

CARACTERIZACIÓN CEPAS DE *Trichoderma* AISLADAS DE SUELOS DE JUJUY-ARGENTINA

CHARACTERISATION OF *Trichoderma* STRAINS ISOLATED IN JUJUY-ARGENTINA SOILS

Susana E. Álvarez^{1*}, Marcelo R. Benítez Ahrendts¹ y Marta G. Yasem de Romero²

¹Facultad de Ciencias Agrarias de la UNJu. ²Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria de la UNT

*Autor para correspondencia:
salvarez@fca.unju.edu.ar

Período de Publicación:
Diciembre 2023

Historial:
Recibido: 03/11/2023
Aceptado: 30/11/2023

RESUMEN

La compleja taxonomía del género *Trichoderma* plantea la utilización de técnicas complementarias, basadas en caracteres morfológicos de especie, moleculares y de compatibilidad vegetativa. Son objetivos del presente trabajo caracterizar tres cepas de *Trichoderma*: T1, T15 aisladas de muestras de suelo de la Depto. Yavi y T16 del Dpto. Tumbaya, provincia de Jujuy. Se realizaron tres repeticiones/caja de cada cepa, en Agar Papa Glucosado (APG 2%) y Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) para la caracterización y determinación del radio de colonia; a partir de cultivos de 96 h en SNA se realizó montajes en KOH 3% y observación microscópica para la descripción micromorfológica. La caracterización molecular implicó la extracción del ADN utilizando el kit Easy Pure[®] Genomic DNA Kit (EE 101), amplificación por PCR de la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico; los productos fueron secuenciados utilizando el servicio de MacroGen Korea. Se utilizó el programa Geneious 9.1.5 para el análisis, contrastando las secuencias con la base de datos moleculares del National Center for Biotechnology Information-NCBI mediante TrichoBLAST. Se utilizó TNT y MEGAS 6 para análisis filogenético. La evaluación de combatividad vegetativa entre las cepas incluyó una cepa de referencia T72 caracterizada como *Trichoderma harzianum*. Se realizaron tres réplicas en PDA 2% de cada combinación de cepas enfrentadas, las que se incubaron a 28°C durante 72 h, la compatibilidad se determinó mediante indicadores de compatibilidad/incompatibilidad. La caracterización morfológica determinó que las tres cepas pertenecen al clado Viridie especie *Trichoderma asperellum*, lo cual guarda correspondencia con la caracterización molecular donde: T1 *Trichoderma asperelloides*/T. *asperellum* y T15 y T16 *Trichoderma asperelloides*. Las tres cepas evidenciaron compatibilidad vegetativa, resultando incompatibles con la cepa de referencia. Las técnicas aplicadas permitieron caracterizar las cepas, aspecto relevante para avanzar en el desarrollo de productos biotecnológicos de uso agrícola.

Palabras clave: taxonomía, micro morfología, filogenia

SUMMARY

The complex taxonomy of the genus *Trichoderma* suggests the use of complementary techniques, based on morphological and molecular characteristics of the species and vegetative compatibility. The objectives of this work are to characterize three strains of *Trichoderma*: T1, T15 isolated from soil samples from Yavi department and T16 from Tumbaya department, Jujuy province. Three repetitions/box of each strain were performed on Glucosated Potato Agar (APG 2%) and Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) for characterization and determination of the colony radius; from 96 h cultures in SNA, mounts were carried out in 3% KOH and microscopic observation for micromorphological description. Molecular characterization involved DNA extraction by means of the Easy PureR Genomic DNA Kit (EE 101), PCR amplification of the ITS1-5,8S-ITS2 region of ribosomal DNA; The products were sequenced using the Macrogen Korea service. The Geneious 9.1.5 program was used for the analysis, contrasting the sequences with the molecular database of the National Center for Biotechnology Information-NCBI using TrichoBLAST. TNT and MEGAS 6 were used for phylogenetic analysis. The evaluation of vegetative combativity between the strains included a reference strain T72 characterized as *Trichoderma harzianum*. Three replicates were carried out in 2% PDA of each combination of opposing strains, which were incubated at 28°C for 72 h, compatibility was determined by means of compatibility/incompatibility indicators. The morphological characterization determined that the three strains belong to the Viridie clade species *Trichoderma asperellum*, which corresponds to the molecular characterization where: T1 *Trichoderma asperelloides*/T. *asperellum* and T15 and T16 *Trichoderma asperelloides*. The three strains showed vegetative compatibility, being incompatible with the reference strain. The applied techniques allowed the strains characterization, a relevant aspect to advance the development of biotechnological products for agricultural use.

Keywords: micro morphology, phylogeny, taxonomy

INTRODUCCIÓN

Trichoderma es un género de los ascomicetes orden Hypocreales, familia Hypocreaceae (Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreales, Hypocreaceae). El teleomorfo ha sido clasificado en los géneros *Hypocrea*, *Aphysiostroma*, *Creopus*, *Chromocrea*, *Podostroma* y *Sarawakus* (Samuels & Hebbbar, 2015). Estos géneros se consideran actualmente sinónimos de *Trichoderma* (Jaklitsch y Voglmayr, 2013, 2015; Rossman *et al.*, 2013). El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794 y posteriormente Rifai lo revisó proponiendo nueve especies agregadas (Persoon, 1794; Rifai, 1969) *T. piluliferum* Webster y Rifai, *T. polysporum* (Link ex Pers) Rifai, *T. hamatum* (Bon) Bain, *T. koningii* Rifai, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai y *T. viride* Pers ex S. F Gray. Bissett reexaminó los criterios de Rifai y definió cinco secciones: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Pachybasium* e *Hypocreanum* (Bissett, 1984; 1991a; 1991b; 1991c). Su estudio se basó en la taxonomía tradicional. En la actualidad, la taxonomía basada en caracteres morfológicos no permite una identificación acabada de las especies del género, por lo que la introducción de técnicas moleculares resulta fundamental en estudios a nivel inter específico y, combinadas con criterios morfológicos, conducen a la reubicación

de algunas especies, la definición de otras nuevas y/o conectar fases anamorfos con su teleomorfo. En este sentido, la Reacción en Cadena de la Polimerasa y la secuenciación específicamente de las regiones ITS1 e ITS2 y del factor de elongación, facilitan la identificación del aislamiento al ser comparadas con secuencias depositadas en NCBI GenBank y TrichoBlast. En la actualidad el sitio web oficial que presenta las actualizaciones en cuanto a la taxonomía y estudios vinculados al género, se corresponde al de la Subcomisión Internacional sobre Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea* (<https://trichoderma.info/>). Es notable el incremento de especies de *Trichoderma*, pasando de nueve especies a más de 100 en 2006 (Druzhinina, Kopchinskiy & Kubicek, 2006), a 254 especies en 2015 (Bissett *et al.*, 2015) y a 464 en 2023 (ICTT: <https://trichoderma.info/>).

