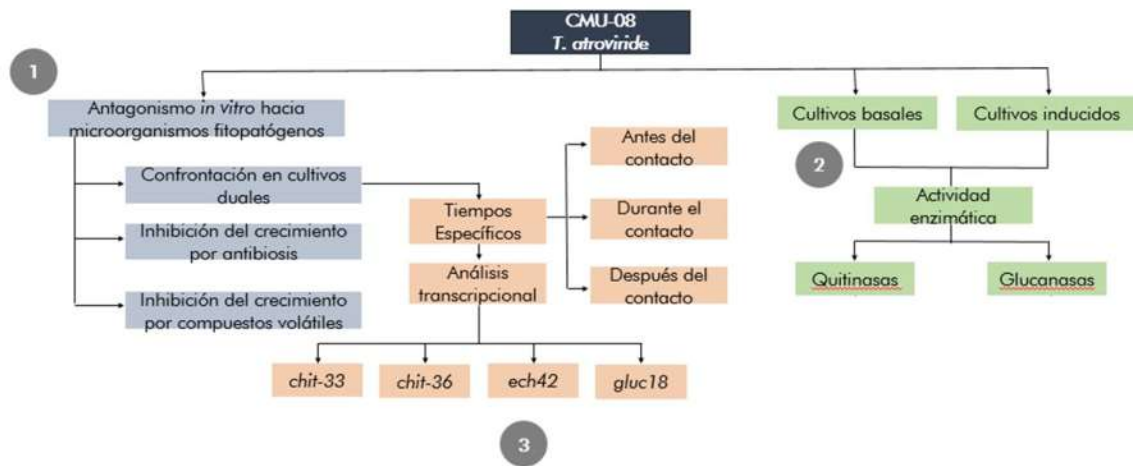
### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antagónica de la cepa silvestre CMU-08 de *Trichoderma atroviride* hacia microorganismos fitopatógenos y la participación de enzimas hidrolíticas en dicho proceso.

#### 4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el nivel de antagonismo *in vitro* de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* contra hongos y oomicetes fitopatógenos.
2. Generar la cinética de actividad extracelular de quitinasa y glucanasa de la cepa CMU-08 en condiciones basales y en presencia de pared celular de microorganismos fitopatógenos.
3. Analizar el perfil transcripcional de genes de isoenzimas seleccionadas de las actividades hidrolíticas extracelulares de interés en diferentes condiciones de cultivo.



**Figura 2.** Estrategia experimental diseñada para el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas de estudio

Se analizó 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). Esta cepa forma parte del Cepario Michoacano Universitario (CMU), perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Michoacán, México).

Las cepas de los microorganismos fitopatógenos fueron proporcionadas por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Tabla 1). Se incluyen tres especies de hongos y una especie de oomicete del género *Phytophthora*.

**Tabla 1.** Microorganismos fitopatógenos de prueba.

| Especie                               | Cultivo/planta de aislamiento            | Organo de aislamiento | Localidad de procedencia |
|---------------------------------------|--|-----------------------|--------------------------|
| <i>Botrytis cinerea</i>               | Fresa<br>( <i>Fragaria x ananassa</i> )  | Fruto                 | Uruapan, Michoacán       |
| <i>Fusarium</i> sp.                   | Zarzamora<br>( <i>Rubus ulmifolius</i> ) | Raíz                  | Los Reyes, Michoacán     |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Aguacate<br>( <i>Persea americana</i> )  | Fruto                 | Uruapan, Michoacán       |
| <i>Phytophthora cinnamomi</i>         | Aguacate<br>( <i>Persea americana</i> )  | Raíz                  | Uruapan, Michoacán       |

### 5.2 Medios de cultivo

#### 5.2.1 Agar papa y dextrosa (PDA)

Este medio se utilizó para mantener en crecimiento activo el micelio de las cepas utilizadas, así como para realizar ensayos de confrontación e inhibición por compuestos volátiles y no volátiles. Se empleó el medio comercial BD Difco (USA),

disolviéndose 39 g en 1 L de agua destilada y esterilizando en autoclave durante 15 min a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión.

#### 5.2.2 Medio agar extracto de malta (AEM)

Este medio se empleó para realizar ensayos de confrontación e inhibición por compuestos volátiles y no volátiles. Se usó el medio comercial BD Difco (USA), se preparó conforme a las especificaciones del proveedor disolviéndose 33.6 g en 1 L de agua destilada y esterilizando en autoclave 15 min a 15 lb/in<sup>2</sup> de presión.

#### 5.2.3 Medio mínimo Vogel (MMV)

Se empleó el medio mínimo Vogel (MMV) sólido para la realización de los ensayos de confrontación e inhibición por compuestos volátiles y no volátiles. Para la siembra de la cepa, la solución concentrada de micronutrientes se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final 1X y se adicionó 1.5% (p/v) de glucosa y agar bacteriológico (15 g/L). Para las cinéticas de crecimiento se empleó este medio, omitiendo el agar en su preparación. El medio se esterilizó de la manera previamente descrita. La solución concentrada de micronutrientes (50X) del MMV está compuesta por (g/L): Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O, 150; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5; biotina (5 mg/100 mL etanol al 50%), 5 mL; solución de oligoelementos, 5 mL. La solución de oligoelementos contiene (g/L): ácido cítrico·2H<sub>2</sub>O, 5; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 5; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.072; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.05.

#### 5.2.4 Medio caldo de papa y dextrosa (PDB)

Este medio se empleó para realizar cinéticas de crecimiento. Se utilizó el medio comercial BD Difco (USA), disolviéndose 0.6 g en 25 mL de agua destilada y esterilizando en autoclave como se describió anteriormente.

### 5.3 Viabilidad celular y obtención de inóculos

Debido a que la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* se encontraba conservada en el Cepario CMU, fue necesario confirmar su viabilidad. Para lo cual

se recuperó un bloque de agar de los tubos de conservación en agua del cepario y se inocularon en Medio PDA (BD Difco, USA), incubando a 28 °C y evaluando el desarrollo del micelio. A partir de estos cultivos se realizó nuevamente una resiembra y se incubó a 28°C, hasta la fase logarítmica de crecimiento. Se tomaron inóculos con un sacabocados de 6 mm de diámetro del borde del micelio vegetativo de la colonia en crecimiento activo de cada cepa y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL que contenían agua destilada estéril, almacenándose a temperatura ambiente.

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

#### **5.4 Cinéticas de crecimiento en medio líquido**

Para estos ensayos se emplearon los medios PDB y MMV. El stock para este último se diluyó en agua destilada hasta obtener una concentración final 1X y se adicionó glucosa al 1.5% (p/v). La cepa CMU-08 de *T. atroviride* se inoculó añadiendo 3 cilindros de 6 mm de diámetro de agar con micelio a matraces de 125 mL que contenían 25 mL de medio. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación. La biomasa (micelio) se recuperó mediante filtración y se determinó el peso seco a las 12, 24, 36, 48 horas, así como de ocho días posteriores. Todas las cinéticas se realizaron por triplicado.

#### **5.5 Ensayos de antagonismo**

Se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990) para evaluar la actividad antagónica de la cepa CMU-08. Para cada experimento se inoculó en un extremo de cajas Petri de 10.0 cm de diámetro con los tres medios descritos, en

experimentos independientes, un disco de 6 mm de diámetro con micelio en crecimiento activo de las distintas especies de hongos fitopatógenos, permitiendo el desarrollo de la colonia a 28 °C durante 3 a 5 días. Esto se realizó con la finalidad que la colonia del fitopatógeno alcanzara un tamaño adecuado debido al lento crecimiento de las cepas empleadas para el ensayo. Posteriormente, en el otro extremo de la caja se inoculó un disco de 6 mm de diámetro tomado del borde de colonias en crecimiento activo de la cepa de *T. atroviride* CMU-08. Las cepas se inocularon a una distancia de 6 cm y se incubaron a 28 °C, en obscuridad. Cuando el control del fitopatógeno cubrió completamente el medio de cultivo se analizaron los ensayos de confrontación, clasificándose el tipo de antagonismo según Bell *et al.* (1982), mediante la escala: 1 = *T. atroviride* sobrecrece completamente al fitopatógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2 = *T. atroviride* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, 3 = *T. atroviride* y el fitopatógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 5.6 Ensayos de inhibición

### 5.6.1 Inhibición por metabolitos no volátiles

Se utilizó el método del papel celofán descrito por Dennis y Webster (1971). Círculos de papel celofán de 9.0 cm de diámetro esterilizados a 121 °C (15 lbs/in<sup>2</sup>) por 15 min se colocaron en condiciones asépticas en campana de flujo laminar sobre cajas de Petri con cada uno de los tres medios de cultivo. En el centro de la placa de Petri, sobre el papel celofán depositado en el medio, se colocaron inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro tomados del borde de la colonia en crecimiento activo de la colonia CMU-08, incubándose a 28 °C. Cuando el micelio cubrió  $\frac{3}{4}$  partes de la superficie del medio de cultivo, se retiró el papel celofán con el micelio de la colonia fúngica adherido. En la misma caja de Petri con el medio en el que había crecido *T. atroviride*, en experimentos independientes, se inoculó a cada una las especies de microorganismos fitopatógenos, incubándose a 28 °C y midiendo cada 24 h el diámetro del crecimiento radial. De la misma manera, en

el mismo medio de cultivo se inoculó e incubó una caja control, en la que no había crecido previamente la cepa CMU-08 de *T. atroviride*. El experimento finalizó cuando el micelio del microorganismo fitopatógeno del cultivo control llenó la caja de Petri. Los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos, se utilizó la siguiente fórmula: % de inhibición =  $[(D1-D2)/D1 \times 100]$  (Worasatit *et al.*, 1994); donde: D1 = diámetro de la colonia del microorganismo fitopatógeno creciendo en medio libre de inhibidores y D2 = diámetro de la colonia del mismo microorganismo creciendo en cajas con medio en el cual previamente creció *Trichoderma* spp. sobre el papel celofán. Se clasificó el tipo de inhibición según su nivel de actividad, donde: clase 1 = *Trichoderma* spp. inhibe del 67 al 100% del crecimiento del fitopatógeno, clase 2 = *Trichoderma* spp. inhibe del 34 al 66% del crecimiento del fitopatógeno, clase 3 = *Trichoderma* spp. inhibe del 1 al 33% del crecimiento del fitopatógeno.

#### 5.6.2 Inhibición por metabolitos volátiles

Este ensayo se realizó de acuerdo con Qualhato *et al.* (2013). Se inocularon independientemente placas Petri con los tres medio de cultivo empleados, colocando en el centro cilindros de 6 mm de diámetro con micelio de cada una de las especies de fitopatógenos y la cepa CMU-08. La tapa de la placa de Petri en la cual estaba creciendo la cepa de *T. atroviride* se sustituyó con las bases de las placas de Petri en las que se encontraban creciendo los fitopatógenos, fungiendo ahora como la tapa de la placa en la cual creció *T. atroviride*. Las placas se sellaron con paraflim y se incubaron a 28 °C, realizándose mediciones del diámetro colonial del fitopatógeno cada 24 h. El ensayo terminó cuando el patógeno cubrió completamente la placa de control sin *T. atroviride* en la base. Los ensayos se realizaron por triplicado. Para obtener los porcentajes de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos se utilizó la siguiente fórmula: % de inhibición =  $[(D1-D2)/D1 \times 100]$  (Worasatit *et al.*, 1994), anteriormente descrita.

### **5.7 Microscopía electrónica de barrido de los ensayos de confrontación**

Se montaron ensayos de confrontación de la cepa CMU-08 hacia los cuatro fitopatógenos empleados, como se describió anteriormente. Se tomó un disco de agar de 6 mm en la zona de contacto entre las dos cepas y se secó a 60 °C durante 48 h. Para observar las estructuras de la interacción se empleó un microscopio modelo JEOL JSPM-5200.

### **5.8 Obtención de micelio y pared celular de fitopatógenos**

Se inocularon matraces de 1 L que contenían 500 mL de medio PDB con 12 cilindros de 6 mm de diámetro de agar con micelio del borde de colonias en crecimiento activo en medio PDA de las cepas de *Fusarium* sp. o *Botrytis 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 finalmente se liofilizó.

La obtención de las paredes celulares de *Fusarium* sp. y *B. cinerea* se realizó de acuerdo al protocolo de Ruíz-Herrera *et al.* (1996). El micelio de los fitopatógenos se lavó con Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y se adicionaron tres volúmenes de la suspensión de perlas de vidrio. La lisis celular se realizó en un equipo FastPrep-24 homogenizer (MP Biomedicals, USA) a una velocidad de 4 m/s. Las perlas de vidrio se recuperaron por decantación y las paredes se obtuvieron centrifugando el homogenado a 1000xg por 15 min. Se realizaron tres lavados con NaCl 1M y con agua destilada estéril y fría otras tres veces. Finalmente, las paredes se liofilizaron.

### **5.9 Generación de las cinéticas de actividad enzimática extracelular**

Para estos ensayos se empleó el medio MMV para la condición basal y para los ensayos de inducción se empleó medio MMV con glucosa al 0.05% (p/v). adicionado con paredes celulares de *B. cinerea* y *Fusarium* sp. al 0.5% (p/v).

