



Identificación de cepas del hongo *Trichoderma* spp. Por métodos moleculares

Marwi Valiente, Domenico Pavone*

Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela

***Autor de correspondencia:** dfpavone@gmail.com

Resumen

Las especies del género *Trichoderma* son capaces de producir enzimas de interés industrial, sustancias con actividad antimicrobiana, que pueden ser utilizadas como agentes biocontroladores de enfermedades en plantas e incluso se han reportado como patógenos oportunistas en pacientes humanos inmunosuprimidos. De esta forma, la identificación correcta de estas especies es un paso fundamental para su manejo biotecnológico. Utilizando métodos moleculares se identificaron 10 aislados a partir de cultivos monospóricos amplificando los genes ITS, *tef1* y *rbp2* por PCR y analizando las secuencias correspondientes. Basado en los resultados obtenidos se asignaron los siguientes epítetos específicos a los aislados en estudio: TV03 (*T. virens*); TVC24 (*T. virens*); TV30 (*T. asperellum*); TVC34 (*T. brevicompactum*); TVC35 (*T. erinaceum*); TVC36 (*T. harzianum*); TV81 (*T. virens*); (*T. koningiopsis*); TV113 (*T. spirale*) y TV217 (*T. reesei*). La identificación de especies de *Trichoderma* por medio de métodos moleculares representa una herramienta útil, rápida y sencilla. La información aportada con respecto a la identidad de las especies, permitirá utilizarlas en distintas áreas de la biotecnología.

Palabras Claves: TrichoBLAST; TrichoKEY; TrichoMark; ITS, *tef1*, *rbp2*

Identification of *Trichoderma* spp strains using molecular methods.

Abstract

The genus *Trichoderma* is very important for human being because they produce industrial enzymes, antibiotics, can act as biocontrol agents and have been found as opportunistic pathogen in immunosuppressed human patients. The correct identification of these species is very important for biotechnological use. Molecular methods have become in a powerful tool for identification of *Trichoderma*. There were identified ten isolates of *Trichoderma* using monosporic culture, from which genomic DNA was isolated. It was amplified ITS 1 and ITS 2, *tef1* and *rbp2* genes, using PCR and its sequence analysed. Based on these results, *Trichoderma* strains were identified as follows: TV03 (*T. virens*); TVC24 (*T. virens*); TV30 (*T. asperellum*); TVC34 (*T. brevicompactum*); TVC35 (*T. erinaceum*); TVC36 (*T. harzianum*); TV81 (*T. virens*); (*T. koningiopsis*); TV113 (*T. spirale*) y TV217 (*T. reesei*). The identification of *Trichoderma* species using molecular methods is a very fast, useful and simple tool. These strains could be used in different biotechnological applications.

Keywords: TrichoBLAST; TrichoKEY; TrichoMark; ITS, *tef1*, *rbp2*

Introducción

Las especies pertenecientes al género anamórfico *Trichoderma*, han sido utilizadas en una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas, que incluyen el biocontrol de agentes fitopatógenos en cultivos agrícolas (Harman, 2000; Kexiang et al., 2002, Benítez et al., 2004; Zhang et al., 2016), la producción de enzimas industriales (Kubicek et al., 1996; Payne et al., 2015), antibióticos (Vizcaíno et al., 2005), polisacáridos (Hoon & Yun; 2005), e incluso algunas especies se han reportado como patógenos en pacientes humanos inmunocomprometidos (Druzhinina & Kubicek, 2005). Por estas razones, la importancia de *Trichoderma* spp. hace que sea necesaria una identificación rápida y confiable. Muchas investigaciones han basado esta identificación en caracteres morfológicos (Maymon et al, 2004; Lieckfeldt et al; 1999), con el problema de que la homoplasia en los caracteres morfológicos, hace la caracterización bajo esta premisa sea difícil, incluso para expertos, con la consecuencia de que alrededor del 50 % de los aislados depositados en colecciones, están mal identificados (Druzhinina & Kubicek, 2005).

La caracterización molecular ha ganado gran aceptación en los últimos años (Maymon et al; 2004), por ofrecer una identificación más confiable y precisa entre dos o más cepas de *Trichoderma* spp. La filogenia de este género se ha basado generalmente en el análisis de las secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal (ADNr) (Figura 1) (Kindermann et al; 1998; Rivas y Pavone, 2010).

