

UCH - IC
Biotecnología
P 426
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO
FÚNGICO *TRICHODERMA* Y DESARROLLO DE UN MARCADOR
MOLECULAR ESPECÍFICO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

GABRIEL ORLANDO PÉREZ GONZÁLEZ



Dra. Margarita Carú
Directora del Seminario de Título

Agosto 2010
Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

“GABRIEL ORLANDO PÉREZ GONZÁLEZ”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Margarita Carú

Directora Seminario de Título

A blue ink signature of Margarita Carú written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dr. Marcelo Baeza

Presidente Comisión

A blue ink signature of Marcelo Baeza written over a horizontal line.

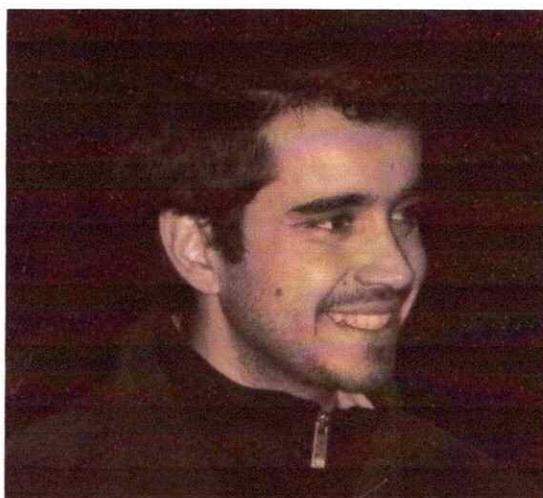
Dr. Marco Méndez

Evaluador

A black ink signature of Marco Méndez written over a horizontal line.



Santiago de Chile, Agosto 2010



Nací el 14 de Septiembre de 1984, fui criado en Santiago y no me he movido de la casa que me vio crecer, soy el hijo mayor de la pareja de hijos del matrimonio de Luis Pérez y Maribel Gonzalez, lo que me da a mi y a mi hermana Marcia nuestros rebuscados apellidos, niño problema por definición, durante la enseñanza básica, dos colegios fueron testigos de mis travesuras, pero finalmente cuando hubo que ponerse serio lo hice, por motivación propia entré a un mejor colegio que me dio la preparación necesaria para llegar a la universidad, el Liceo Manuel Arriaran Barros, no obstante, también recuerdo con mucho cariño al desaparecido Colegio Claretiano y al José Luis Lagrange, donde también aprendí y compartí durante años importantes de mi vida.

Termine el colegio el año 2002, para entrar a Licenciatura en Biología en la Universidad de Chile el año 2003, movido tanto por un profundo interés por la ciencia, como por el miedo de tener que dar una prueba de ingreso nueva, no obstante fue siempre mi intención conseguir lo que en el año 2005, ingresar a la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular, ya que si bien mi interés está en la ciencia, mi motivación está en sus aplicaciones.

Viví muchas experiencias, en la Facultad de Ciencias, algunas muy alegres, otras tristes, de angustia, y dicha, conocí gente maravillosa que ha marcado para siempre mi vida y mi destino, y ahora que miro hacía atrás, soy consciente que yo no sería el mismo sin cada una de las experiencias que he vivido, por lo que agradezco cada una de ellas y a sus actores, y de verdad espero que este no sea un punto final para seguir aprendiendo y compartiendo con las personas que conocí en estos años, sino un punto seguido en este camino que decidí seguir y que me apasiona.



A los que en mi creyeron.



AGRADECIMIENTOS

A los que de una u otra manera me acompañaron en este camino, al profesor Víctor Cifuentes, por recibirme en su laboratorio siendo un cándido alumno de primer año, a Salvador Barahona por su paciencia en la instrucción de mis primeras técnicas de laboratorio, a la profesora Irma Vila quien me guio en mi primera unidad de investigación y en lo que fue mi camino de ahí en más, al ex profesor Mark Hershkovitz, por su amistad, apoyo, guía e invaluable instrucción en las técnicas que incluso me ayudaron a desarrollar este trabajo, al profesor Miguel Allende, por permitirme trabajar con un organismo modelo, simplemente maravilloso (*Danio rerio*) y a Pedro Hernandez, quien me guiara en dicho trabajo, a la profesora Margarita Carú por su paciencia y buena voluntad, al permitirme llevar a cabo este trabajo en su laboratorio, y a todos los que ahí me ayudaron y acompañaron (Julieta, Rafael, Catalina, Juanita, Valentina, Mauricio, José, Fernanda, Marisol, Felipe y Natalia), a Juan Carlos Letelier quien fue un importante asesor en el desarrollo de este trabajo y quien propició mi acercamiento a la empresa Biopacific Ltda., algo simplemente vital para mi desarrollo como biotecnólogo, también agradezco a la empresa por confiar en mí para el desarrollo de tan importante trabajo.

Finalmente, pero no por eso menos importante, agradezco a mi familia, que me acompañó y apoyó, que más de algo tuvieron que sacrificar para que yo pudiese mantener mi condición de estudiante, que pasaron y vivieron conmigo los buenos y malos momentos, a mis abuelos Mario y Tosca, a mi hermana Marcia, a mis padres y a la Eliana, también a mis compañeros, Camilo Gouet, Daniel Opazo, Gissela Araya, Ignacio Jara e Inelia Morales, que estuvieron ahí cuando las tareas se veían complejas y bordeando en lo titánico, trabajando codo a codo, dándose un tiempo para conversar, alentar e incluso criticar, por que no solo la cátedra fue lo que aprendí en mi paso por la universidad, por eso les doy las gracias, y a todos con los que compartí durante el transcurso de mis 7 años en la Facultad de Ciencias.



ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Portada.....	i
Biografía.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de Contenido.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiv
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	9
1.- Cepas.....	9
2.- Obtención y cultivo de aislados monospóricos.....	10
3.- Preparaciones al microscopio.....	11
4.- Extracción del DNA.....	12
5.- Electroforesis en gel de agarosa.....	13
6.- Amplificación del fragmento ITS1-5.8S rDNA-ITS2 mediante PCR y secuenciación.....	13
7.- Identificación y análisis de relaciones.....	14
8.- Marcadores RAPD.....	15
9.- Clonación y secuenciación de un amplicon RAPD.....	16
10.- Partidores SCAR.....	17
Resultados.....	20
1.- Caracterización morfológica de los aislados.....	20
2.- Identificación molecular de los aislados fúngicos.....	21
2.1.- Amplificación por PCR de las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 y secuenciación.....	21
2.2.- Análisis de la secuencia de la región ITS.....	22
2.2.1.- Análisis de relaciones.....	26
3.- Variabilidad genética de los aislados mediante análisis de RAPD.....	33
4.- Desarrollo del marcador SCAR.....	35
4.1.- Diseño de partidores SCAR para PCR diagnóstico.....	37
Discusión.....	43
1.- Identificación de <i>Trichoderma</i> : La morfología versus marcadores moleculares para la identificación.....	42
1.1.- Análisis de relaciones para <i>T. harzianum</i>	49
1.2.- Variabilidad genética de los aislados mediante PCR-RAPD.....	49
2.- SCAR.....	50

3.- Aproximación a la biodiversidad de <i>Trichoderma</i> en Chile.....	53
Conclusiones.....	55
Referencias.....	56
Anexo I.....	61
Anexo II.....	62





ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1.....	6
Alineamiento maestro del código de barras oligonucleotídico basado en los ITS1 e ITS2 para TrichOKEY1.0 (Extraída de Druzhnina & Kopchinskiy 2009).	
Figura 2.....	13
Representación esquemática del segmento correspondiente al cluster de genes ribosomales que contiene el amplicon de interés (ITS1-5.8S rDNA-ITS2), además se muestra la orientación de los primers ITS1 e ITS4.	
Figura 3.....	20
Imagen a 100X del espécimen BpT7, las flechas negras muestran el conidioforo, las flechas verdes las ramificaciones en verticilo, las flechas rojas indican los filidios en verticilo, las flechas azules muestran conidios en desarrollo y con flechas amarillas hifas. La barra de tamaño corresponde a 20µm.	
Figura 4.....	22
Electroforesis del DNA amplificado con los partidores ITS1 e ITS4 que muestra el fragmento de aproximadamente 600pb (indicado con una flecha) a partir del DNA de los aislados BpTF, BpTH, BpT7, BpT6, BpT10a, BpTA, BpTC y BpTR, (-) Control negativo, como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).	
Figura 5.....	28
Dendrograma de 135 taxas fúngicas. La topología del se infirió mediante el algoritmo de Neighbor- Joining con 1000 iteraciones de <i>bootstrap</i> . Los porcentajes <i>bootstrap</i> se muestran al lado de cada nodo (Felsenstein 1985). Todas las ramas que no contenían a ninguna de las secuencias en estudio fueron colapsadas y representadas como <i>Trichoderma spp.</i> Las muestras analizadas en este trabajo están representadas con un (●).	
Figura 6.....	30
Agrupamiento de 32 taxa fúngicas. La topología del se infirió mediante el algoritmo de Neighbor- Joining con 1000 iteraciones de <i>bootstrap</i> . Se indican sólo los valores de <i>bootstrap</i> mayores de 50% El dendrograma fue dibujado a escala, con el largo de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el dendrograma.	
Figura 7.....	33
Dendrograma de 10 taxa pertenecientes al género <i>Trichoderma</i> . La topología del dendrograma se infirió mediante el algoritmo de Neighbor- Joining con 1000 iteraciones de <i>bootstrap</i> . Los porcentajes con los cuales los taxa se agrupan en el test de <i>bootstrap</i> se muestran al lado de cada nodo.	
Figura 8.....	34
Patrón de amplicones polimórficos obtenidos mediante PCR-RAPD con el partidore OPA-03, como marcador de peso molecular se usó 100 bp (Invitrogen), las muestras "BpT" corresponden a aislados del género <i>Trichoderma</i> (ver detalle en materiales y métodos), HI cepa de <i>Aspergillus</i> , Atc4 cepa de <i>Penicillium</i> y Atc 8 cepa de <i>Monascus</i> (ver detalle en materiales y métodos), (-) Control negativo, como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).	
Figura 9.....	35
Dendrograma de similitud de marcadores RAPD de aislados fúngicos, obtenido usando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979) y el método de agrupamiento UPGMA, a partir de una matriz de presencia/ausencia de amplicones obtenidos mediante PCR-RAPD con los partidores OPA-03, OPA-13, OPX-02, OPBF-15, OPBH-03 y OPBH-20. Los aislados pertenecen al género <i>Trichoderma</i> (para detalles ver apartado cepas en materiales y métodos). Los valores de <i>bootstrap</i> menores al 50% no fueron indicados.	



Figura 10.....	36
Patrón de amplicones obtenidos mediante PCR-RAPD con el partidor seleccionado, para todas los aislados identificadas como <i>Trichoderma harzianum</i> . Como marcador de peso molecular se usó 100 bp (Invitrogen), los aislados están indicados de acuerdo a la Tabla 1 (ver detalles en materiales y métodos). La flecha indica la banda de aprox. 500Pb, (-) Control negativo.	
Figura 11.....	37
Amplicones obtenidos desde el DNA de las colonias de <i>E. coli</i> transformantes. La amplificación por PCR se realizó con los partidores del vector M13 y el amplicón se resolvió por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. La flecha muestra el amplicón de aproximadamente 650bp. Como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen). (-) Control negativo.	
Figura 12.....	37
Ubicación relativa de los partidores en la secuencia de 503pb analizada.	
Figura 13.....	41
Amplificación del marcador SCAR con los partidores TFX2FI-TFX2RI. El PCR se realizó con temperatura de annealing 64°C, Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. Los carriles 1,2,3,4,6,7,8,9,BpTF, BpTH, BpT7, BpT6, BpT10a, BpTA corresponden a los aislados de <i>T. harzianum</i> , los carriles BpTR, BpTC, BpT5, BpT10, BpT9 corresponden a <i>T. atroviride</i> , BpT1a corresponde a <i>T.novaezelandiae</i> , BpTP corresponde a <i>T. Citrinoviride</i> , BpT2 corresponde a <i>Trichoderma sp.</i> Atc4, Atc5, 9a, 9ar1, C1R, HC1 y C3F corresponden a <i>Penicillium spp.</i> HI y 4a corresponden a <i>Aspergillus spp.</i> , HM corresponde a <i>Davidiella sp.</i> , 9ar corresponde a <i>Paecilomyces sp.</i> , Atc8 corresponde a <i>Monascus sp.</i> , y C3R corresponde a una mezcla de especies provenientes de compost.(-) control negativo, como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).	
Figura 14.....	42
Amplificación del marcador SCAR con los partidores TFX2FI y TFX2RI. El PCR se realizó con temperatura de annealing 64°C, Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2 %. Los carriles 1,2,3,4,6,7,8,9,BpTF, BpTH, BpT7, BpT6, BpT10a, BpTA corresponden a <i>T. harzianum</i> , los carriles BpTR, BpTC, BpT5, BpT10, BpT9 corresponden a <i>T. atroviride</i> , BpT1a corresponde a <i>T.novaezelandiae</i> , BpTP corresponde a <i>T. citrinoviride</i> , BpT2 corresponde a <i>Trichoderma sp.</i> , Atc4, Atc5, 9a, 9ar1, C1R, HC1 y C3F corresponden a <i>Penicillium spp.</i> HI y 4a corresponden a <i>Aspergillus spp.</i> , HM corresponde a <i>Davidiella sp.</i> , 9ar corresponde a <i>Paecilomyces sp.</i> , Atc8 a <i>Monascus sp.</i> , y C3R a una mezcla de especies provenientes de compost. (-) control negativo. Marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).	
Figura 15.....	48
Crecimiento en placa Petri de cepas aisladas, identificadas como <i>Trichoderma atroviride</i> , crecidas en PDA a 25°C. Cortesía de Pedro Castillo.	
Figura 16.....	54
Visualización en nubes de la abundancia relativa de especies del genero <i>Trichoderma</i> , realizado en www.ibarcode.org (Singer & Hajibabaei 2009) para los 14 aislados de este trabajo reconocidos como pertenecientes al género <i>Trichoderma</i> .	



ÍNDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1.....	9
Detalle del origen, fuente y lugar de recolección de las muestras obtenidas.	
Tabla 2.....	16
Secuencia de los partidores 10mer utilizados en la amplificación RAPD.	
Tabla 3.....	23
Identificación mediante BLAST, del organismo más relacionado con las secuencias obtenidas de los aislados en estudio.	
Tabla 4.....	24
Identificación mediante BLAST del organismo más relacionado, con las secuencias sometidas a TrichoMARK.	
Tabla 5.....	26
Identificación de especies por análisis de las secuencias ITS mediante <i>TrichOKEY</i> 2.0	
Tabla 6.....	31
Mapa haplotípico (Barcode-HAPMAP) construido en www.ibarcode.org . (Singer & Hajibabaei 2009)	
Tabla 7.....	32
Mapa haplotípico (Barcode-HAPMAP) construido en www.ibarcode.org , (Singer & Hajibabaei 2009) para todos los aislados nativos identificados como <i>Trichoderma harzianum</i> .	
Tabla 8.....	39
Evaluación de combinaciones posibles de partidores para reacciones de PCR diagnóstico.	
Tabla 9.....	45
Ejemplo de una búsqueda en BLAST con una secuencia ITS1 e ITS2 de <i>Trichoderma</i> que mostró un resultado ambiguo. (Extraída de (Druzhinina & Kubicek 2005))	

ABREVIATURAS.

GMO: Genetically Modified Organism (Organismo Genéticamente Modificado)

BCA: Bio Control Agent (Agente de Control Biológico)

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Método de Agrupamiento de Pares con la Media Aritmética no Ponderada)

ITS: Internal Transcribed Spacer (Espaciador Interno Transcrito)

DNA: DeoxyriboNucleic Acid (Ácido DesoxyriboNucleico)

RNA: RiboNucleic Acid (Ácido RiboNucleico)

SCAR: Sequence Characterized Amplified Region (Región Amplificada Caracterizada por la Secuencia)

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA (DNA Polimorfico Amplificado al Azar)

ORF: Open Reading Frame (Marco de Lectura Abierto)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de Búsqueda por Alineamiento Local Básico)

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información Biotecnológica)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Un Nucleotido)

PDA: Papa Dextrosa Agar (Agar Papa Dextrosa)

ME: Malt Extract (Extracto de Malta)

MEB: Malt Extract Broth (Caldo de Extracto de Malta)

TAE: Tris Acetato EDTA

TE: Tris EDTA

EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid (Ácido EtilenDiaminoTetraacético)

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate (Dodecil Sulfato de Sodio)

ISTH: International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy

(Subcomision internacional en la taxonomía de Hypocrea y Trichoderma)

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

RT-PCR: Real Time PCR (PCR en Tiempo Real)

RESUMEN.

