

## **A *Trichoderma brevicompactum* strain isolated in Mexico inhibits the growth of phytopathogenic fungi**

### **Una cepa de *Trichoderma brevicompactum* aislada en México reprime el crecimiento de hongos fitopatógenos**

Xunaxi Juquila Moreno-López<sup>1</sup>, José Luis Villarruel-Ordaz<sup>1</sup> , José Humberto Valenzuela-Soto<sup>2</sup> , Luis David Maldonado-Bonilla<sup>3\*</sup> 

<sup>1</sup>Universidad del Mar campus Puerto Escondido. Instituto de Genética. Puerto Escondido, Oaxaca.

<sup>2</sup>Programa Investigadoras e Investigadores por México, comisionado en Centro de Investigación en Química Aplicada, Departamento de Biociencias y Agrotecnología. Saltillo, Coahuila.

<sup>3</sup>Programa Investigadoras e Investigadores por México, comisionado en Universidad del Mar campus Puerto Escondido. Instituto de Genética. Puerto Escondido, Oaxaca.

\*Corresponding author

E-mail address: [maldonado@zicatela.umar.mx](mailto:maldonado@zicatela.umar.mx) (L. D. Maldonado-Bonilla)

Article history:

Received: 15 March 2023 / Received in revised form: 8 May 2023 / Accepted: 13 May 2023 / Published online: 1 July 2023.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.3.1>

### **ABSTRACT**

Fungi of the *Trichoderma* genus have been widely studied for their mycoparasitic characteristics that allow the generation of biological control products. In addition, some of them promote plant growth. Currently, there are over 300 species divided into 8 clades or lineages. Despite such diversity, few species have been reported in Mexico, and there is not representativeness of every clade. Here, we present the identification of the 2IG2102 strain of *T. brevicompactum* based on analysis of 3 phylogenetic markers, as well as its characterization as antagonist towards 2 *Fusarium* fungi, and it also boosts tomato and cucumber seed germination. Trichothecene biosynthesis might be a mechanism required to inhibit phytopathogens growth and in parallel affect the post-

germinative growth of tomato. This is the first report of a *Trichoderma* belonging to the clade 6 isolated in Mexico, that displays capacity to antagonize fungi and it might produce trichothecenes for biological control.

**Keywords:** Mycoparasitism, phylogeny, phytopathogens, toxins, *Trichoderma*

## RESUMEN

Los hongos del género *Trichoderma* han sido ampliamente estudiados por sus características de micoparásito que permiten generar productos de control biológico, además de que algunos de ellos promueven el crecimiento vegetal. Actualmente existen más de 300 especies divididas en 8 clados o linajes. A pesar de esta diversidad, pocas especies se han reportado en México y no hay representatividad de todos los clados. Aquí presentamos la identificación de la cepa 21G2102 de *T. brevicompactum* basado en análisis de 3 marcadores filogenéticos, su caracterización como antagonista de 2 hongos del género *Fusarium* y que impulsa levemente la germinación de semillas de jitomate y pepino. La biosíntesis de tricotecenos puede ser uno de los mecanismos para inhibir el crecimiento de fitopatógenos, pero podría afectar el desarrollo post-germinativo de jitomate. Este es el primer reporte de una cepa de *Trichoderma* del clado 6 aislada en México que presenta capacidad para antagonizar hongos y potencial para producir tricotecenos para control biológico.