Sin embargo, algunas veces las secuencias ITS no logran una identificación definitiva, debido a la falta de polimorfismo en algunas especies. En estos casos se utilizan otras secuencias como la del factor de elongación de la traducción 1α (*tef1*) (Figura 2), que es usada para obtener datos sobre la distancia genética más adecuada entre la especie objetivo y sus parientes más cercanos en niveles intercladal o niveles intergrupo del género *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2004). Otro gen utilizado es el fragmento codificador de la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II (*rbp2*) que cataliza la síntesis de ARN mensajero en el núcleo de las células eucariotas y muestra valiosa información evolutiva (Denton et al, 1998). También puede utilizarse el gen *chit42* que codifica endoquitinasas que degradan la quitina

de las paredes celulares (Carsolio et al., 1994) y la calmodulina (*cal*) que ha permitido obtener en algunos casos, filogramas con una estructura interna bien resuelta (Druzhinina et al., 2012). De esta forma, una identificación confiable requiere obligatoriamente el estudio de las secuencias de estos genes, por lo que la estandarización de su amplificación y secuenciación, es fundamental. El presente trabajo pretende identificar a nivel taxonómico de especie a 10 aislados de *Trichoderma* spp. a través de métodos moleculares, estudiando las secuencias de los genes ITS1 e ITS2, *tef1* y *rbp2*.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron 10 cepas del género *Trichoderma* spp. pertenecientes al cepario del Centro de Biotecnología Aplicada del Departamento de Biología FACYT-UC. Los aislados utilizados y su origen, se presentan en la Tabla 1.

Cultivos monospóricos

Partiendo de los cultivos aislados de *Trichoderma* spp. se realizaron cultivos monospóricos con el fin de obtener una única especie en cada aislado. Se colocaron en 10 mL de agua destilada estéril una pequeña muestra de la cepa correspondiente hasta lograr obtener una suspensión muy diluida. Dicha suspensión se vertió sobre una placa de agar agua (1,6 %) descartando inmediatamente el líquido excedente. Este proceso aseguró que las esporas estaban suficientemente separadas entre sí para facilitar el aislamiento de una sola espora. Posteriormente se incubó por un período de 18 horas a temperatura ambiente. Finalmente los aislados se observaron a través de un microscopio estereoscópico con un aumento de 40X, para ubicar las esporas germinadas individuales, las cuales se extrajeron de una sección del agar marcado con una aguja de punta plana para transportar la espora seleccionada a una placa con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) marca Hi Media. Las placas se incubaron bajo los mismos parámetros por un período de una semana para permitir el crecimiento a partir de una sola espora.

Cultivos líquidos

Se sembró con un asa de platino el aislado monospórico en 20 mL de caldo papa dextrosa, coloca-

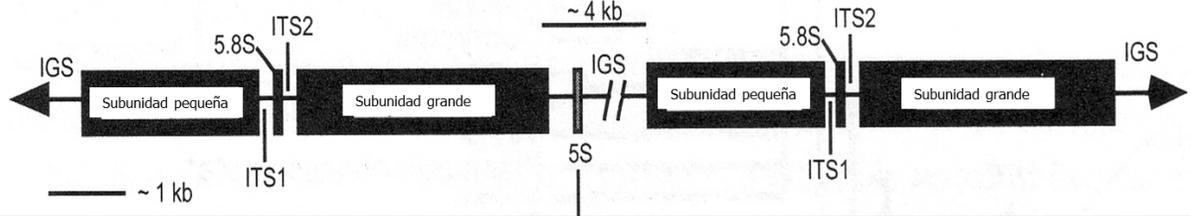


Figura 1. Representación esquemática del ADN ribosomal que muestra las regiones de los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS 1 e ITS 2) y 5,8 S. Fuente: Geiser (2004).