La metodología para construir las cinéticas de actividad enzimática fue de acuerdo con Qualhato *et al.* (2013). La cepa CMU-08 de *T. atroviride* se inoculó añadiendo 6 cilindros de 6 mm de diámetro de agar con micelio obtenidos de la

manera previamente descrita a matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación. Se tomó una alícuota de 1 mL en condiciones de esterilidad cada seis horas, durante 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## **5.10 Ensayos de actividad enzimática**

### *5.10.1 Actividad de $\beta$ -1,3 glucanasa*

La actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa se determinó utilizando laminarina (Sigma, USA) al 0.75% (p/v) en buffer de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0. La mezcla de reacción contenía 10  $\mu$ L de solución enzimática y 20  $\mu$ L de laminarina, la cual se incubó a 50 °C durante 10 min. Para detener la reacción, al término de la incubación se añadieron 100  $\mu$ L de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) y la reacción se mantuvo a 95 °C durante 5 min. La conversión del DNS a 3-amino-5-ácido nitrosalicílico mediante un aumento en la concentración de azúcares reductores se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 540 nm ( $\epsilon_{540} = 0.121123 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Las actividades enzimáticas se expresan en unidades (U). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de azúcares reductores por minuto.

### *5.10.2 Actividad de quitinasa*

La actividad de quitinasa se determinó empleando como sustrato quitina coloidal (Sigma, USA) al 0.5% (p/v) en buffer de acetato 50 mM, pH 5,5. La mezcla de reacción contenía 50  $\mu$ L de solución enzimática y 150  $\mu$ L de quitina coloidal. La cual se incubó a 35 °C durante 120 min. La reacción se detuvo añadiendo 1 mL de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) e incubando a 100°C. La conversión del DNS a 3-amino-5-ácido nitrosalicílico mediante un aumento en la concentración de azúcares reductores se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 540 nm ( $\epsilon_{540} = 0.121123 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Las actividades enzimáticas se expresan en unidades (U). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de azucares reductores por minuto.

## 5.11 Ensayos de qRT-PCR

### 5.11.1 Extracción de ARN total

El ARN total se extrajo de ensayos de confrontación que se realizaron como se mencionó anteriormente de la cepa CMU-08 contra *Fusarium* sp. y *B. cinerea*. Se tomaron muestras del micelio en tres tiempos específicos, antes del contacto (AC), durante el contacto (DC) y después del contacto (DC) con los fitopatógenos. El micelio tomado se congeló con N<sub>2</sub> líquido, se maceró hasta obtener un polvo fino y se transfirió a un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente se adicionó un volumen de Trizol (Invitrogen, USA), se agitó en vortex durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 1500xg a 4 °C durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 0.2 volúmenes de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex por 2 min y se centrifugó a 1500xg a 4 °C durante 15 min. A la fase acuosa recuperada, se añadieron 0.2 volúmenes de cloroformo, se agitó en vortex de 2 a 3 min para después centrifugar a 1500xg a 4 °C durante 15 min. Posteriormente se rescató la fase acuosa y se añadieron 0.25 volúmenes de isopropanol, centrifugando a 1500xg por 10 min. Se decantó y la pastilla se lavó con un volumen de etanol al 70% en DEPC, se agitó en vortex 30 s y se centrifugó a 600xg por 15 min. Se realizó un lavado final con un volumen de etanol 75% (v/v) en DEPC como se mencionó anteriormente. Se decantó y la pastilla se secó a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla se resuspendió en H<sub>2</sub>O DEPC.

### 5.11.2 Síntesis de ADNc

A 1 µg del ARN total obtenido se le dió tratamiento con DNase I Amplification Grade (Invitrogen, CA, USA) para eliminar restos de ADN. Posteriormente se añadió 1 µL de oligo (dT)<sub>12-18</sub> a 500 µg/mL y se calentó a 70 °C durante 10 minutos. Después se realizó la síntesis de ADNc empleando el kit *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific™; EUA), añadieron 4 µL de buffer 5x (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3 a 25 °C; 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 10 mM de cada dNTP, y se incubó a 42 °C por dos min. Posteriormente se añadieron 200 U de la enzima *RevertAid Reverse Transcriptase*, se incubó la reacción durante 50 min a 42 °C. Finalmente la reacción se inactivó calentando a 70 °C durante 15 min.

### 5.11.3 Ensayos de RT-PCR

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) para evaluar el ADNc sintetizado, así como la eficiencia de los oligonucleótidos (Tabla 2). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ L. Para todas las muestras la concentración de la mezcla de reacción fue la misma: 10 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 mM de oligonucleótido, 1 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, USA), 500 ng/ $\mu$ L de templado, ajustando el volumen final a 25  $\mu$ L con  $H_2O$  destilada desionizada estéril. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA) mediante el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 3 s, alineamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1% (p/v), desarrollados a 85 V y teñidos con SYBER Green (Invitrogen, USA). Además se realizó un análisis densitométrico, utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

### 5.11.4 Ensayos de qPCR

Los ensayos de qPCR en tiempo real contenían la siguiente mezcla por reacción: 5  $\mu$ L iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad; CA, USA), 30 ng de templado de cDNA, 1  $\mu$ L de cada uno de los oligos (1.5  $\mu$ M), en un volumen total de 10  $\mu$ L. El protocolo de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo a 95 °C por 5 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 minuto y 72 °C por 20 s. Las curvas de fusión para cada producto fueron generadas comenzando en 60 °C con incrementos de 0.5°C/s hasta llegar a 95 °C y se corroboró que las reacciones amplificaran un solo producto específico. El equipo utilizado fue CFX96 Real Time PCR detection system (Bio-Rad; CA, USA). Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Para determinar la expresión relativa, el promedio del ciclo umbral (CT) de los genes problema fue normalizado al CT del gen gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa (*gpd*) y calculada según el método  $2(-\Delta\Delta CT)$  (Livak & Schmittgen, 2001).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de quitinasas y glucanasa.

| Oligonucleótido      | Secuencia              | Referencia                     |
|----------------------|------------------------|--------------------------------|
| <b><i>chit33</i></b> |                        |                                |
| 49766RT-Fwd          | GCTTCGCCATCGCAGCTGGC   |                                |
| 49766RT-Rev          | CAGGCCCGACGGGAAGCG     |                                |
| <b><i>chit36</i></b> |                        |                                |
| 83999RT-Fwd          | CCAAAACGGCCGACTGTGGTGG |                                |
| 83999RT-Rev          | GCCCCGCCAGCTCCATTTTG   | Rico-Ruiz <i>et al</i> , 2019* |
| <b><i>ech42</i></b>  |                        |                                |
| 131598RT-Fwd         | CCATTGCTGCCCCGCTGG     |                                |
| 131598RT-Rev         | GGTCTGGCCAATGCCACCGG   |                                |
| <b><i>gluc18</i></b> |                        |                                |
| 217415RT-Fwd         | CAGCGGCTTCGGCACCATGG   |                                |
| 217415RT-Rev         | CAGGCCAGGGCGCAGAATCTC  |                                |

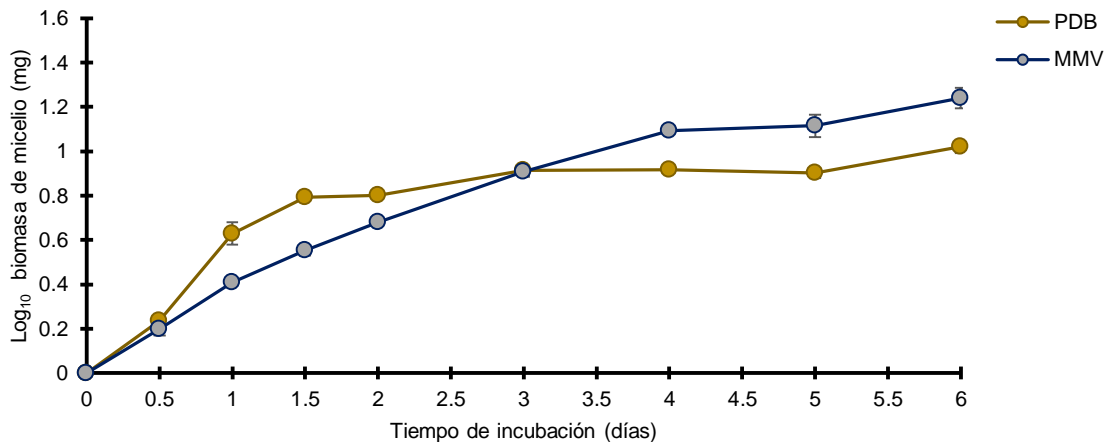
\* Datos no publicados.

## 5.12 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, así como una prueba de Tukey para la comparación de medias; para evaluar la inhibición en el crecimiento de cada fitopatógeno en cada uno de los medios de cultivo probados. De igual manera, para evaluar la actividad quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa en cada condición de inducción. Para los ensayos de qPCR se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para evaluar la diferencia estadística en la expresión de distintos genes en los tiempos de interacción con ambos fitopatógenos. El valor de significancia fue de  $P < 0.05$ . El software utilizado para este análisis fue jmp® (USA).

## 6. RESULTADOS

En las cinéticas de crecimiento en medio mínimo Vogel (MMV) la cepa CMU-08 alcanzó la fase logarítmica media al primer día de incubación, mientras que la fase estacionaria se presentó a partir del quinto día. En el caso de las cinéticas realizadas en medio PDB, se alcanzó la fase logarítmica media al primer día de incubación; sin embargo, la fase estacionaria inició en un tiempo más corto de incubación con respecto al medio MMV, presentándose al tercer día de incubación (Fig. 3).

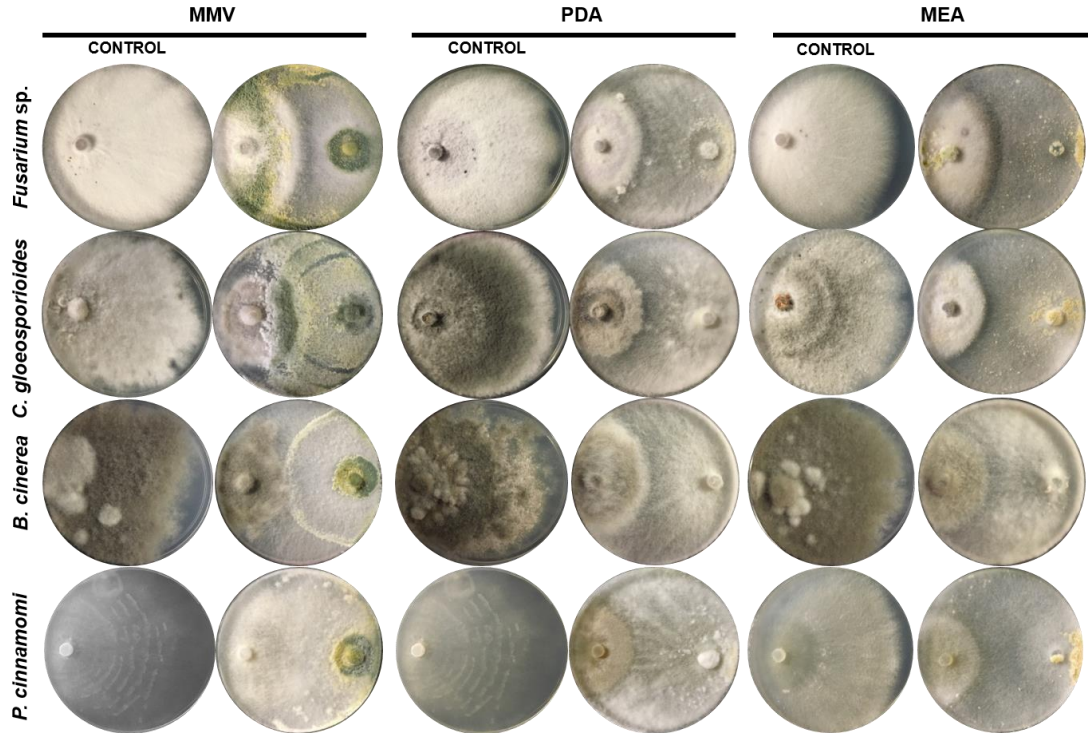


**Figura 3. Cinética de crecimiento de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.** La cepa se inoculó en medio caldo papa-dextrosa (PDB) y medio mínimo Vogel líquido (MMV), incubándose a 28 °C y 120 rpm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados de los ensayos de confrontación (Fig. 4) en cultivos duales en medio agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (AEM) y en MMV, mostraron que para los hongos *Fusarium* sp. y *B. cinerea*, así como para el oomycete *P. cinnamomi* el nivel de antagonismo de la cepa CMU-08 es de tipo 1 (Tabla 3). Para el caso del fitopatógeno *C. gloeosporioides*, el antagonismo por parte de la cepa de estudio fue de tipo 2 en los tres medios de cultivo.

### 6.1 Ensayos de antagonismo *in vitro*

En todos los ensayos de antagonismo entre los distintos fitopatógenos y la cepa



**Figura 4.** Ensayos de confrontación de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* contra microorganismos fitopatógenos. En todos los ensayos la cepa de *T. atroviride* está inoculada en el lado derecho y el fitopatógeno en el lado izquierdo de la placa de Petri. Se indica la columna de las placas control de cada fitopatógeno, sin *T. atroviride*, en la parte superior. Los nombres de los fitopatógenos de prueba aparecen a la izquierda. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

CMU-08 de *Trichoderma atroviride*, tanto de confrontaciones como de inhibición, el análisis de varianza mostró que el medio de crecimiento utilizado ( $P < 0.05$ ), así como los patógenos ( $P < 0.05$ ) tuvieron un efecto significativo en el resultado del antagonismo.