**Palabras clave:** Filogenia, fitopatógenos, micoparasitismo, toxinas, *Trichoderma*

## 1. INTRODUCCIÓN

*Trichoderma* es un género de ascomicetos asexuales ampliamente investigado por competir y vivir a expensas de otros hongos de suelo, propiedad conocida como micoparasitismo (Mukherjee *et al.*, 2022), también porque está asociado con plantas. Este ascomiceto tiene relevancia agrobiotecnológica porque muchas de las presas del micoparasitismo son hongos fitopatógenos, debido a esto, muchas de las formulaciones de micoinsecticidas se basan en *Trichoderma* spp. El micoparasitismo incluye enrollamientos y penetración de las hifas de *Trichoderma* sobre el hongo presa, lo cual se favorece por la actividad de enzimas líticas de la pared celular (Dutta *et al.*, 2022). Las proteínas y metabolitos tóxicos debilitan a la presa, además, los productos de la actividad enzimática se utilizan como fuentes de carbono y nitrógeno (Mukherjee *et al.*, 2022), lo cual resulta en un mejor establecimiento de *Trichoderma* en suelos con baja disponibilidad de nutrientes.

Hasta 2020 se tenían registro de 375 especies de *Trichoderma* de las cuales 361 son cultivables en laboratorio (Cai & Druzhinina, 2021). En México se tienen registro de 42 especies identificadas por sus características morfológicas, siendo *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. viride* las más frecuentes (Allende-Molar *et al.*, 2022). De estas 42, sólo 17 especies cuentan con un registro de clasificación por criterios moleculares utilizando principalmente la secuencia de la región ITS (por sus siglas en inglés, *Internal*

*Transcribed Spacer*) y en menor instancia la secuencia de *tef1* (por sus siglas en inglés, *translation elongation factor 1  $\alpha$* ) (Allende-Molar *et al.*, 2022).

Las especies de *Trichoderma* se han clasificado en clados o linajes de acuerdo con sus características morfológicas y códigos de barras genéticos basados en *ITS*, sin embargo, la similitud morfológica interespecies y altas identidades de secuencias *ITS*, demanda nuevos criterios taxonómicos que permitan diferenciar entre especies de un mismo clado. Cai y Druzhinina (2021) proponen un protocolo de identificación que considera la secuenciación inicial de la región *ITS* solo para incluir a un aislado dentro el género *Trichoderma*; la determinación de la especie lo define el análisis de fragmentos filogenéticamente informativos de los genes *tef1* y *rpb2* (por sus siglas en inglés, *RNA polymerase B subunit II*). Dependiendo la identidad de las secuencias de interés respecto a secuencias de cepas tipo, se asignará una especie o se procederá a realizar filogenias. Con estos criterios, las especies se han reorganizado en 8 clados (Cai & Druzhinina, 2021). La especie *T. harzianum* que es común en México pertenece al clado 1, mientras que las otras 2 especies comunes *T. asperellum* y *T. viride* son del clado 5 (Cai & Druzhinina, 2021).

El actual clado 6 alberga a las especies clasificadas originalmente dentro del clado *Brevicompactum*, frecuentemente reportadas como residentes de suelos (Degenkolb *et al.*, 2008). Las especies de este clado también tienen propiedades biocontroladoras y se distinguen por la producción de tricotecenos (Cardoza *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2021). Los tricotecenos son metabolitos específicos de hongos que inhiben la síntesis de proteínas al bloquear la actividad de peptidil transferasa dentro de la subunidad grande ribosomal (Garreau de Loubresse *et al.*, 2014). La producción de tricotecenos depende de los genes *tri* que codifican enzimas biosintéticas de esta ruta, así como transportadores de membrana y reguladores transcripcionales (Proctor *et al.*, 2018).

En este reporte se presenta la identificación de *Trichoderma brevicompactum* 2IG2102 perteneciente al clado 6 con base en criterios morfológicos y análisis de 3 secuencias de ADN filogenéticamente informativas. A ser del género *Trichoderma*, se evaluaron características propias del género, tanto el antagonismo *in vitro* contra 2 hongos fitopatógenos y el efecto positivo en plantas a través de ensayos de promoción de la germinación en semillas de jitomate y pepino. Para complementar la evaluación del efecto antagónico se probó un extracto de acetato de etilo derivado de 2IG2102 y se identificó al gen *tri5* en este hongo como un primer paso para dilucidar la ruta de tricotecenos propias del clado 6 de *Trichoderma*. Este es el primer reporte de caracterización de una especie del clado 6 en México y abre la posibilidad de desarrollar nuevos biocontroladores de hongos y malezas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Asilamiento del hongo 2IG2102