La compatibilidad somática o vegetativa evidencia la existencia o no de variabilidad genética entre aislados de una misma especie de hongo, cepas con cercanía genética muestran patrones similares de compatibilidad (Galdames, 2001). La compatibilidad entre aislados de *Trichoderma* se trató de demostrar sobre la base que las células vegetativas, posiblemente basado en la cantidad de núcleos que poseen estas (Samuels, Petrini, Kuhls, Lieckfeldt & Kubicek 1998), pueden formar heterocarión entre varias especies por medio de la anastomosis hifal, fusión de protoplastos o las transferencias nucleares (Barcellos, Hungria & Pizzirani-Kleiner, 2011). Precisamente por esto, la compatibilidad vegetativa permite evaluar las relaciones genéticas entre especies y/o cepas, y es un marcador útil para mostrar diversidad o variabilidad genética en diferentes especies de hongos (Ortuño & Miranda, 2013; Moo Koh, Alejo, Ramírez, Suárez, Angulo & Islas- Flores, 2018).

Debido a la importancia del género y la complejidad para su identificación hasta nivel de especie, surge la necesidad de abordar su taxonomía con un enfoque amplio, teniendo en cuenta en el presente trabajo los aspectos morfológicos, compatibilidad vegetativa y molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como resultado del trabajo de Sivila *et al.* (2017), se aislaron 23 cepas locales de *Trichoderma* de suelos agrícolas de Jujuy, y evaluaron *in vitro* frente a *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Sclerotium sp.* La caracterización propuesta en el presente trabajo se realizó seleccionando las tres cepas con mejor respuesta antagonista (Tabla N°1).

Tabla 1: Código y procedencia de cepas de *Trichoderma sp.* a caracterizar

Código cepa	Procedencia (Desde muestras de suelo)	Geo-referenciación	Lote/productor
T1	Comunidad Aborigen Hornaditas de la Cordillera Dpto. Yavi-Puna	S 22° 29' 42,35", O 65° 22' 45,30", 3945 msnm	Don Jacinto Torres
T15	Comunidad Aborigen Hornaditas de la Cordillera Dpto. Yavi-Puna	S 22° 29' 42,90", O 65° 22' 51,06", 3934 msnm	Don Rufino Fidencio Torres
T16	Comunidad Aborigen de Punta Corral Dpto. Tumbaya-Quebrada	S 23° 51' 10", -O 65° 27' 58", 2099 msnm	Don Jorge Vilca

1. Caracterización de cepas de *Trichoderma sp.*

Las cepas T1, T15 y T16 conservadas en tubos con APG 2% a 4°C en el cepario de la cátedra de Fitopatología de la FCA-UNJu, se reactivaron sobre el mismo medio de cultivo. A partir de cultivos

puros de 4 días se realizaron tres repeticiones/caja de las cepas, en función del medio de cultivo y temperatura de incubación, usando cajas Petri de 9 cm de diámetro con 20 ml de los medios de cultivo Agar Papa Glucosado (APG 2%) y Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA). La caracterización de colonias y micromorfología se realizó de acuerdo a lo propuesto Samuels & Hebbbar (2015):

a) Características de las colonias y micromorfología

Radio de la colonia. Con un sacabocado estéril se cortaron discos de 3 a 5 mm de diámetro del borde de crecimiento activo de colonias de 3 a 4 días de edad en SNA (o antes de la conidiación). Un disco se colocó con el lado del micelio hacia abajo 10-15 mm desde el borde de la placa Petri. Las placas se incubaron en oscuridad con la superficie de la colonia hacia arriba. El radio, expresado en milímetros, representa la mayor longitud de la colonia medida desde el exterior del disco de inóculo hasta el punto de crecimiento más distante. Esto se repitió tres veces obteniéndose los valores medios.

Características de la colonia. Los caracteres de las colonias y los patrones de conidiación se determinaron a partir de colonias incubadas 7 días a 25°C con un régimen de 12 h luz/oscuridad. Los caracteres incluyen distribución de conidios en colonias en PDA 2% y SNA, presencia de pigmentación en el reverso de colonia (generalmente amarillo cuando está presente), color de los conidios y presencia de olor a coco en PDA 2% (6-pentil-Ci-pirona, 6-PAP).

Micromorfología. Se partió de cultivos en SNA incubados a 25 °C con alternancia de 12 h luz/oscuridad de 96 h. El montaje para microscopía se realizó en KOH 3% (acuoso), con lo cual se obtienen preparados planos. Se utilizó un microscopio Marca EAKINS acoplado a cámara digital genérica de 51mp y anexada a un equipo informático con software S-EYE 1.4.7.558 del 2017. Todas las mediciones se redujeron a valores medios, producto de un mínimo de 30 mediciones individuales.

2. Caracterización molecular

A partir de cultivos de siete días en medio líquido extracto de malta 1,27% (p/v), se realizó la extracción de ADN utilizando el kit Easy Pure[®] Genomic DNA Kit (EE 101) de la empresa Transgen Biotech Co., LTD siguiendo las indicaciones del fabricante. Se amplificó la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* (1990). La PCR se realizó en un volumen final de 20 ul conteniendo Buffer 1X, cloruro de magnesio 2,5 Mm, dNTPs 200 uM, picoM de cada cebador, Taq polimerasa 0,5 U, utilizando un ciclado compuesto por una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C y 35 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s a 52°C y 40 s a 72 °C, con una extensión final de 4 min a 72°C. Para lo cual se utilizó un termociclador Hangzhou Bioer Technology CO (GeneProThermal Cyler, modelo TC-E-48D, B-48D). Los productos amplificados fueron evaluados en geles de agarosa al 1,5% y secuenciados utilizando el servicio de Macrogen (Korea). Posteriormente fueron analizados con el programa Geneious 9.1.5 (Kearse *et al.*, 2012). Las secuencias fueron contrastadas contra la base de datos moleculares del National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando la herramienta BLASTn y la base de datos molecular secundaria del TrichoKey (<http://www.isth.info/tools/molkey/>), utilizando la herramienta TrichoBLAST.

