

**Identificación de dos cepas del agente biocontrolador *Trichoderma* sp. de dos zonas del estado de Guerrero**

MICHEL-ACEVES, Alejandro\*†, DÍAZ-NÁJERA José Francisco`, GÓMEZ-GUADALUPE, Alvarado Omar`` y ALCÁNTARA-JIMÉNEZ, José Ángel`

*`Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Avenida Vicente Guerrero Núm. 81. Iguala, Guerrero, C.P. 40000.**``Universidad Autónoma Chapingo, Dpto. de Fitotecnia, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México C.P. 56230.**```Facultad de Agronomía, UANL. Francisco Villa s/n C.P. 66050. Colonia Exhacienda "El Canadá", Escobedo, N.L.*

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

**Resumen**

El uso de agentes biocontroladores es una de las estrategia de control más utilizada son últimamente para el control de enfermedades de los cultivos por proporcionar un control más racional, además de que pueden ser incluidos dentro del control integrado de enfermedades. El suelo es una importante fuente de microorganismos que han sido ampliamente estudiados para procesos biotecnológicos, contándose entre estos el control biológico de enfermedades en plantas por medio de procesos naturales como la antibiosis y el parasitismo. La principal estrategia para el biocontrol ha sido la identificación de microorganismos del suelo que sean antagonistas efectivos y que su uso biológico sea seguro, estrategia que ya cuenta con resultados exitosos.

**Abstract**

The use of biocontrol agents is one of the most used strategy control are ultimately to control crop diseases by providing a more rational control, plus it can be included within the integrated disease control. Soil is an important source of microorganisms that have been extensively studied for biotechnological processes, counting among these biological control of plant diseases through natural processes such as antibiosis and parasitism. The main strategy for biocontrol has been the identification of soil microorganisms that are effective antagonists and their use is safe biological strategy that already has successful results.

**Strains, biocontrol, *Trichoderma*.****Cepas, biocontrolador, *Trichoderma*.**

**Citación:** MICHEL-ACEVES, Alejandro, DÍAZ-NÁJERA José Francisco, GÓMEZ-GUADALUPE, Alvarado Omar y ALCÁNTARA-JIMÉNEZ, José Ángel. Identificación de dos cepas del agente biocontrolador *Trichoderma* sp. de dos zonas del estado de Guerrero. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 Abril 2014, 1-1:107-110

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: apigro1988@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

## Introducción

Entre los microorganismos nativos del suelo, *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente estudiado y se ha propuesto como agente de control biológico, especialmente contra fitopatógenos nativos del suelo. Los factores clave que contribuyen al efecto antagónico de estos organismos son su rápido crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos y sus características fisiológicas, sin embargo para una adecuada comprensión de las propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas se requiere de la acertada ubicación taxonómica de estos organismos. La variabilidad de las características morfológicas de las especies de *Trichoderma* hace que su clasificación sea difícil, no obstante con el desarrollo de técnicas moleculares la sistemática de este género ha avanzado sustantivamente en los últimos años y es debido a este avance que la importancia de métodos morfológicos ha disminuido paulatinamente. La descripción de las diferencias en las regiones 5.8S del rRNA, ITS1 e ITS2 y otras técnicas han ocasionado que en años recientes, diferentes cepas de *Trichoderma harzianum*, se reubicaran en especies como *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. longibrachiatum*. Del mismo modo, cepas de *T. atroviride* o *T. viride* se han reubicado como *T. asperellum* (Guigón et al., 2010).

## Objetivo

Identificar molecularmente a dos cepas nativas de *Trichoderma*, una aislada del campo experimental del CEP-CSAEGro y otra de la comunidad del Refugio municipio de Chilapa de Alvares Gro.

## Metodología

### Obtención de la especie nativa de *Trichoderma* sp.

Colecta de muestra de suelo. En el sitio de estudio se obtuvieron cinco muestras de 1 kg de suelo bajo el método “cinco de oros”.

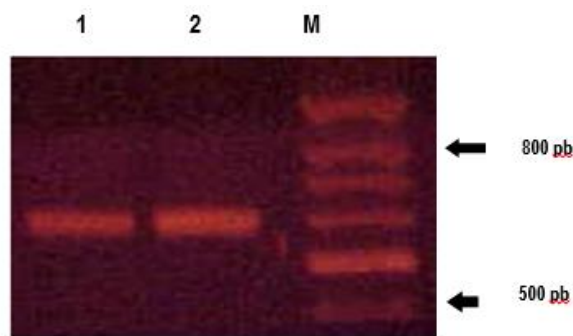
Las cuales se mezclaron y homogenizaron para tomar una submuestra representativa de 1 kg. En cada cepa, se eliminó la materia orgánica superficial y los primeros 4 cm de suelo, y se colectó suelo de una capa de 20 cm de profundidad, se transportó en bolsas de plástico al laboratorio de fitopatología del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, en donde se mantuvo en refrigeración a 10 °C, hasta el momento de su procesamiento. Aislamiento e identificación morfológica de *Trichoderma* sp. El aislado de *Trichoderma* sp. se obtuvo mediante el método de dilución de esporas en caja Petri; para esto, de cada muestra compuesta, se utilizó 1 g de suelo diluido en 10 mL (proporción 1/10 p/v) de agua destilada estéril hasta obtener diluciones 1/100 y 1/1000, de las cuales se tomaron alícuotas de 0.5 mL y se distribuyeron homogéneamente sobre la superficie de medio de cultivo PDA en cajas Petri; éstas se incubaron a temperatura ambiente por 10 días. Se utilizaron en total 10 cajas Petri por cada muestra compuesta de suelo. Las colonias de *Trichoderma* spp. se reconocieron por su forma de crecimiento en parches verdes y formación de anillos concéntricos. Del aislado se realizó la purificación por medio de cultivos monospóricos. Para identificarlo morfológicamente se utilizaron las claves propuestas por Wantanabe (2002). Identificación Molecular. PCR y secuenciación. Para las reacciones de PCR se utilizó el ADN de micelio de aislamientos purificados a partir de muestras de suelo. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos con los oligos ITS-1fu 5'-tccgtagtgtaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tctcgcgttattgatatgc-3'; los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 500 y 900 pares de bases (pb) aproximadamente. Esta práctica se realizó con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, cuyos componentes fueron: amortiguador de reacción 5X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP's 200 nM, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Promega).