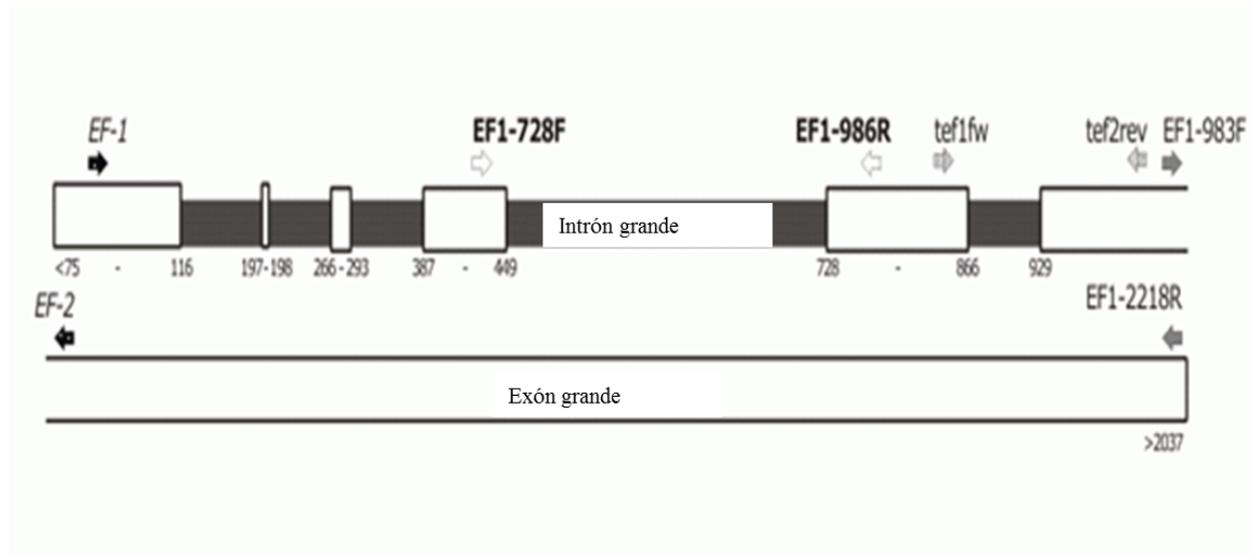


Figura 2. Representación esquemática del gen del factor de elongación de la traducción 1α (*tef1*). Se muestran el intrón largo, utilizado como el marcador filogenético que aporta mayor información y el exón largo. El iniciador EF1-728F/LLerev puede utilizarse para amplificar el extremo 3'. El iniciador LLerev no se muestra en la figura, pero se encuentra en el centro del último exón largo. Fuente: Druzhinina (2009).

dos en un agitador a 90 rpm por cinco días a temperatura ambiente, con el propósito de obtener micelio de cada cepa correspondiente y ser usado para la extracción de ADN.

Extracción de ADN

Se realizó siguiendo el protocolo reportado por Aljanabi & Martínez (1997), donde un fragmento del micelio obtenido en el cultivo líquido se homogenizó en 400 µL de tampón de extracción (Tris-HCl 10 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 0,02 M; pH 8), se agregaron 50 µL de SDS 20 % y se incubó por una hora a 60 °C, seguido de la adición de 300 µL de NaCl (6M); posteriormente cada homogenizado se agitó en un vortex a máxima velocidad por 30 s y se centrifugó por 20 min a 11.000 g. El sobrenadante fue transferido a un eppendorf nuevo adicionando igual volumen de isopropanol puro, se agitó por inversión y se incubó a

-20 °C por una hora. Finalmente, los tubos fueron centrifugados por 20 min a 11.000 g, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con etanol al 70 %. Descartado el etanol, el precipitado se dejó secar por una hora para finalmente ser resuspendido en 50 µL de agua destilada estéril. El ADN fue mantenido a -20 C hasta su análisis.

Amplificación del ADN

Las distintas regiones del ADN a estudiar fueron amplificadas utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa con un termociclador modelo Icyler, BIORAD, según se indica a continuación:

Los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e IS2)

Se amplificaron utilizando las condiciones de reacción: Tampón 5X, MgCl₂ (25

Tabla 1. Origen y colector de los aislados de *Trichoderma* spp. que se utilizaron en este estudio.

Aislado	Origen	Colector
TVC01	Parque Nacional San Esteban, Carabobo	Marzuly Rivas
TV03	Parque Nacional San Esteban, Carabobo	Domenico Pavone
TV06	Rancho Grande, Parque Nacional Henry Pittier, Aragua	Domenico Pavone
TV14	Campanero, Parque Nacional San Esteban, Carabobo	Domenico Pavone
TVC24	Borburata, Carabobo	Marzuly Rivas
TV25	Estado Anzoátegui	Domenico Pavone
TV30	Estado Anzoátegui	Domenico Pavone
TVC34	Borburata, Carabobo	Marzuly Rivas
TV35	Estado Anzoátegui	Domenico Pavone
TVC36	Urama, Estado Carabobo	Marzuly Rivas
TV81	Estado Bolívar	Domenico Pavone
TV82	Estado Bolívar	Domenico Pavone
TV83	Estado Bolívar	Domenico Pavone
TV113	Estado Barinas	Domenico Pavone
TV217	Estado Portuguesa	Domenico Pavone

mM), dNTPs (10 mM), iniciador ITS1 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3' (Forward) e iniciador ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Reverse), agua bidestilada estéril, GoTaq ADN polimerasa (Promega) y el ADN correspondiente a cada aislado. Condiciones de amplificación: Paso 1, 94 °C 5 min; 45 ciclos de amplificación de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; paso final 72 °C por 10 minutos.