*Trichoderma brevicompactum* 2IG2102 se aisló a partir del suelo circundante donde crecen plantas de plátano manzano (*Musa* sp. AAB) en terrenos que pertenecen a la Universidad del Mar campus Puerto Escondido. Este hongo se mantuvo dada su

capacidad inhibidora de crecimiento micelial, evaluada en ensayos preliminares (datos no mostrados). Una vez que realizados los ensayos preeliminarios, se realizaron cultivos monospóricos y se prepararon *stocks* de conidios en glicerol al 50% para almacenarse a -20°C. Este hongo también se mantuvo en agar papa dextrosa (APD), agar extracto de malta (AEM) y agar de avena (AA).

## 2.2. Extracción de ADN genómico y amplificación

El ADN genómico del micelio de 2IG2102 se obtuvo con el EZ-10 Spin Column Genomic Kit (BIOBASIC). Una vez obtenido, se amplificó por PCR la región del 3' del ARN ribosomal de la subunidad pequeña ó *SSU* (*Small subunit ribosomal RNA*), la región *ITS* y parte del ARN ribosomal de la subunidad grande ó *LSU* (*Large subunit ribosomal RNA*) usando los oligonucleótidos ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') y LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3'). Las condiciones para PCR fueron 95°C por 5 min como desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 30 s y 72°C por 1 min, para finalizar con adicionales 5 min a 72°C. Un fragmento del gen *tef1* se obtuvo con la combinación de oligonucleótidos degenerados *tef71F* (5'-CAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC-3') y *tef997R* (5'-CAGTACCGGCRGCRATRATSAG-3') siguiendo un protocolo de amplificación previamente validado por nuestro grupo (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2021). El amplicón derivado del gen *rpb2* se obtuvo con la combinación de oligonucleótidos *fRPB2-5F* (5'-GACGATCGTGACCACTTTGG-5') y *fRPB2-7R* (5'-GAYTGRTTRTGRTCRGGGA AVGG-3') siguiendo un programa de amplificación preestablecido (Matheny, 2005). Todas las amplificaciones se llevaron a cabo con el kit de MyTaq DNA polimerase (Meridian Bioscience). La producción de los amplicones fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1% y finalmente se secuenciaron previa clonación por el método Sanger de electroforesis capilar en la empresa Macrogen (Corea del Sur).

## 2.3. Identificación de 2IG2102

A partir del amplicón obtenido con los oligos ITS1F y LR5 (disponible en la base de datos de secuencias genéticas Genbank con el ID OP174987.1) se obtuvo exclusivamente la región *ITS* (*ITS1-5.8S-ITS2*) para someterse a búsqueda de secuencias similares utilizando el algoritmo BLASTN en la base de datos de *ITS* de hongos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para refinar el análisis de la región *ITS*, se realizó el alineamiento de la región de 2IG2102 y de especies cercanas (Degenkolb *et al.*, 2008). También se generó una matriz de distancias genéticas con el modelo Jukes-Cantor en el software MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). También se realizaron búsquedas para las secuencias *tef1* y *rpb2* con el mismo algoritmo, pero utilizando las bases de datos estándares de nucleótidos y acotando la búsqueda a secuencias del género *Trichoderma*. Para las secuencias de *rpb2* fue necesario realizar una filogenia de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución HKY85 y 200 réplicas *Bootstrap* en MEGA-X. Las demás secuencias utilizadas para esta filogenia fueron obtenidas de un compendio de especies del clado 6 ó *Brevicompactum* (Degenkolb *et al.*, 2008) y se limitan a la región filogenéticamente informativa establecida recientemente (Cai & Druzhinina, 2021). Las secuencias de *tef1* y *rpb2* están disponibles en NCBI con los ID OP203935 y

OP203936. Para complementar estos resultados, se observaron preparaciones de micelio crecido en medio AEM y teñido con lactofenol-azul de algodón al microscopio óptico (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2021). También se hicieron mediciones del tamaño de 35 conidios utilizando el software ToupView 3.7 (TuopTek).