Cebadores utilizados (White *et al.*, 1990)

Nombre	Secuencia	Tm	Longitud
ITS1 (S)	5'-TCCgTAggTgAACCTgCgg	64.48	19
ITS4 (As)	5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC	58.35	20

S: sentido; As: antisentido

Para la determinación de la relación filogenética de las cepas, las secuencias se analizaron usando MEGA6, BLASn, BioEdit y CLUSTAL W, antes de la construcción del árbol. El análisis filogenético fue llevado a cabo usando el programa TNT y MEGAS 6. En ambos casos los gaps (indels) fueron tratados como un quinto estado ya que representan eventos de inserción-delección. El análisis de secuencias (10) en la base de datos del NCBI incluyó *T. asperelloides* y *Aspergillus flavus* (KX463034) como outgroups o grupo externo. El set de datos fue reducido, en la búsqueda heurística, se implementó 100RAS, guardando un árbol TBR. Para evaluar el soporte de la identificación de grupos, se realizaron análisis de parsimonia de Jack-knifing y bootstrap. El análisis de Jack-knife incluye 1000 matrices remuestreadas. Se realizó 100 ciclos de RAS+TBR para TNT. Con MEGA se utilizó el Maximun Likelihood y el modelo que permite inferir el análisis filogenético (Jukes y Cantor, 1969).

3. Compatibilidad vegetativa

La compatibilidad vegetativa entre las cepas se evaluó siguiendo la metodología descrita por Moo Koh *et al.* (2018), empleando la cepa de referencia T72: *T. harzianum* conservada en el cepario de la cátedra de Fitopatología. Se realizaron tres réplicas de cada combinación de enfrentamiento entre cepas. Para ello, un disco de colonia de 5 mm de diámetro de una cepa, se sembró frente a otro a una distancia de 70 mm, en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio PDA 2%. Posteriormente, las placas se incubaron bajo oscuridad constante a 28°C y se evaluaron a las 72 h. La evaluación de las interacciones se realizó macroscópicamente y la compatibilidad de los aislamientos se determinó, según el tipo de reacción entre ellos: 1) Incompatible: formación de una línea sin crecimiento evidente en la zona de contacto entre las colonias, normalmente coloreada o pigmentada o cuando un aislado sobrecrece al otro; 2) Compatible: no se observa formación de línea en la zona de interacción después del contacto entre las colonias, aparentando una sola colonia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización macro y microscópica

Los aislados de *Trichoderma* mostraron las siguientes características generales: rápido crecimiento con formación de pústulas tanto en el medio SNA como APG 2%, sin producción de pigmentos amarillos u olor particular. Las tres cepas presentaron hifas hialinas septadas, conidióforos hialinos del tipo piramidal, presencia de fiálides langeriformes y ampuliformes de acuerdo a la disposición de las mismas en el conidióforo, conidios verdes ovalados a globosos, con una tenue ornamentación (aumento 1000X), al quinto día se observó el desarrollo de clamidosporas. De acuerdo a las características macro y micro morfológicas las tres cepas se ubican en el Clado Viride. No obstante, los aislados entre sí, presentaron diferencias, evidenciándose variabilidad (Tabla N° 2).

Tabla 2: Parámetros macro y micro morfológicos de las cepas de *Trichoderma*.

Parámetro/Cepas	T1		T15		T16	
	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
Temp. de incubación	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C
Radio de colonia (promedio en mm) SNA (*)	46	14	45	16.7	43.3	13.7
Radio de colonia (promedio en mm) APA (*)	62.7	17.3	64.7	23	63.3	21
Pigmentación SNA (**)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Pigmentación APG (**)	(-)	Borde ocre	(-)	Borde ocre	(-)	Borde ocre
Olor SNA (**)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Olor APG (**)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Pústulas SNA (**)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Pústulas APG (**) Tapizan rápidamente la superficie de la caja de Petri de 90mm	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Dimensión de conidios (promedio en μm) (***)	Ancho 2.9 Largo 3.4 L/W: 1.2		Ancho 2.6 Largo 3.3 L/W: 1.2		Ancho 2.5 Largo 3.3 L/W: 1.2	
Morfología/ Ornament. conidial (***)	Elipsoidales a oblongos		Elipsoidales a oblongos		Elipsoidales a oblongos	
Tipo de ramificación de conidióforos (***)	Piramidal		Piramidal		Piramidal	
Pelos estériles (***)	Ausentes		Ausentes		Ausentes	
Disposición de fiálides (***)	Verticilos de 2-3 fiálides, a veces solitarias		Verticilos de 3 y 4 fiálides		Verticilos de 2,3 y 4 fiálides	
Forma de fiálides (***)	Fiálides langeriformes y ampuliformes integradas		Fiálides langeriformes y ampuliformes integradas		Fiálides langeriformes y ampuliformes integradas	
Dimensión de fiálides Langeriforme (predom.) (promedio en μm) (***)	Ancho 2.3 Largo 8.4 L/W: 3.6		Ancho 2.6 Largo 8.5 L/W: 3.2		Ancho 2.9 Largo 8.6 L/W: 2.9	
Ancho de célula soporte de fiálide (promedio en μm) (***)	2.9		2.6		2.8	
Relación entre el largo de la fiálide y ancho de célula soporte (***)	2.9		3.2		3.0	
Relación entre el ancho de la fiálide y ancho de célula soporte (***)	0.8		1		1	
Dimensión y forma de clamidosporas (promedio en μm) (****)	10.3 x 9.9 Solitarias subglobosas terminales		11.0 x 9.24 Solitarias subglobosas terminales		9.2 x 8.4 Solitarias subglobosas terminales	

(*) Cultivos de 4 días; (**) Cultivos de 7 días; (***) Observaciones a partir de cultivos de 4 días a 25 °C en SNA; (****) Presentes en cultivos de 5° días a 25 °C en SNA.