Amplificación del factor de elongación de la traducción 1 α (*tef1*)

Se amplificó utilizando para cada reacción de PCR: Tampón Taq 5X, MgCl₂ (25mM), dNTPs (10 mM), iniciador EF1-728F 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' (Forward) e iniciador Tef1-Llevrev 5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3' (Reverse), agua bidestilada estéril, GoTaq ADN polimerasa (Promega) y el ADN correspondiente a cada aislado. Condiciones de amplificación: 94 °C por 1 minuto; 30 ciclos de amplificación: 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto, 74°C por 55 segundos; paso final 74°C por 7 minutos.

Amplificación del gen codificador de la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (*rbp2*)

Se utilizó para cada reacción de PCR: Tampón Taq 5X, MgCl₂ (25mM), dNTPs (10 mM), iniciador

FRPB2-5F 5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3' (Forward) e iniciador FRPB2-7cR 5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3' (Reverse), agua bidestilada estéril, GoTaq ADN polimerasa (Promega) y el ADN correspondiente a cada aislado. Condiciones de amplificación: 94 °C por 1 minuto; 30 ciclos: 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 90 segundos, 72 °C por 90 segundos; paso final 72 °C por 7 minutos.

Todas las amplificaciones que se realizaron fueron acompañadas con un control con agua bidestilada estéril y se verificaron con una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb (Promega) y fueron purificadas utilizando el kit PCR clean up, Axygen

Secuenciación del ADN obtenido mediante la técnica de PCR

Los productos de PCR purificados se enviaron al Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CESAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la PCR de secuenciación se preparó una mezcla de 10 μ L finales con 20 ng del templado y 10 pmol de los iniciadores ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3') para las regiones ITS; EF1-728F 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' para *tef1* y FRPB2-5F 5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3' para el gen *rbp2*. Posteriormente se agregaron 4

μ L de mezcla de reacción (BygDye® Terminator 3.1, Applied Biosystem) con solución buffer y una mezcla de ddNTPs y dNTPs, completándose el volumen con agua estéril. Condiciones de amplificación: 25 ciclos a 98°C por 2 min, 55°C por 1 min y 60°C por 4 min. Finalmente, el ADN purificado y eluido en formamida fue procesado en un Secuenciador Automático modelo ABI 3130xl (Applied Biosystem)

Identificación de especies a través del análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de los genes estudiados, fueron analizadas comparándolas con una base de datos específica para *Trichoderma* spp., disponible en línea: www.isth.info, sitio oficial de la Subcomisión Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea*. Se utilizaron las herramientas TrichOKEY 2.0, TrichoMark y TrichoBLAST.

Resultados y discusión

Para la identificación de *Trichoderma* spp., es fundamental la obtención de cultivos monospóricos, a partir de los cuales se deben realizar todos los pasos subsiguientes de extracción de ADN, PCR y secuenciación, para lograr identificar correctamente una especie de *Trichoderma*. Este paso se debe realizar debido a que la homoplasia de los caracteres morfológicos en *Trichoderma*, hace prácticamente imposible distinguir si existe una o más especies en un cultivo o aislado determinado (Druzhinina et al., 2006). El hecho de extraer ADN y posterior amplificación por PCR a partir de cultivos mixtos, traería como consecuencia amplificaciones de varios alelos de un gen, que llevarían a secuencias poco confiables y resultados dudosos.

El orden de pasos lógicos para la identificación de *Trichoderma* spp., comienza con el análisis de las secuencias de los genes ITS1 e ITS2, con el Programa TrichOKEY (Druzhinina et al, 2006). La mayoría de las especies de este género pueden ser identificadas solo con esta información. Sin embargo, en algunas especies muy relacionadas, el polimorfismo de los genes ITS no es suficiente como para lograr distinguir entre dos especies; es allí donde entran a jugar un papel importante otros genes. En el análisis de las secuencias ITS con el programa TrichOKEY, se identifica en la secuencia cinco anclas o regiones características del género *Trichoderma*; se realiza la

identificación de la Sección a la que pertenece el aislado y da el resultado de la identificación con la comparación correspondiente. En este caso, el programa al encontrar regiones características de una especie determinada, proporciona el nombre de la especie, incluso a pesar de no encontrar todas las anclas. Los resultados de los análisis de las secuencias ITS arrojaron en la mayoría de los casos un nombre de especie, sin embargo, hay aislados que no pudieron identificarse con un único nombre ya que el polimorfismo de ITS no fue suficiente para discernir entre varias especies posibles (TV30, TV82, TV83). Para poder determinar la especie correcta se utilizaron otros genes, específicamente *tefl*.