Algunas especies del género *Trichoderma* establecen interacciones biológicas con diversos micro y macroorganismos (hongos, plantas, animales, etc.). Algunas de estas interacciones tienen un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo en biocontrol y debido a la producción de enzimas celulolíticas y quitinolíticas, entre otras posibilidades. Para su aplicación en soluciones biotecnológicas, es importante hacer una buena identificación del agente biológico y específicamente de la cepa de interés, de esta manera es posible relacionar sus características fenotípicas con un perfil genético basado en marcadores moleculares que permitan hacer un seguimiento del agente biológico durante todas las etapas del proceso de producción y aplicación. En este sentido, el objetivo general del trabajo fue identificar, mediante un perfil genético un conjunto de cepas nativas del género *Trichoderma* y desarrollar un marcador molecular específico del tipo SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) para la caracterización de las especies.

Para la identificación de los aislados se secuenciaron las regiones intergénicas de los genes que codifican para los RNA ribosomales (ITS1 e ITS2) en 29 muestras de hongos filamentosos aislados desde distintos orígenes: 14 de ellas fueron obtenidos desde muestras ambientales de 4 localidades del sur de Chile, 7 fueron obtenidas desde un producto comercial y 8 muestras de DNA proporcionadas desde una colección privada de *T. harzianum*. Para determinar su identidad hasta el nivel de especies, las secuencias

obtenidas fueron analizadas mediante las herramientas de DNA barcode (www.isth.info). De las muestras analizadas 22 de ellas fueron identificadas como aislados correspondientes al género *Trichoderma*. Las 7 secuencias provenientes del producto comercial se analizaron mediante BLAST y se identificaron como pertenecientes a los géneros *Monascus* y *Penicillium*. Las relaciones entre las cepas se determinaron mediante el software MEGA4.

Para el desarrollo del marcador SCAR, se evaluaron 16 partidores RAPD de 10 mer, de los cuales solo 6 partidores generaron amplicones reproducibles, de éstos se seleccionó uno de los partidores, el cual entregó un patrón de amplicones polimórficos entre los aislados analizados. En particular, este partidor generó una banda común, presente solo en las cepas de la especie *Trichoderma harzianum*. A partir de este amplicón, se diseñó un marcador molecular de tipo SCAR específico para esta especie. La capacidad de discriminación del marcador SCAR fue evaluada con 14 muestras de *T. harzianum* y con otras cepas de distintas especies fúngicas. El marcador permitió distinguir todas las cepas de *Trichoderma harzianum*, proporcionando perfiles genéticos distinguibles cuando se compararon con otras especies de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Davidiella*, *Paecilomyces*, *Monascus* y una mezcla de especies provenientes de compost.

Finalmente, se usaron los patrones RAPD para evaluar el grado de polimorfismo de las cepas de *Trichoderma* estudiadas y se contrastaron estos resultados con los obtenidos

mediante el análisis de los fragmentos ITS1 e ITS2, lo que resulto en una buena correlación de los resultados.

ABSTRACT.

Some species of the genus *Trichoderma* establish biological interactions with various micro and macroorganisms (fungi, plants, animals, etc.). Some of these interactions have great potential in biotechnological applications, such as in biocontrol and due to the production of cellulolytic and chitinolytic enzymes, among other possibilities. For their application in biotechnological solutions, it is important to make a good identification of the biological agent and specifically of the strain of interest, so it is possible to relate their phenotypic traits with a genetic profile based on molecular markers that allow tracking of biological agents at all stages of production and application. In this sense, the objective of our study was to identify, through a genetic profile, a set of native strains of the genus *Trichoderma* and develop a type specific molecular marker SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) for the characterization of the species.

For identification of the isolates, intergenic regions of genes that code for ribosomal RNA (ITS1 and ITS2), were sequenced in 29 samples of filamentous fungi, these were isolated from different sources: 14 of them were obtained from environmental samples from 4 locations in southern Chile, 7 were obtained from a commercial product and 8 samples of DNA were provided from a private collection of *T. harzianum*. To determine its identity to species level, the sequences obtained were analyzed by DNA barcode tools (www.isth.info). Of the tested samples, 22 were identified as corresponding to the

genus *Trichoderma*. The other 7 sequences from the commercial product were analyzed by BLAST and identified as *Monascus* and *Penicillium*. The phylogenetic relationships between strains were determined by MEGA4 software.

To develop the SCAR marker, 16 RAPD primers of 10 mer were evaluated, of which only 6 primers generated reproducible amplicons, out of these, one of the primers was selected, which gave a pattern of polymorphic amplicons among the isolates analyzed. In particular, this primer generated a common band, present only in strains of the species *Trichoderma harzianum*. From this amplicon, we designed a SCAR marker specific for this species. The SCAR marker was evaluated with 14 strains of *Trichoderma* and strains from different fungal species. The marker allowed us to distinguish all strains of *Trichoderma harzianum*, providing distinct genetic profiles when compared with other species of the genera *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Davidiella*, *Paecilomyces*, *Monascus* and a mixture of species from compost.

Finally, RAPD patterns were used to evaluate the polymorphism of the studied *Trichoderma* strains and to contrast these results with those obtained by analyzing the ITS1 and ITS2 fragments, which resulted in a good correlation of the results.

INTRODUCCIÓN

El género de hongos anamorfos *Trichoderma*, perteneciente a la división Ascomycota y al orden Hypocreales, fue descrito por Persoon en 1794, y su asociación con los teleomorfos *Hypocrea* Fr. fue reconocida por los hermanos Tulasne en 1865. Sin embargo, su taxonomía se ha mantenido a oscuras hasta décadas recientes (Bissett & Gams 1998). Las especies del género *Trichoderma* son abundantes en madera en descomposición y suelos (Samuels 1996, Klein & Eveleigh 1998) llegando a comprender una porción mayoritaria de la biomasa total de hongos en dichos ambientes (Danielson & Davey 1973, Widden & Abitbol 1980, Nelson 1982) lo que resulta de su éxito en la obtención de nutrientes en forma saprofítica y en la capacidad de estos microorganismos para establecer diferentes interacciones biológicas con micro y macroorganismos tales como parasitismo, amensalismo, depredación e incluso endofitismo oportunista (Harman 2004).

Algunas especies del género *Trichoderma* y su teleomorfo *Hypocrea* tienen gran relevancia para el hombre como productores de enzimas (Kubicek & Penttilä 1998); y como agentes biocontroladores (BCAs), por sus siglas en inglés, destacando su acción sobre fitopatógenos. Entre las especies con capacidad biocontroladora se encuentran: *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*), *Trichoderma viride* (*Hypocrea rufa*), *Trichoderma atroviride* (*Hypocrea atroviridis*) y *Trichoderma asperellum* (Hjeljord & Tronsmo 1998). Algunas especies de *Trichoderma*, son también

patógenos en mamíferos inmunodeprimidos, incluyendo humanos (Kredics y col. 2003) los cuales pueden encontrarse como contaminantes intra-domiciliarios (Thrane y col. 2001).

Las propiedades del género *Trichoderma* como BCAs han sido investigadas por más de 70 años (Weindling 1934, Weindling & Fawcett 1936), pero sólo recientemente con la tendencia hacia el abandono del uso de pesticidas y fumigantes químicos, es que estos microorganismos se han convertido en productos comerciales disponibles para su uso como BCAs en el control de fitopatógenos (Hermosa y col. 2000).

Existe una gran diversidad de mecanismos por los cuales estos hongos establecen interacciones con fitopatógenos. Estas interacciones pueden ser de tipo indirecto como son la competencia por nutrientes y espacio, modificando las condiciones ambientales o estimulando el crecimiento y/o el sistema inmune de las plantas mediante endofitismo (Harman y col. 2004), o de tipo directo como el micoparasitismo, en el cual hongos del género *Trichoderma* parasitan directamente a otros hongos como los pertenecientes a los géneros *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, conocidos agentes de enfermedades en plantas (Benitez y col 2004; Harman 2006), además de nematodos (Meyer y col. 2001). Otro mecanismo directo esta constituido por relaciones amensales, asociadas a la producción de antibióticos y peptaiboles (Benitez y col 2004; Komon-Zelazowska 2007a; Grondona y col 1997).

La taxonomía del género *Trichoderma* ha resultado problemática principalmente por la homoplasia de las características fenotípicas, es por esto que las especies tipificadas mediante características de este tipo llegan a estar en un 50% erradas (Druzhinina & Kubicek 2005). Sin embargo, desde la década del ochenta el uso de marcadores moleculares ha permitido su identificación y han ayudado a definir más claramente las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Trichoderma*. Entre los marcadores usados se encuentran: los genes que codifican para la subunidad 2 de la RNA polimerasa (*rpb2*), fragmentos del factor de elongación traduccional 1-alpha (EF-1alpha=*tef1*), las porciones codificantes de la endoquitinasa 42 (*ech42*) y las regiones diagnósticas de los espaciadores internos transcritos de las regiones ribosomales ITS1 e ITS2 (Druzhinina & Kubicek 2005). Los ITS1 e ITS2 en conjunto con las técnicas de “fingerprinting” han permitido la resolución más fina de las unidades taxonómicas (Bissett & Gams 1998), que desde mediados de los noventa ha conllevado a la re-evaluación de la taxonomía basada en características morfológicas.

En el sentido de lo anterior, los laboratorios de Samuels, G.J. (Beltsville, MD, USA), T. Börner (Berlín, FRG) y Kubicek, C.P. (Austria, Viena), iniciaron una revisión pionera, de la sección llamada Longibrachiatum perteneciente al género *Trichoderma*, la que fue descrita en un comienzo por Bissett (Bissett 1991). En dicha oportunidad, los autores mencionados, combinando métodos moleculares, fisiológicos y morfológicos, validaron ampliamente la descripción de Bissett. Además de agregar otras secciones y especies a la sección Longibrachiatum y se confirmó por estos métodos la relación anamorfo/teleomorfo entre *Hypocrea* y *Trichoderma* (Samuels 1996) (Kuhls y col.

1996) (Kuhls y col. 1997) (Turner y cols. 1997) (Samuels y col. 1998). Por otro lado cuando secciones mayores fueron investigadas usando métodos moleculares, en particular los fragmentos ITS1 e ITS2, se intentó un análisis filogenético de todo el género (Kindermann y col. 1998). Posteriormente, este estudio ha sido validado por análisis filogenéticos basados en varios otros marcadores moleculares (Kullnig-Gradinger y col. 2002) (Chaverri 2003a) (Chaverri 2003b), con lo que finalmente, se llegó a la conclusión que el género *Trichoderma* consta de tres secciones (Longibrachiatum, Pachybasium B y Trichoderma), más algunos linajes únicos (Druzhinina & Kubicek 2005).

En el año 2005 se desarrolló un código de barras oligonucleotídico basado en un alineamiento de las secuencias de los ITS1 e ITS2 (Fig. 1) y que consiste en una combinación diagnóstica de varios sellos oligonucleotídicos, ubicados en esta región intergénica, que permite la identificación a nivel de género, clado y especie, basados en un total de 135 haplotipos de las regiones correspondiente a los ITS1 e ITS2. Con estos sellos oligonucleotídicos se desarrolló el software *TrichOKEY* 1.0 (disponible en www.isth.info) (Druzhinina y col. 2005; Druzhinina & Kopchinskiy 2009). Actualmente *TrichOKEY* se encuentra en su versión 2.0, la cual es capaz de reconocer 104 especies a partir de 153 haplotipos de ITS1 e ITS2. El programa entrega los resultados con tres posibles niveles de confianza; HIGH: cuando el código de barras está diseñado en base a más de 15 secuencias de especímenes provenientes de aislamientos independientes, STANDARD: cuando el código de barras está diseñado en base a 6 a 15 secuencias ITS de especímenes provenientes de aislamientos independientes y el número de alelos ITS

no es más alto que 3 y LOW: cuando la especie está descrita en base a un solo aislamiento, o cuando los bordes de la especie no están claramente resueltos filogenéticamente, o cuando el número de aislados conocidos es igual al número de alelos ITS1 e ITS2. Junto con esta herramienta también se encuentran TrichoMARK y TrichoBLAST, el primero permite detectar uno o varios fragmentos de la secuencia que corresponden a marcadores filogenéticos y el segundo permite realizar un análisis de tipo BLAST, contra la base de datos de www.isth.info, que contiene prácticamente la totalidad de las secuencias ITS1 e ITS2 conocidas correspondientes al género *Trichoderma/Hypocrea* (Kopchinskiy y col. 2005).

En este trabajo se realizó la identificación de 21 aislados fúngicos, 14 de ellos fueron obtenidos a partir de muestras ambientales de 4 localidades del sur de Chile, 7 aislados derivan de un producto comercial, el cual según su fabricante, está basado en 3 especies del género *Trichoderma*. Los aislados fueron identificados mediante la amplificación y secuenciación de las regiones correspondiente a los ITS1 e ITS2. Para conducir este análisis se usaron las herramientas *Tricho*OKEY, TrichoMARK y TrichoBLAST disponibles en el sitio www.isth.info. Además, para contrastar los resultados obtenidos, los datos de secuencias se analizaron usando la herramienta BLAST (Zhang y col. 2000) disponible en <http://blast.cbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> luego para evaluar las relaciones intra y entre los especímenes se usó el programa MEGA 4 (Tamura y col. 2007), y para presentar de manera gráfica los resultados del análisis de las secuencias se usaron las herramientas disponibles en www.ibarcode.org.

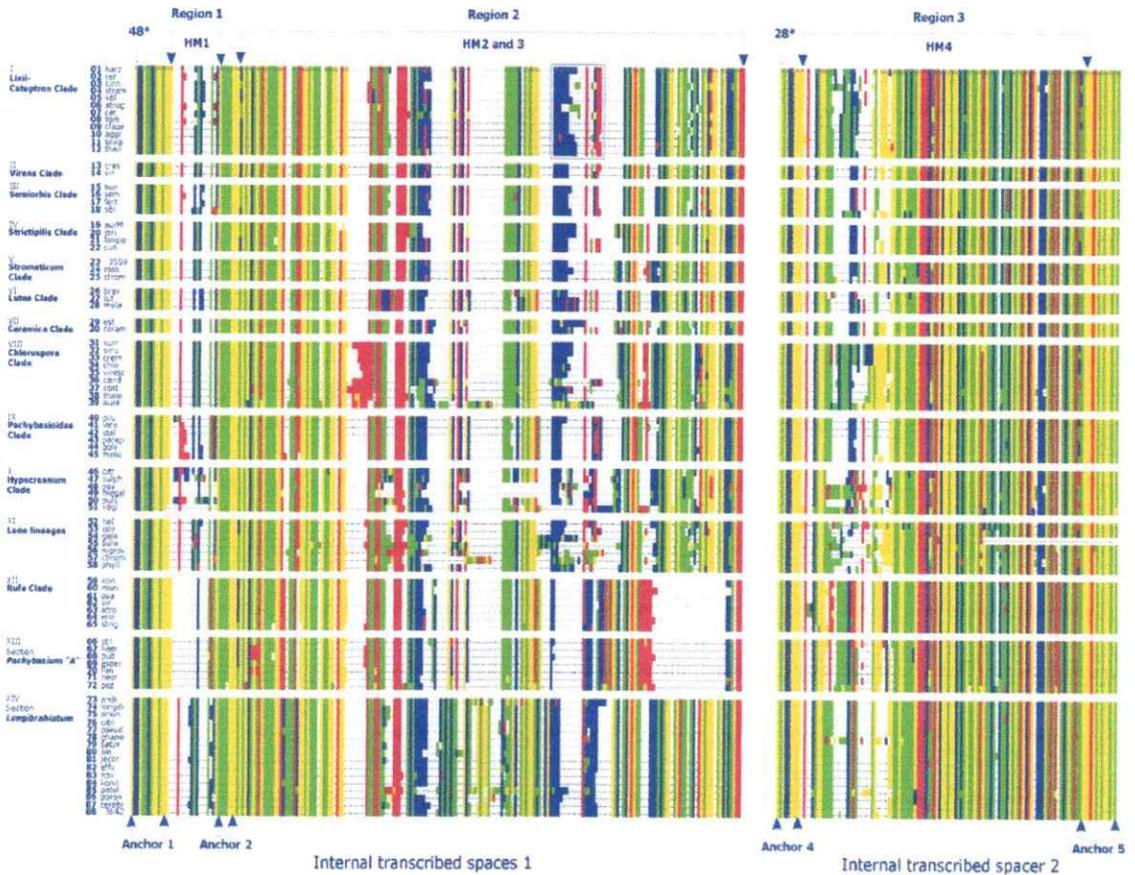


Fig. 1 : Alineamiento maestro del código de barras oligonucleotídico basado en los ITS1 e ITS2 para TrichOKEY1.0, donde es posible observar las regiones conservadas y polimórficas (sellos) que permiten la identificación a nivel de género clado y especies para *Trichoderma* (Extraída de Druzhnina & Kopchinskiy 2009)

Además de la identificación de los aislados, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un marcador molecular que permita el seguimiento de dicha especie en las etapas de formulación, producción y utilización en campo de un producto basado en microorganismos como BCAs (Hermosa y col. 2001). Para esto se han propuesto distintas técnicas que van desde el cultivo en medio selectivo (Jensen y col. 1996), a la modificación génica de los organismos (Green & Jensen 1995). Sin embargo, estos métodos tienen las siguientes dificultades; para el primero es imposible diferenciar las cepas utilizadas, de cepas propias del lugar y para el segundo si bien es posible el

seguimiento de los organismos en el terreno, no es posible la liberación de organismos genéticamente modificados (GMOs) dada la normativa vigente en Chile y la opinión pública adversa a estos procedimientos. Por lo tanto, una forma de realizar este seguimiento, es a través de la identificación de la(s) cepa(s) en uso, mediante marcadores moleculares específicos (Hermosa y col. 2000).