De acuerdo a las características culturales y la micromorfología, las tres cepas presentan características comunes a las descritas para la especie *T. asperellum*. Sobre esta especie Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (1999) sostienen evidencias de que dos especies diferentes fueron llamadas *T. viride*, una de las cuales es el estado asexual de *Hypocrea rufa* y la otra correspondía a una especie no descrita. En su trabajo se describe una especie *T. viride* "real" y a la otra especie se le asigna la denominación de *T. asperellum*. La nueva especie se distingue de *T. viride* por una ornamentación conidial más fina, conidios ligeramente ovoides, una tasa de crecimiento más rápida, ramificaciones generalmente de a pares, fiálides langeriformes principalmente donde hay mayor distancia entre ramas fértiles, y cuando ésta es corta tiene forma ampuliforme y presencia constante de clamidosporas Samuels & Hebbbar (2015). Samuels et al. (2009, 2010 y 2015) describen los caracteres morfológicos de *T. asperellum*, correspondiendo a las observadas en T1, T15 y T16 (Tabla N° 2 y Figuras N° 1, 2 y 3).

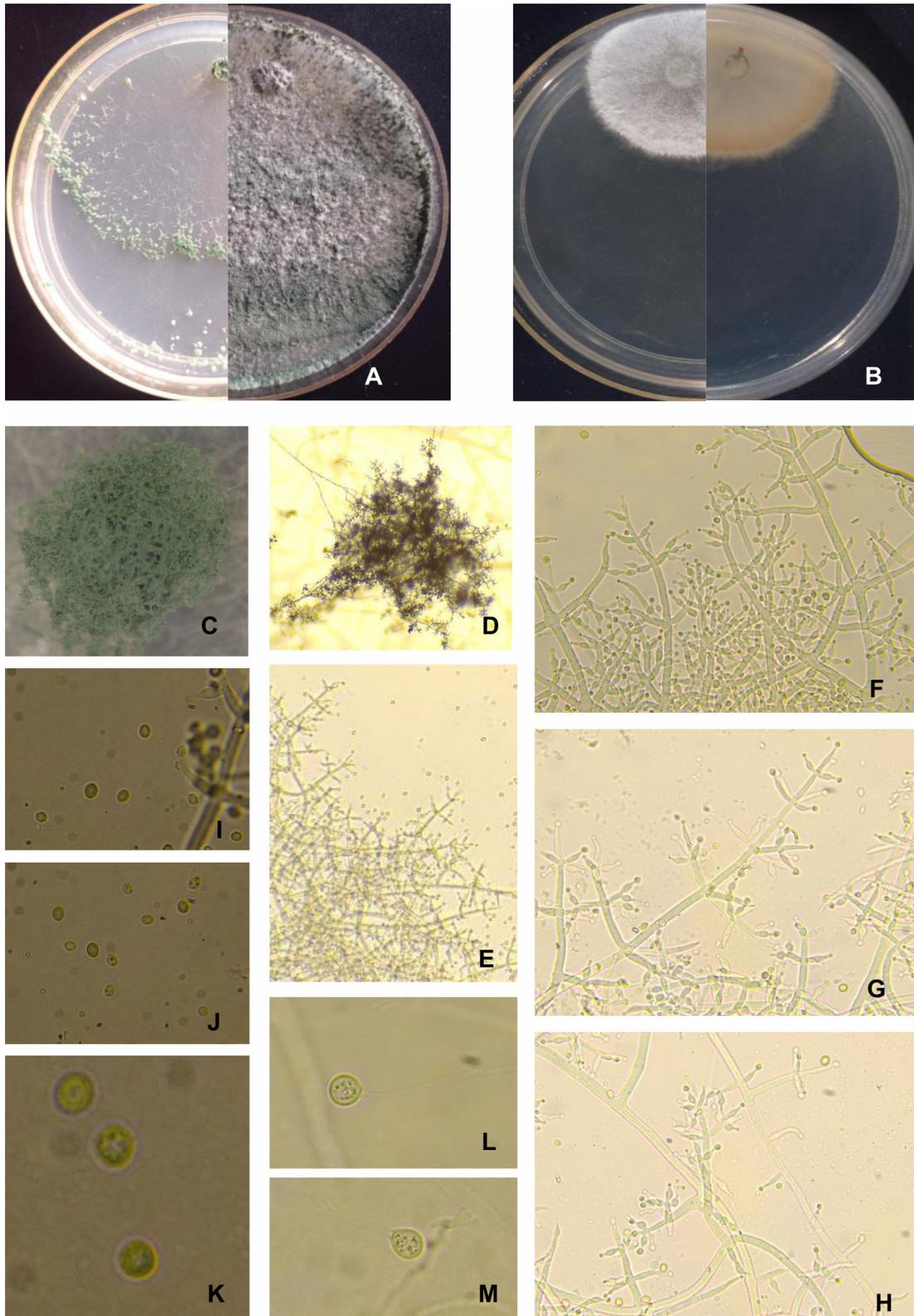


Figura 1: T1 *Trichoderma asperellum*. **A.** Colonia de 7 días 25°C SNA/APG, **B.** Colonia de 7 días APG 35°C haz y envés (nótese pigmentación amarilla/ocre en el margen de crecimiento). **C-D.** Pústulas conidiales (nótese la proyección de los conidióforos), **E-H.** Conidióforos verticilados, fiálides verticiladas (nótese en H presencia de fiálides solitarias); **I-K.** Conidios (nótese la tenue ornamentación); **L-M.** Clamid esporas.