Para realizar el análisis de las secuencias del gen *tefl* se debe utilizar otra aplicación, el TrichoBLAST. Tradicionalmente, este tipo de análisis se basa en someter las secuencias obtenidas a un BLAST (Altschul et al., 1990), generalmente en el sitio (www.ncbi.nlm.nih.gov) perteneciente a la National Center for Biotechnology Information (NCBI), basándose en el “mejor resultado” o en el grado de similitud de las secuencias. Sin embargo, los resultados de las grandes bases de datos públicas como el GenBank, causan errores, trayendo como efecto secuencias mal identificadas (alrededor de un 40% en *Hypocrea* / *Trichoderma*) (Kopchinskiy et al, 2005). Por otro lado, no todas las bases de datos públicas contienen la gama completa de secuencias de especies de un género. En consecuencia a menudo es difícil evaluar el resultado del BLAST donde las secuencias se encuentran incompletas, esto es de importancia crítica ya que los investigadores a menudo hacen identificaciones basadas en los mejores resultados obtenidos del BLAST independientemente de las puntuaciones obtenidas en la alineación (Kopchinskiy et al, 2005). Debido a la variabilidad intraespecífica en las secuencias de *Trichoderma* depositadas en esta base, un nivel alto de correspondencia dada no llega a confirmar o refutar la identidad de una especie. Con el fin de eliminar estas dificultades respecto a *Hypocrea* y *Trichoderma* se desarrolló TrichoBLAST una base de datos pública soportada por medio del diagnóstico de sus secuencias y el uso de herramientas que buscan similitud. Esta base de datos abarca todas las especies del género *Trichoderma* genéticamente caracterizadas y contiene un compendio de secuencias basadas en cinco marcadores utilizados con mayor frecuencia a nivel filogenético, entre los

que están ITS1 e ITS2, *tefl* (intrón grande y corto) y *rbp2*. TrichoBLAST posee la ventaja de que permite utilizar varios loci, lo cual accede a la detección del fragmento correcto dentro de las secuencias que son utilizadas para la búsqueda de similitud (BLAST) (Kopchinskiy et al, 2005).

Para utilizar la herramienta anteriormente descrita, se debe realizar un diagnóstico preliminar de la secuencia problema con TrichoMARK, el cual comprende un programa diseñado específicamente para la detección y recuperación de marcadores filogenéticos de secuencias problema, lo que permite realizar posteriormente la presentación individual de éstas en el programa TrichoBLAST para buscar similitudes. TrichoMARK es capaz de diagnosticar secuencias de genes de *Hypocrea/Trichoderma*, basado en secuencias de oligonucleotidos específicas para los géneros, tomando en cuenta tanto del extremo 5' como el extremo 3' del marcador (Druzhinina et al, 2005) y recupera el área exacta de la región del marcador filogenético, omitiendo las secuencias flanqueantes.

En el análisis de las secuencias *tefl* con TrichoMARK, el programa busca el sitio específico al cual pertenece la secuencia a analizar, para hacer una comparación con la zona correcta. En nuestro caso, se encontraron y analizaron las secuencias del intrón largo y corto. Cabe destacar que el intrón largo es el marcador filogenético más informativo en *Hypocrea/Trichoderma* (Druzhinina, 2009).

Una vez ubicados los marcadores filogenéticos, se hizo el análisis de similitud con TrichoBLAST. En el análisis que arroja el programa (datos no mostrados) se muestran los 10 mejores resultados (alineamientos) que consiguió el programa y los alineamientos de los dos resultados más parecidos. Los análisis realizados por *tefl* pudieron discriminar entre las distintas especies posibles que habían sido propuestas por ITS, confirmando solo un nombre de especie correcto para los aislados TV30, TV82 y TV83. Además pudo corroborarse la identificación de los aislados TV03, TVC34, TV35, TVC36, TV81, TV113 y TV217. La mayoría de las especies estudiadas se pudo identificar con este análisis en combinación con ITS.

Continuando con los pasos para la identificación de los aislados de *Trichoderma*, se procedió a la obtención de las secuencias del gen *rbp2*. Al igual que para *tefl* se debió realizar el análisis preliminar con TrichoMARK y posteriormente con TrichoBLAST.