Entre los marcadores moleculares específicos se encuentran los de tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) que permiten el seguimiento de aislados nativos reconocidos como potenciales BCAs. Para identificar este marcador es necesario purificar el DNA de la muestra para su análisis.

Los marcadores SCAR se obtienen a partir de amplificación del DNA genómico del tipo RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), usando, en este caso, partidores de 10 mer arbitrarios que permiten la amplificación al azar en el genoma. Los partidores útiles son aquellos que proporcionan un "fingerprinting" que revela la presencia de polimorfismos en el genoma de las cepas en estudio y permite diferenciar las cepas de *Trichoderma* entre ellas y con otras especies. Estos polimorfismos luego son seleccionados y el amplicón de interés es clonado y secuenciado. A partir de la secuencia se diseñan nuevos partidores que amplifiquen específicamente la región que servirá como marcador molecular, constituyéndose de esta manera un marcador del tipo SCAR.

Objetivos de este Seminario de Título son:

- 1) Identificación molecular de aislados fúngicos.
- 2) Desarrollar un marcador del tipo SCAR para la caracterización de las cepas reconocidas como *Trichoderma harzianum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- **Cepas** : 14 cepas fúngicas fueron proporcionadas por Pedro Castillo Del Valle, (Castillo, 2009), quien en el marco de su tesis de pregrado, aisló, purificó e identificó en base a características morfológicas y pruebas de antagonismo, cepas de hongos con hábitos similares a los del género *Trichoderma*. El detalle del lugar de colecta de las muestras y los nombres de estas aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Detalle del origen, fuente y lugar de recolección de las muestras obtenidas.

Nombre	Origen	Fuente	Origen de la muestra	Coordenadas*
BpT10	Puerto Fuy	<i>Borrigo officinalis</i>	Radicular	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
BpT9	Río Laja	<i>Eucryphia cordifolia</i>	Radicular	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
BpTR	Río Laja	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Trampa	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
BpT5	Neltume	<i>Nothofagus oblicua</i>	Follar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm
BpTC	Puerto Fuy	<i>Berberis microphylla</i>	Follar	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
BpT6	Río Laja	<i>Populus nigra</i>	Radicular	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
BpTA	Neltume	<i>Malus sylvestris</i>	Follar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm
BpT7	Río Laja	<i>Prunus insititia</i>	Radicular	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
BpT10a	Puerto Fuy	<i>Borrigo officinalis</i>	Radicular	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
BpTH	Puerto Fuy	<i>Borrigo officinalis</i>	Follar	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
BpTF	Río Laja	<i>Eucryphia cordifolia</i>	Follar	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
BpT1a	Neltume	<i>Luma apiculata</i>	Follar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm
BpTP	Puerto Consuelo	<i>Achillea millefolium</i>	Follar	51°39'53"S - 72°34'25"O 27 msnm
BpT2	Neltume	<i>Senecio sp.</i>	Follar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm

* Coordenadas aproximadas.

Por otra parte se aislaron 7 cepas fúngicas desde un producto comercial basado, según el fabricante, en 3 especies del género *Trichoderma*. Para su aislamiento y purificación se utilizaron 3 medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA) OXOID, Medio mínimo mineral Vogel-Bonner (Vogel) y medio en base a extracto de malta (ME) (3% extracto de malta, 1% sacarosa y 0,75% extracto de levadura). Para la obtención de las cepas desde el producto comercial, este se resuspendió en medio fisiológico (NaCl 0,7%) desde el cual 100µl de una dilución adecuada se sembró en cada uno de los medios de cultivo mencionados. La dilución se calculó en base al título rotulado en el envase (25×10^3 UFC/gr). Las placas se incubaron a 23°C por un tiempo suficiente para observar crecimiento, luego las colonias se transfirieron a medio PDA para su repurificación y obtención de cultivos monospóricos. Los aislados obtenidos se identificaron como Atc4, Atc5, Atc6, Atc7, Atc8, Atc9 y Atc10.

Adicionalmente, se utilizó DNA de 8 aislados de *Trichoderma harzianum* proporcionado por un colaborador externo, estas muestras de DNA se rotularon con los nombres 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9.

2.- Obtención y cultivo de aislados monospóricos: Los cultivos monospóricos se obtuvieron mediante diluciones seriadas de conidias de los aislados purificados. Para esto se tomaron 100 µl de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y se sembraron en medio PDA, las placas se incubaron a 23°C hasta que se obtuvieron colonias individuales (2 a 3 días) provenientes de solo una conidia. Los aislados obtenidos fueron mantenidos en medio

PDA a 23°C (Bissett & Gams 1998).

3.- Preparaciones al microscopio: Para llevar a cabo observaciones de la morfología de las especies en estudio se realizaron tinciones con azul de metileno basadas en el método de Riddell (1950), modificado por Ellis, disponible en http://www.mycology.adelaide.edu.au/Laboratory_Methods/Microscopy_Techniques_and_Stains/slide.html, las imágenes fueron obtenidas en un microscopio óptico Olympus BX61, las fotos fueron tomadas con un equipo Diagnostic modelo 25.4 2mp slider y las imágenes procesadas con el software Spot version 4.5.9.9.

4.- Extracción del DNA:

Inóculos de las colonias monospóricas, fueron cultivados en medio líquido en base a extracto de malta (MEB) a 150 rpm y 23°C durante 3-5 días dependiendo de la densidad del cultivo. Los micelios obtenidos fueron lavados tres veces con 10 ml de agua destilada, centrifugando a 5500 rpm por 20 minutos entre cada lavado. Luego un volumen de aproximadamente 1 ml de micelio hidratado fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5ml y centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos para eliminar el exceso de sobrenadante. Para la lisis del micelio se usó una variante del método descrito por Siddique y col. 2007, para ello los micelios se resuspendieron en 1,0 ml de buffer de lisis (2%Triton, 1%SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris HCl pH8, 1mM EDTA) y se incubaron toda la noche a 50°C. Luego se agregó RNAsa (Sigma®) a una concentración final de 50µg/ml y se incubó por 15 minutos a 37 °C, finalmente el micelio en buffer de

lisis, fue sometido a 3 pasos de congelamiento-descongelamiento, desde -80°C a $+80^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos en cada caso.

Para la extracción del DNA se utilizó el método de Fenol-Cloroformo, según Hoffman & Winston. (1987), para esto, el material suspendido en buffer de lisis fue centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos y al sobrenadante recuperado y se le agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Winkler®). Luego se agito suavemente y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos, se colectó la fase superior, se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (Winkler®), luego de agitar suavemente se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos. Para precipitar el DNA de la fase acuosa (superior) se colectó y se agregaron 2 volúmenes de etanol 95% y 1/10 de acetato de sodio 3M y se dejó por una hora o más a -20°C . El DNA precipitado se obtuvo por centrifugación a 13.000 rpm por 15-20 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM pH 8.0).

5.- Electroforesis en gel de agarosa:

Para determinar la calidad y concentración del DNA purificado, éste se utilizó electroforesis en gel de agarosa, 0,8% preparado en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM) con bromuro de etidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El gel se cargó con 5 μl de cada aislado y se usó como marcador de peso molecular, el DNA del fago lambda digerido con *Hind*III (Invitrogen®). La electroforesis se realizó a 70-80 V

por 2-3 horas con una fuente de poder (Bio-Rad power pac 300), para visualizar el DNA, los geles fueron observados en un transiluminador UV y fotografiados.

6.- Amplificación del fragmento ITS1-5.8S rDNA-ITS2 mediante PCR y secuenciación: Para esto se utilizaron los partidores ITS1: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' e ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White y col. 1990), los partidores fueron comercialmente provistos por Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada) estos amplifican un fragmento correspondiente a las regiones intergénicas ITS1, 5,8S e ITS2 de la región ribosomal (Fig. 2).

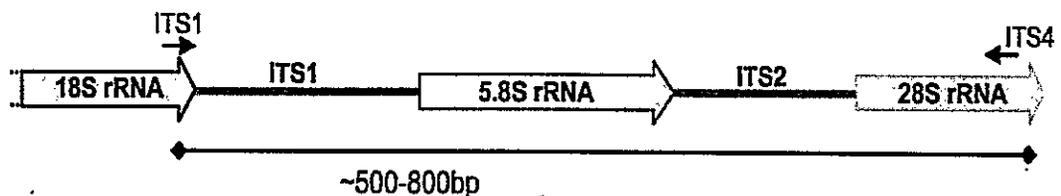


Fig. 2: Representación esquemática del segmento correspondiente al cluster de genes ribosomales que contiene el amplicon de interés (ITS1-5.8S rDNA-ITS2), además se muestra la orientación de los primers ITS1 e ITS4 (Extraída de Embong y col. 2008).

Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un volumen total de 25µl, usando 1µl de DNA genómico (20 ± 5 ng), los partidores fueron usados a una concentración de 400 nM cada uno y la concentración del resto de los reactivos corresponden a las del producto GoTaq® Green Master Mix Promega 1X (200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl), utilizado para la amplificación. La reacción se realizó con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C para luego seguir con 37 ciclos consistentes en una primera fase de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, luego una hibridación de 30 segundos a 55°C y 3 minutos de extensión a 72°C y finalmente una extensión de 20

minutos a 72°C, en el termociclador Minicycler modelo-150 de MJResearch™.

Los productos de PCR fueron evaluados en geles de agarosa al 1,2%, bajo las condiciones indicadas anteriormente. Se cargaron 5µl de cada amplificado para ver la presencia o ausencia de amplicones y se usó como marcador de tamaño molecular 100bp (Invitrogen®).

La secuenciación del DNA fue realizada por la empresa Macrogen Inc. a quien se le enviaron 20 µl del producto de PCR en concentraciones que fueron entre 20 y 39 ng/µl y se utilizó para esto el partidor ITS1.

7.- Identificación y Análisis de relaciones: El análisis de relaciones se realizó usando la herramienta de búsqueda por similitud de NCBI, BLAST (Basic Local Aligment Search Tool; www.ncbi.nih.gov/BLAST), y la identificación se hizo mediante la herramienta *TrichOKEY2.0* disponible en www.isth.info.

Todas las secuencias identificadas como pertenecientes al género *Trichoderma/Hypocrea* mediante *TrichOKEY2.0*, fueron sometidas a TrichoMARK para luego construir los alineamientos, las secuencias *Atc* no fueron sometidas a TrichoMARK, pero fueron alineadas y editadas en función de éste. En los análisis que se incluyeron las especies más relacionadas a la secuencia en estudio, éstas fueron obtenidas directamente desde BLAST, como la especie con un menor e-value,

relacionada a la secuencia “input” del análisis.

Los alineamientos fueron hechos usando el programa MEGA 4 (Tamura y col. 2007), y para construir los dendrogramas se usó el análisis de agrupamiento de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987). La robustez de los nodos se evaluó por análisis de bootstrap (Felsenstein 1985) con 1000 iteraciones. Todas las posiciones que contienen gaps e información faltante, fueron eliminadas del set de datos (opción de delección completa).

Para los casos en que la especie más relacionada presentaba diferencias con la especie identificada en este trabajo, se construyó un mapa haplotípico (HAPMAP) en el sitio www.ibarcode.org con el fin de mostrar las diferencias entre las secuencias ITS de dichos organismos. Luego para graficar la abundancia relativa de las distintas especies de *Trichoderma* identificadas se construyó un esquema en nubes con los nombres de las especies, en el mismo sitio web del análisis HAPMAP.

8.- Marcadores RAPD: Para la amplificación del DNA genómico se probaron 16 partidores arbitrarios de 10 mer, (Operon, Huntsville, USA) los que se muestran en la Tabla2. A partir de los patrones de amplicones obtenidos se seleccionaron los partidores que generaron bandas polimórficas. Las condiciones de los reactivos de amplificación fueron las mismas del protocolo de amplificación de los ITS. Como control positivo se realizó una amplificación de los fragmentos ITS. El ciclo térmico fue aquel indicado por Lehmann y col. (1992), que consiste en una denaturación inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C y 2 minutos a 72°C, y una

extensión final de 10 minutos a 72°C, usado un termociclador Axygene modelo Maxygene gradient.

Los productos de PCR fueron evaluados en geles de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml, en TAE 1X. Los geles se cargaron con 10µl de cada reacción. Para determinar el tamaño del amplicón se usó el software Kodak Digital Science 1D V.2.0.1 usando como marcador de tamaño molecular 100 bp (Invitrogen®).

Tabla 2. Secuencia de los partidores 10mer utilizados en la amplificación RAPD.

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPBF-20	ACCCTGAGGA
OPA-13	CAGCACCCAC	OPBG-04	GTTCCCGACA
OPC-16	CACACTCCAG	OPBG-07	CAGAGGTTCC
OPX-02	TTCCGCCACC	OPBG-08	GACCAGAGGT
OPBF-06	TCCACGGGCA	OPBG-12	CCCGAGAAAC
OPBF-15	ACGCGAACCT	OPBH-03	GGAGCAGCAA
OPBF-17	CAAGCTCGTG	OPBH-11	AGCCCAAAGG
OPBF-19	TTCCCGCACT	OPBH-20	CACCGACATC

La comparación en los perfiles de amplicones obtenidos con los partidores 10 mer seleccionados, se llevó a cabo en base a la presencia/ausencia (1/0) de amplicones del mismo tamaño. Para el análisis de los datos se usó el coeficiente de Nei y Li (1979) también conocido como el coeficiente de Dice (Kosman & Leonard 2005) y que se puede representar de la siguiente manera: $[2a/2a+b+c]$, donde a corresponde al número de bandas presentes en las dos muestras de un par y luego b y c corresponden al

número de bandas presentes en una y otra muestra. Este coeficiente no considera la ausencia de bandas como características comunes.

A partir de la matriz de similitud se construyó un dendrograma usando el método, UPGMA en el programa computacional TREECON versión 1.3b (Van de Peer & De Wachter 1994), considerando un bootstrap de 1000 iteraciones (Felsenstein 1985).

9.- Clonación y secuenciación de un amplicón RAPD: Para secuenciar el fragmento polimórfico identificado en el análisis de RAPD, este fragmento fue clonado según se indica a continuación. El amplicón de interés fue purificado usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), luego para la clonación se utilizó el producto purificado y el kit InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) para la transformación de *E. coli*, según instrucciones de los fabricantes. Los transformantes se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (50 µg/ml) y por su incapacidad de hidrolizar el compuesto X-gal en presencia de IPTG. La presencia del inserto esperado se corroboró por PCR de colonias usando los partidores M13F (5'GTAAAACGACGGCCAG3') y M13R (5'CAGGAAACAGCTATGACC3') del vector. Una muestra directa de la colonia se resuspendió en la mezcla de reacción para 25 µl, que contenía los partidores a 400 nM cada uno y GoTaq® Green Master Mix Promega 1X (200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl), el ciclo de PCR corresponde al especificado por el fabricante del kit InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) excepto en un primer paso de lisis/denaturación a 94°C por 5 minutos. El resultado de la reacción de PCR se evaluó en geles de agarosa al 1.2%.

La secuenciación del producto amplificado fue encargada a la empresa Macrogen Inc. usando los partidores M13F y M13R, el resultado de la secuenciación se evaluó usando BLAST (Zhang y col. 2000) para dilucidar si dicha secuencia posee alguna identidad con secuencias conocidas presentes en la base de datos de NCBI.

10.- Diseño de partidores y PCR diagnóstico de los partidores SCAR: Los partidores fueron diseñados en base a la secuencia obtenida para el amplicon de 503 pb obtenido con el partidador seleccionado. Para esto se usó la herramienta Primer-BLAST (Rozen & Skaletsky 2000) de NCBI disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> y que usa las herramientas Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000). Para el diseño de partidores específicos para la secuencia “input”, y BLAST para evitar que dichos partidores puedan amplificar otras secuencias. De esta manera se diseñaron 5 partidores, 2 directos (TFX2F y TFX2FI) y 3 reversos (TFX2R, TFX2RI y TFX2R1).