**Tabla 3.** Antagonismo de la cepa CMU-8 *Trichoderma atroviride* contra microorganismos fitopatógenos en cultivos duales.

| Fitopatógeno              | MMV                 | PDA                 | AEM                 |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                           | Tipo de antagonismo | Tipo de antagonismo | Tipo de antagonismo |
| <i>Fusarium sp.</i>       | 1                   | 1                   | 1                   |
| <i>B. cinerea</i>         | 1                   | 1                   | 1                   |
| <i>C. gloeosporioides</i> | 2                   | 2                   | 2                   |
| <i>P. cinnamomi</i>       | 1                   | 1                   | 1                   |

Para el significado de las clases de antagonismo ver detalles en Materiales y Métodos. MMV, medio mínimo Vogel; PDA, agar papa-dextrosa; AEM, agar extracto de malta.

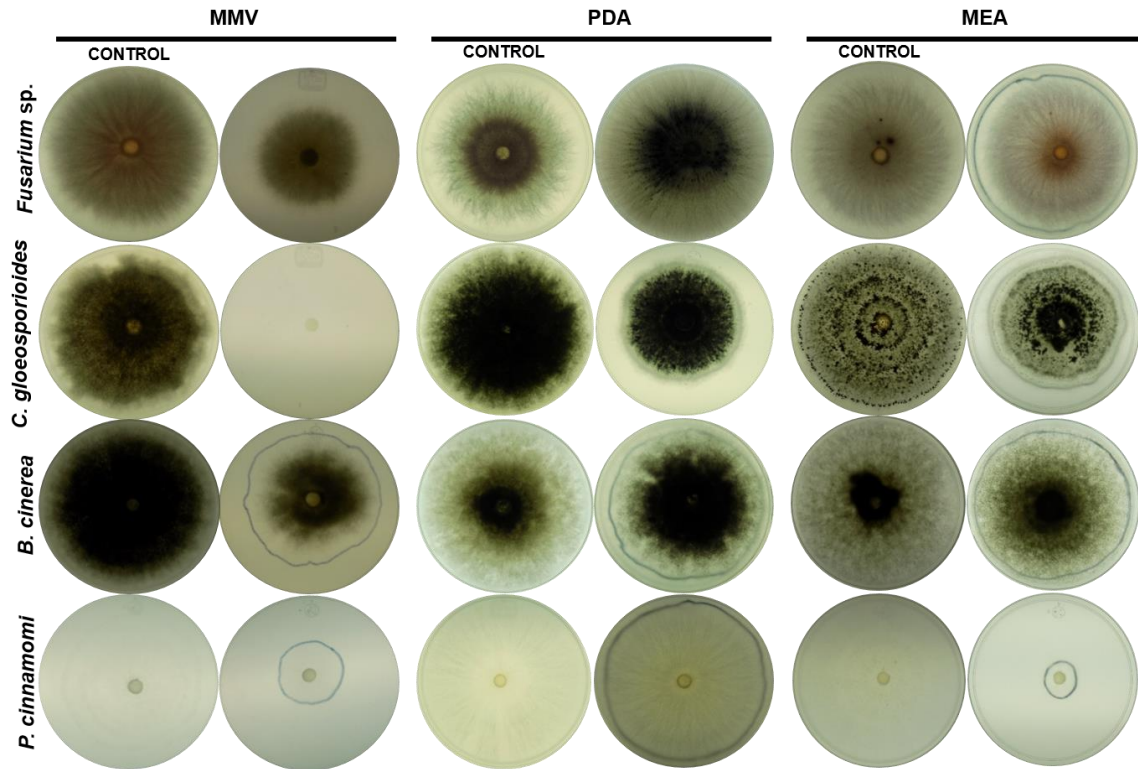
En los ensayos de inhibición por metabolitos no volátiles los resultados obtenidos son heterogéneos (Tabla 4). Para el caso de *Fusarium* sp., el antagonismo observado en los tres medios de cultivo se ubica en la clase 3, inhibiendo en un 30.55% el crecimiento de este fitopatógeno en MMV. Sin embargo, en PDA y AEM no se observó inhibición del crecimiento. El antagonismo hacia *C. gloeosporioides* en MMV fue clase 1, inhibiendo en 92.85% su crecimiento; mientras que en PDA el antagonismo fue clase 2, con un 38.09% de inhibición. Finalmente, en AEM el

**Tabla 4.** Inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos por metabolitos no volátiles de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.

| Fitopatógeno              | MMV             |                      | PDA             |                      | AEM             |                      |
|---------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
|                           | % de inhibición | Clase de antagonismo | % de inhibición | Clase de antagonismo | % de inhibición | Clase de antagonismo |
| <i>Fusarium</i> sp.       | 30.55           | 3                    | 0               | 3                    | 0               | 3                    |
| <i>C. gloeosporioides</i> | 92.85           | 1                    | 38.09           | 2                    | 19.44           | 3                    |
| <i>B. cinerea</i>         | 31.54           | 3                    | 16.26           | 3                    | 38.49           | 2                    |
| <i>P. cinnamomi</i>       | 70.23           | 1                    | 8.73            | 3                    | 14.68           | 3                    |

Para las clases de antagonismo ver detalles en Materiales y Métodos. MMV, medio mínimo Vogel; PDA, agar papa-dextrosa; AEM, agar extracto de malta.

antagonismo fue clase 3, con un 19.44% de inhibición hacia este patógeno. Para *B. cinerea* se presentó una clase 3 de antagonismo, con un 31.54% y 16.26% de inhibición del crecimiento en MMV y PDA, respectivamente. Mientras que en AEM se inhibió el crecimiento de *B. cinerea* en un 38.49%, resultando en un antagonismo clase 2. Para el caso del antagonismo de la cepa de estudio hacia el oomicete *P. cinnamomi*, en MMV se observó un antagonismo clase 1, con 70.23% de inhibición del crecimiento. Sin embargo, en PDA y AEM la clase de antagonismo observado es 3, con 8.73% y 14.68% de inhibición del crecimiento, respectivamente (Fig. 5).

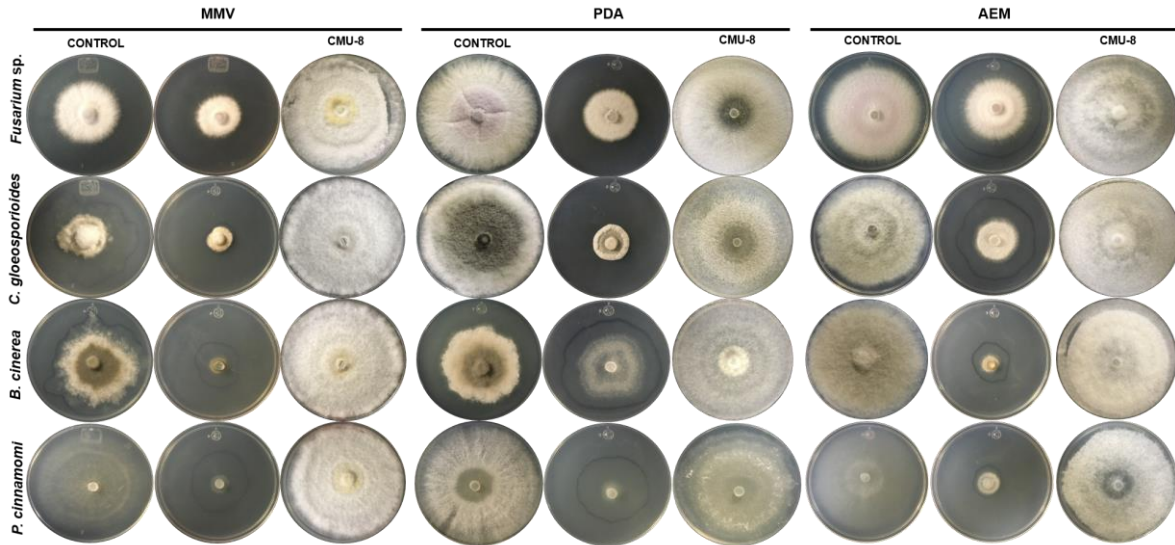


**Figura 5. Ensayos de inhibición de microorganismos fitopatógenos por metabolitos no volátiles de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.** En algunos de los ensayos se muestra tenuemente con un marcador de color azul el contorno de la colonia, el cual no es visible en la fotografía. Se indica la columna de las placas control de cada fitopatógeno en la parte superior. Los nombres de los fitopatógenos de prueba aparecen a la izquierda. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

En los ensayos para evaluar la inhibición de los fitopatógenos por metabolitos volátiles de la cepa CMU-08 también se observan variaciones dependiendo del fitopatógeno y el medio de prueba (Fig. 6). El crecimiento de *Fusarium* sp. se inhibió en 24.6% en AEM, correspondiente a un antagonismo clase 3. Sin embargo, en los medios MMV y PDA la clase de antagonismo observada fue 2, al inhibir su crecimiento 51.19% y 46.42%, respectivamente.

*C. gloeosporioides* mostró antagonismo clase 2 en MMV, con una inhibición de crecimiento del 63.39% y en AEM, con 39.68%. En PDA el crecimiento de este fitopatógeno se inhibió en 68.65%, correspondiente a un antagonismo clase 1. En el caso de *B. cinerea* se observó un antagonismo clase 2 en MMV y PDA, y clase 1 en AEM. Los porcentajes de inhibición del crecimiento fueron 50.25%, 48.8% y 67.06% para MMV, PDA y AEM, respectivamente. Para *P. cinnamomi* los

porcentajes de inhibición fueron de 70.19% en MMV y 70.23% en AEM, ubicándose en ambos casos como antagonismo clase 1. En PDA el crecimiento de *P. cinnamomi* se inhibió 50.39%, correspondiente a un antagonismo clase 2 (Tabla 5).



**Figura 6. Ensayos de inhibición de microorganismos fitopatógenos por metabolitos volátiles de la cepa CMU-08 *Trichoderma atroviride*.** En el caso de algunos de los ensayos, se muestra tenuemente con un marcador de color azul el contorno de la colonia, el cual no es visible en la fotografía. Se indican las placas control de cada fitopatógeno en la parte superior. Los nombres de los fitopatógenos de prueba aparecen a la izquierda. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

**Tabla 5.** Inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos por compuestos volátiles por parte de la cepa CMU-8 de *Trichoderma atroviride* en tres medios de cultivo distintos.

| Fitopatógeno              | MMV             |                      | PDA             |                      | AEM             |                      |
|---------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
|                           | % de inhibición | Clase de antagonismo | % de inhibición | Clase de antagonismo | % de inhibición | Clase de antagonismo |
| <i>Fusarium sp.</i>       | 51.19           | 2                    | 46.42           | 2                    | 24.6            | 3                    |
| <i>C. gloeosporioides</i> | 63.39           | 2                    | 68.65           | 1                    | 39.68           | 2                    |
| <i>B. cinerea</i>         | 50.25           | 2                    | 48.8            | 2                    | 67.06           | 1                    |
| <i>P. cinnamomi</i>       | 70.19           | 1                    | 50.39           | 2                    | 70.23           | 1                    |

Para las clases de antagonismo ver detalles en Materiales y Métodos. MMV, medio mínimo Vogel; PDA, agar papa-dextrosa; AEM, agar extracto de malta.

Es importante resaltar que cada fitopatógeno se antagoniza más eficientemente con un tipo de mecanismo distinto, que varía con el medio de cultivo. Así, en el caso de *B. cinerea* se presenta un antagonismo mayor por confrontación directa, Tipo 1 en los tres medios de cultivo, e inhibición por metabolitos volátiles, con un antagonismo Clase 1 en AEM y Clase 2 en MMV y PDA, en comparación con la inhibición por metabolitos no volátiles, donde en MMV y PDA es una clase 3 de antagonismo y Clase 2 en AEM.