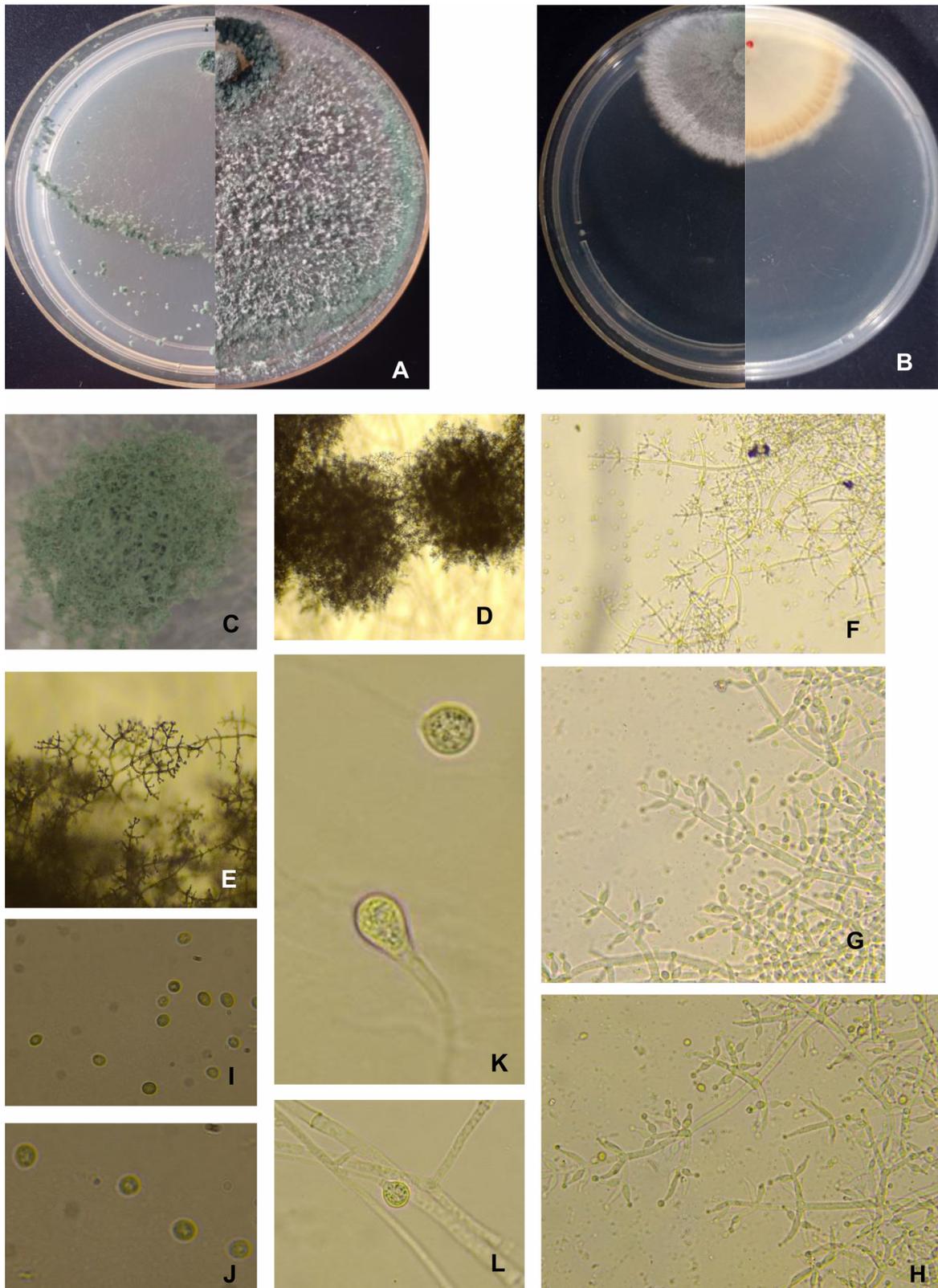


Figura 2: T15 *Trichoderma asperellum*. **A.** Colonia de 7 días 25°C SNA/AGP, **B.** Colonia de 7 días APG 35°C haz y envés (nótese pigmentación amarilla/ocre en el margen de crecimiento); **C-E.** Pústulas conidiales (nótese la proyección de los conidióforos), **F-H.** Conidióforos verticilados, fiálides verticiladas; **I-J.** Conidios (nótese la tenue ornamentación); **K-L.** Clamidosporas.