Para evaluar los partidores diseñados, y definir la temperatura de annealing del PCR se utilizó como templado el DNA de BpTF, las condiciones de los reactivos (DNA, MgCl₂, etc) fueron las mismas del protocolo de amplificación de los ITS y RAPD, excepto que la concentración de los partidores fue de 200nM y se usó el siguiente ciclo térmico de PCR: denaturación inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de denaturación a 94°C, 1 minuto de annealing, cuya temperatura varió entre 40° y 64°C, 1 minuto de extensión a 72°C para terminar con una extensión final de 7 minutos a 72°C. El ciclo usado constituye una variación del ciclo descrito por Paavanen-Huhtala y col.

2000, y se realizó en un termociclador Axygen Maxygen con una gradiente de temperatura. Como control positivo se amplificaron los fragmentos ITS usando las mismas condiciones antes mencionadas, en este caso se usó una temperatura de annealing de 54.4°C. Determinadas las condiciones del ciclo térmico se evaluaron los partidores con 8 aislados identificados como *Trichoderma* y que pertenecen a 4 especies distintas, también se probó la amplificación con 7 especies de *Penicillium*, 3 de *Aspergillus*, 1 de *Davidiella*, 1 de *Paecilomyces*, 1 de *Monascus* y una mezcla de especies provenientes de compost.

RESULTADOS

1.- Caracterización morfológica de los aislados

En la figura 3 se muestra los caracteres morfológicos del conidioforo de la cepa BpT7 tomada como representativa del género *Trichoderma*, dicho espécimen fue aislado desde una muestra radicular de *Prunus insititia*. En esta figura se observa la presencia de un conidioforo que tiene un eje principal ancho con ramas apicales y distales a intervalos regulares, que se vuelven progresivamente más cortas y angostas en un entramado repetitivo verticilado, que resulta en una estructura piramidal. También se observan ramificaciones terminadas en fialidios en verticilo, los fialidios presentan una forma lageniforme y es posible observar el cuello conidiogénico y las primeras conídias en formación.

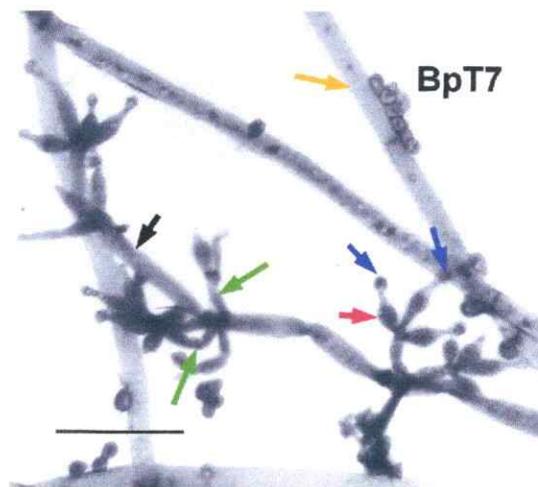


Fig. 3 Imagen a 100X del espécimen BpT7, las flechas negras muestran el conidioforo, las flechas verdes las ramificaciones en verticilo, las flechas rojas indican los fialidios en verticilo, las flechas azules muestran conidios en desarrollo y con flechas amarillas hifas. La barra de tamaño corresponde a 20 μ m.

En el Anexo II se muestra las características morfológicas de los conidióforos de los otros aislados de *Trichoderma*, usados en este trabajo.

2.- Identificación Molecular de los aislados fúngicos

Para la identificación molecular de los aislados fúngicos se purificó el DNA total de cada muestra y se obtuvieron preparaciones de DNA de alto peso molecular de tamaño igual o superior a las 23kb de acuerdo a lo estimado por comparación con el marcador de peso molecular. Posteriormente, se amplificó y secuenció la región de los ITS y se realizó un análisis de alineamiento de secuencia mediante BLAST. La identificación de los aislados se realizó usando la herramienta *TrichOKEY2.0*.

2.1.- Amplificación por PCR de las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 y secuenciación.

En la figura 4 se muestran los amplicones obtenidos a partir del DNA total de un grupo de los aislados fúngicos obtenidos desde muestras ambientales. En todas las reacciones de amplificación usando los partidores ITS1 e ITS4, se obtuvo un amplicón de un tamaño de aproximadamente 600 pares de bases, que comprende la región intergénica ITS 1 e ITS 2 además del rDNA de 5.8S como se indica en la Figura 2.

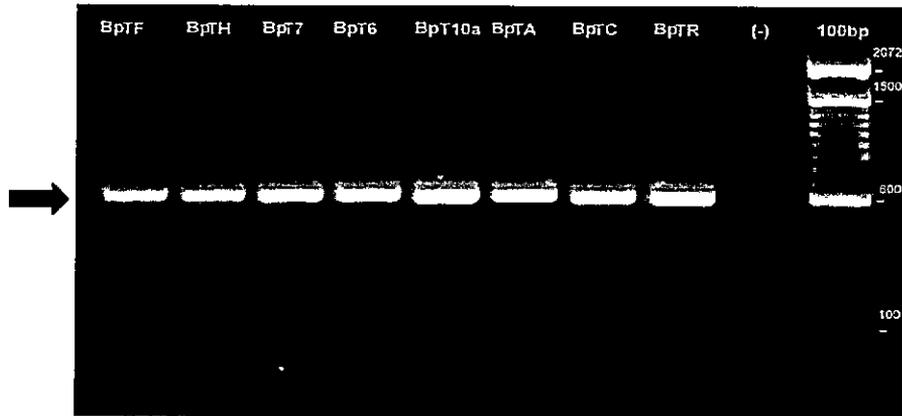


Fig. 4. Electroforesis del DNA amplificado con los partidores ITS1 e ITS4 que muestra el fragmento de aproximadamente 600pb (indicado con una flecha) a partir del DNA de los aislados BpTF, BpTH, BpT7, BpT6, BpT10a, BpTA, BpTC y BpTR, (-) Control negativo, como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).

2.2.- Análisis de la secuencia de la región ITS.

Las secuencias de los amplicones fueron analizadas por la herramienta BLAST. En la Tabla 3 se muestra el resultado de este análisis, que muestra que las secuencias derivadas de los 14 aislados nativos, identificados morfológicamente como *Trichoderma* (Castillo, 2009), se relacionan con 7 especies del género *Trichoderma/Hypocrea* con porcentajes de cobertura de entre un 60 y 97% y porcentajes de identidad de entre 98 y 99%. Por su parte las secuencias derivadas de los aislados obtenidos del producto comercial, se relacionan con 2 especie del género *Monascus* con porcentajes de cobertura de entre un 50 y 75% y porcentajes de identidad de entre 99 y 100% respectivamente y con 2 especies del género *Penicillium* con porcentajes de cobertura de entre un 58 y 59% y un porcentaje de identidad de 99%.

Tabla 3: Identificación mediante BLAST, del organismo más relacionado con las secuencias obtenidas de los aislados en estudio.

Nombre	Organismo más relacionado	Nº de acceso	% cobertura	% identidad
BpT10	Trichoderma atroviride isolate DB-T7	FJ426394	97%	99%
BpT9	Trichoderma atroviride isolate DB-T7	FJ426394	63%	99%
BpTR	Hypocrea koningii strain xsd08052	FJ478089	82%	99%
BpT5	Trichoderma viride isolate DB-023	FJ426389	62%	99%
BpTC	Hypocrea koningii strain xsd08052	FJ478089	64%	99%
BpT6	Hypocrea lixii strain PPRI 3772	EF113585	72%	98%
BpTA	Hypocrea lixii strain PPRC-ET28	FJ461561	61%	98%
BpT7	Hypocrea lixii strain UNISS 11-70	EF596947	71%	99%
BpT10a	Hypocrea lixii strain UNISS 23-28	EF596951	65%	99%
BpTH	Hypocrea lixii strain UNISS 11-70	EF596947	67%	99%
BpTF	Hypocrea lixii strain UNISS 11-70	EF596947	60%	99%
BpT1a	Hypocrea novaezelandiae	AY154925	60%	99%
BpTP	Trichoderma citrinoviride strain DAOM 172792	EU280098	69%	99%
BpT2	Trichoderma longipile strain xsd08108	FJ481019	75%	98%
Atc10	Monascus ruber	AB477256	56%	99%
Atc9	Monascus pilosus strain BCRC31502	AY750725	56%	99%
Atc8	Monascus pilosus strain BCRC31503	AY750725	56%	99%
Atc7	Monascus ruber	AB477256	55%	100%
Atc6	Monascus ruber	AB477256	70%	100%
Atc5	Penicillium chrysogenum strain SL302	FJ549439	58%	99%
Atc4	Penicillium roseopurpureum strain NRRL 2064	AF033415	59%	99%

("BpT") aislados nativos.

("Atc") aislados fúngicos obtenidos desde muestra de producto comercial.

Luego al someter estas secuencias al programa TrichoMARK, con el fin de obtener solo el fragmento de la secuencia relevante para la identificación, y llevar el resultado nuevamente a la herramienta BLAST (Tabla 4) observamos que los aislados BpT se relacionan con solo 5 especies del género *Hypocrea/Trichoderma*. Seis de estos aislados se relacionan con 3 cepas de *Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum* (GJS 05-39, CNRA 347, 5-7T), todas con un 100% de cobertura e identidad. Estos datos sugieren que los aislados relacionados con *Hypocrea lixii* son más polimórficos, tal como lo señalara Chaverri y col 2003b.

Tabla 4: Identificación mediante BLAST del organismo más relacionado, con las secuencias sometidas a TrichoMARK.

Nombre	Secuencia más relacionada	Nº de acceso	% cobertura	% identidad
BpT10	Trichoderma sp. 3S5C	FJ861462	100%	100%
BpT9	Trichoderma sp. 3S5C	FJ861462	100%	100%
BpTR	Trichoderma sp. 3S5C	FJ861462	100%	100%
BpT5	Trichoderma sp. 3S5C	FJ861462	100%	100%
BpTC	Trichoderma sp. 3S5C	FJ861462	100%	100%
BpT6	Hypocrea lixii strain GJS 05-93	FJ442645	100%	100%
BpTA	Hypocrea lixii strain CNRA 347	EU598538	100%	100%
BpT7	Hypocrea lixii strain GJS 05-93	FJ442645	100%	100%
BpT10a	Hypocrea lixii strain 5-7T	FJ654687	100%	100%
BpTH	Hypocrea lixii strain GJS 05-93	FJ442645	100%	100%
BpTF	Hypocrea lixii strain GJS 05-93	FJ442645	100%	100%
BpT1a	Hypocrea novaezelandiae Ir. 501	AY154925	100%	100%
BpTP	Trichoderma citrinoviride strain CCRC33610	AF414333	100%	100%
BpT2	Trichoderma spirale strain 3S4E	FJ861463	100%	100%
Atc10	Monascus fumeus isolate N2	FJ974049	100%	100%
Atc9	Monascus fumeus isolate N2	FJ974049	100%	100%
Atc8	Monascus fumeus isolate N2	FJ974049	100%	100%
Atc7	Monascus fumeus isolate N2	FJ974049	100%	100%
Atc6	Monascus fumeus isolate N2	FJ974049	100%	100%
Atc5	Penicillium sp. DQ25	FJ647576	100%	100%
Atc4	Penicillium roseopurpureum strain NRRL 2064	AF033415	100%	100%

("BpT") aislados nativos.

("Atc") aislados fúngicos obtenidos desde muestra de producto comercial.

Con esta reevaluación de las secuencia con BLAST post TrichoMARK, observamos una mejora en los porcentajes de identidad y cobertura para todos los aislados, obteniéndose tanto para la identidad como para la cobertura un 100% en todos los casos. Los datos de secuencia también indican que los aislados obtenidos desde el producto comercial no se relacionan con *Trichoderma*. Ellos se relacionan con una especie del género *Monascus* (*M.fumeus*) y con dos especies del género *Penicillium* (*P. chrysogenum* y *P. roseopurpureum*).

Mediante el análisis con el programa *TrichOKEY2.0* (Tabla 5), se confirma que los aislados se adscriben a 5 especies de *Trichoderma*, incluyendo una especie no identificada (BpT2), que según el análisis anterior (Tablas 3 y 4) se encuentra relacionada con *Trichoderma spirale*.

Los aislados (BpT10, BpT9, BpTR, BpT5, BpTC) que previamente fueron identificados como *Trichoderma spp.* (Tabla 3 y 4), mediante el análisis de sus secuencias con *TrichOKEY2.0* fueron adscritos a la especie *Trichoderma atroviride* con un alto nivel de confianza (Tabla 5).

Para el caso, de los aislados obtenidos desde el producto comercial, el análisis *TrichOKEY 2.0* (Tabla 5) corrobora que no corresponden a secuencias del género *Trichoderma*, y también usando *TrichOKEY 2.0* se comprobó que las muestras de DNA (1,2,3, etc) corresponden a *T.harzianum*.

Tabla 5: Identificación de especies por análisis de las secuencias ITS mediante *Tricho*OKEY 2.0

Nombre	Especie según ISTH	Confiabilidad
BpT10	<i>Hypocrea atroviridis/Trichoderma atroviride</i>	High
BpT9	<i>Hypocrea atroviridis/Trichoderma atroviride</i>	High
BpTR	<i>Hypocrea atroviridis/Trichoderma atroviride</i>	High
BpT5	<i>Hypocrea atroviridis/Trichoderma atroviride</i>	High
BpTC	<i>Hypocrea atroviridis/Trichoderma atroviride</i>	High
BpT6	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>	High
BpTA	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>	High
BpT7	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>	High
BpT10a	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>	High
BpTH	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>	High
BpTF	<i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i>	High
BpT1a	<i>Hypocrea novaezelandiae</i>	Standard
BpTP	<i>Hypocrea schweinitzii/Trichoderma citrinoviride</i>	High
BpT2	Especie no identificada de <i>Hypocrea/Trichoderma</i>	
Atc10	La secuencia consultada no pertenece a <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .	
Atc9	La secuencia consultada no pertenece a <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .	
Atc8	La secuencia consultada no pertenece a <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .	
Atc7	La secuencia consultada no pertenece a <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .	
Atc6	La secuencia consultada no pertenece a <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .	
Atc5	La secuencia consultada no pertenece a <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .	
Atc4	La secuencia consultada no pertenece a <i>Hypocrea/Trichoderma</i> .	

2.2.1.- Análisis de relaciones.

Para el primer análisis se tomaron 114 secuencias de ITS1 e ITS2 correspondientes a especies del género *Trichoderma*, disponibles en la base de datos de la Sub-Comision Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma/Hypocrea* (http://www.isth.info/tools/blast/show_all_seq.php). Con estos datos se construyó un alineamiento donde se incluyeron las secuencias de los amplicones obtenidos con los partidores ITS1 e ITS4, correspondientes a los aislados nativos de *Trichoderma*. Con este alineamiento se construyó un dendrograma, que presentó altos valores de bootstrap, y que muestra que todos los aislados derivados de muestras ambientales se agrupan

dentro del cluster correspondiente a las especies del genero *Trichoderma/Hypocrea*. Por su parte los aislados derivados del producto comercial formaron un grupo independiente de *Trichoderma*, con un bootstrap del 99% y que se usó como outgroup (Figura 5).

En el set de datos para la formación del dendrograma de la Figura 5 se usó un total de 137 posiciones, y el dendrograma se enraizó con el grupo de aislados obtenidos desde el producto comercial. El dendrograma muestra las 3 secciones de grupo *Trichoderma/Hypocrea* separadas por altos valores de bootstrap (Druzhinina & Kubicek 2005). Los aislados de este estudio se ubican en los 3 grandes grupos dentro del género *Trichoderma/Hypocrea*.