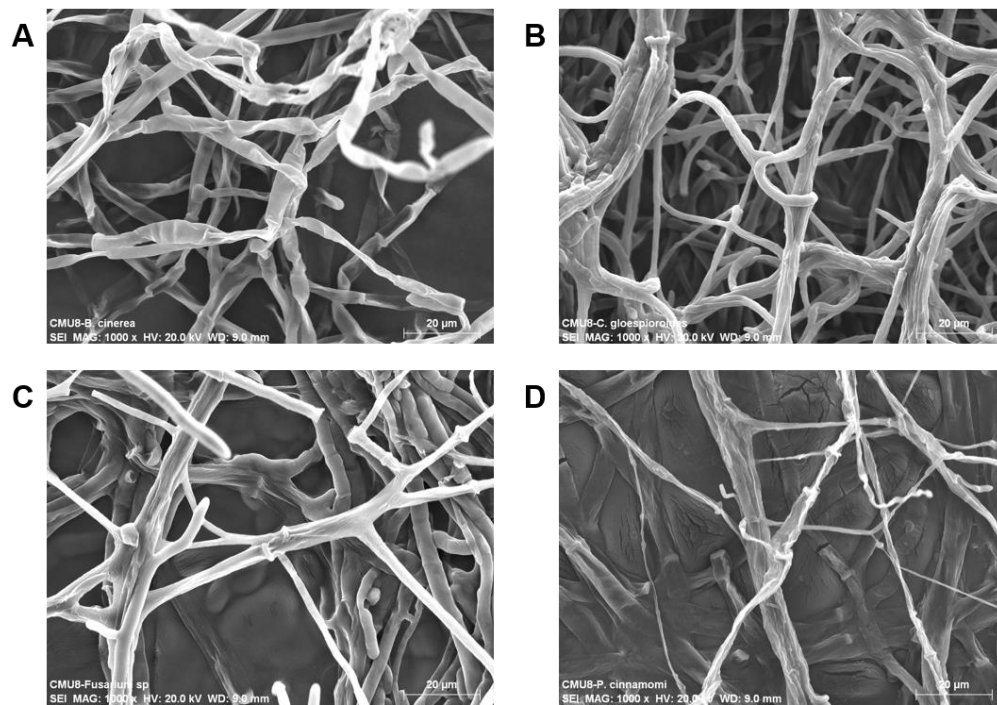
**Tabla 6.** Tipos de antagonismo con los diferentes mecanismos de CMU-08 *Trichoderma atroviride* contra fitopatógenos en tres medios de cultivo.

| Fitopatógeno              | Medio de cultivo | Confrontación | Inhibición MNV    | Inhibición MV    |
|---------------------------|------------------|---------------|-------------------|------------------|
| <i>B. cinerea</i>         | MMV              | Tipo 1        | Clase 3 (31.54%)  | Clase 2 (50.25%) |
|                           | PDA              | Tipo 1        | Clase 3 (16.26%)  | Clase 2 (48.8%)  |
|                           | AEM              | Tipo 1        | Clase 2 (38.49%)  | Clase 1 (67.06%) |
| <i>C. gloeosporioides</i> | MMV              | Tipo 2        | Clase 1 (92.85 %) | Clase 2 (63.39%) |
|                           | PDA              | Tipo 2        | Clase 2 (38.09%)  | Clase 1 (68.69%) |
|                           | AEM              | Tipo 2        | Clase 3 (19.44%)  | Clase 2 (39.68%) |
| <i>Fusarium sp.</i>       | MMV              | Tipo 1        | Clase 3 (30.55%)  | Clase 2 (51.19%) |
|                           | PDA              | Tipo 1        | Clase 3 (0%)      | Clase 2 (46.42%) |
|                           | AEM              | Tipo 1        | Clase 3 (0%)      | Clase 3 (24.6%)  |
| <i>P. cinnamomi</i>       | MMV              | Tipo 1        | Clase 3 (31.54%)  | Clase 2 (50.25%) |
|                           | PDA              | Tipo 1        | Clase 3 (16.26%)  | Clase 2 (48.8%)  |
|                           | AEM              | Tipo 1        | Clase 2 (38.49%)  | Clase 1 (67.06%) |

Para las clases de antagonismo ver detalles en Materiales y Métodos. MMV, medio mínimo Vogel; PDA, agar papa-dextrosa; AEM, agar extracto de malta. En la escala de color, el Tipo y Clase 1 de antagonismo se muestran en recuadros azul oscuro, el Tipo y Clase 2 de antagonismo se muestran en recuadros azul celeste y el Tipo y Clase 3 de antagonismo se muestran en recuadros azul claro. MNV, metabolitos no volátiles; MV, metabolitos volátiles.

Mientras que para *C. gloeosporioides* la cepa CMU-08 inhibe su crecimiento más eficientemente mediante metabolitos volátiles, presentando Clase 1 de antagonismo en medio AEM y Clase 2 en medio MMV y PDA. En confrontación directa el antagonismo fue Tipo 2 en los tres medios de cultivo. En el ensayo de metabolitos volátiles se inhibió su crecimiento en niveles Clase 1, 2 y 3 en medio MMV, PDA y AEM, respectivamente (Tabla 6).

El fitopatógeno que mostró mayor resistencia hacia el antagonismo de CMU-08 fue *Fusarium* sp., el cual se antagonizó eficientemente únicamente en confrontación directa con un Tipo 1 en los tres medios de cultivo. Mientras que la inhibición del crecimiento por metabolitos no volátiles fue Clase 2 en MMV y AEM, y Clase 3 en AEM. En la inhibición del crecimiento de este patógeno por metabolitos no volátiles, se observa una Clase 3 en los tres medios de cultivo (Tabla 5). En contraste, *P. cinnamomi* fue el fitopatógeno que la cepa CMU-08 antagonizó más eficientemente por confrontación directa, la cual fue Tipo 1 en los tres medios de cultivo. Seguido de inhibición del crecimiento por metabolitos volátiles, presentando una clase de inhibición Clase 1 en AEM y Clase 2 en MMV y PDA. Además, en la inhibición del crecimiento por metabolitos volátiles, estos fueron Clase 2 en MMV y PDA y Clase 1 en AEM (Tabla 5).



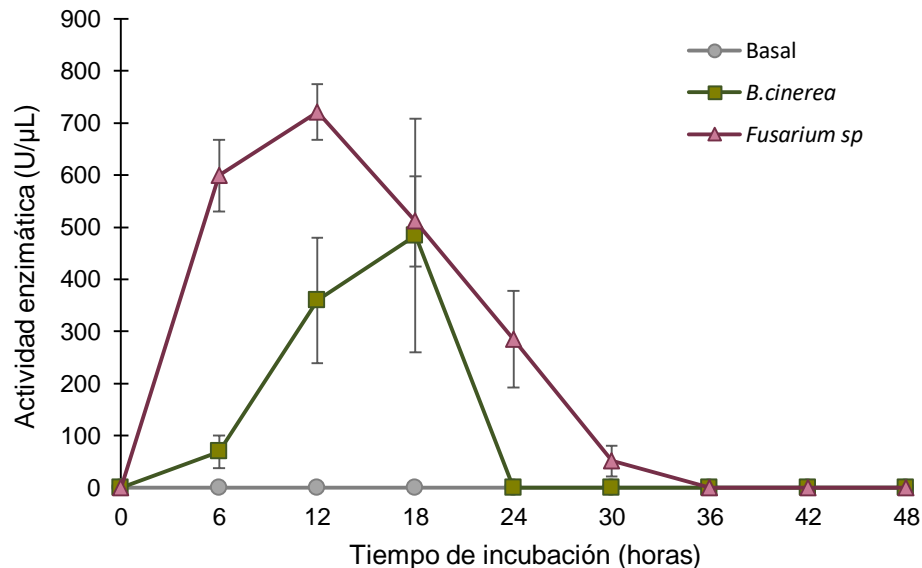
**Figura 7. Enrollamiento y formación de apresorios del micelio de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* sobre el micelio de los cuatro fitopatógenos de prueba. Se muestran las interacciones con *B. cinerea* (A), *C. gloeosporioides* (B), *Fusarium* sp. (C) y *P. cinnamomi* (D). Se señalan con una flecha los enrollamientos de la cepa CMU-08 sobre cada fitopatógeno.**

Las microfotografías obtenidas durante el proceso de interacción de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* con las cepas de los fitopatógenos de prueba en los cultivos duales muestran el enrollamiento del micelio de la *T. atroviride* alrededor del micelio de cada fitopatógeno (Fig. 7). Las hifas de *T. atroviride* se pueden distinguir de las de los fitopatógenos ya que son más delgadas y se observa en dicho micelio la formación de apresorios, una estructura característica del micoparasitismo.

## 6.2 Actividad enzimática de $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa de la cepa CMU-08

### 6.2.1 $\beta$ -1,3 glucanasa

No se encontró actividad enzimática basal de  $\beta$ -1,3 glucanasa en la cepa CMU-08 de *T. atroviride* creciendo en MMV. Cuando el medio se suplementó con paredes celulares de *B. cinerea* y *Fusarium sp.* la actividad se detecta a partir de las seis horas de incubación (Fig. 8).

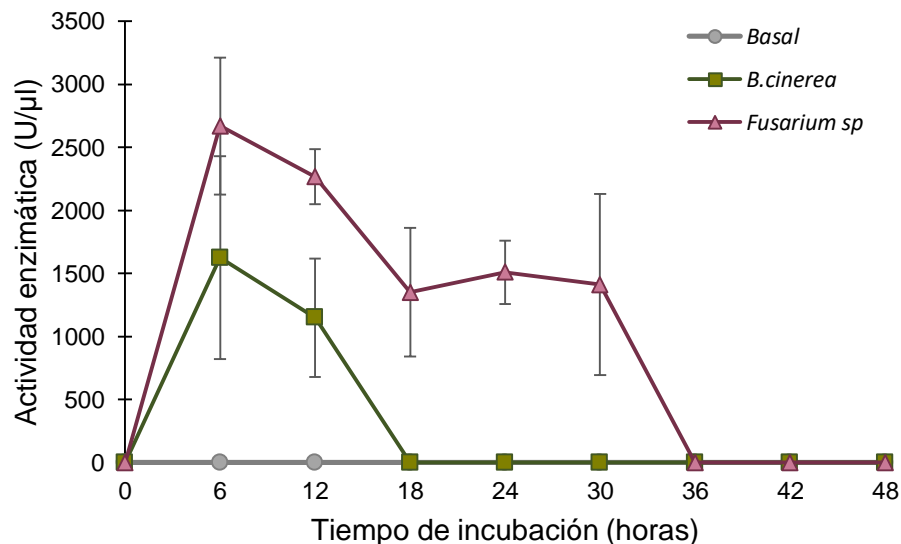


**Figura 8. Actividad enzimática  $\beta$ -1,3 glucanasa de CMU-08 de *T. atroviride*.** Se muestra la actividad basal en medio MMV y la actividad en MMV suplementado con paredes celulares (0.5% p/v) de *B. cinerea* y *Fusarium sp.* Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm, en tres ensayos independientes por triplicado. Las barras representan el error estándar.

La actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa en presencia de paredes celulares de *B. cinerea* presenta el valor máximo a las 18 h de incubación, con un valor de 484.14 ( $\pm 223.97$ ) U/ $\mu$ L. Después de dicho máximo, la actividad desaparece en el resto de puntos de medición, hasta las 48 h de cultivo. En el caso de la actividad en presencia de paredes celulares de *Fusarium* sp., la actividad alcanza un punto máximo a las 12 horas, con un valor 721.08 ( $\pm 53.14$ ) U/ $\mu$ L, observándose posteriormente una disminución progresiva en la actividad, siendo detectable todavía a las 30 h, con un valor de 51.64 ( $\pm 29.59$ ) U/ $\mu$ L.

### 6.2.2 Quitinasa

De manera semejante al caso de la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3 glucanasa, no se observó actividad de quitinasa extracelular de la cepa CMU-08 en condición basal de cultivo en MMV. La actividad en medio suplementado con paredes celulares de *B. cinerea* y *Fusarium* sp. se detecta a partir de las seis horas de incubación, siendo el nivel máximo de actividad en ambas condiciones (Fig. 9).

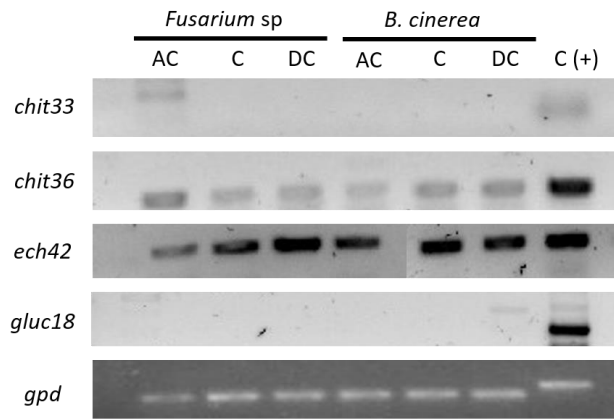


**Figura 9. Actividad enzimática quitinasa de CMU-08 de *T. atroviride*.** La actividad se indujo con 0.5% de paredes celulares de *B. cinerea* y *Fusarium* sp. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm, en tres ensayos independientes por triplicado. Las barras representan el error estándar.

La actividad de quitinasa inducida con paredes celulares de *B. cinerea* a las seis horas presentó un valor de 1625.635 ( $\pm 803.41$ ) U/ $\mu$ L. Después de dicho máximo se observa una rápida disminución de la actividad, para desaparecer por completo a partir de las 18 horas de incubación. En el caso de la actividad de quitinasa en presencia de paredes de *Fusarium* sp., el punto máximo observado a las seis horas muestra un valor de 2671.334 ( $\pm 542.91$ ) U/ $\mu$ L. Se observa un descenso de actividad a las 12 y 18 horas de incubación, para mantenerse constante desde este momento hasta las 30 horas y desaparecer a las 36 horas (Fig. 9).

### 6.3 Análisis de la transcripción de genes de quitinasas y glucanasa

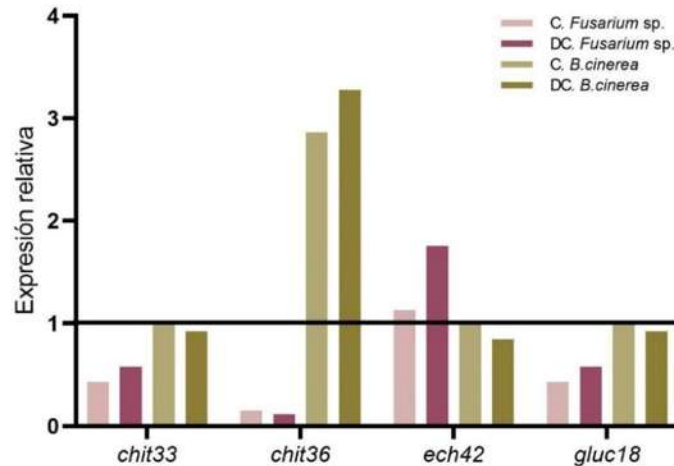
Los resultados de los ensayos de RT-PCR de punto final indicaron variaciones en la expresión de genes de quitinasas y la glucanasa analizada en la cepa CMU-08, en interacción con *Fusarium* sp. y *B. cinerea* (Fig. 10).