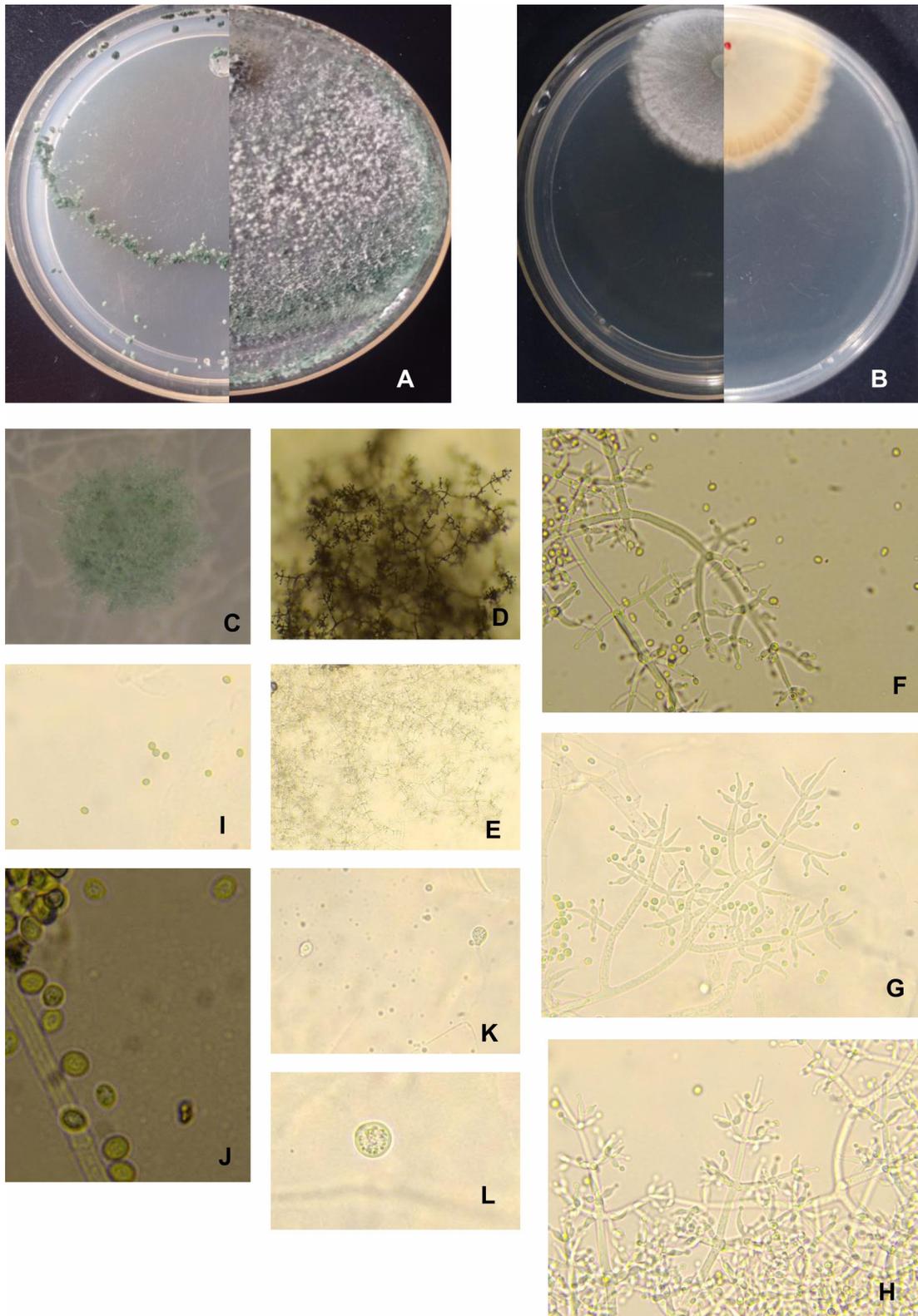


Figura 3: T16 *Trichoderma asperellum*. **A.** Colonia de 7 días 25°C SNA/AGP, **B.** Colonia de 7 días APG 35°C haz y envés (nótese pigmentación amarilla/ocre en el margen de crecimiento); **C-D.** Pústulas conidiales (nótese la proyección de los conidióforos sin pelos estériles), **E-F-G-H.** Conidióforos verticilados, fiálides verticiladas; **I-J.** Conidios (nótese la tenue ornamentación); **K-L.** Clamidosporas.

2. Caracterización molecular

La secuencia nucleotídica del aislado T1 presentó identidad con secuencias reportadas de *T. asperellum* y *T. asperelloides*. La secuencia nucleotídica del aislado T15 identidad con secuencias reportadas de *T. asperelloides* y la secuencia del aislado T16 con secuencias reportadas de *T. asperellum* y *T. asperelloides*. En la Tabla N° 3 se muestran los resultados del contraste en las bases de datos NCBI y TrichOkey. Samuels, Ismaniel, Bon, De Respinis & Petrini (2010), relaciona a las especies *T. asperellum* y *T. asperelloides* como especies hermanas crípticas, en donde la separación entre ambas especies aún está poco clara. Las secuencias de T1, T15 y T16 se subieron en base de datos del NCBI, GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Tabla N° 3: Análisis molecular y bioinformático de las secuencias nucleotídicas de T1, T15 y T16

Aislamiento		Resultados del análisis mediante PCR-Secuenciación		
	Secuencia en análisis	Base de datos primaria NCBI	Base de datos curada TrichOkey	Nombre científico final
T 1	ITS 1	<i>T. asperellum</i> (KT426889)	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. asperelloides</i> / <i>T. asperellumn s.s.</i>
	ITS 4	<i>T. asperellum</i> (KM386427)	<i>T. asperellumn s.s.</i> <i>T. asperelloides</i>	
T 15	ITS 1	-	-	<i>T. asperelloides</i>
	ITS 4	<i>T. viride</i> (KP7663495)	<i>T. asperelloides</i>	
T16	ITS 1	<i>T. asperellum</i> (KT426889)	<i>T. asperelloides</i>	<i>T. asperelloides</i>
	ITS 4	<i>T. asperellum</i> (KM100785)	<i>T. asperelloides</i>	

Determinación de la relación filogenética de las cepas:

El análisis con TNT arrojó dos tipologías de árbol resultante de 991, los cuales mostraron que las cepas *T. asperelloides* LF1 y *T. asperelloides* LF3 formaron un clado monofilético estrechamente relacionada, con un alto soporte Jackknifing y bootstrap del 100%, las cepas de *T. asperelloides*; LF4 estableció relación, con cepas de *T. asperellum* un alto soporte Jackknifing y bootstrap del 100% de ambos (Figura N° 4).

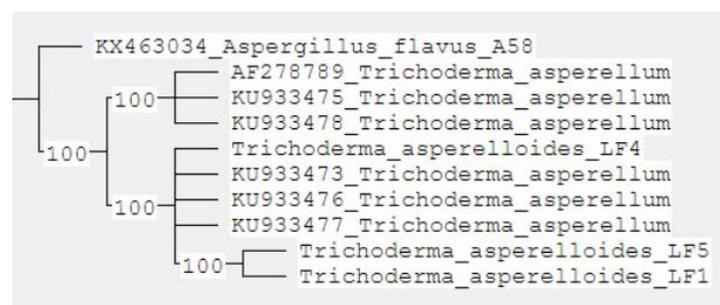


Figura 4: Relación filogenética entre cepas de las regiones ITS de 5.8S del ADNr, el grupo soporte fue evaluado usando 1000 replicaciones, bootstrapping and parsimonia de Jack-knifing.