Es importante señalar que los alineamientos resultantes de un BLAST son una medida de similitud, pero la similitud no representa una medida de relación (de Queiroz, 1992; citado en Kopchinskiy et al, 2005). Por lo tanto, al utilizar estas herramientas de comparación de secuencias, se debe tomar en cuenta cuales marcadores filogenéticos se están utilizando y si la base de datos contiene todas las secuencias conocidas. La Subcomisión Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea*, ha estudiado más de 1000 secuencias de ITS 1 y 2, que representan todas las especies genéticamente conocidas de *Hypocrea/Trichoderma*, mostrando que estas regiones aportan mucha información taxonómica. Bajo estas condiciones, la identificación de una especie es posible solo donde se consiga una alineación perfecta entre dos secuencias. En los casos donde no exista una alineación perfecta, es indicativo de la presencia de un nuevo alelo de una especie conocida o pudiera tratarse de una especie nueva (Kopchinskiy et al, 2005).

Como ya se ha mencionado, para identificar especies que con las regiones ITS no se han podido discriminar, se utilizan genes como *tefl*. Los intrones de *tefl*, son muy particulares ya que son muy raras las secuencias idénticas, debido a la alta variabilidad intraespecífica; por lo tanto, la Subcomisión para la Taxonomía de *Hypocrea/Trichoderma*, ha probado si los alineamientos con la mayor puntuación, representan una identificación correcta, y se ha logrado comprobar esto en todas las muestras estudiadas (Kopchinskiy et al, 2005). Por lo tanto al obtener las secuencias de los intrones correspondientes a *tefl* se puede considerar como la identificación correcta las de mayor puntuación, a pesar de no coincidir en un 100%. En el análisis de las secuencias de exones de *tefl* y *rbp2*, estos dos marcadores proporcionan un nivel muy bajo de resolución interespecífica para *Hypocrea/Trichoderma* (Chaverri & Samuels, 2004), y son poco útiles para la diferenciación de especies. Sin embargo ya que muestran agrupación fiable sobre el nivel de clado, se recomienda el uso de estos dos marcadores filogenéticos principalmente como datos de apoyo a las identificaciones hechas con base en intrones de *tefl* (preferiblemente el *tefl* _int4 -Grande) e ITS1 y 2 (Kopchinskiy et al, 2005).

Un resumen de todos los resultados obtenidos en este trabajo se presentan en la Tabla 2, donde puede apreciarse la identificación arrojada por cada gen,

Tabla 2. Resumen de las identificaciones obtenidas de los aislados de *Trichoderma* con base en las secuencias ITS utilizando el programa TrichOKEY y *tef1* y *rbp2*, utilizando los programas TrichoMARK y TrichoBLAST.

Aislado	ITS	<i>tef1</i>	<i>rbp2</i>
TV03	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. crassum</i> / <i>T. virens</i>
TV30	<i>T. koningiopsis</i> / <i>T. ovalisporum</i> / <i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>T. pubescens</i>
TVC34	<i>T. brevicompactum</i>	<i>T. brevicompactum</i>	<i>T. phyllostachydis</i>
TV35	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. erinaceum</i>	<i>T. viride</i>
TVC36	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. helicum</i> / <i>T. parapilulifera</i> <i>T. harzianum</i>
TV81	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>
TV82	<i>T. koningiopsis</i> / <i>T. ovalisporum</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. viride</i>
TV83	<i>T. koningiopsis</i> / <i>T. ovalisporum</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. viride</i>
TV113	<i>T. spirale</i>	<i>T. spirale</i>	<i>T. spirale</i>
TV217	<i>T. reesei</i>	<i>T. reesei</i>	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>

según el análisis realizado en cada caso. Para el aislado TV03, las secuencias ITS sugieren que se trata de *T. virens*, lo cual es corroborado por las secuencias *tef1* que dan el mismo resultado. En el caso de *rbp2* el mejor alineamiento fue con secuencias de *T. crassum* y en segundo lugar con *T. virens*. *T. crassum* (teleo. *Hypocrea crassum*) es conocido a partir de un único aislado, aunque el análisis filogenético basado en el último exón largo de *tef1* y una porción del gen *rbp2*, muestran que estas especies pertenecen al clado Virens (Chaverri & Samuels, 2004). Esto explicaría el resultado obtenido con *rbp2* y la cercanía de estas dos especies