**Figura 10. Patrón de transcripción de genes de quitinasas y glucanasa de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride*.** Patrones de amplificación de la cepa CMU-08 de *Trichoderma atroviride* con iniciadores para detectar transcritos de genes que codifican para *chit33*, *chit36* y *ech42* (quitinasas), *gluc18* (endo-1,3- $\beta$ -glucanasa) y *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Durante el contacto (C) y después del contacto (DC); entre la cepa CMU-08 de *T. atroviride* con *Fusarium* sp. y *B. cinerea*. Gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con SYBR Green (Invitrogen, USA).

Al realizar el análisis densitométrico se observan diferencias en la expresión de los genes evaluados durante la interacción con los fitopatógenos (Fig. 11). Los resultados de expresión relativa de los genes de interés de la cepa CMU-08, indican que el gen *chit33* se sobreexpresa únicamente durante el contacto con *B.*

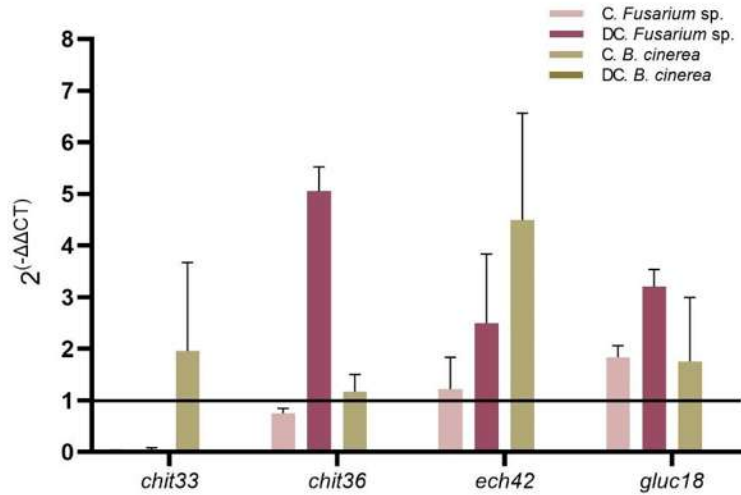
*cinerea*, mientras que en las demás condiciones de interacción con los fitopatógenos se ve reprimido (Fig. 12).



**Figura 11. Expresión relativa de genes que codificantes de enzimas degradadoras de pared celular de CMU-08 de *T. atroviride* durante la interacción con hongos fitopatógenos.** Diferencias en la expresión de genes codificantes para *chit33*, *chit36* y *ech42* (quitinasas) y *gluc18* (endo-1,3- $\beta$ -glucanasa). Durante el contacto (C) y después del contacto (DC); entre la cepa CMU-08 de *T. atroviride* con *Fusarium* sp. y *B. cinerea*.

Sin embargo, los genes *chit36*, *ech42* y *gluc18*, presentan diversos patrones de expresión. La transcripción de gen *chit36* se ve reprimida durante el contacto con *Fusarium* sp., pero se sobreexpresa después del contacto con este fitopatógeno. Mientras que en contacto con *B. cinerea*, la transcripción de dicho gen se induce, pero después del contacto con este fitopatógeno, mostró represión transcripcional (Fig. 12). En el caso del gen *ech42*, este se ve inducido tanto durante el contacto y después del contacto, alcanzando niveles de transcripción más altos en esta última interacción con *Fusarium* sp. La expresión de este gen se indujo durante el contacto con *B. cinerea*, pero se reprimió después del contacto entre los dos hongos.

La transcripción del gen *gluc18* se ve inducida durante y después del contacto con *Fusarium* sp., siendo mayor la expresión durante el contacto con este hongo y también durante el contacto con *B. cinerea* (Fig. 12).



**Figura 12. Cambio en la expresión de genes codificantes de quitinasas y una glucanasa en la cepa CMU-08 de *T. atroviride* durante el micoparasitismo.** Nivel de expresión de genes que codifican para *chit33*, *chit36* y *ech42* (quitinasas) y *gluc18* (endo-1,3- $\beta$ -glucanasa). Se ven los cambios en los niveles de expresión de los genes analizados durante el contacto y después del contacto entre la cepa CMU-08 de *T. atroviride* con *Fusarium* sp. y *B. cinerea*. Las barras representan el error estándar.

## 7. DISCUSIÓN

En la primera etapa del presente proyecto se evaluó la capacidad de la cepa silvestre CMU-08 de *T. atroviride* para crecer en los medios completo PDB y definido MMV. La obtención de las cinéticas de crecimiento de la cepa de estudio permitió establecer el inicio y la duración de la fase log, así como la entrada en la fase estacionaria del crecimiento en los medios de cultivo empleados. Esto es relevante ya que la expresión de las actividades enzimáticas esta asociada a distintas fases de crecimiento del hongo. Así, el estudio de las variaciones en los patrones de actividad enzimática durante el desarrollo del micelio en medio líquido puede contribuir a mejorar procesos biotecnológicos, al mismo tiempo que aporta información sobre la fisiología básica de una especie fúngica (Bull, 2010).

La determinación de las cinéticas de crecimiento en diferentes medios de cultivo permite asociar las actividades enzimáticas de interés, en este caso quitinasas y glucanasas, a una fase del desarrollo específica, lo que en términos biotecnológicos implica diseñar un proceso de producción adecuado para mantener a la cepa en esa etapa de crecimiento, optimizando así los niveles de producción. No obstante su relevancia, los estudios recientes sobre las fases fisiológicas del crecimiento de cepas de *Trichoderma* spp. y su relación con la producción de enzimas extracelulares son escasos. En el caso de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*, trabajos pioneros documentan que la producción de  $\beta$ -glucosidasa se incrementa en fase estacionaria tardía (Sidhu y Sandhu, 1984, 1985). De la misma manera, las actividades extracelulares de carboximetilcelulasa y  $\beta$ -glucosidasa en *T. reesei* se incrementan significativamente durante la fase estacionaria, después de cuatro días de cultivo (Kubicek, 1981). La asociación entre las variaciones de los patrones de actividad enzimática con un determinado estado fisiológico permite plantear hipótesis sobre el papel fisiológico y el uso de sustratos de dichas enzimas. En particular, en *T. atroviride* se ha documentado que la expresión de algunos genes de quitinasas depende del cultivo en medio sólido o líquido, como de la fuente de carbono empleada (Gruber *et al.*, 2011).

## 7.1 Ensayos de antagonismo

Con la finalidad de evaluar si la cepa CMU-08 era capaz de antagonizar eficientemente *in vitro* a cepas de microorganismos fitopatógenos que atacan cultivos de relevancia socioeconómica en Michoacán, e identificar mecanismos asociados a dicha capacidad, se realizaron ensayos de inhibición por metabolitos volátiles y no volátiles, así como pruebas de confrontación en tres distintos medios de cultivo sólido.

En general, los protocolos actuales para realizar los ensayos de antagonismo e inhibición por metabolitos volátiles y no volátiles, recomiendan el uso de medio PDA (Steyaert *et al.*, 2016). En apego a la sugerencia de diversos manuales, dicho medio se reporta con mayor frecuencia en la evaluación del antagonismo de cepas silvestres de *Trichoderma* spp. hacia distintos fitopatógenos (Karimi *et al.*, 2017; Sunpapao *et al.*, 2018; Barros Filizola *et al.*, 2019), aunque con menos frecuencia, otros trabajos reportan el uso de medio AEM (El-Hasan *et al.*, 2007; Anees *et al.*, 2010; Schwarze *et al.*, 2012) y medios definidos similares al MMV (Kim y Knudsen, 2013; Schubert *et al.*, 2008 a, b; Pastirčáková, 2019). No obstante que al inicio de los estudios de antagonismo *in vitro* había interés en analizar las diferencias de acuerdo al medio de cultivo en el que se realizaba el ensayo (Whipps, 1987), los trabajos relativamente más recientes en los que el antagonismo de *Trichoderma* spp. se evalúa en distintos medios de cultivo son poco frecuentes (Schubert *et al.*, 2008 a, b; Naher *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2013; Pastirčáková, 2019).

La evaluación en distintos medios de cultivo puede servir para imitar las condiciones nutricionales del ambiente natural del fitopatógeno contra el cual se desea que el antagonismo de *Trichoderma* spp. sea efectivo (Knudsen *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 2008 a, b). Por otra parte, uno de los mecanismos de antagonismo es la competencia por nutrientes (Benitez *et al.*, 2004; Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014), por lo que es interesante analizar la efectividad del antagonismo de *Trichoderma* spp. en distintas condiciones nutricionales. Así, los tres medios de cultivo utilizados en el presente trabajo representan un gradiente nutricional de mayor a menor en el orden AEM>PDA>MMV. En los tres medios

analizados, la confrontación por cultivo dual muestra un antagonismo Tipo I contra todos los fitopatógenos de prueba, mientras que la inhibición por MNV y MV es menos eficiente, con inhibiciones Clase 2 y 3 en su mayoría.

Otros estudios han observado diferencias significativas en el antagonismo de *Trichoderma* spp. contra fitopatógenos, de acuerdo al medio de cultivo empleado. Por ejemplo, el antagonismo de distintas cepas *Trichoderma* spp. hacia el basidiomicete *Polyporus squamosus*, patógeno de árboles, es más eficiente en AEM que en medio limitado de nutrientes, con una baja relación N:C (Schubert *et al.*, 2008a). También, cepas de *T. virens* y *T. harzianum* antagonizan más eficientemente al basidiomiceto *Ganoderma* sp. en medio de agar sacarosa papa que en PDA (Naher *et al.*, 2012). Al analizar el antagonismo de cepas de *T. virens* y *T. pseudokoningii* contra los basidiomicetes *Neolentinus lepideus*, *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor* empleando AEM y un medio mínimo que simulaba nutricionalmente a la madera, se encontró que en AEM las cepas de *Trichoderma* spp. inhibían significativamente más el crecimiento radial de los fitopatógenos (Wheatley *et al.*, 1997). Los ensayos de antagonismo de tres cepas de las especies *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. virens* contra distintas cepas de *Ophiostoma novo-ulmi*, patógeno del olmo (*Ulmus minor*), mostraron variación significativa en la eficiencia de antagonismo entre los medios PDA y AEM (Díaz *et al.*, 2013). De la misma forma, distintas cepas de *Trichoderma* spp. inhiben de manera diferencial a cepas de los fitopatógenos *Phyllosticta sphaeropsoidea*, *Phomopsis carposchiza* y *Diaporthe padi* en los medios AEM y PDA, y otros tres medios de cultivo evaluados (Pastirčáková, 2019). Se evaluó la inhibición del crecimiento de una cepa de *Moniliophthora roreri*, fitopatógeno del cacao (*Theobroma cacao*), utilizando cepas de distintas especies de *Trichoderma* aisladas como endófitas de plantas del mismo género (Bailey *et al.*, 2008). Dicho trabajo mostró diferencias significativas entre los medios AEM y un medio mínimo de sales (MMS) en los ensayos de inhibición por MNV (antibiosis) y de antagonismo en cultivo dual, con algunas cepas de *Trichoderma* spp. inhibiendo el crecimiento del fitopatógeno más eficientemente en medio AEM y otras en medio MMS. Aún más, algunas de las cepas

biocontroladoras cambiaron de inhibición a estimulación del crecimiento del fitopatógeno con el cambio de medio (Bailey et al., 2008).

De manera interesante, pocos de los trabajos anteriores plantean hipótesis sobre las diferencias obtenidas. Solo el estudio de Wheatley *et al.* (1997) está diseñado para evaluar la diferencia en la producción de metabolitos volátiles (MV) en los medios AEM y mínimo empleados, y su efecto inhibitorio hacia los fitopatógenos. Dicho trabajo muestra que el medio en el que se producen más MV es el AEM, siendo el que más inhibe a los hongos de prueba en el ensayo de volátiles. Además, se ha documentado que la síntesis de policétidos, terpenos, fenoles, alcaloides, grupos de metabolitos secundarios químicamente distintos y asociados a las actividades de inhibición por MV y MNV, será diferente en cada condición de cultivo (Harman y Kubicek, 2014). Todo lo anterior da evidencia contundente de las aseveraciones de los trabajos pioneros que mencionan que ningún medio por si solo puede reflejar todas las posibles interacciones microparasíticas y la producción de metabolitos durante estas, por lo que es difícil establecer un medio único como recomendación general en los ensayos de antagonismo (Whipps, 1987; Knudsen *et al.*, 1997).

Los resultados anteriores muestran la relevancia de evaluar distintos medios de cultivo en los ensayos *in vitro* de *Trichoderma* spp., con la finalidad de conocer mejor las características nutricionales asociadas a los distintos mecanismos de antagonismo contra fitopatógenos de interés. Dichos resultados, y los previamente obtenidos en el laboratorio a distintas temperaturas y condiciones de pH (datos no publicados), sugieren que la cepa CMU-08 presenta una gran versatilidad fisiológica, que le permite un aprovechamiento eficiente de macro y micronutrientes en distintas condiciones de cultivo, generando tanto un rápido crecimiento como la detección y ataque de fitopatógenos. Por otra parte, la inhibición por MNV y MV presentó los valores más altos en los medios completos PDA y AEM, por lo que estos medios deben de inducir más eficientemente la producción de metabolitos secundarios. El uso de medios completos como el PDA y el AEM es deseable desde el punto de vista biotecnológico, ya que son medios baratos y de fácil preparación en los que se pueden obtener inóculos y realizar los

primeros ensayos de caracterización de una cepa silvestre. Por otra parte, el uso de medios definidos como el MMV ayuda a la realización de una caracterización fisiológica y bioquímica más detallada de las cepas de interés, en los que se puede ir modificando de manera precisa las condiciones de cultivo para analizar su efecto en el proceso de desarrollo o de cualquier bioensayo de la cepa.