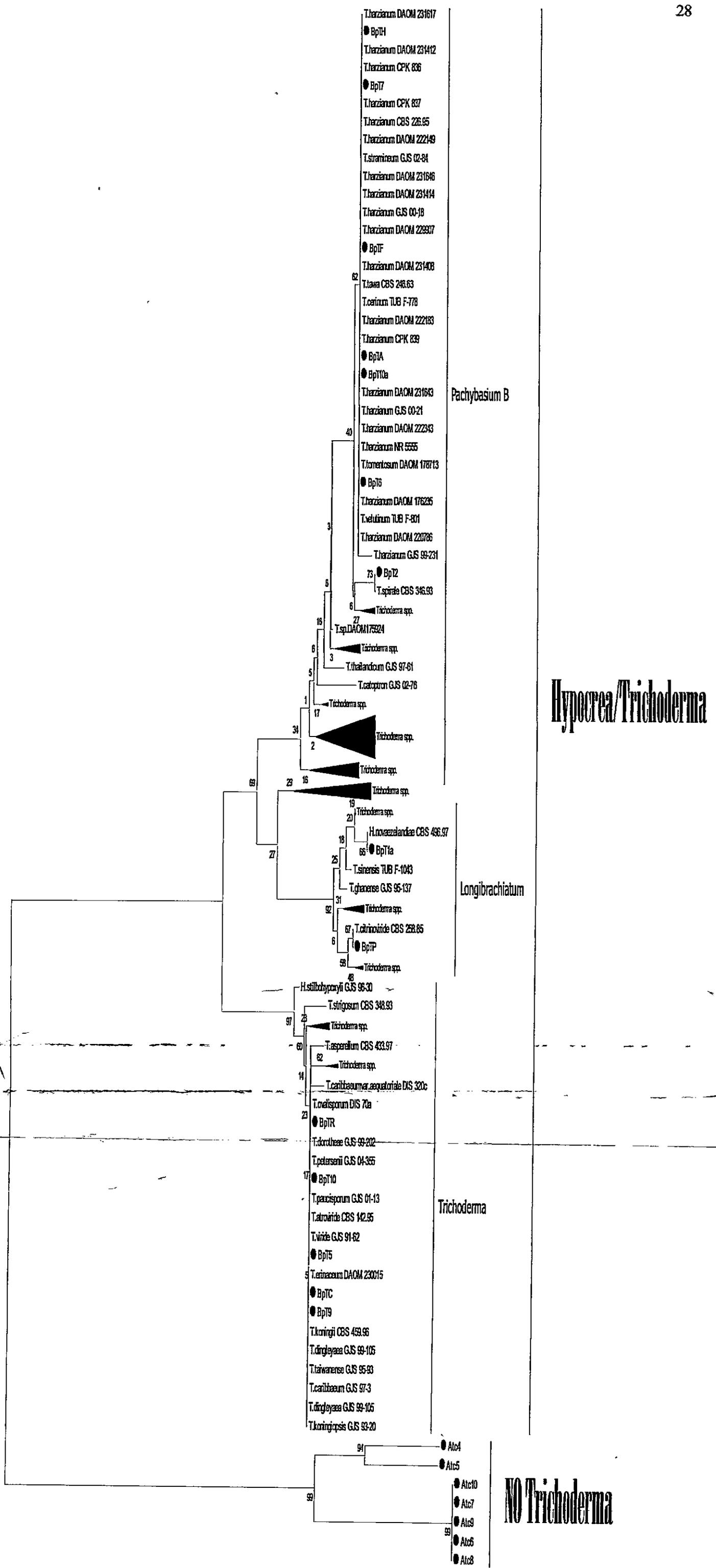


Fig. 5. Agrupamiento de 135 taxas fúngicas. La topología del dendrograma se infirió mediante el algoritmo de Neighbor- Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Los porcentajes bootstrap se muestran al lado de cada nodo (Felsenstein 1985). Todas las ramas que no contenían a ninguna de las secuencias en estudio fueron comprimidas y representadas como *Trichoderma* spp. Las muestras analizadas en este trabajo están representadas con un (●).

La Figura 6 muestra el agrupamiento de las secuencias ITS derivados de los aislados y sus respectivas especies más relacionadas. La ubicación de los aislados está en congruencia con los resultados del análisis mediante *TrichOKEY* 2.0 (Tabla 5). El dendrograma de la Figura 6 esta construido en base a 360 posiciones en el set de datos final.

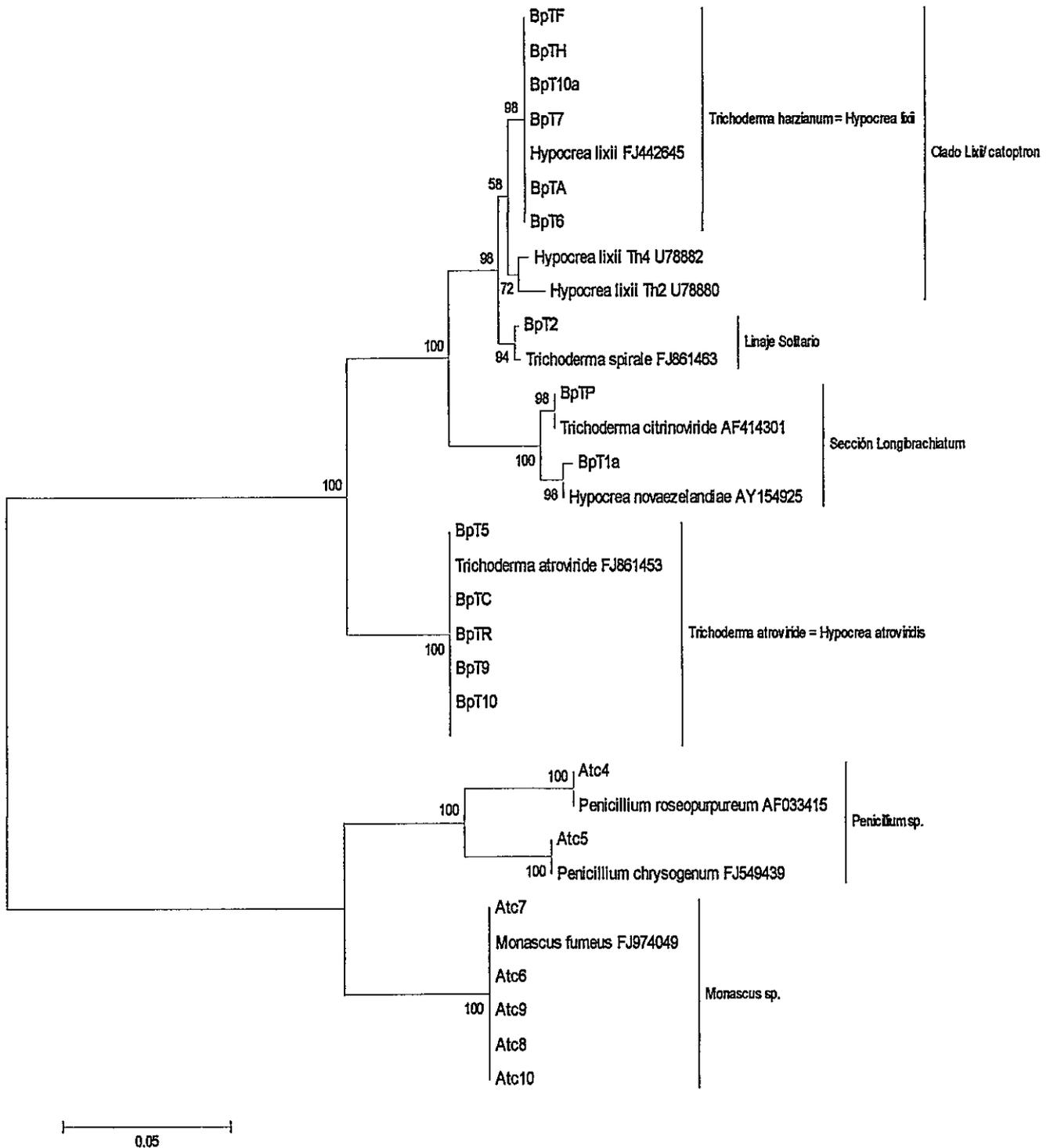


Fig. 6. Agrupamiento de 32 taxa fúngicas. La topología del dendrograma se inferió mediante el algoritmo de Neighbor-Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Se indican sólo los valores de bootstrap mayores de 50%. El dendrograma fue dibujado a escala, con el largo de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el dendrograma.

En la Figura 6 se observa que *Hypocrea lixii* FJ442645, que caracteriza al grupo de *Trichoderma harzianum*, se agrupa con los aislados obtenidos en este estudio y que fueron identificados como *Trichoderma harzianum*. y no con *Hypocrea lixii* Th4 ni *Hypocrea lixii* Th2.

En la Figura 5, dentro de la sección Pachybasium B, se observa el linaje único representado por *Trichoderma spirale* (Kullnig-Gradinger 2002), asociado a esta especie se encuentra el aislado BpT2, el cual presenta, 5 mutaciones cuando se comparan con *T. spirale*, las que comprenden 4 inserciones/delecciones y 1 transversión (Tabla 6). Por otro lado, la cepa BpT1a difiere con su organismo más relacionado (*H. novaezelandiae*) en solo 1 posición, que corresponde a una mutación del tipo transición (Tabla 6).

Tabla 6: Mapa haplotípico (Barcode-HAPMAP) construido en www.ibarcode.org. (Singer & Hajibabaei 2009)

Posición*	115	116	117	384	393	Posición*	61
Trichoderma spirale FJ861463	-	-	A	C	G	Hypocrea novaezelandiae AY154925	A
BpT2	T	A	C	-	-	BpT1a	G

*Las posiciones son relativas y no reflejan relación con las bases del fragmento ITS.

Las secuencias de los aislados nativos identificados como *Trichoderma harzianum*=*Hypocrea lixii*, fueron analizadas de manera independiente. Para ello las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA 4 (Tamura y col. 2007). Con el alineamiento obtenido se construyó el mapa haplotípico (HAPMAP) que muestra las variaciones nucleotídicas del fragmento ITS (Tabla 7) para esta especie.

Tabla 7: Mapa haplotípico (Barcode-HAPMAP) construido en www.ibarcode.org, (Singer & Hajibabaei 2009) para todos los aislados nativos identificados como *Trichoderma harzianum*.

Posición*	60	70	96	97	354	359	364
BpT6	-	A	T	T	G	G	-
BpT7	-	A					-
BpTF	-	A					-
BpTH	-	A					-
BpTA	-	A		-	C	A	G
BpT10a	T	T	-	-	C	A	G

* Las posiciones son relativas y no reflejan relación con las bases del fragmento ITS.

Por otra parte, se determinaron los agrupamientos de estos aislados mediante la construcción de un dendrograma (Fig. 7), en el cual se observan 3 grupos: el grupo A, caracterizado por *H. lixii* FJ442645 que incluye a BpT6, BpT7, BpTF y BpTH, el grupo B caracterizado por *H. lixii* FJ654687 y que incluye a BpT10a, y por ultimo el grupo C, caracterizado por *H. lixii* EU598538 donde se agrupa BpTA. En el set de datos utilizados hubo un total de 411 posiciones, de las cuales 3 dan cuenta de las diferencias entre cepas, las otras 4 son eliminadas del set de datos por la formación de gaps (Tabla 7).

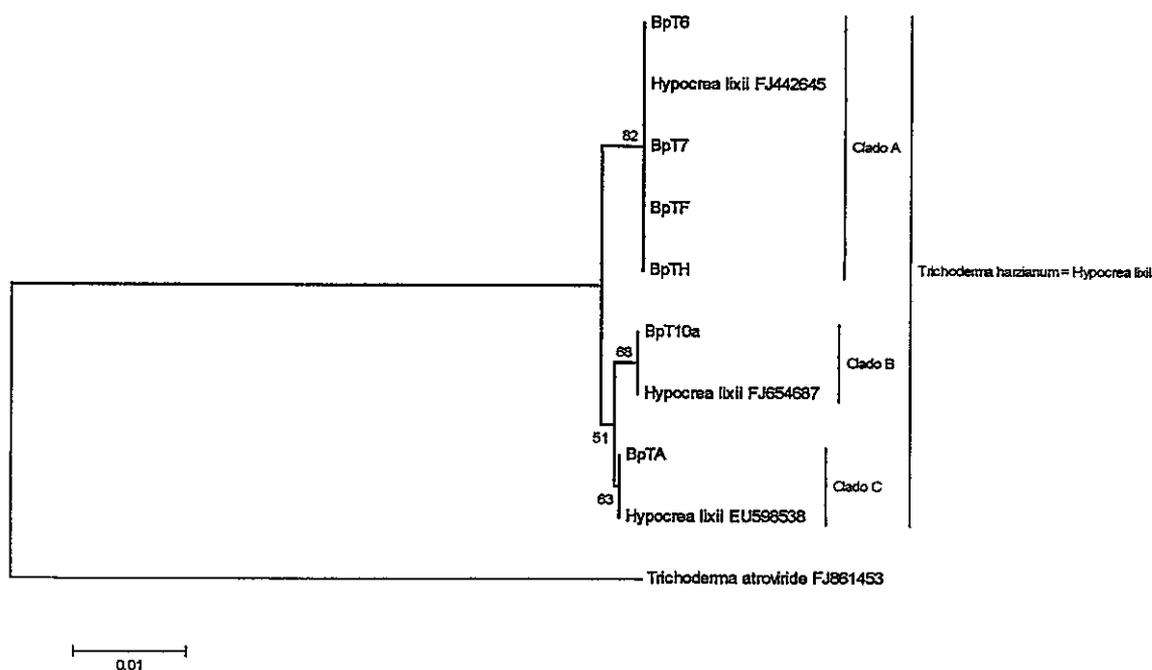


Fig. 7. Dendrograma de 10 taxa pertenecientes al género *Trichoderma*. La topología del dendrograma se infirió mediante el algoritmo de Neighbor- Joining con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Los porcentajes con los cuales los taxa se agrupan en el test de bootstrap se muestran al lado de cada nodo.

3.- Variabilidad genética de los aislados mediante análisis de RAPD .

Para el análisis de RAPD se probaron 16 partidores de 10 mer de los que se seleccionaron 6 (OPA-03, OPA-13, OPX-02, OPBF-15, OPBH-03 y OPBH-20) los que dieron patrones de amplicones polimórficos.

En la Figura 8 se muestra un ejemplo del patrón de amplicones obtenidos para la reacción de PCR-RAPD con el partidor OPA-03, con distintos DNA fúngicos. En el análisis de RAPD se incluyeron los aislados nativos identificados como *Trichoderma spp.*, y los aislados; Atc8, Atc4 y HI, pertenecientes a los géneros *Monascus*, *Penicillium* y *Aspergillus* respectivamente.

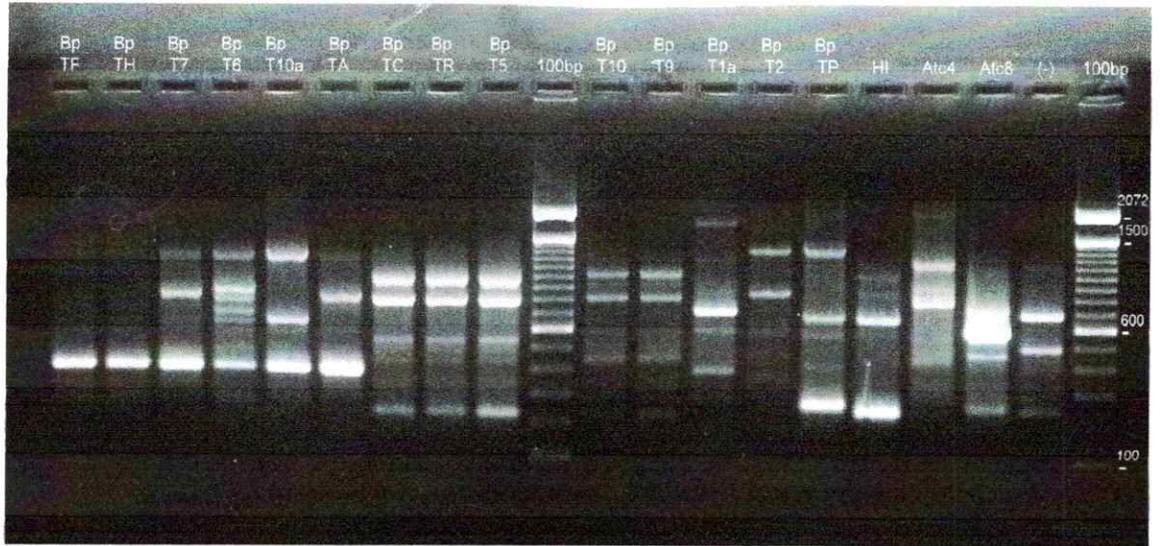


Fig. 8. Patrón de amplicones polimórficos obtenidos mediante PCR-RAPD con el partidor OPA-03, como marcador de peso molecular se usó 100 bp (Invitrogen), las muestras "BpT" corresponden a aislados del género *Trichoderma* (ver detalle en materiales y métodos), HI cepa de *Aspergillus*, Atc4 cepa de *Penicillium* y Atc 8 cepa de *Monascus* (ver detalle en materiales y métodos), (-) Control negativo, como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).

Los amplicones obtenidos presentaron tamaños en el rango de 200-2350 pares de bases. Para el análisis se consideraron sólo aquellos amplicones con alta intensidad y reproducibles, que en su conjunto dieron un total de 90 caracteres. Los patrones de marcadores RAPD fueron representado por una matriz de presencia/ausencia (1/0), a partir de la cual se realizó un análisis de cluster (UPGMA) con el software TREECON versión 1.3b (Van de Peer & De Wachter 1994), para finalmente construir dendrogramas (Fig 9).

Del dendrograma se puede observar que los aislados identificados previamente como *T. atroviride* no pudieron distinguirse entre si por este análisis, ya que no presentaron variabilidad genética en estos marcadores. Por el contrario, los aislados identificados

como *T. harzianum* presentaron 4 patrones RAPD polimorficos que permiten distinguir a los aislados. Excepto BpTF y BpTH que presentaron el mismo patrón al igual que BpT7 y BpTA.