El protocolo consistió en mantener una temperatura a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 seg y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 %, y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se tomaron fotografías. Los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados directamente y se compararon los resultados con las secuencias disponibles en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (Qiagen, 2012).

## Resultados

**Identificación morfológica.** De las dos muestras de suelo indicadas, se obtuvieron la cepas nativas de *Trichoderma* spp., se identificaron a nivel género, presentaron las características morfológicas siguientes: conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos, con dimensiones de 4.6-6.1 × 2.3-3.7 μ de largo por ancho; conidios de una célula, ovoides, subglobosos y elipsoidales nacidos en pequeños racimos terminales de colores verdes fuerte y olivo, el largo y ancho del conidio osciló entre los 3.9 μ × 2.05 μ; presentan clamidosporas intercalares, terminales o solitarias, verdes, miden entre 7.5-8.8 y 7.4-2.8 μ de largo por ancho; la distancia entre septos es de 15 a 21 μ (Wantanabe, 2002).

**Identificación molecular.** Se logró la amplificación del ADN de la región ITS de las dos cepas de *Trichoderma*. Se utilizó un primers universal para amplificar la región ITS. Se utilizaron dos muestras y se obtuvieron productos de la misma talla (Figura 1). Los productos obtenidos de la secuenciación se compararon en el Gen Bank y se identificaron como *T. asperellum* (Cuadro 1).

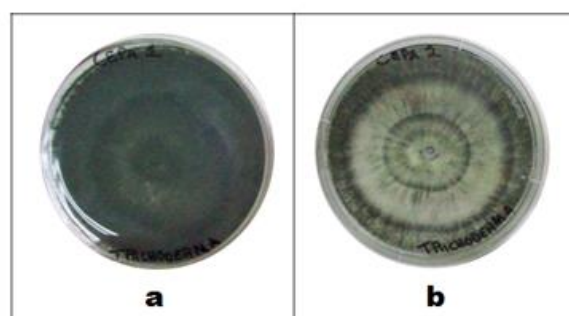


**Figura 1** Amplificación por PCR a partir de ADN's de micelio de dos muestras de *Trichoderma* aislados del sitio CSAEGRO y de Chilapa de Álvarez, Gro. Los productos de amplificación obtenidos de los carriles 1 al 2 fueron: 589 y 586 pb. M es el marcador de peso molecular ladder-100 de Axygen.

La cepa aislada perteneció a la especie *Trichoderma asperellum* (Cuadro 1 y Figura 2). La identidad de la especie se confirmó con la identificación molecular y la comparación de las secuencias obtenidas, con las secuencias reportadas en el banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information; [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)).

Sitio	Especie	Comparación de la secuencia con el Gen Bank
CSAEGRO	<i>T. asperellum</i>	gblHQ293149.1 <i>Trichoderma asperellum</i> strain BHU216
Chilapa	<i>T. asperellum</i>	gblJN618341.1 <i>Trichoderma asperellum</i> strain BHU265

**Tabla 1** Comparación de la secuencia de las cepas de *Trichoderma* de cada sitio de cultivo.



**Figura 2** Colonias de: *T. asperellum*, aisladas del sitio a) CSAEGro y b) Chilapa.

## Discusión

La presencia de especies de *Trichoderma* en suelos guerrerenses, muestra la naturaleza cosmopolita de este género, sin excluir que es un habitante natural del suelo (Samuels, 2006). Debido a la similitud entre características morfológicas dentro de las especies del género *Trichoderma*, ha sido necesaria la reclasificación de éstas (Bissett et al., 2003). Recientemente el número de especies filogenéticamente distintas se ha incrementado considerablemente, debido principalmente a la introducción de técnicas moleculares, a un muestreo geográfico más amplio y, por consecuencia, nuevos nichos ecológicos (Samuels, 2006).

## Conclusión

Las cepas nativas de *Trichoderma*, de las dos zonas del estado de Guerrero fueron identificadas morfológicamente a nivel género y molecularmente se identificaron como la especie *T. asperellum*.

## Referencias

Ayvar-Serna S., Mena-Bahena A., Durán-Ramírez J.A., Cruzaley-Sarabia R y Gómez-Montiel N.O. (2007). La calabaza pipiana y su manejo integrado. Folleto técnico. Fundación Produce de Guerrero, A. C. Campo Experimental Iguala. CSAEGro. Iguala, Gro. México. 26p.

Quiagen. (2012). Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Versión 2. Alemania.

Wantanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultures Fungi and Key to Species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p.

Bissett, J., Szakacs, G. and Nolan, C. A. (2003). New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal Botanic* 81:570-586.

Guigón, L. C., Guerrero, P. V., Vargas, A. F., Carvajal, M. E., Ávila, Q. G.D., Bravo, L., L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:87-96.

Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology*. *Phytopathology* 96:195-206.