En los ensayos de confrontación *in vitro* de la cepa CMU-08 contra diversos fitopatógenos, se encontró en los tres medios de cultivo probados un antagonismo tipo I en la mayoría de los casos, a excepción de *C. gloeosporioides*. Así, la cepa de *T. atroviride* sobrecreció totalmente a los fitopatógenos mostrándose como un antagonista eficiente. Estos resultados concuerdan con la actividad antagonista registrada con cepas silvestres y de referencia de *T. atroviride* contra cepas de algunos de los géneros o especies a las que pertenecen los fitopatógenos evaluados en el presente trabajo. Por ejemplo, la evaluación de 24 cepas silvestres de las especies *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. cremeum*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. longipile*, *T. viride* y *T. viridescens* mostró que solo cinco eran antagonistas eficientes en ensayos de confrontación en medio PDA de por lo menos cuatro de las cinco cepas de las especies micotoxigénicas del género *Fusarium*, que incluían a *F. avenaceum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. temperatum* (Błaszczuk *et al.*, 2017). Dos de las cinco antagonistas eficientes eran cepas de *T. atroviride*, y el micelio de la cepa AN240 formó enrollamientos alrededor de las hifas de los fitopatógenos de prueba. Además, dicha cepa fue una de las dos más eficientes para reducir la producción de micotoxinas por parte de las cepas de prueba de *Fusarium* spp. Los resultados de este trabajo sugieren que la cepa AN240 utiliza varios de los mecanismos de antagonismo descritos para *Trichoderma* spp., incluidos el micoparasitismo y la antibiosis mediada por la producción de compuestos antifúngicos y otros metabolitos extracelulares (Błaszczuk *et al.*, 2017).

El antagonismo de cepas de *T. atroviride* hacia *Botrytis cinerea* ha sido estudiado *in vitro* e *in vivo*. Particularmente, la cepa de referencia P1 de *T. atroviride* (ATCC 74058) la cual inhibe *in vitro* la germinación de conidias de *B. cinerea* de una manera dependiente de la concentración de conidias del

antagonista, y dicha inhibición se ha atribuido al consumo de oxígeno por parte de las conidias del biocontrolador para iniciar el proceso de germinación (Hjeljord y Tronsmo, 2003). La baja disposición de oxígeno debido al consumo de este, por las conidias del antagonista en un estado de pre-germinación, impide que las conidias del fitopatógeno puedan germinar. Cuando las conidias de la cepa P1 son preactivadas mediante incubación en medio PDB, proceso denominado activación nutricional, la eficiencia de la inhibición se ve incrementada. Más recientemente se ha documentado que la isocitrato liasa de *T. atroviride*, enzima del ciclo del glioxilato, juega un papel relevante en el antagonismo *in vitro* contra *B. cinerea* y la inducción de la defensa en plantas contra dicho patógeno (Dubey *et al.*, 2013). Un aspecto interesante del análisis de este antagonismo en particular es que los resultados obtenidos *in vitro* se correlacionan de manera positiva con los resultados *in planta* y en campo. Así, el análisis en invernadero mostró que las conidias de la cepa P1 inhiben la esporulación de *B. cinerea* en flores de plantas de fresa de manera dependiente de la temperatura, alcanzando valores superiores al 85% a 24°C, y solamente del 35% a 12°C (Hjeljord *et al.*, 2001). No obstante, al igual que las observaciones *in vitro*, cuando las conidias de la cepa P1 son activadas nutricionalmente, la inhibición de la conidiación del fitopatógeno se incrementa al 60% o más a 12°C. Las conidias preactivadas también inhiben eficientemente en campo la infección de fresa por parte de *B. cinerea* (Hjeljord *et al.*, 2001). Por lo anterior, es factible que el antagonismo *in vitro* de la cepa CMU-08 hacia la cepa de *B. cinerea* documentado en el presente trabajo también sea funcional en campo, lo que incrementa el potencial de la cepa CM-08 para su uso en una formulación para biocontrol.

La cepa de estudio presentó un antagonismo eficiente hacia *P. cinnamomi* en los tres medios de cultivo evaluados. El antagonismo *in vitro* de cepas seleccionadas de *Trichoderma* spp. hacia especies del género *Phytophthora* se encuentra ampliamente documentado (Bae *et al.*, 2011; Nath *et al.*, 2014; Tchameni *et al.*, 2017; Nawaz *et al.*, 2018), y en particular el de cepas silvestres de *T. atroviride* sobre fitopatógenos de dicho taxón (Sánchez *et al.*, 2019; Chilosi *et al.*, 2020). Sin embargo, aunque se ha documentado la protección *in planta* de

la cepa de colección IMI206040 hacia *P. cinnamomi* (Macías-Rodríguez *et al.*, 2018), hasta donde se pudo documentar en el presente trabajo no hay estudios de antagonismo *in vitro* o *in planta* de cepas silvestres de *T. atroviride* hacia dicho fitopatógeno. El único estudio *in vitro* e *in planta* en el que se establece una relación entre una cepa silvestre de *T. atroviride* y el biocontrol de *P. cinnamomi*, es en el que composta orgánica que lleva al micoparásito suprime la infección en el patosistema *P. cinnamomi*/*Rhododendron azalea* (De Corato *et al.*, 2018). No obstante, en la composta empleada también se detecta a *T. harzianum*, además de cepas del género fúngico *Aspergillus*, del género de bacterias *Pseudomonas*, y de actinomicetes *Streptomyces*, todos los cuales también pueden contribuir a la supresión de la enfermedad.

Se ha documentado que la cepa de colección IMI206040 de *T. atroviride* estimula la producción de exudados ricos en carbohidratos de las raíces de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), particularmente de sacarosa (Macías-Rodríguez *et al.*, 2018). Los resultados de dicho estudio sugieren que la disponibilidad de carbohidratos exudados por la planta durante la interacción con *T. atroviride* estimula el crecimiento del micoparásito, permitiendo así su competencia eficiente por el espacio y los nutrientes de suelo con *P. cinnamomi*, lo que permite el control del fitopatógeno. En concordancia con el presente trabajo, se ha documentado que cepas silvestres de *T. atroviride* micoparasitan fitopatógenos del género *Phytophthora* (Sánchez *et al.*, 2019), pero también se ha encontrado que, al igual que la cepa de referencia, promueven el crecimiento vegetal (Sánchez *et al.*, 2019). A futuro será necesario documentar si la cepa CM-08 y otras cepas silvestres de *T. atroviride*, comparten la característica de promover el crecimiento vegetal, esto debido a que, como se comentó en la introducción, cepas genéticamente idénticas de este micoparásito pueden presentar diferencias fisiológicas significativas (Lange *et al.*, 2016).

## **7.2 Ensayos de actividad enzimática**

La evidencia generada en este estudio muestra que la cepa CMU-08 de *T. atroviride* presenta un mecanismo de antagonismo micoparasítico, en el que las

enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular del fitopatógeno juegan un papel importante. Se evaluó la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa de la cepa de estudio, debido a la relevancia de estas enzimas en el proceso de micoparasitismo (Ihrmark *et al.*, 2010; Geraldine *et al.*, 2013). La cinética de actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa de la cepa CMU-08 mostró que las paredes celulares de *B. cinerea* y *Fusarium* sp. inducen significativamente dichas enzimas, aunque las del segundo fitopatógeno mostraron mayores valores de inducción.

Los puntos máximos de actividad enzimática de las dos enzimas evaluadas se encuentran durante las 12 y 24 h de cultivo, en la fase logarítmica media de crecimiento de la cepa CMU-08. Esto sugiere que la cepa de estudio de *T. atroviride* produce estas enzimas degradadoras de pared celular de los fitopatógenos mientras se encuentra en crecimiento, y emplea los productos de degradación de las enzimas como fuente de carbono. Además, el hecho que exista variación en la actividad enzimática de quitinasa y de  $\beta$ -1,3 glucanasa en las dos condiciones de inducción puede atribuirse a las diferencias en los patrones de expresión de diferentes isoenzimas. Otro factor que influye en las variaciones de la actividad enzimática de estas enzimas es la composición diferencial de polisacáridos de las paredes celulares de cada fitopatógeno (Adams, 2004; Kaur *et al.*, 2005; Marcello *et al.*, 2008; Gruber *et al.*, 2011).

Al evaluar la actividad enzimática de quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa de cepas de *T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum* en medio líquido Czapek enriquecido con paredes celulares de *Fusarium solani*, los cultivos de *T. harzianum* mostraron los mayores niveles de inducción, en concordancia con la mayor capacidad micoparasítica de dicha especie en comparación con *T. viride* y *T. lignorum* (Chakraborty y Chatterjee, 2008). Sin embargo, aún entre diferentes cepas de la misma especie se observan diferencias en la inducción y valores de actividad enzimática. Así, se ha documentado que tres cepas de *T. atroviride*, T38, T2 y T1, presentan variación en la producción de glucanasas y quitinasas en presencia de distintas fuentes de carbono (Kaur *et al.*, 2005). En dicho estudio la actividad de endoquitinasa fue mayor en cultivos donde se emplearon como fuente de carbono

quitina y esclerocios de *R. solani*, siendo T1 la cepa que mostró los mayores niveles de actividad. La actividad endoglucanasa fue mayor empleando laminarina y esclerocios como fuente nutricional, y en este caso las cepas T2 y T38 presentaron mayor inducción (Kaur *et al.*, 2005).

Son diversos los estudios en donde se evalúa la inducción de la actividad de las enzimas aquí estudiadas en *Trichoderma* spp., documentándose variaciones entre especies y cepas de la misma especie. No obstante, son escasos los reportes en los que se analizan las actividades de quitinasa y glucanasa de *T. atroviride*. En uno de dichos estudios se evaluó la actividad de quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa de la cepa T17 de *T. atroviride*, inducida con 1% de micelio de *Guignardia citricarpa* (de Lima *et al.*, 2016). La cinética de quitinasa obtenida muestra actividad de las 24 a las 120 h de incubación, encontrando valores máximos a las 24, 96 y 120 horas. En el caso de la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa, esta se observa desde las 72 hasta las 120 h de incubación, y los puntos máximos de actividad se presentan a las 72 y 96 h (de Lima *et al.*, 2016). En contraste con el trabajo aquí realizado, este estudio previo no asocia las actividades enzimáticas con la fase de desarrollo del hongo, aunque, debido a la velocidad de crecimiento de las cepas de *T. atroviride*, posiblemente dichas actividades estén asociadas a la fase estacionaria temprana y tardías.

Es importante mencionar que, aunque en este trabajo se detectó actividad de quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa, estas enzimas actúan sinérgicamente con otras que no se analizaron, tales como  $\beta$ -1,6 glucanasas, N-acetil-glucosaminidasas, celulasas y proteasas. Para que una cepa de *Trichoderma* sea una buena antagonista, debe haber una correlación entre estas enzimas degradadoras de pared celular (Qualhato *et al.*, 2013). Además, las enzimas producidas actúan en conjunto con metabolitos secundarios como pironas, policétidos, terpenos y peptaiboles para inhibir y/o antagonizar el crecimiento de microorganismos fitopatógenos. El hecho que la cepa CMU-08 presente la capacidad de producir dichas enzimas y antagonizar a los fitopatógenos a través del mecanismo de antibiosis evaluado en este estudio, indica que todos estos factores antes

mencionado están actuando de manera sinérgica, por lo es una óptima candidata para el desarrollo de un producto de biocontrol.

### **7.3 Ensayos de expresión de genes de quitinasas y glucanasas**

Con la finalidad de analizar la regulación transcripcional de genes codificantes de quitinasas y glucanasas de la cepa CMU-08 de *T. atroviride* en las distintas etapas de interacción en con *Fusarium* sp. y *B. cinerea*, se realizaron ensayos de RT-PCR y qRT-PCR. Los resultados de estos ensayos muestran que los tres genes de quitinasas, *ech42*, *chit33* y *chit36*, así como el gen *gluc18*, codificante de una endoglucanasa se expresan durante y después del contacto de CMU-08 y *Fusarium* sp. Además, la expresión de estos genes es mayor después del contacto con el fitopatógeno. Estos resultados, más la evidencia de microscopía electrónica, coinciden con la documentación previa de que la degradación de la pared celular y entrada al lumen del fitopatógeno por parte de *Trichoderma* spp. ocurre cuando se forman estructuras tipo apresorio o estructuras tipo papila “*papila like*” sobre las hifas del hongo blanco (Druzhinina *et al.*, 2011) .