El análisis de identificación molecular de la región ITS y el análisis bio-informático de porcentaje de identidad en referencia a las secuencias depositadas en la base de datos moleculares permitieron designar al aislamiento T1 como perteneciente a las especies crípticas *T. asperelloides*/*T. asperellum*; y a los aislados T15 y T16 como pertenecientes a la especie *T. asperelloides*. Las tres cepas de *T. asperelloides* aisladas mostraron una relación filogenética alejada de otras cepas de *T. asperellum* cuando se analizaron con MEGAS6. El análisis de TNT agrupa a *T. asperelloides* con cepas de *T. asperellum* debido a que su relación todavía es poco clara. En éste sentido, Samuel *et al.*, (2010) plantea que aún la diferenciación morfológica de ambas especies no es posible. Las cepas de *T. asperellum* y *T. asperelloides* son reportadas en la literatura para el control biológico como *T. asperellum* o *T. viride* (Samuels *et al.*, 2010). Los autores realizaron el análisis de una colección mundial de cepas de *T. asperellum* en sentido amplio utilizando genealogías multilocus de cuatro regiones genómicas (*tef1*, *rpb2*, *act*, ITS1, 2 y 5.8s rRNA), marcadores derivados de polimorfismos de secuencia (SPD), espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) del proteoma y técnicas micológicas clásicas, lo que reveló dos cripto especies morfológicamente hermanas dentro de *T. asperellum*; *T. asperellum*, *T. asperelloides* sp. nov. y una tercera especie estrechamente relacionada pero morfológicamente distinta *T. yunnanense*. *T. asperellum* y *T. asperelloides* tienen una amplia distribución en múltiples continentes; *T. yunnanense* está representada por una sola cepa de China. Varias cepas reportadas en la literatura o representadas en GenBank como *T. asperellum* se reidentificaron como *T. asperelloides*. La diversidad de secuencias de ADN, marcadores SPD y polipéptidos en *T. asperellum* sugiere que se está produciendo una mayor especiación dentro de *T. asperellum*. Los dos clados que representan la especie morfológica *T. asperellum* no se pueden distinguir por las dimensiones de los conidios y/o fiálides, la configuración de los conidióforos, la producción de clamidosporas y la tasa de crecimiento o apariencia de la colonia. La mayoría de las cepas estudiadas del complejo de *T. asperellum* fueron aislados de suelos agrícolas en países de zonas tropicales de los cinco continentes. *T. asperellum* es más común que *T. asperelloides* (Samuels *et al.*, 2010). En este sentido tanto las dos cepas aisladas de suelo agrícolas de la puna jujeña, como la cepa aislada del suelo de la quebrada de Humahuaca evidenciaron pequeñas variantes en cuanto a las dimensiones de las estructuras reproductivas y vegetativas, con características culturales muy semejantes, agrupándose por ello en una misma especie *T. asperellum*. Samuels *et al.*, (2010) plantean que *T. asperellum* y *T. asperelloides* son entre las pocas especies comunes de Trichoderma para las cuales no se conoce ningún teleomorfo, al analizar *T. asperelloides* se verifica que es mucho menos diversa que *T. asperellum*, por lo que posiblemente deriva de ésta. La diversidad para *T. asperellum* sugiere recombinación, mientras que *T. asperelloides* parece ser clonal. la nueva caracterización de *T. viride* y la descripción de *T. asperellum*; y de *T. asperelloides* como nueva especie (Samuels *et al.*, 2010)

3. Compatibilidad vegetativa

La cepa de referencia de *T. harzianum* (T72) evidenció una clara reacción de incompatibilidad frente a T1, T15 y T16 (Figura N°6), determinada por la presencia de una barrera de inhibición (cambio de coloración en las colonias - metabolitos difusibles al medio). Barcellos *et al.*, (2011) sostienen que la reacción de incompatibilidad se rige por un *loci het*, que limita la formación de heterocariones entre individuos genéticamente distintos. Es decir, si la diferencia es en uno o más *loci het*, las células que participan en la fusión son compartimentadas y se someten a un proceso lítico que conduce a la muerte celular. En estos casos los aislados son incompatibles; el fenómeno se identifica por la vacuolación, disolución de núcleos y generación de pigmentos, lo que se describió como barrera de reacción (Galdames, 2001). Por otra parte, en las interacciones de las cepas T1, T15 y T16 se observaron reacciones de compatibilidad (Figura N° 5).