Las secuencias ITS para el aislado TV30, arrojó como resultado, tres posibles especies, *T. koningiopsis* / *T. ovalisporum* / *T. asperellum*, ya que estas regiones no son suficientemente polimórficas como para distinguir entre estas especies. Así, solo genes como el *tef1*, pueden lograr diferenciarlas, como efectivamente ocurrió, identificando a TV30 como *T. asperellum*. Sin embargo, existe una discrepancia al tomar en cuenta los resultados con *rbp2*, donde se identifica como *T. pubescens*. Se ha señalado que el exón utilizado en este caso de *rbp2* ofrece información segura sobre el clado al cual pertenece una especie por lo que se recomienda que los datos suministrados por este gen sean usados como complemento a la identificación realizada por *tef1* e ITS (Stone, 2005). Cabe destacar que ambas especies (*T. aspe-*

rellum y *T. pubescens*) pertenecen al mismo clado VIRIDE (Degenkolb et al, 2008), lo cual podría explicar las semejanzas en sus secuencias *rbp2*.

Las secuencias ITS y *tef1* de TVC34 coinciden en identificar al aislado como *T. brevicompactum*. Sin embargo, *rbp2* tiene su mejor alineamiento con secuencias de *T. phyllostachydis*, que no tiene ninguna relación con *T. brevicompactum*, por ser especies distantes. Haciendo un análisis a la secuencia *rbp2* de este aislado, se observó que la misma posee una longitud de alrededor de 325 pb, mientras que el resto de los aislados (excepto TVC34 y TVC36) poseen una longitud de aproximadamente 900 pb. Obviamente al momento de secuenciar las muestras de *rbp2* para TVC34 y TVC36, hubo problemas que dieron como resultado secuencias más cortas y por lo tanto menos informativas. Para el aislado TV35, ITS y *tef1* lo identifican como *T. erinaceum*. Pero *rbp2* lo asocia con *T. viride*. Estas especies se relacionan ya que pertenecen al mismo clado (VIRIDE). En el caso de TVC36 el análisis de ITS y *tef1* arrojó que se trata de *T. harzianum*, aunque las secuencias *rbp2* más cortas (como se discutió más arriba) de este aislado, sugieren que la asociación del mismo con *T. helicum* es poco confiable. Como tercer mejor alineamiento para este gen se encontró a *T. harzianum*, lo cual si coincide con la información aportada por ITS y *tef1* para este aislado.

El aislado TV81 fue identificado por todos los

genes estudiados como *T. virens*, sin dejar lugar a dudas de su identificación.

Los aislados TV82 y TV83 fueron identificados con base en ITS como *T. koningiopsis*/*T. ovalisporum*, mientras que *tef1* confirmó que se trata de *T. koningiopsis*. Las secuencias de *rpb2* asocian a estos aislados con la especie relacionada *T. viride*, perteneciendo todas al clado VIRIDE. Para TV113, los tres genes estudiados identificaron al aislado como *T. spirale*. Finalmente el aislado TV217, fue identificado por ITS y *tef1* como *T. reesei*, mientras que *rpb2*, dio este mismo resultado pero como segundo mejor alineamiento, siendo el primero *T. longibrachiatum*.

Con base en los resultados obtenidos se sugiere asignar los siguientes epítetos específicos a los aislados en estudio: TV03 (*T. virens*); TVC24 (*T. virens*); TV30 (*T. asperellum*); TVC34 (*T. brevicompactum*); TV35 (*T. erinaceum*); TVC36 (*T. harzianum*); TV81 (*T. virens*); TV82 y TV83 (*T. koningiopsis*); TV113 (*T. spirale*) y TV217 (*T. reesei*).

Conclusiones y Recomendaciones

La identificación de especies de *Trichoderma* por medio de métodos moleculares representa una herramienta útil, rápida y sencilla, si se cuenta con los equipos necesarios. La información genética disponible en la literatura relacionada con los distintos genes que se utilizan para identificar especies de *Trichoderma*, permite identificar aislados pertenecientes a especies conocidas y establece los pasos para identificar posibles especies nuevas.

Estas herramientas permitieron identificar en el presente trabajo las siguientes especies: *T. virens*; *T. asperellum*; *T. brevicompactum*; *T. erinaceum*; *T. harzianum*; *T. koningiopsis*; *T. spirale* y *T. reesei*.

El análisis de las secuencias debe seguir una serie de pasos para poder llegar a conclusiones acertadas en cuanto a la identidad del aislado, entre las que se incluyen: el análisis y comparación de segmentos de ADN correctos, una base de datos adecuada y la destreza para elegir con base en la información aportada, el epíteto específico correcto.