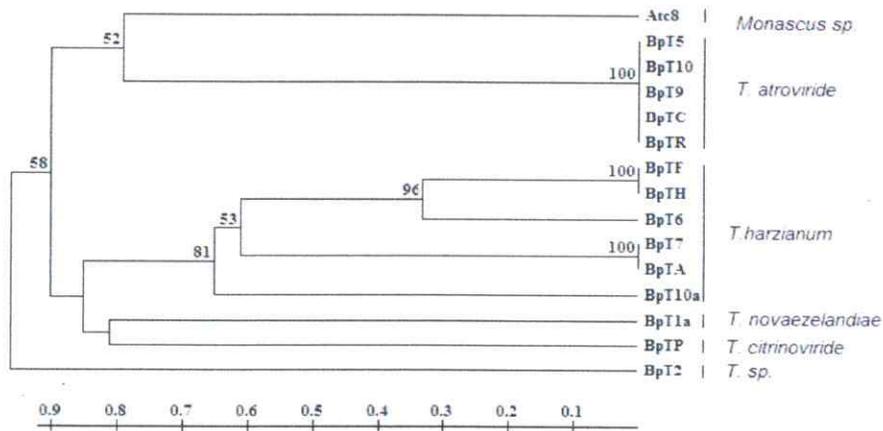


Fig. 9. Dendrograma de similitud de marcadores RAPD de aislados fúngicos, obtenido usando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979) y el método de agrupamiento UPGMA, a partir de una matriz de presencia/ausencia de amplicones obtenidos mediante PCR-RAPD con los partidores OPA-03, OPA-13, OPX-02, OPBF-15, OPBH-03 y OPBH-20. Los aislados pertenecen al género *Trichoderma* (para detalles ver apartado cepas en materiales y métodos). Los valores de bootstrap menores al 50% no fueron indicados.

4.- Desarrollo del marcador SCAR

Para el desarrollo de un marcador SCAR para *T. harzianum* se realizó una reacción de PCR-RAPD en la que se identificó una banda compartida por todos los aislados de *Trichoderma harzianum*. En la figura 10 se observa una banda de aproximadamente 500 pares de bases, amplificada con el partidor seleccionado, que es común a los aislados estudiados y a las muestras de DNA, provistas y que son usadas como control positivo cabe señalar que estas fueron identificadas como *T. harzianum*, mediante los mismos métodos usados en este trabajo para el resto de los aislados identificados como *Trichoderma*.

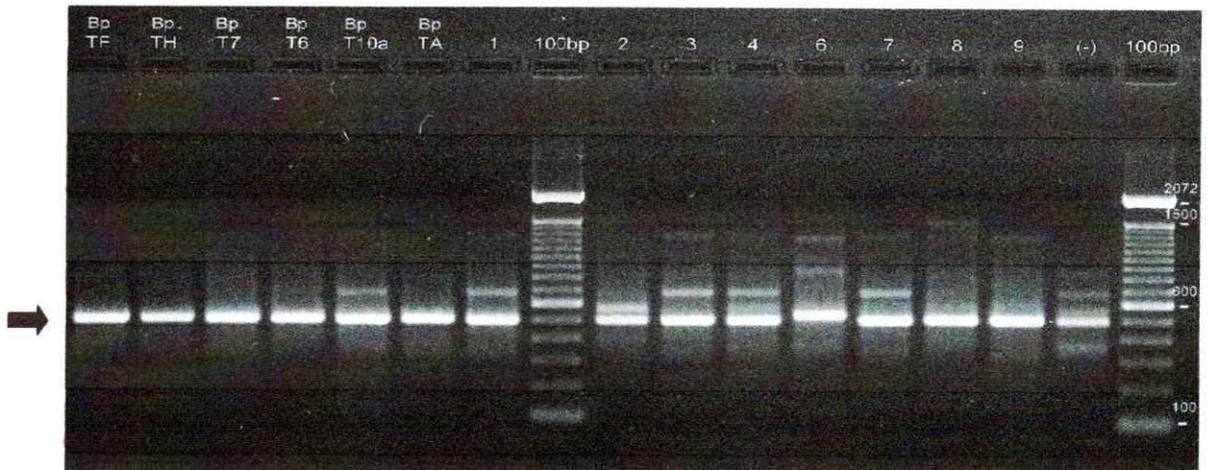


Fig. 10. Patrón de amplicones obtenidos mediante PCR-RAPD con el partidor seleccionado, para todas los aislados identificadas como *Trichoderma harzianum*. Como marcador de peso molecular se usó 100 bp (Invitrogen), los aislados están indicados de acuerdo a la Tabla 1 (ver detalles en materiales y métodos). La flecha indica la banda de aprox. 500Pb, (-) Control negativo.

Una vez identificada la banda de interés, esta fue aislada y purificada a partir del aislado BpTF, El amplicón fue ligado al vector pTZ57R/T, con el cual se transformó en *E.coli* y se seleccionaron cinco transformantes (1X02, 2X02, 3X02, 4X02 y 5X02). El DNA de cada transformante se amplificó usando los partidores M13, y se obtuvo una banda de un tamaño aproximado a 650 pb (Fig 11) correspondiente al inserto de 500 bp más 150 bp correspondientes a los extremos del vector pTZ57R/T.

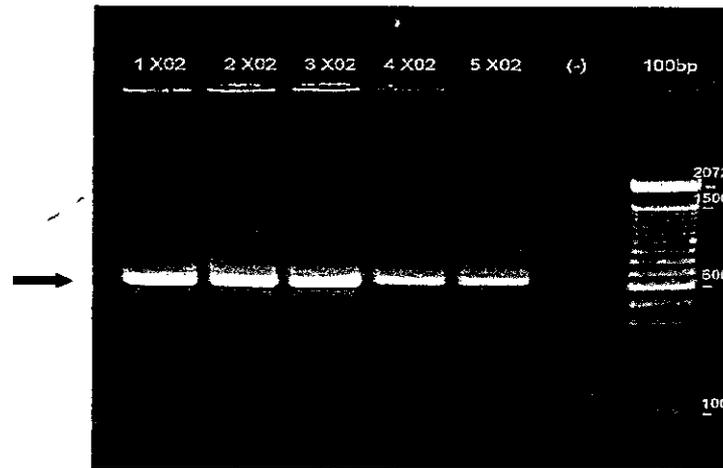


Fig. 11. Amplicones obtenidos desde el DNA de las colonias de *E. coli* transformantes. La amplificación por PCR se realizó con los partidores del vector M13 y el amplicón se resolvió por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. La flecha muestra el amplicón de aproximadamente 650bp. Como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen). (-) Control negativo.

El amplicón fue secuenciado usando los partidores M13F y M13R. La secuencia fue editada (se eliminó las secuencias del vector) y se dejó solo el fragmento flanqueado por el partidor seleccionado. El fragmento resultante tuvo un tamaño de 503 pares de bases.

4.1.- Diseño de partidores SCAR para PCR diagnóstico.

Usando la secuencia de 503 pb se diseñaron 5 partidores como se muestra en la Figura 12. Para ello se usó la herramienta Primer-BLAST (Rozen & Skaletsky 2000).

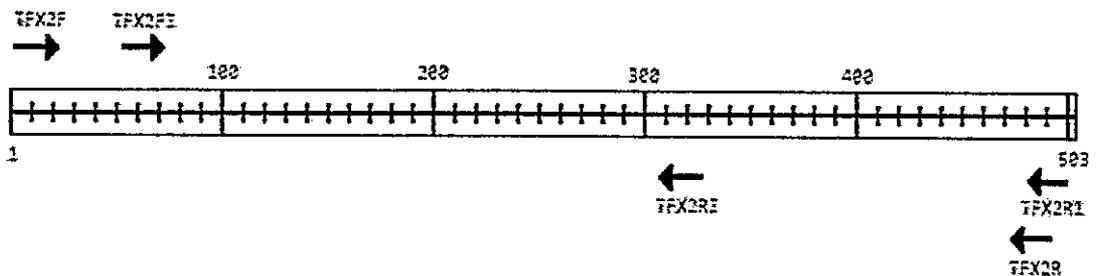


Fig. 12. Ubicación relativa de los partidores en la secuencia de 503pb analizada.

Para el diseño del partidador para SCAR se debe considerar idealmente las secuencias del partidador RAPD y las secuencias adyacentes, es por esto que inicialmente se diseñaron dos partidores: El partidador reverso (TFX2R) y el partidador directo (TFX2F), no obstante la evaluación *in silico* del partidador reverso, TFX2R indicó que la secuencia del partidador seleccionado es muy rica en G+C, favoreciendo la formación de horquillas y la posible hibridación entre partidores. Por lo tanto, los partidores se diseñaron quedando como sigue: el partidador directo (TFX2F) abarca desde la posición 2 a la 23, considerando 9 bases del partidador seleccionado, y posee un porcentaje de G+C del 56.52% y una Tm de 58.28°C, y el partidador reverso (TFX2R) que se extiende de la posición 494 a la 474, y considera solo la última base del partidador seleccionado, con un porcentaje de G+C del 65% y una Tm de 58.68°C.

Posteriormente se diseñaron 3 nuevos partidores 1 forward (TFX2FI) de 23 bases de largo y 2 reverse (TFX2RI y TFX2R1), de 22 bases el primero y 20 el segundo, los partidores TFX2FI y TFX2RI, fueron diseñados usando los parámetros de mayor estrictez posibles en la herramienta Primer-BLAST (Rozen & Skaletsky 2000), en detrimento de considerar la secuencia del partidador seleccionado y haciéndolos que fueran compatibles con los partidores diseñados anteriormente. El partidador TFX2FI abarca desde la posición 51 a la 73 y el partidador TFX2RI abarca desde la posición 328 a la 307, y poseen un % de G+C del 56.52% y 59.09% y Tm de 58.26°C y 57.92°C, respectivamente. Finalmente el partidador TFX2R1, abarca desde la posición 499 a la 480, tiene una Tm de 61.78°C y un % de G+C del 70%, e incluye 6 de las bases correspondientes al partidador seleccionado.

La evaluación de los partidores por PCR se realizó usando distintas combinaciones de éstos, como se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Evaluación de combinaciones posibles de partidores para reacciones de PCR diagnóstico.

Caso N°	Parejas de partidores	Tamaño esperado del amplificado	Resultado 2do paso evaluación
1	TFX2F - TFX2R	493 pb	(-)
2	TFX2FI - TFX2RI	278 pb	(+)
3	TFX2F - TFX2R1	497 pb	(+/-)
4	TFX2F - TFX2RI	326 pb	(-)
5	TFX2FI - TFX2R1	448 pb	(+)
6	TFX2FI - TFX2R	443 pb	(-)

Para los casos N° 2 y 5 (Tabla 8), en un primer paso de evaluación se obtuvieron amplicones bien representados, y del tamaño esperado en todo el rango de temperatura evaluado (40°C a 64°C). Para evitar amplificación inespecífica se utilizó la temperatura de annealing más alta, para llevar a cabo el segundo paso de la evaluación de los partidores.

Por otra parte, el resultado del caso N° 3 se considera como parcialmente positivo dado que se amplificó la banda esperada para todos los *T. harzianum*, no obstante, este caso no fue llevado a la segunda etapa de evaluación, por presentar amplificadores inespecíficos.

En la segunda etapa de evaluación, se condujeron reacciones de PCR que incluyeron todos los aislados de *Trichoderma* utilizados en este trabajo, más los DNA

correspondientes a especies de los géneros *Penicillium spp.* (Atc4, Atc5, 9a, 9ar1, C1R, HC1 y C3F), *Aspergillus spp.* (HI y 4a), *Davidiella sp.* (HM), *Paecilomyces sp.* (9ar), *Monascus sp.* (Atc8) y una mezcla de especies provenientes de compost (C3R).

El resultado del segundo paso de evaluación indica que los partidores adecuados corresponden a los del caso N° 2 y 5, en el caso N°2 los partidores TFX2FI y TFX2RI (Fig 13), amplifican solo el producto esperado de 278 pares de bases, para los 14 aislados de *Trichoderma harzianum* utilizados en este trabajo, y no se observó amplificado en ninguna otra especie presente en la evaluación, lo mismo sucedió con el caso N° 5 (Fig. 14), donde los partidores TFX2FI y TFX2R1, solo amplificaron el producto esperado de 448 pares de bases, en las reacciones donde se usó DNA de *Trichoderma harzianum* como templado.

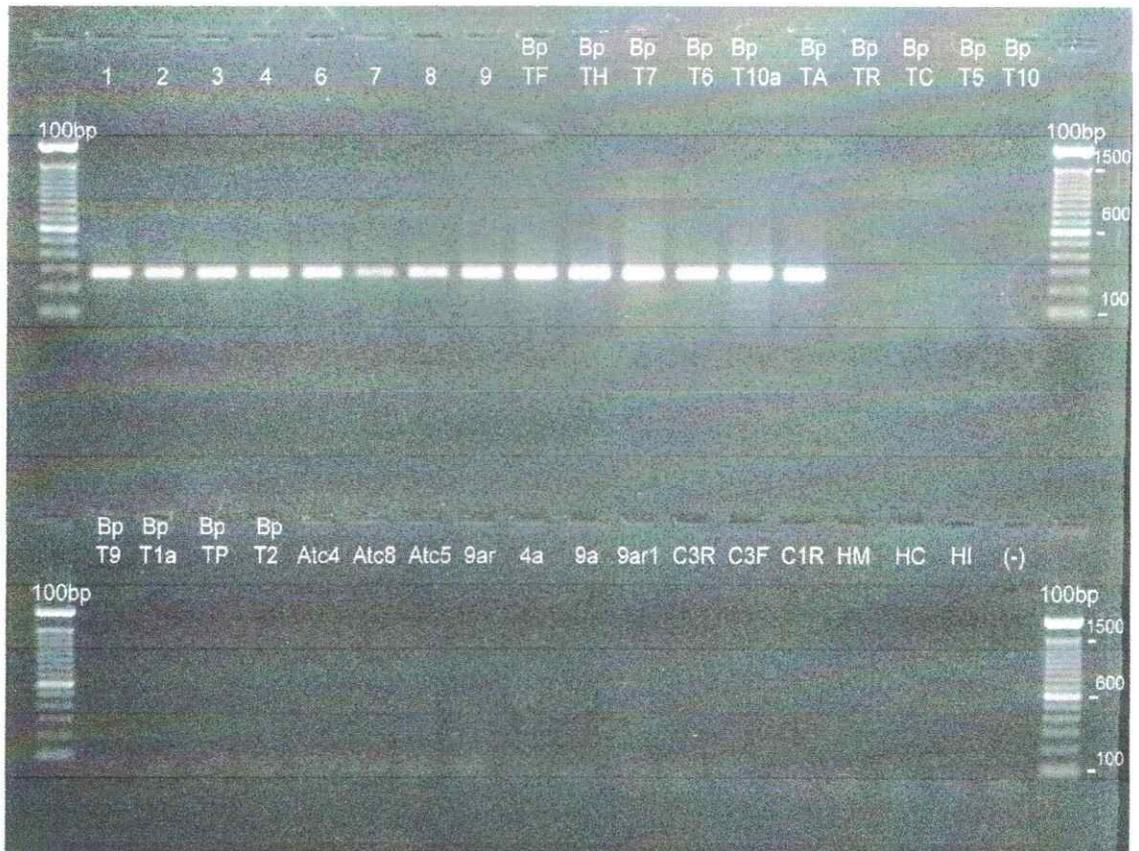


Fig 13. Amplificación del marcador SCAR con los partidores TFX2FI-TFX2RI. El PCR se realizó con temperatura de annealing 64°C. Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. Los carriles 1,2,3,4,6,7,8,9,BpTF, BpTH, BpT7, BpT6, BpT10a, BpTA corresponden a los aislados de *T. harzianum*, los carriles BpTR, BpTC, BpT5, BpT10, BpT9 corresponden a *T. atroviride*, BpT1a corresponde a *T.novaezealandiae*, BpTP corresponde a *T. Citrinoviride*, BpT2 corresponde a *Trichoderma sp.* Atc4, Atc5, 9a, 9ar1, C1R, HC1 y C3F corresponden a *Penicillium spp.* HI y 4a corresponden a *Aspergillus spp.*, HM corresponde a *Davidiella sp.*, 9ar corresponde a *Paecilomyces sp.*, Atc8 corresponde a *Monascus sp.*, y C3R corresponde a una mezcla de especies provenientes de compost. (-) control negativo, como marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).