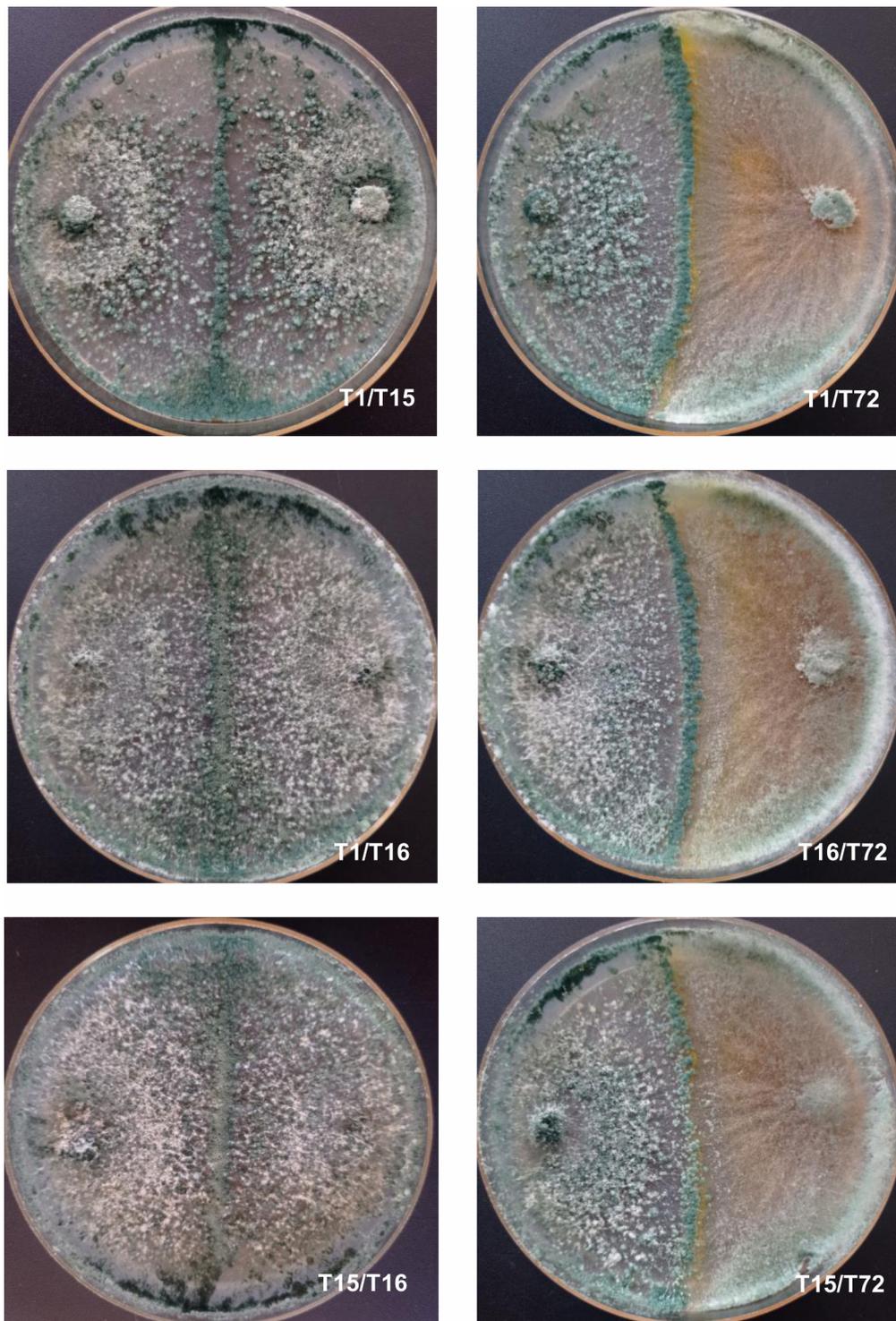


Figura 5: Reacciones de compatibilidad entre T1/T15; T1/T16 y T15/T16 y reacciones de incompatibilidad entre las cepas T1, T15 y T16 y la cepa de referencia *T. harzianum* (72), nótese la barrera de inhibición y cambio de coloración del medio por la producción de T72 de metabolitos difusibles.

Teniendo en cuenta la compatibilidad vegetativa (Cv) que mostraron los aislamientos en estudio, se puede inferir, que estos tienen relación taxonómica. Cook y Baker (1983) utilizaron esta técnica para confirmar la identificación taxonómica de aislados de *Trichoderma* realizada previamente por ellos, a partir de aspectos morfológicos. En el mismo sentido Galdames (2001), planteó que la Cv puede ser considerada como un criterio de clasificación de las especies del género *Trichoderma*, basados en la consistencia de los resultados al comparar el agrupamiento obtenido entre 21 cepas de *Trichoderma* sp. por técnicas moleculares (RAPD y AFLPs) y la Cv. De forma general, esta prueba demuestra que cepas de

una misma especie comparten patrones similares de compatibilidad, lo que se reduce entre especies más alejadas. Por tal motivo, puede ser considerada como una alternativa, simple y rápida para valorar la especie a que pertenece un nuevo aislado. Las pruebas de CV resultan muy prácticas por sus implicancias en la formulación de productos biológicos utilizando consorcios de especies ya que la presencia de incompatibilidad vegetativa, conlleva la inhibición de alguno de los microorganismos (Moo Koh et al., 2018; Gallegos-Morales et al., 2022).

CONCLUSIÓN

La caracterización macro y micromorfológica de T1, T15 y T16 mostró correspondencia taxonómica con la especie *Trichoderma asperellum* del clado Viridie. La caracterización molecular permitió diferenciar entre T1 *Trichoderma asperelloides* /*T. asperellum* y T15 y T16 *Trichoderma asperelloides*. En tanto la compatibilidad somática o vegetativa evidenció la cercanía genética entre las cepas, con patrones similares de compatibilidad, resultando una prueba complementaria a las anteriores, donde indirectamente se verifican las relaciones genéticas cercanas entre especies y/o cepas. La caracterización de cepas de *Trichoderma*, representa un requisito insoslayable para futuros trabajos vinculados al desarrollo de productos biotecnológicos orientados al manejo sanitario y/o nutricional de cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Barcellos, F.G., Hungria, M. & Pizzirani-Kleiner, A. 2011. Limited Vegetative Compatibility as a cause of Somatic Recombination in *Trichoderma pseudokoningii*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 1625-1637
- Bissett J. A. 1984. Revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Can J Bot.*: 62:924-931.
- Bissett J. A. 1991a. Revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot.*; 69 (11): 2 357-72.
- Bissett J. A. 1991b Revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. *Can J Bot.*; 69 (11): 2 373-417.
- Bissett J, A. 1991c. Revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. *Can J Bot.*: 69: 2418-2420
- Druzhinina I, Kopchinskiy A & Kubicek C. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*; 47: 55-64.
- Galdames, R. 2001. Análisis genético-molecular de la diversidad del hongo patógeno *Sclerotium cepivorum* Berk., y del biocontrolador *Trichoderma* sp. Tesis Doctoral Biotecnología de Plantas. Irapuato, Gto, México.
- Moo Koh, F.A., Alejo, J.C., Ramírez, A.R., Suárez, J.T., Angulo, G. & Islas- Flores, I.R. 2018. Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*. *Scientia Fungorum*. 47: 37-45
- Ortuño, N.C. & Miranda, M.C. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal Selva Andina Biosphere*. 1: 16-4.
- Persoon CH. 1794. *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues. *Mag Bot.*; 1:81-128.

- Rifai M. A. 1969. Revision of the genus *Trichoderma*. Mycol Pap.;116:1-56.
- Samuels G, Ismaniel A, Bon M, De Respini S & Petrini O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Mycologia.; 102: 944-966.
- Samuels G, Lieckfeldt E & Nirenberg H. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *Trichoderma viride*. Sydowia.; 51(1): 71-88
- Samuels G, Petrini O, Kuhls K, Lieckfeldt, E & Kubicek, C. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. Stud Mycol.; 41: 2-54
- Samuels, G. J. & Hebbbar, P. K. 2015. *Trichoderma*: identification and agricultural applications. APS Press: 196.
- Sivila N. F., Álvarez S. E., Catacata J. R. & Bonillo M. C. 2017. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de suelos de Jujuy, sobre los fitopatógenos *Fusarium* spp., *Sclerotium* spp. y *Rhizoctonia solani*. Agraria Vol X N° 17: 49-53.