En la literatura existen muy pocos trabajos en los que se ha evaluado la expresión de genes de quitinasa y glucanasa de *T. atroviride* durante el proceso de micoparasitismo. En un estudio realizado por Seidl *et al.* (2005) se evaluó de manera semicuantitativa la variación en la expresión de difentes genes de quitinasas, entre ellos *ech42*, en distintas condiciones de cultivo. Dicho trabajo mostró que este gen se transcribía de manera constitutiva utilizando como fuentes de carbono quitina coloidal y las paredes celulares de *R. solani*. Además, la transcripción de *ech42* es mayor cuando el teleomorfo *H. atroviridis* crecía en ausencia de *R. solani*, que en confrontación con este. También se han documentado las diferencias en la expresión de ocho genes de quitinasa del subgrupo C de *T. atroviride* utilizando paredes celulares de *B. cinerea* y *R. solani* como fuentes de carbono, en las tres etapas de interacción (antes, durante y después del contacto) con estos mismos patógenos. Los patrones de expresión en dicho análisis mostraron que los genes de las ocho quitinasas se transcribían a las 40 h de incubación empleando las paredes celulares de *B. cinerea*, y únicamente

el gen *tac6* de una de estas enzimas se transcribía en presencia de paredes celulares de *R. solani*. Sin embargo, los patrones de expresión en interacción con los patógenos indicaron que los genes evaluados se sobreexpresaban durante y después de contacto con *B. cinerea*, más no con *R. solani* (Gruber *et al.*, 2011). Estos últimos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, en los que se observó que la transcripción de los genes evaluados es mayor en estas etapas de interacción de *T. atroviride* con las cepas de fitopatógenos.

De las quitinasas que tienen las especies del género *Trichoderma*, la quitinasa *chi18-5* (*ech42*) es una de las enzimas mejor conservadas dentro del reino fúngico. Además, esta enzima es la que se encuentra mayoritariamente en extractos de cultivo inducidos con distintas fuentes de carbono. Se sabe que la transcripción de *chi18-5* se puede desencadenar mediante la presencia de productos obtenidos de la degradación de quitina, ya sean originados a partir de la degradación de quitina exógena o de lisis de la pared celular fúngica. Sin embargo, la expresión de este gen también se puede inducir durante las etapas del ataque micoparasitario (Seidl, 2008). Adicionalmente, la inducción de los genes *chi18-5*, *chi18-12* (*chi33*) y *chi18-15* (*chi36*) también está regulada por la represión catabólica de carbono, así como de la fuente e inanición de nitrógeno (Seidl *et al.*, 2005; Seidl, 2008).

Se ha propuesto que la inducción del gen *ech42* empleando las paredes celulares de *R. solani* requiere la difusión de un factor con un tamaño entre 12–90 kDa (Kullnig *et al.*, 2000). La isozima *chit36* también se expresa durante condiciones de crecimiento similares, al ser inducida por una molécula soluble mayor a los 12 kDa, la cuál es liberada directamente de las paredes celulares de *R. solani* (Viterbo *et al.*, 2002). Así, es factible que estos inductores no identificados puedan jugar un papel en la regulación transcripcional del mismo gen, en la cepa aquí estudiada. Algo que sería interesante analizar en futuros estudios. Es importante considerar que además de los factores que regulan e inducen la expresión de los genes anteriormente mencionados, puede existir una regulación epigenética. Así, la presencia de tricostatin A (TSA), un inhibidor de histona desacetilasa, en co-cultivo con *R. solani*, disminuye la expresión de *ech42* (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2018).

Uno de los pocos estudios en los que se evalúa la variación en la expresión de glucanasas es el realizado por Djonovic *et al.* (2006), quienes analizaron la expresión del gen *Tvbgn3* de *T. virens*, en cultivos sumergidos de medio mínimo Vogel con paredes celulares de *R. solani* y *Pythium ultimum*. La transcripción de este gen fue mayor en los cultivos enriquecidos con las paredes celulares de *P. ultimum* en comparación a los cultivos con paredes celulares de *R. solani*. Esto es debido a que las paredes celulares de *R. solani* son ricas en  $\beta$ -1,3-glucanos, mientras que las paredes celulares de *P. ultimum* tienen un alto contenido de  $\beta$ -1,6-glucanos. Dichos resultados, aunados a los de otros estudios y los del presente trabajo, refuerzan la observación de que existen variaciones en la transcripción de genes de *Trichoderma* spp. involucrados en el micoparasitismo de diferentes fitopatógenos, ocasionados por la variación en la composición de la pared celular de estos.

Aunque los genes de quitinasa y glucanasa en el genoma de *Trichoderma* spp. están relacionados al proceso de micoparasitismo, estas enzimas también participan de otros procesos fisiológicos, como en la ramificación de hifas, el crecimiento, la división celular y la autólisis (Langner y Göhre, 2015). Por otro lado, estrategias de análisis ómico han permitido identificar los cambios en la transcripción de genes y la presencia de proteínas durante el proceso de micoparasitismo. Así, en el análisis transcriptómico de *T. atroviride* en confrontación con *R. solani*, se encontró que la categoría de genes transcritos más enriquecida durante el contacto entre ambos hongos son los del metabolismo. Otras categorías corresponden a funciones asociadas con modificaciones postraduccionales, mecanismos de transducción de señales, producción y conversión de energía, transporte y metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y iones inorgánicos, biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios y rescate celular y defensa (Atasanova *et al.*, 2013). También, el análisis del secretoma de *T. atroviride* (T17) en cultivos enriquecidos con micelio de *G. citricarpa*, mostró que las proteínas encontradas corresponden mayoritariamente a micoparasitismo, control biológico, metabolismo y defensa de la planta (de Lima *et al.*, 2016). Con la información disponible, es evidente que el

proceso de micoparasitismo por parte de *Trichoderma* spp. es un proceso complejo en donde la participación de enzimas líticas de la pared celular y la actividad de los distintos metabolitos producidos por estas especies, hacen de *Trichoderma* un eficiente biocontrolador.

## 8. RESUMEN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que la cepa CMU-08 crece óptimamente en MMV y en PDB, lo que permite su estudio bioquímico y fisiológico en ambos medios. Además, dicha cepa antagoniza a microorganismos fitopatógenos mediante la combinación de antibiosis, producción de metabolitos volátiles y el micoparasitismo mediante ataque directo. En las condiciones evaluadas la cepa de estudio secreta metabolitos hidrosolubles y volátiles de acuerdo con el tipo de medio de cultivo, resultando en variación de inhibición en el crecimiento de los fitopatógenos.

La cepa CMU-08 presenta actividad de quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa, enzimas que participan en la degradación de la pared celular de fitopatógenos, correspondiente al estilo de vida micoparasitario.

Los ensayos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real muestran que existen variaciones en la expresión de genes codificantes de quitinasas y la glucanasa analizados en la cepa CMU-08 de *T. atroviride*, de acuerdo en el tiempo de interacción y el tipo de fitopatógeno al que se encuentra atacando.

La cepa de estudio es un candidato adecuado para la generación de productos de biocontrol. No obstante, es necesario seguir evaluando la optimización experimental de las características que hacen a dicha cepa un antagonista eficiente, incluidas la producción de metabolitos secundarios y de enzimas hidrolíticas que atacan los polisacáridos de la pared celular de los microorganismos fitopatógenos.

## 9. CONCLUSIÓN

La cepa CMU-08 de *T. atroviride* es un antagonista Nivel 1 de microorganismos fitopatógenos de fresa y aguacate del estado de Michoacán, siendo el micoparasitismo su principal mecanismo de antagonismo.

Las paredes celulares de los fitopatógenos evaluados inducen significativamente la actividad extracelular de quitinasa y glucanasa de la cepa CMU-08 en cultivo líquido, lo que sugiere que dichas actividades enzimáticas también pueden ser inducidas durante el proceso de micoparasitismo.

Los patrones de actividad de quitinasa y glucanasa extracelular de la cepa CMU-08 son distintos a los reportados para otras cepas de la misma especie y del género.

Por todo lo anterior, se acepta la hipótesis planteada.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150(7): 2029-2035.
- Agrawal T, Kotasthane AS. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*. 1(1):73.
- Anees M, Tronsmo A, Edel-Hermann V, Hjeljord LG, Héraud C, Steinberg C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*. 114(9): 691-701.
- Anita S, Ponmurugan P, Babu RG. (2012). Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of *Phomopsis* canker disease. *African Journal of Biotechnology*. 11: 10350-10357.
- Atanasova L, Le Crom S, Gruber S, Culpier F, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Druzhinina IS. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics*, 14:121.
- Atanasova L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. G. Tuohy (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Heidelberg, Elsevier. pp. 25-40.
- Bae H, Roberts DP, Lim HS, Strem MD, Park SC, Ryu CM, Melnick RL, Bailey BA. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24(3): 336-351.
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Crozier J, Thomas SE, Samuels GJ, Holmes KA. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 46(1): 24-35.
- Barros-Filizola PR, Cavalcanti-Luna MA, de Souza AF, Coelho IL, Laranjeira D, Campos-Takaki GM. (2019). Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. *Microbial Cell Factories*. 18(1): 89. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1108-y>.
- Benítez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.
- Berini F, Katz C, Gruzdev N, Casartelli M, Tettamanti G, Marinelli F. (2018). Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances*. 36(3): 818-838.
- Bissett J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*. 6: 263-295.
- Błaszczyk L, Basinska-Barczak A, Cwiek-Kupczynska H, Gromadzka K, Popiel D, Stepień, L. (2017). Suppressive effect of *Trichoderma* spp. on toxigenic *Fusarium* species. *Polish Journal of Microbiology*. 66(1): 85-101.
- Brunner K, Peterbauer CK, Mach RL, Lorito M, Zeilinger S, Kubicek CP. (2003). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for

- chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current genetics*. 43(4): 289-295.
- Bull AT. (2010). The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37(10): 993-1021.
- Carreras-Villaseñor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella AH. (2012). *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*. 158 (1): 3-16.
- Carsolio C, Gutiérrez A, Jiménez B, Van Montagu M, Herrera-Estrella A. (1994). Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(23): 10903-10907.
- Celestino KRS, Cunha RB, Felix CR. (2006). Characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry*. 7(1): 23.
- Chakraborty MR, Chatterjee NC. (2008). Control of *Fusarium* wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. *Biologia Plantarum*. 52(3): 582-586.
- Chavan SB, Deshpande MV. (2013). Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnology Progress*. 29: 833-846.
- Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107(3): 558-590.
- Chen LL, Liu LJ, Shi M, Song XY, Zheng CY, Chen XL, Zhang YZ. (2009). Characterization and gene cloning of a novel serine protease with nematocidal activity from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2. *FEMS Microbiology Letters*. 299: 135-142.
- Chen K, Zhuang WY. (2016). *Trichoderma shennongjianum* and *Trichoderma tibetense*, two new soil-inhabiting species in the Strictipile clade. *Mycoscience*. 57(5): 311–319.
- Chilosi G, Aleandri MP, Luccioli E, Stazi SR, Marabottini R, Morales-Rodríguez C, Vettriano AM, Vannini A. (2020). Suppression of soil-borne plant pathogens in growing media amended with espresso spent coffee grounds as a carrier of *Trichoderma* spp. *Scientia Horticulturae*. 259: 108666. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108666>.
- Cortés C, Gutiérrez A, Olmedo V, Inbar J, Chet I, Herrera-Estrella A. (1998). The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. *Molecular Genetics and Genomics* 260: 218–225
- Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience*. 13(4): 1240-1249.
- 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.
- de las Mercedes D, Limón MC, Mejías R, Mach RL, Benítez T, Pintor-Toro JA, Kubicek CP. (2001). Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*. 38: 335-342.
- De Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A. (2018). Suppression of soil-borne pathogens in container media amended with on-farm composted agro-bioenergy

- wastes and residues under glasshouse condition. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 125(2): 213-226.
- Diáñez-Martínez F, Santos M, Carretero F, Marín F. (2016). *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96(6): 1934-1944.
- Díaz G, Córcoles AI, Asencio AD, Torres MP. (2013). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novoulmi*. *Forest Pathology*. 43(1): 51-58.
- Dieleman H. (2016). Urban agriculture in Mexico City: balancing between ecological, economic, social and symbolic value. *Journal of Cleaner Production*. 163:S156-S163.
- Djonović S, Pozo MJ, Kenerley, CM. (2006). Tvbn3, a  $\beta$ -1, 6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(12): 7661-7670.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*. 9(10): 749–759.
- Druzhinina IS, Shelest E, Kubicek CP. (2012). Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters*. 337:1-9.
- Dubey MK, Broberg A, Sooriyaarachchi S, Ubhayasekera W, Jensen DF, Karlsson M. (2013). The glyoxylate cycle is involved in pleiotropic phenotypes, antagonism and induction of plant defence responses in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride*. *Fungal Genetics and Biology*. 58: 33-41.
- El-Hasan A, Walker F, Schöne J, Buchenauer H. (2007). Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 114(2): 62-68.
- El-Katatny M, Gudelj M, Robra KH, Elnaghy M, Gübitz G. (2001). Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56(1-2): 137-143.
- El Komy MH, Saleh AA, Eranthodi A, Molan YY. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium Wilt*. *The Plant Pathology Journal*. 31(1): 50–60. doi:10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087
- Espinoza-Gallardo D, Contreras-Porcía L, Ehrenfeld N. (2017).  $\beta$ -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 52(1): 33-49.
- FAO. García Z. 2006. Agricultura, expansión del comercio y equidad de género. <http://www.fao.org/3/a-a0493s.pdf>
- FAO. 2018. Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta. <http://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/>
- FAO. 2020. <https://www.who.int/topics/pesticides/en/>. Accesado el 25 de febrero del 2020.