Fig. 14. Amplificación del marcador SCAR con los partidores TFX2FI y TFX2R1. El PCR se realizó con temperatura de annealing 64°C, Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2 %. Los carriles 1,2,3,4,6,7,8,9,BpTF, BpTH, BpT7, BpT6, BpT10a, BpTA corresponden a *T. harzianum*, los carriles BpTR, BpTC, BpT5, BpT10, BpT9 corresponden a *T. atroviride*, BpT1a corresponde a *T.novaezelandiae*, BpTP corresponde a *T. citrinoviride*, BpT2 corresponde a *Trichoderma sp.*, Atc4, Atc5, 9a, 9ar1, C1R, HC1 y C3F corresponden a *Penicillium spp.* HI y 4a corresponden a *Aspergillus spp.*, HM corresponde a *Davidiella sp.*, 9ar corresponde a *Paecilomyces sp.*, Atc8 a *Monascus sp.*, y C3R a una mezcla de especies provenientes de compost. (-) control negativo. Marcador de peso molecular se usó 100bp (Invitrogen).

Cabe señalar que el amplificado del espécimen 6, que en la reacción de PCR-RAPD con el partidador OPX-2 presentaba una banda con un tamaño levemente mayor al resto (Fig. 10). De la Figura 13 y 14 podemos ver que la diferencia en el tamaño de la secuencia se encontraría entre las bases 328 y 499 del fragmento correspondiente a la reacción de PCR-RAPD para BpTF.

DISCUSIÓN

1.-Identificación de *Trichoderma*: La morfología versus marcadores moleculares para la identificación.

La taxonomía clásica de hongos esta fuertemente apoyada en las características morfológicas, sin embargo, características que son útiles en otros géneros de Hyphomycetes, generalmente no son útiles para diferenciar especies de *Trichoderma*, usualmente debido al estrecho rango de variación en la morfología simplificada de *Trichoderma*. Rifai (1969) y Bissett (1991) han discutido las características morfológicas que ellos usaron para caracterizar y diferenciar especies de *Trichoderma*. Ambos autores enfatizan las dificultades inherentes en definir especies morfológicas de *Trichoderma*, lo cual se puede observar de las diversidad morfológica que presentan los aislados fúngicos estudiados en este trabajo (Anexo II). No obstante, observaciones cuidadosas de los caracteres diagnósticos de la morfología fúngica son a menudo suficientes para la identificación de especies de *Trichoderma*.

Dentro de las características que se usan para identificar especies de *Trichoderma* se encuentra la morfología de los conidióforos que en la mayoría de las especies tienen un eje principal ancho, con ramas a intervalos regulares, usualmente con ramas sucesivas; ramas apicales y distales que se vuelven progresivamente más cortas y angostas; las ramas pueden ser divergentes, solitarias, pareadas o en verticilios; generando un enramado repetitivo verticilado, con una estructura piramidal altamente ramificada. En

otros géneros el enramado es menos regular con ramas solitarias o pareadas y sin ramificaciones.

Frecuentemente los fialidios y las ramas fértiles nacen de hifas aéreas indiferenciadas en áreas de conidiación. Las células conidiógenas (fialidios), están típicamente dispuestas en verticilos terminales en ramas del conidióforo. Los fialidios pueden presentar formas cilíndricas, subulatas, lageniformes, ampuliformes o subglobosas; usualmente atenuadas por un cuello conidiogénico estrecho, corto y cilíndrico (Bissett & Gams 1998).

De acuerdo a las características morfológicas mencionadas anteriormente, todos los aislados nativos usados en este estudio se pueden adscribir al género *Trichoderma* (Fig. 3, Anexo II). Sin embargo, esta identificación resulta laboriosa y requiere experiencia y conocimiento de las estructuras fúngicas, para que sea confiable, sumado a esto las influencias de las condiciones ambientales en las características morfológicas y fisiológicas hace aun más compleja la identificación basada en dichas características (Lieckfeldt y col. 1998)

Otra forma de aproximarse a la identificación de especies fúngicas es el análisis de secuencias de DNA, en especial marcadores moleculares con valor taxonómico como los genes para el RNA ribosomal (rDNA) o las regiones ribosomales intergénicas (ITS1 e ITS2) (Druzhinina & Kubicek 2005, Borman y col. 2008,), para el caso del género *Trichoderma*, las regiones ITS han sido muy importantes en la sistemática y la taxonomía del género (Kindermann y col. 1998, Chaverri y col. 2003b, Druzhinina y

col. 2005, Druzhinina y col. 2006).

Cuando se usan marcadores moleculares para identificar especies, en muchos casos se utiliza la herramienta de búsqueda por similitud de NCBI (BLAST), buscando un E-value igual o cercano a 0.00. Sin embargo, este mecanismo presenta desventajas, ya que hay muchas secuencias indexadas en GenBank, que no están correctamente identificadas, en el caso de *Trichoderma* se estima que un 40% de las especies están mal identificadas (Kopchinskiy y col. 2005), lo que puede llevar a resultados ambiguos como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Ejemplo de una búsqueda en BLAST con una secuencia ITS1 e ITS2 de *Trichoderma** que mostró un resultado ambiguo. (Extraída de (Druzhinina & Kubicek 2005))

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E-value
gi 19880152 gb AF362109.1	<i>Trichoderma aureoviride</i> strain T...	1132	0.0
gi 19880083 gb AF359399.1	<i>Trichoderma aureoviride</i> strain T...	1116	0.0
gi 32394933 gb AY154947.1	<i>Trichoderma aggressivum</i> Ir. 560 ...	1112	0.0
gi 19880067 gb AF359267.1	<i>Trichoderma aureoviride</i> strain T...	1108	0.0
gi 19032416 gb AF345948.1	<i>Trichoderma harzianum</i> isolate GJ...	1100	0.0
gi 19880081 gb AF359397.1	<i>Trichoderma aureoviride</i> strain T...	1100	0.0
gi 21239369 gb AF501330.1	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. europ...	1096	0.0
gi 3095175 gb AF055216.1 AF055216	<i>Trichoderma harzianum</i> str...	1082	0.0
gi 27448757 gb AF443912.1	<i>Trichoderma harzianum</i> G.J.S. 00-...	1045	0.0
gi 9230639 gb AF194019.1 AF194019	<i>Trichoderma aureoviride</i> s...	1045	0.0
gi 9230631 gb AF194011.1 AF194011	<i>Trichoderma harzianum</i> str...	1045	0.0
gi 9230630 gb AF194010.1 AF194010	<i>Trichoderma aureoviride</i> s...	1045	0.0
gi 27448762 gb AF443917.1	<i>Hypocrea lixii</i> G.J.S. 91-138 int...	1041	0.0
gi 27448761 gb AF443916.1	<i>Hypocrea lixii</i> G.J.S. 94-53 inte...	1041	0.0
gi 27448758 gb AF443913.1	<i>Trichoderma harzianum</i> G.J.S. 00-...	1041	0.0
gi 27448771 gb AF443926.1	<i>Hypocrea lixii</i> G.J.S. 90-254 int...	1039	0.0
gi 27448769 gb AF443924.1	<i>Hypocrea lixii</i> G.J.S. 92-110 int...	1037	0.0
gi 27448764 gb AF443919.1	<i>Hypocrea lixii</i> G.J.S. 92-100 int...	1037	0.0
gi 27448760 gb AF443915.1	<i>Hypocrea lixii</i> G.J.S. 90-22 inte...	1037	0.0
gi 32394935 gb AY154949.1	<i>Trichoderma harzianum</i> Ir. 112 C ...	1033	0.0
gi 27448770 gb AF443925.1	<i>Trichoderma harzianum</i> G.J.S. 92-...	1033	0.0
gi 1813651 gb U78881.1 THU78881	<i>Trichoderma harzianum</i> isola...	1033	0.0
gi 32394941 gb AY154955.1	<i>Trichoderma inhamatum</i> Ir. 286 18...	1029	0.0

*Como consulta se uso la secuencia AF3362109 (*Trichoderma harzianum*, depositado erróneamente como "*Trichoderma aureoviride*"), usando BLAST.

Así tenemos que el método de reconocimiento de especies mediante BLAST no es un método de identificación confiable, por lo cual deben usarse otras herramientas para el reconocimiento de las muestras como *TrichOKEY2.0*, que es una herramienta de identificación, propiamente tal. Así, vemos que en el análisis de individuos de *Trichoderma atroviride*, los cuales son relacionados por BLAST a *Trichoderma viride* y a *Hypocrea koningii*, (Tabla 3), y que solo en 2 casos (BpT9 y BpT10) de los 6 analizados, el análisis fue consistente con el programa *TrichOKEY2.0*. No obstante, para el caso de algunas especies del género, los ITS1 e ITS2 han demostrado ser insuficientes para la identificación de estos (Druzhinina & Kubicek 2005).

Con respecto al resultado de *TrichOKEY 2.0* en lo referente a una nueva especie no identificada de *Trichoderma/Hypocrea*, cabe señalar que esta probable nueva especie, podría contribuir a aclarar la posición filogenética de *Trichoderma spirale*, dentro de la sección *Pachybasium B*, dada la relación encontrada entre el aislado y dicha especie. Asimismo, ayudaría a evaluar sus relaciones con el resto de los miembros de este grupo, ya que incluso aproximaciones multigénicas no han podido resolver la posición de esta especie (Kullnig-Gradinger 2002), que se ha mantenido como un linaje único dentro del género.

La herramienta *TrichOKEY2.0* permite la identificación de especies, ya que este software incluye el conocimiento derivado de estudios con otros marcadores moleculares, lo que permite agrupar las especies similares e identificar incluso polimorfismos únicos nucleares o SNPs, los que por si solos son capaces de diferenciar

una especie de otra (Druzhinina y col. 2005). Por otra parte al caracterizar una especie en base a una sola base nucleotídica, conlleva el problema de que si esta base se encuentra mutada, entonces la especie deja de ser reconocida como tal, lo que puede conducir a error.

Otra aproximación para el análisis de secuencias es la de analizar estas últimas mediante herramientas bioinformáticas (MEGA4) que permiten observar las diferencias puntuales entre una y otra secuencia, es así que a partir de la observación hecha en la Tabla 6, donde vemos que hay solo un nucleótido de diferencia entre BpT1a y su especie más relacionada, y a partir de lo antes mencionado, podemos decir que el aislado identificado como *Trichoderma novaezelandiae*, puede pertenecer a una sub-especie, o bien a otra especie, o una nueva especie.

Con respecto a la variabilidad genética versus diversidad morfológica, vemos en el caso del grupo de especies identificadas como *Trichoderma atroviride*, que las características morfológicas macroscópicas del crecimiento a 25°C en PDA, revelan al menos dos fenotipos (Castillo, 2009), que se corresponden con los grupos formados por BpT5, BpT10 y BpT9 para una variedad y por el grupo BpTC y BpTR para el otro fenotipo (Fig 15). Sin embargo, ni el análisis de los ITS (Fig. 6), ni el análisis de los patrones de RAPD (Fig. 9) revelan polimorfismo en estos aislados, lo cual sugiere que el número de marcadores moleculares del tipo RAPD identificados es insuficiente para un estudio de variabilidad genética de estas cepas. Por otra parte, no se puede descartar que se trate de los mismos aislados, y su diferencia morfológica corresponda a un fenómeno de

plasticidad fenotípica.

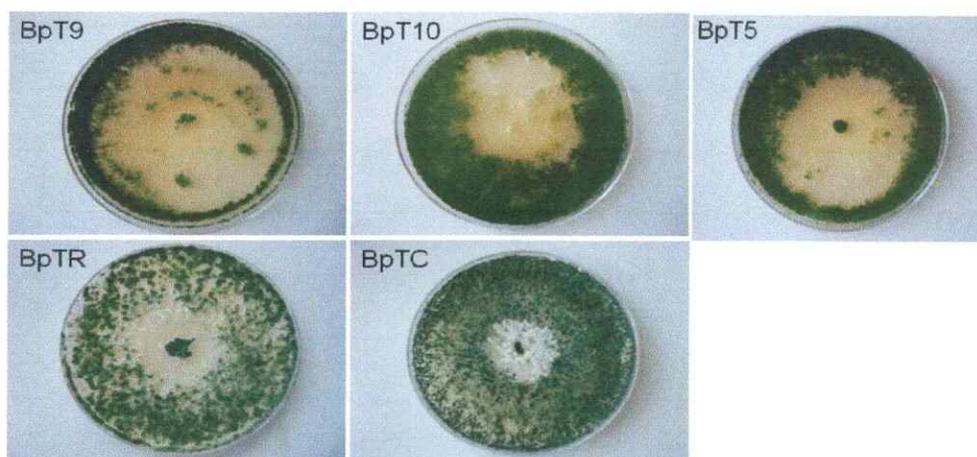


Fig. 15: Crecimiento en placa Petri de cepas aisladas, identificadas como *Trichoderma atroviride*, crecidas en PDA a 25°C. Cortesía de Pedro Castillo.

Finalmente, vemos en este trabajo, que la mejor manera de llegar a la identificación de especies del género *Trichoderma*, es con una combinación de análisis que incluyan análisis de secuencias conservadas del rDNA, técnicas de “fingerprinting” como RAPD y análisis morfológico. Por lo demás, como señala Hermosa y col. en (Hermosa y col. 2001), sería recomendable agregar a este análisis un estudio del DNA mitocondrial, sin embargo, este estudio se justifica solo en el caso de los aislados BpT2 y BpT1a, ya que el primero no pudo ser adscrito a ninguna especie en particular, y el segundo solo fue identificado con un nivel de confiabilidad “standard”, además de no mostrar un 100% de identidad con su organismo más relacionado, para el resto de las especies identificadas hasta el nivel de especie, la identificación hecha en este trabajo se considera exitosa e inequívoca en base al conocimiento actual.

1.1.- Análisis de relaciones para *T. harzianum*.

En el análisis de la Figura 6 se incluyeron secuencias de *Hypocrea lixii* Th4 e *Hypocrea lixii* Th2, estas especies son responsables de causar una enfermedad epidémica a los cultivos de *Agaricus bisporus* en Europa y Norte America respectivamente, y que estas son parte del grupo más cercano a *Trichoderma harzianum* junto con *Trichoderma atroviride* (Th3)(Samuels y col. 2002) y en este sentido podemos ver en la Figura 6 que ninguno de nuestros aislados se relacionan con estas especies agresivas.

1.2.- Variabilidad genética de los aislados mediante PCR-RAPD.

A partir de los datos generados mediante RAPD, en este trabajo se llevó a cabo un análisis de clusters, con este fin se utilizo el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979), que representa la proporción de fragmentos que dos muestras comparten debido a que han sido heredadas de un ancestro común, y como señala Lamboy, W. 1994, el coeficiente de similitud de Nei y Li es el mejor índice para computar datos de similitud génica a partir de datos de RAPD.

Con los datos obtenidos mediante el análisis de clusters, se confirma la observación hecha en base a las diferencias morfológicas a nivel macroscópico, de que el aislado BpT7, es distinto a BpTF, BpTH y BpT6 y más aun, que se relaciona estrechamente con BpTA, esto es particularmente llamativo ya que indica, tal como lo hiciera ver Chaverri y col. 2003, que la sola secuencia de los ITS es insuficiente para dilucidar el complejo de especies de *Trichoderma harzianum*.

El análisis de RAPDs es útil para el estudio de cepas estrechamente relacionadas ya que se pueden obtener numerosos marcadores polimorficos (Góes y col. 2002, Paavanen y col. 2000). La comparación de especies no relacionadas mediante RAPDs puede llevar a resultados erróneos ya que pueden obtenerse fragmentos que co-migran en el gel pero que corresponden a marcadores genéticos distintos. Un ejemplo de esto puede observarse en la ubicación del aislado Atc8 (identificada como *Monascus sp*), el cual fue incorporada en el análisis de clusters (Fig. 9), y aparece relacionada con *Trichoderma atroviride*.

A partir del análisis RAPD se identificaron marcadores polimórficos en el grupo de cepas de *T. harzianum*, que sirvieron de base para el desarrollo de un marcador de tipo SCAR específico para la especie.

2.- SCAR.

Las especies del género *Trichoderma*, *T. harzianum* y *T. atroviride*, están siendo ampliamente usadas en la agricultura por sus propiedades biocontroladoras y bioestimulantes, y por su potencial uso en cultivos orgánicos (Hjeljord & Tronsmo 1998, Hermosa y col. 2000). Sin embargo, no todas las formulaciones de *Trichoderma* presentes en el mercado nacional parecen tener un control de calidad microbiológico estricto, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo el producto comercial estudiado contenía esencialmente cepas perteneciente a los géneros *Penicillium* y *Monascus*, además de otras especies de levaduras que no fueron analizadas.

El desarrollo de biotecnologías ligadas a microorganismos requiere de control permanente de las cepas microbianas (Hermosa y col. 2001). Para el caso de las especies del género *Trichoderma* que se usan como bioestimulante del crecimiento de plantas o como BCAs, asegurar la composición del formulado microbiano es esencial para la calidad del producto (Hermosa y col. 2000). Varios trabajos se han orientado a la identificación de cepas mediante marcadores moleculares basados en la secuencia (Hermosa y col. 2000, Hermosa y col. 2001, Rubio y col. 2005, Cordier y col. 2007, Savazzini y col. 2008), por lo que en este trabajo se siguió la misma línea, en lugar del aislamiento mediante el uso de cultivos en medio selectivo (Jensen y col. 1996) o en la identificación de organismos genéticamente modificados (Green & Jensen 1995), por las razones ya expuestas (ver introducción).