#### **2.4. Pruebas de confrontación directa**

Se inocularon bloques cuadrados de APD con micelio de 2IG2102 y de los fitopatógenos *Fusarium* sp. M5 (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2019) y *Fusarium graminearum* FG1 (donado por Mauricio Chávez Avilés, TecNM Ciudad Hidalgo) en extremos opuestos de una caja Petri con APD. Como testigos se usaron los hongos inoculados por separado. Las cajas se incubaron a 25°C durante 2 semanas para finalmente medir el crecimiento micelial de cada cepa de *Fusarium* en los testigos y junto con la cepa 2IG2102. Las mediciones se hicieron desde la parte inferior de las cajas Petri inoculadas. Se realizaron 5 experimentos independientes, cada uno con 3 repeticiones, y de cada experimento se calculó el porcentaje de inhibición (%) (Halifu *et al.*, 2020) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%I = ((\text{Crecimiento control} - \text{Crecimiento con 2IG2102}) / \text{Crecimiento control}) * 100\%$$

#### **2.5. Detección de tricodieno por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas**

Se colectó el perfil de compuestos volátiles en el espacio de cabeza existente entre dos placas sobrepuestas, una de ellas contenía el micelio de 2IG2102 con 7 días de cultivo en oscuridad a 25 °C. En el espacio de cabeza se introdujo una fibra de micro-extracción en fase sólida (SPME gray fiber, 50/30 µm, DVB/CAR/PDMS, SUPELCO) para inyectar y detectar los compuestos volátiles adsorbidos en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies GC7890A) acoplado a espectrometría de masas (Agilent Technologies MSD 5975 C). Las condiciones de corrida fueron: temperatura inicial de 60 °C por 1 min, con incrementos de 8°C/min hasta alcanzar 280 °C por 1 min, la temperatura del inyector fue de 230 °C. La columna empleada fue de Agilent Technologies HP-5MS (30m × 0.25 mm x 0.25 µm) (Mayo-Hernández, *et al.*, 2019). El tricodieno fue detectado al comparar su patrón de fragmentación con la base de datos NIST92.

#### **2.6. Pruebas de inhibición por un extracto de acetato de etilo**

La cepa 2IG2102 se incubó en dos cajas con APD durante 7 días a 25 °C en oscuridad. Posteriormente se recolectó el micelio y se incubó durante 24 h en agitación con 100 mL de acetato de etilo para extraer los tricotecenos de *Trichoderma* (Safwan *et al.*, 2022). Pasado este periodo, el acetato de etilo se recuperó, se llevó a sequedad para registrar el peso seco del extracto, después, el extracto seco se disolvió en Dimetil Sulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 50 mg/mL. Esta solución se utilizó para preparar cajas Petri con APD a concentraciones del extracto de 50 µg/mL y 100 µg/mL, que son rangos de concentraciones en las que son adicionados antibióticos en medios de cultivo. En estas cajas y cajas control de APD con DMSO se inoculó un bloque de APD con micelio previamente crecido en APD. Se incubaron durante 7 días a 25°C en oscuridad. Después de este periodo se midió el diámetro de crecimiento micelial. Se hicieron mediciones en 3 cajas con las 2 concentraciones del extracto y una caja control

con DMSO. Con las mediciones obtenidas se calculó el porcentaje de inhibición como se describe en el apartado 2.4. Este experimento se realizó 3 veces.