- Fernández-Pavía SP, Gregorio-Cipriano R, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Mondragón-Flores A, Gómez-Dorantes N, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Fernández R, Herrera-Camacho J. (2015). Enfermedades de especies vegetales en México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Friedl MA, Kubicek CP, Druzhinina IS. (2008). Carbon source dependence of conidiation and its photostimulation in *Hypocrea atroviridis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 245-250.
- Fungicide Resistance Action Committee. 2019. Fungicides sorted by mode of action.  
[https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019-finale0af2a2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?Status=Temp&sfvrsn=7d8c489a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019-finale0af2a2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?Status=Temp&sfvrsn=7d8c489a_2)
- Fungicide Resistance Action Committee. 2019. Pathogen risk list.  
<https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>
- Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC, Barbosa ET, Rodrigues AR, Brandão RS, Ulhoa CJ, Junior ML. (2013). Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*. 67(3): 308-316.
- Giorno L, Drioli E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in Biotechnology*. 18(8): 339-349.
- Gómez-Rodríguez EY, Uresti-Rivera EE, Patrón-Soberano OA, Islas-Osuna MA, Flores-Martínez A, Riego-Ruiz L, Rosales-Saavedra MT, Casas-Flores S. (2018). Histone acetyltransferase TGF-1 regulates *Trichoderma atroviride* secondary metabolism and mycoparasitism. *PloS one*. 13(4): e0193872.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193872>
- González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, Miranda I, Peteira B. (2012). Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Biotecnología Aplicada*. 29(1): 12-16.
- Grigorevski-Lima AL; de Oliveira MMQ, do Nascimento RP, da Silva Bon EP, Coelho RRR. (2013). Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169(4): 1373-1385.
- Gruber S, Vaaje-Kolstad G, Matarese F, López-Mondéjar R, Kubicek CP, Seidl-Seiboth V. (2011). Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. *Glycobiology*. 21:122-133.
- Gruber S, Seidl-Seiboth V. (2012). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*. 158: 26-34.
- Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Lanzuise S, Lorito M. (2014). Enzyme activity of extracellular protein induced in *Trichoderma asperellum* and *T. longibrachiatum* by substrates based on *Agaricus bisporus* and *Phymatotrichopsis omnivora*. *Fungal Biology*. 118: 211-221.
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, Javed S. (2013). Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 5(1): 21.

- Harman GE, Kubicek CP. (2014). *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor and Francis. DOI:
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509-547.
- Hjeljord LG, Stensvand A, Tronsmo A. (2001). Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 91(12): 1172-1180.
- Hjeljord LG, Tronsmo A. (2003). Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. *Phytopathology*. 93:1593-1598.
- Ihrmark K, Asmail N, Ubhayasekera W, Melin P, Stenlid J, Karlsson M. (2010). Comparative molecular evolution of *Trichoderma* chitinases in response to mycoparasitic interactions. *Evolutionary Bioinformatics*. 6: EBO-S4198. <https://doi.org/10.4137/EBO.S4198>
- INEGI. 2014. Perspectiva estadística: Michoacán de Ocampo. [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estd\\_perspect/sep\\_2014/mich/702825\\_064402.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estd_perspect/sep_2014/mich/702825_064402.pdf)
- Jackson AM, Whipps JM, Lynch JM. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 7: 494-501.
- Jácome AG, del Almo Rodríguez S. (1999). Agricultura y Sociedad en México: diversidad, enfoques, estudios de caso. México: *Progreso*. 156-333.
- Juturu V, Wu JC. (2012). Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30: 1219-1227.
- Karimi K, Ahari AB, Arzanlou M, Amini J, Pertot I. (2017). Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 124(5): 453-466.
- Kaur J, Munshi GD, Singh RS, Koch E. (2005). Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*. 153: 274-279.
- Kim TG, Knudsen GR. (2013). Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *psi*. *Applied Soil Ecology*. 68: 57-60.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(4): 345-351.
- Knudsen IMB, Hockenull J, Jensen DF, Gerhardson B, Hökeberg M, Tahvonen R, Teperi E, Sundheim L, Henriksen B. (1997). Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *European Journal of Plant Pathology*. 103(9): 775-784.
- Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*. 41(1): 37-42.
- Kredics L, Manczinger L, Antal Z, Péntes Z, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. (2004). In vitro water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular

- enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal of Applied Microbiology*. 96(3): 491-498.
- Kubicek CP. (1981). Release of carboxymethyl-cellulase and  $\beta$ -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 13(4): 226-231.
- Kubicek CP, Druzhinina IS. (2014). *Trichoderma*: genomic aspects of mycoparasitism and biomass degradation. In B. A. Horwitz et al. (eds.), *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*, *Soil Biology* 36. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 127-156.
- Kuhad RC, Gupta R, Singh A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*. 2011: 1-10.
- Kullnig C, Mach RL, Lorito M, Kubicek CP. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5): 2232-2234.
- Lange C, Weld RJ, Cox MP, Bradshaw RE, McLean KL, Stewart A, Steyaert JM. (2016). Genome-scale investigation of phenotypically distinct but nearly clonal *Trichoderma* strains. *PeerJ*. 4: e2023.
- Langner T, Göhre V. (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current Genetics*. 62:(2), 243-254.
- Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66(2): 279-290.
- Leeder AC, Palma-Guerrero J, Glass NL (2011). The social network: deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*. 9(6): 440-451.
- Macías-Rodríguez L, Guzmán-Gómez A, García-Juárez P, Contreras-Cornejo HA. (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>.
- Mouyna I, Hartl L, Latgé JP. (2013).  $\beta$ -1, 3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*. 4:81. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00081>
- de Lima FB, Félix C, Osório N, Alves A, Vitorino R, Domingues P, Esteves AC. (2016). Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa*. *Biological Control*. 99: 38-46.
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M, Kenerley CM. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*. 51: 105-129.
- Naher L, Yusuf UK, Siddiquee S, Ferdous J, Rahman MA. (2012). Effect of media on growth and antagonistic activity of selected *Trichoderma* strains against *Ganoderma*. *African Journal of Microbiology Research*. 6(48): 7449-7453.
- Nagpure A, Choudhary B, Gupta RK. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology*. 34: 215-232.
- Nath VS, John NS, Anjanadevi IP, Hegde VM, Jeeva ML, Misra RS, Veena SS. (2014). Characterization of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Phytophthora*

- colocasiae* associated with leaf blight of taro. *Annals of Microbiology*. 64(4): 1513-1522.
- Nawaz K, Shahid AA, Bengyella L, Subhani MN, Ali M, Anwar W, Iftikhar S, Ali S W. (2018). Diversity of *Trichoderma* species in chili rhizosphere that promote vigor and antagonism against virulent *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*. 239: 242-252.
- Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*. 4: 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>.
- Olmedo-Monfil V, Casas-Flores S. (2014). Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina, M.G. Tuohy (Editors). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Heidelberg, Elsevier. pp. 429-453.
- Omann MR, Lehner S, Rodríguez CE, Brunner K, Zeilinger S. (2012). The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. *Microbiology*. 158(1): 107-118.
- Ortíz-Paniagua CF, Chávez JCLN. (2018). Michoacán y el cambio ambiental global: especialización relativa y vulnerabilidad agrícolas. *Cimexus*. 13(1): 161-181.
- Ortíz-Paniagua CF, Infante-Jiménez ZT, Gómez PO. (2018). Competitividad agrícola de los municipios de Michoacán. *Commercium PLUS*. 1(2): 1-28.
- Osorio Torres, C. (2014). La productividad total de los factores: la agricultura en México antes y después del Tratado de Libre Comercio con América del Norte. Una transición a la economía agrícola verde. (Disertación doctoral, Universidad Iberoamericana Puebla).
- Özkara A, Akyıl D, Konuk M. (2016). Pesticides, environmental pollution, and health. In M. Larramendy and S. Soloneski (Editors), Environmental health risk-hazardous factors to living species. IntechOpen. eBook (PDF) ISBN: 978-953-51-5435-8. 25 pp.
- Pastirčáková, K. (2019). *In vitro* interactions between *Trichoderma harzianum* and pathogenic fungi damaging horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum*) leaves and fruits. *Biological Letters*. 54(1): 21-35.
- Pontón J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25(2): 78-82.
- Price CL, Parker JE, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. 2015. Azole fungicides—understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science*. 71(8): 1054-1058.
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Fischer R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 566-571.
- Qin WT, Zhuang WY. (2016). Four new species of *Trichoderma* with hyaline ascospores from central China. *Mycological Progress*. 15(8): 811-825.
- Qualhato TF, Lopes F AC, Steindorff AS, Brandao RS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 35(9): 1461-1468.

- Rathore, AS, Gupta RD. 2015. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. *Enzyme Research*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/791907>
- Ruiz-Herrera J, León C, Carabez-Trejo A., Reyes-Salinas E. (1996). Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*. 20: 133-142.
- SAGARPA, 2018. Agricultura principal actividad del sector en el Estado: Sagarpa Michoacán. <https://www.gob.mx/agricultura/michoacan/es/articulos/agricultura-principal-actividad-del-sector-en-el-estado-sagarpa-michoacan?idiom=es>
- Samuels GJ. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96(2): 195-206.
- Sánchez, E.T., Cota, H.C. (2006). Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas. Disponible en: [http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe\\_2006/1038967/21\\_c17.pdf](http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/1038967/21_c17.pdf)
- Sánchez, A. D., Ousset, M. J., Sosa, M. C. (2019). Biological control of *Phytophthora* collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. *Biological Control*. 135: 124-134.
- Sarma BK, Yadav SK, Patel JS, Singh HB. (2014). Molecular mechanisms of interactions of *Trichoderma* with other fungal species. *Open Mycology Journal*. 8:140-147.
- Savary S, Ficke A, Aubertot JN, Hollier C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*. 4:519–537.
- Schmoll M, Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella A. (2010). *Trichoderma* in the light of day—physiology and development. *Fungal Genetics and Biology*. 47(11): 909-916.
- Schmoll M, Dattenböck C, Carreras-Villaseñor N, Mendoza-Mendoza et al. (2016). The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80: 205-327.
- Schubert M, Fink S, Schwarze F. W. (2008a). Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control*. 45(1): 111-123.
- Schubert, M., Fink, S., Schwarze, F. W. (2008b). *In vitro* screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. *Arboricultural Journal*. 31(4); 227-248.
- Schuster A, Schmoll M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(3): 787-799.
- Schwarze, F. W., Jauss, F., Spencer, C., Hallam, C., Schubert, M. (2012). Evaluation of an antagonistic *Trichoderma* strain for reducing the rate of wood decomposition by the white rot fungus *Phellinus noxius*. *Biological Control*. 61(2): 160-168.
- Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP. 2005. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 272(22): 5923-5939.

- Seidl V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*. 22(1): 36-42.
- Seidl V, Song L, Lindquist E, Gruber S, Koptchinskiy A, et al. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the close presence of a fungal prey. *BMC Genomics*. 10: 567.
- SIAP (2017b). Infonografía Agroalimentaria 2017. SAGARPA. México. 52p.
- Sidhu, M. S., & Sandhu, D. K. (1984). Production and localization of  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma harzianum* and some aspects of catabolite repression. *Canadian Journal of Microbiology*. 30(11): 1377-1382.
- Sandhu, D. K., & Sidhu, M. S. (1985). Production, localization and glucose repression of  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Basic Microbiology*. 25(9): 591-598.
- Souza PMD, Bittencourt MLD, Caprara CC, Freitas, et al. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46. 337-346.
- Stenberg JA, Heil M, Åhman I, Björkman C. 2015. Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. *Trends in Plant Science*. 20(11): 698-712.
- Steyaert JM, Weld RJ, Mendoza-Mendoza A, Stewart A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*. 156: 2887-2900.
- Steyaert J, Hicks E, Kandula J, Kandula D, Alizadeh H, Braithwaite M, Yardley J, Mendoza-Mendoza A. (2016). Methods for the evaluation of the bioactivity and biocontrol potential of species of *Trichoderma*. In TR Glare, ME Moran-Diez (editors), *Microbial-based biopesticides: methods and protocols*. Humana Press, New York, NY. pp. 23–35.
- Strakowska J, Błaszczuk L, Chełkowski J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *Journal of Basic Microbiology*. 54(1): 2-13.
- Sunpapao A, Chairin T, Ito SI. (2018). The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. *Biological Control*. 123: 36-42.
- Tchameni SN, Sameza ML, O'donovan A, Fokom R, Mangaptche Ngonkeu EL, Wakam Nana L, Etoa FX, Nwaga D. (2017). Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora megakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. *Mycology*. 8(2): 84-92.
- United States Environmental Protection Agency. (2020). What is a pesticide? US Environmental Protection Agency, Washington, DC. <https://www.epa.gov/minimum-risk-pesticides/what-pesticide>. Accesado el 25 de febrero del 2020.
- Viterbo A, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A, Chet I. (2002). Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics*. 42: 114–122.
- Vega S. 1985. Toxicología I: evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS. OMS. 69 pp.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(1):1-10.

- Viterbo A, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A. Chet I. (2002). Expression regulation of the endoquininase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics*. 42: 114-122.
- Wang Q, Chen L, Yu D, Lin H, Shen Q, Zhao Y. (2017). Excellent waste biomass-degrading performance of *Trichoderma asperellum* T-1 during submerged fermentation. *Science of The Total Environment*. 609: 1329-1339.
- Whipps JM. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*. 107: 127–142.
- Wheatley R, Hackett C, Bruce A, Kundzewicz A. (1997). Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 39(2-3): 199-205.