En este trabajo se desarrolló un marcador molecular del tipo SCAR con el propósito de hacer el seguimiento de un producto biocontrolador y bioestimulante, basado en las cepas de *Trichoderma harzianum*. Para amplificar la región usada como marcador, se diseñaron 5 partidores que permitieron probar 6 combinaciones de partidores “forward” y “reverse”, de las cuales 3 de ellas amplifican el marcador genético, que permite detectar *Trichoderma harzianum*.

Por otra parte las especies de *Trichoderma* se reproducen principalmente por vía asexual, ya que es sabido que la fase perfecta (teleomorfa) de estos hongos, si bien se ha observado, en la mayoría de los casos no ocurre y las cepas son mayoritariamente mitóticas y clonales (Zolan 1995). Por lo tanto, se espera que el marcador SCAR sea

estable en el genoma del hongo con baja posibilidades de recombinación. Además se ha observado que el polimorfismo cromosómico ocurre lentamente en poblaciones de hongos filamentosos y que las cepas permanecen estables durante varios años (Zolan 1995). Aunque se ha demostrado que en condiciones de laboratorio existe un cierto grado de recombinación génica asexual (Harman y col. 1998), no es claro que esto ocurra en la naturaleza (Gómez y col. 1997).

El marcador molecular SCAR obtenido en este trabajo también podría ayudar en los estudios de trazabilidad, y así poder evaluar la efectividad y permanencia de tratamientos con *Trichoderma harzianum*, (Abbasi y col. 1999). Otra posibilidad es evaluar estos partidores en amplificación por PCR en tiempo real como los desarrollados por Cordier y col. 2007 y Savazzini y col. 2008.

Determinar la presencia de *Trichoderma harzianum* en muestras ambientales es fundamental para evaluar la eficiencia de este hongo en ensayos de biocontrol o bioestimulación. Considerando que dentro de la especie *T. harzianum* o del género *Trichoderma* se encuentran numerosas cepas que exhiben propiedades interesante como BCAs, también para ellas se pueden desarrollar marcadores del tipo SCAR a nivel de cepas utilizando estrategias similares.

Esta identificación de aislados en muestras ambientales es relevante por cuanto las especies del género *Trichoderma*, poseen diversas propiedades de interés biotecnológico. Entre ellas su capacidad para producir enzimas celulolíticas, las cuales

son importante en el desarrollo de biocombustibles (Chandra y col. 2010), en este sentido tenemos un asilado de *Trichoderma citrinoviride* (Chandra y col. 2010).

3.- Aproximación a la biodiversidad de *Trichoderma* en Chile.

A pesar de que el número de muestras es reducido, es posible observar en la Figura 16 una dominancia de la especie *Trichoderma harzianum*, sobre *Trichoderma atroviride*. De la Tabla 1 es posible observar que la distribución de esta especie esta asociada a la mayoría de los sitios de colecta, lo que sugiere que *Trichoderma harzianum* es una especie ampliamente distribuida y dominante en la zona centro-sur de Chile. Esto coincide con las observaciones de Nagy y col. 2007, que muestra que esta especie domina la mayoría de las poblaciones de *Trichoderma* estudiadas y da cuenta de un 20% del total de aislados del género.

Por otro lado *Trichoderma atroviride*, no se encuentra igualmente representada, probablemente debido al reducido número de muestras que se analizaron. En la Tabla 1 observamos que *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum* se encuentran en las mismas localidades, por lo que se podría especular que estas especies convivirían ocupando nichos similares, o bien siendo parte de los mismos ensambles microbiológicos.

Estudiar la diversidad de este género en Chile nos permitiría conocer el recurso genético de esta biota fúngica y su potencial aplicación biotecnológica

Trichoderma harzianum

Trichoderma atroviride

Trichoderma novaezelandiae

Trichoderma citrinoviride

Trichoderma sp.

Fig. 16: Visualización en nubes de la abundancia relativa de especies del género *Trichoderma*, realizado en www.ibarcode.org (Singer & Hajibabaei 2009) para los 14 aislados de este trabajo reconocidos como pertenecientes al género *Trichoderma*.

CONCLUSIONES

1.- A través del análisis de las secuencias de los ITS1 e ITS2, los aislados obtenidos a partir de muestras ambientales fueron identificados como pertenecientes al género *Trichoderma*.

2.- Utilizando la misma aproximación experimental, los aislados derivados del producto comercial se identificaron como pertenecientes a los géneros, *Penicillium* y *Monascus*. Lo que valida desarrollar un marcador molecular específico para monitorear especies fúngicas.

3.- El marcador SCAR desarrollado es específico para la especie *T. harzianum*, por lo tanto es capaz de discriminar adecuadamente dicha especie de otras especies de *Trichoderma* e incluso de hongos pertenecientes a otros géneros.

4.- Las cepas identificadas como *T. harzianum* exhiben polimorfismo genético de acuerdo al análisis de RAPD, por lo que sería posible diseñar marcadores específicos para cepas de *T. harzianum*.

REFERENCIAS

- Abbasi, P. A., Miller, S. A., Meulia, T., Hoitink, H. A. & Kim, J. M. (1999). Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5421-5426.
- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **7**, 249-260.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* **69**, 2357-2372.
- Bissett, J. & Gams, W., Eds. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. En C.P. Kubicek y G.E. Harman (eds.), *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1 Basic Biology, Taxonomy and Genetics. pp 35-35. Teylor & Francis, Londres.
- Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J. & Johnson, E. M. (2008). Molecular identification of pathogenic fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, i7-i12.
- Castillo P. (2009). Obtención, reconocimiento e identificación de cepas de *Trichoderma* sp. nativas de Chile. Evaluación de antagonismo *in vitro* frente a *Botrytis* sp.
- Chandra, M., Kaira, A., Sharma, P.K., Kumar, H. & Sangwan, R.S. (2010). Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass Bioenergy* **34**, 805-811.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E. & Samuels, G. J. (2003a). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* **95**, 1100-1140.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J. & Geiser, D. M. (2003b). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* **27**, 302-313
- Cordier, C., Edel-Hermann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C. & Alabouvette, C. (2007). SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *J. Microbiol. Methods* **68**, 60-68.

- Danielson, R. & Davey, C. (1973). The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 485-494.
- Druzhinina, I. & Kopchinskiy, A. (2009). International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy, Vol. 2008.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G. & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 813-828.
- Druzhinina, I. & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **6**, 100-112.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. & Kubicek, C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* **47**, 55-64.
- Embong, Z., Wan Hitam, W., Yean, C., Abdul, N., Kamarudin, B., Zainal, S., Osman, S., Zainuddin, Z. F., Ravichandran, M. (2008). Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC ophthalmology* **8**:7
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Góes, L. B., Lima da Costa, A. B., Lopes de Carvalho, L., Tinti de Oliveira, N. & (2002). Randomly Amplified Polymorphic DNA of *Trichoderma* Isolates and Antagonism Against *Rhizoctonia solani*. *Braz Arch. Biol. Technol.* **45**, 151-160.
- Green, H. & Jensen, D. F. (1995). A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*. II: The use of a GUS transformant for ecological studies in the rhizosphere. *Phytopathology* **85**, 1436-1440.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Monte, E. & Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3189-3198.
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**, 190-194.
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Ondik, K.L. (1998). Asexual genetics En *Trichoderma* and *Gliocladium*: mechanisms and implications En: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (eds) *Trichoderma and Gliocladium*, vol 1. pp 243-270. Taylor & Francis, Londres.

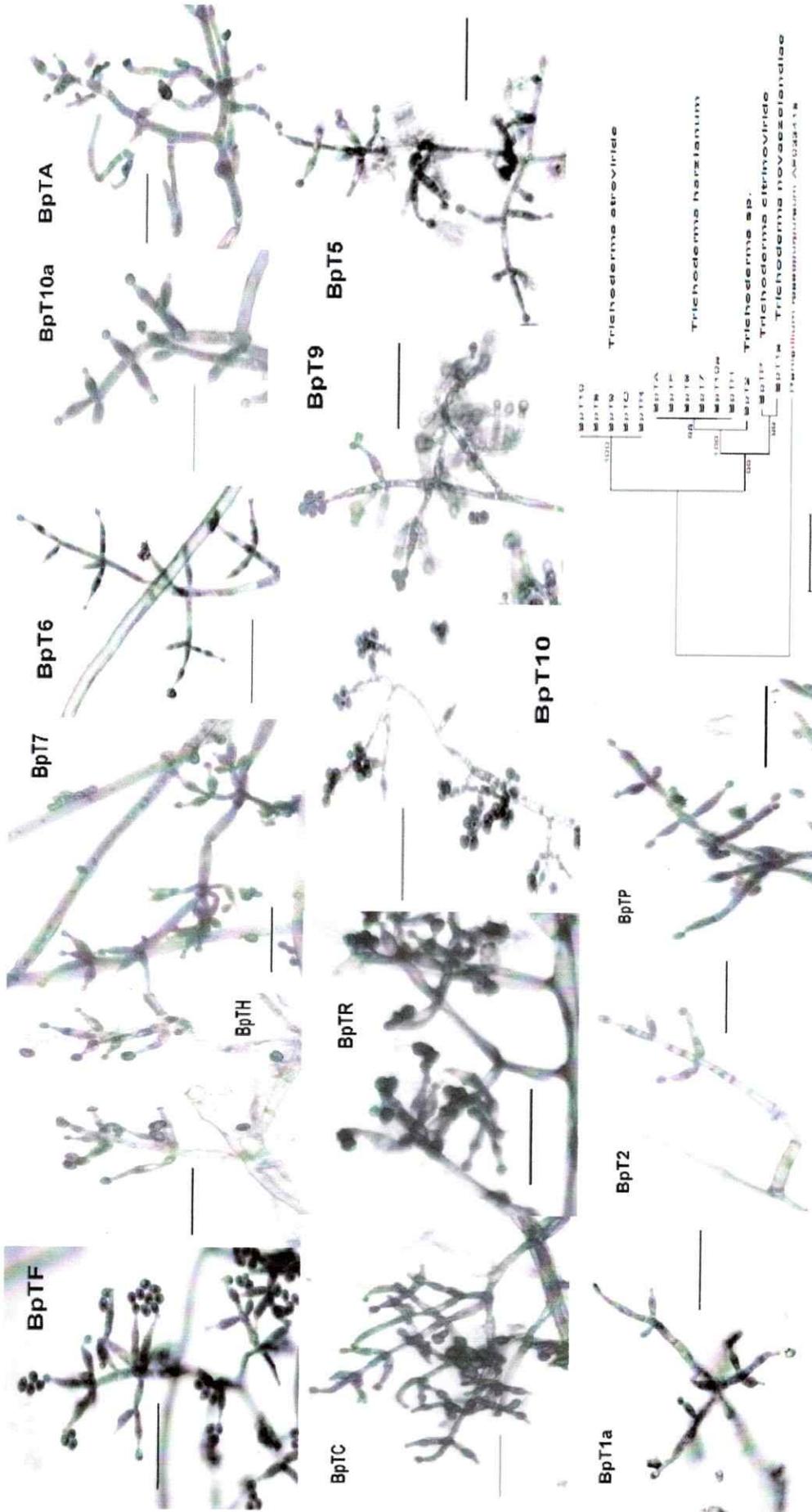
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 43-56.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Domiguez, J. M., Castro, C., Monte, E. & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1890-1898.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Diaz-Minguez, J. M., Iturriaga, E. A. & Monte, E. (2001). Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr. Genet.* **38**, 343-50.
- Hjeljord, L. & Tronsmo, A., (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in Biological Control: An Overview. *En Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Harman, G. E. & Kubicek, C. P. (eds.) Taylor and Francis Ltd, London.
- Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Jensen, D. F., Tronsmo, A. & Jansson, H. B. (1996). Occurrence of *Gliocladium roseum* on barley roots in sand and field soil. *En Developments in Plant Pathology*. Vol. 8. Knudsen, I. M. B., Jensen, B., Jensen, D. F. & Hockenhull, J. Dordrecht (eds.) Kluwer Academic, Holanda.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G. J. & Kubicek, C. P. (1998). Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA clade. *Fungal Genet. Biol.* **24**, :298-309.
- Klein, D. & Eveleigh, D. E., Eds. (1998). Basic Biology, Taxonomy and Genetics. *En Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (eds.) Taylor and Francis Ltd, London.
- Komon-Zelazowska, M., Neuhof, T., Dieckmann, R., von Dohren, H., Herrera-Estrella, A., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. (2007a). Formation of atroviridin by *Hypocrea atroviridis* is conidiation associated and positively regulated by blue light and the G protein GNA3. *Eukaryot. Cell.* **6**, 2332-42.
- Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D. Hatvani, L., Manczinger, L. Woo, S., Lorito, M., Kredics, L. Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2007b) Genetically Closely Related but Phenotypically Divergent *Trichoderma* Species Cause Green Mold Disease in Oyster Mushroom Farms Worldwide. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7415-7426

- Kopchinskiy, A., Komon, M., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. (2005). TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycol. Res.* **109**, 658-660.
- Kredics, L., Antal, Z., Doczi, I., Manczinger, L., Kevei, F. & Nagy, E. (2003). Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **50**, 105-117.
- Kubicek, C. P. & Penttilä, M. E., Eds. (1998). Regulation of Production of Plant Polysaccharide Degrading Enzymes by *Trichoderma*. *En Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (eds.) Taylor and Francis Ltd, London.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T. & Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7755-7760.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Meyer, W., Kubicek, C. P. & Börner, T. (1997). Revision of *Trichoderma* section Longibrachiatum including related teleomorphs based on an analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* **89**, 442-460.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* **106**, 757-767.
- Lamboy, W. F. (1994). Computing Genetic Similarity Coefficients from RAPD Data: The Effects of PCR Artifacts. *Genome Res.* **4**, 31-37.
- Lieckfeldt, E., Khuls, K. & Muthumeenakshi, S. (1998). Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. *En C.P. Kubicek y G.E. Harman (eds.), Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1 pp 35-56. Teylor & Francis, Londres.
- Lehmann, P. F., Lin, D. & Lasker, B. A. (1992). Genotypic Identification and Characterization of Species and Strains within the Genus *Candida* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3249-3254.
- Meyer, S. L. F., Roberts, D. P., Chitwood, D. J., Carta, L. K., Lumsden, R. D. & Mao, W. L. (2001). Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica* **31**, 75-86.
- Nagy, V., Seidl, V., Szakacs, G., Komon-Zelazowska, M., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. (2007). Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7048-58.

- Nelson, E. E. (1982). Occurrence of *Trichoderma* in a Douglas-fir soil. *Mycologia* **74**, 280-284
- Paavanen-Iluhtala, S., Avikainen, H. & Yli-Mattila, T. (2000). Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**, 187-198.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. pp 365-386 Human Press, Totowa, NJ.
- Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E. & Monte, E. (2003). Specific PCR Assays for the Detection and Quantification of DNA from the Biocontrol Strain *Trichoderma harzianum* 2413 in Soil. *Microbial Ecol.* **49**, 25-33.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus *Mycological Res.* **100**, 923-935
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A. & Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **94**, 149-170.
- Samuels, G. J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E. & Kubicek, C. P. (1998). The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. *Stud Mycol*, 1-54.
- Savazzini, F., Longa, C. M., Pertot, I. & Gessler, C. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *J Microbiol. Methods* **73**, 185-194.
- Singer, G. A. & Hajibabaei, M. (2009). iBarcode.org: web-based molecular biodiversity analysis. *BMC Bioinformatics* **10**, (Suppl 6):S14.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599.
- Thrane, U., Poulsen, S. B., Nirenberg, H. I. & Lieckfeldt, E. (2001). Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS Microbiol. Letters* **203**, 249-255.

- Turner, D., Kovacs, W., Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Peter, B., Arisan-Atac, I., Strauss, J., Samuels, G. J., Börner, T. & Kubicek, C. P. (1997). Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. *Mycol. Res.* **101**, 449-459.
- Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994) TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Aplic. Biosci.* **10**, 569-570
- Weindling, R. (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* **24**, 1153-1179.
- Weindling, R. & Fawcett, H. S. (1936). Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedlings. *J. Agric. Sci. Calif. Agric. Exp. Stn* **10**, 1-16.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & J., T., (eds.) (1990). PCR protocols, A guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press.
- Widden, P. & Abitbol, J. J. (1980). Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia* **72**, 775-784.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000), A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J. Comput. Biol.*; **7**(1-2), 203-214.
- Zolan, M.E. (1995) Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.* **59**, 686-698.

Anexo II



Imágenes de los aislados identificados como pertenecientes al género *Trichoderma*, las barras de tamaño corresponden a 20 μm , adicionalmente se incluye un dendrograma que muestra las relaciones entre los aislados y sus respectivos nombres identificados mediante *TrichoKEY2.0*.