Las especies identificadas en el presente estudio pudieran tener importancia para el ser humano desde el punto de vista agroalimentario, industrial y ecológico, y pudieran ser utilizadas próximamente en aplicaciones biotecnológicas, tales como el biocontrol de agentes fitopatógenos, mejoramiento de la

fisiología de plantas de interés agrícola, producción de polisacáridos y celulasas, entre otras.

Bibliografía

- Aljanabi M., I. Martinez. (1997). Universal & rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Benitez T, A. Rincón, M. Limón, A. Codon. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260.
- Carsolio C., A. Guitierrez, B. Jimenes, M. Montagu, A. Herrera. (1994). Caracterización of ech-42, a *Trichoderma* Harzianum endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the Natural Academy of Science* 91: 10903-10907.
- Chaverri P., G. Samuels. (2004). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) : Species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48: 1-116.
- Degenkolb T., R. Dieckmann, K. Nielsen, T. Grafenhan, C. Theis, D. Safari, P. Chaverri, A. Ismaiel, H. Bruckner, H. Dohren, U. Traen, U; Petrini, O & Samuels, G. (2008). The *Trichoderma* brevicompactum clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress* 7: 177-219.
- Denton A., B. McConaughy, B. Hall. (1998). Usefulness of RNA polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny. *Molecular Biology Evolution* 15:1082-1085.
- Druzhinina I. (2009). PCR protocols for amplification of *Trichoderma* phylogenetic markers. En línea: <http://www.isth.info/methods/method.php?methodid=10>. Accesado: 11 de Mayo de 2011.
- Druzhinina I., P. Chaverri, P. Fallah, C. Kubicek, G. Samuels. (2004). *Hypocrea* flaviconidia, a new species from Costa Rica with yellow conidia. *Studies in Mycology* 50:401-407.
- Druzhinina I., A. Kopchinskiy, M. Komon, J. Bisett, G. Szakacs, C. Kubicek. (2005). An oligonucleotide

- barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 813-828.
- Druzhinina I. C. Kubicek. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University Science*. 6B:100-112.
- Druzhinina I., A. Kopchinskiy, C. Kubicek. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Druzhinina I., M. Komon-Zelazowska, A. Ismaiel, W. Jaklitsch, T. Mullaw, G. Samuels, C. Kubicek. (2012). Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49: 358-368.
- Geiser D. (2004). Practical molecular taxonomy of fungi. En: Tkacz J. y L. Lange (Eds.). *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York pp 1-13.
- Harman G. (2000). Myths & Dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393.
- Hoon J., J. Yun. (2005). Structural and Molecular Characterization of Extracellular Polysaccharides Produced by a New Fungal Strain, *Trichoderma erinaceum* DG-312. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 1250- 1257.
- Kexiang G., L. Xiaoguang, L. Yonghong, Z. Tianbo, W. Shuliang. (2002). Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. *Journal of Phytopathology* 150: 271-276.
- Kindermann J., Y. El-Ayouti, G. Samuels, C. Kubicek. (1998). Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology* 24:298-309.
- Kopchinskiy A., M. Komón, C. Kubicek, I. Druzhinina. (2005). TrichoBlast: A Multilocus Database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research* 109: 658-660.
- Kubicek C., U. Bözlbauer, W. Kovacs, R. Mach, K. Kuhls, E. Lieckfeldt, T. Börner, G. Sameuls. (1996). Cellulase formation by species of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and of *Hypocrea* spp. with anamorphs referable to *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Fungal Genetics and Biology* 20: 105-114.
- Lieckfeldt E., G. Samuels, H. Nirenberg, O. Petrini. (1999). A Morphological & Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species. *Applied Environmental Microbiology* 24:18-2428.
- Maymon M., D. Minz, O. Barbul, A. Zveibil, Y. Elad, S. Freeman. (2004). Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to ap-PCR & ITS sequence analyses. *Phytoparasitica* 32:370-375.
- Payne C., B. Knott, H. Mayes, H. Hansson, M. Himmel, M. Sandgren, J. Ståhlberg, G. Beckham. (2015). Fungal Cellulases. *Chemical Review* 115(3): 1308-448.
- Rivas M., D. Pavone. (2010). Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. *Interciencia* 35(10) 777-783.
- Stone J. (2005). *Mycological Research News*. *Mycological Research* 6: 657- 660.
- Vizcaíno J., L. Sanz, A. Basilio, F. Vicente, S. Gutiérrez, M. Hermosa, E. Monte. (2005). Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research* 109(12): 1397-1406.
- Zhang F., H. Ge, F. Zhang, N. Guo, Y. Wang, L. Chen, X. Ji, C. Li. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 100: 64-74.