## 2.7. Identificación del gen *tri5* en 2IG2102

Se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos tri5F1 (5'-TTGAGCTCAACGACGTCCC-3') y tri5R1 (5'-GCCATCTCACGCTCGCATA-3') cuyo diseño se basó en secuencias del gen *tri5* del clado 6, es una secuencia parcial, pero amplifica 1146 pb de 1126 pb totales que tienen estos genes (Cardoza *et al.*, 2011). La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y una elongación adicional a 72 °C por 5 min. El producto se secuenció con el mismo método que los amplicones descritos anteriormente. La identidad de esta secuencia se confirmó en el Genbank con el algoritmo BLASTN y está disponible en GeneBank con el número de acceso OQ320398. Ésta, junto con otras secuencias de *tri5* de especies del clado 6 y *tri5* de especies de otros clados (Gutiérrez *et al.*, 2021) fueron alineadas para luego realizar una filogenia por máxima verosimilitud con el modelo de sustitución HKY85 y 100 réplicas.

## 2.8. Evaluación de la promoción de la germinación de semillas

El efecto en semillas de 2IG2102 se evaluó con un protocolo establecido para el género *Trichoderma* (Asaduzzaman *et al.*, 2010). Las semillas desinfectadas de jitomate saladette (*Solanum lycopersicum*) y pepino americano (*Cucumis sativus*) se resuspendieron por 2 min con una suspensión de conidios disueltos en APD al 2% a una concentración de  $1 \times 10^5$  conidios/mL. Posteriormente, 14 semillas inoculadas y testigo se secaron para colocarlas en cajas Petri con papel filtro estéril y humedecido en obscuridad a 25 °C. Se contó el número de semillas germinadas considerando la emergencia de la radícula y cotiledones a los 7 días en el caso de jitomate y a los 4 días en el caso de pepino y se determinó el porcentaje de germinación considerando el número de semillas germinadas entre el total. Las plántulas de ambas especies se pasaron a macetas con una mezcla de turba:vermiculita 1:1 durante 7 días con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 obscuridad y temperatura que oscilaba entre 24 °C y 26 °C, después de este tiempo se clasificaron las plántulas de jitomate de acuerdo al daño, es decir a los 14 días de inocular los conidios de 2IG2102. En el caso del pepino, las plántulas se recolectaron para medir peso seco como indicadores del desarrollo post-germinativo. Estos experimentos se realizaron 4 veces y se calculó el promedio de porcentaje de germinación con su desviación estándar con los datos de estas 4 repeticiones.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Identificación de 2IG2102

Los fragmentos filogenéticamente informativos *ITS*, *tef1* y *rpb2* de 2IG2102 se sometieron para hacer búsquedas en la base de datos de GeneBank. La Tabla 1 muestra el porcentaje de identidad más elevado para cada secuencia consultada. La región *ITS* indicó la especie *T. turrialbense*, para *tef1* fue *T. brevicompactum* y se obtuvo *T.*

*turrialbense* al utilizar *rpb2*. Ambas especies pertenecen al clado 6. Aunque la región *ITS* es por excelencia el código de barras genético de los hongos, para *Trichoderma* solo es un primer paso en la identificación de la especie (Cai & Druzhinina, 2021). Es posible asignar una especie cuando el porcentaje de identidad de *tef1* es superior al 97%, que en el caso de 2IG2102 resulta en *T. brevicompactum* con 99.23% (Tabla 1). La asignación de la especie utilizando *rpb2* requiere una identidad mayor al 99%, en el caso de 2IG2102 se obtuvo el valor más alto con la especie *T. turrialbense* con un 97.16% (Tabla 1), en este caso, el resultado no es definitivo y es necesario un análisis filogenético completo.

Con el propósito de obtener más información sobre la identidad de la cepa 2IG2102, se realizó un alineamiento de las regiones *ITS* de 2IG2102 y de regiones de cepas tipo del clado 6 y de *T. atroviride*. Una vez alineadas se realizó una matriz de distancias genéticas con el modelo Jukes-Cantor, estos valores se despliegan en la tabla 2.

Esta matriz de distancias indica que la región *ITS* ayuda a clasificar a el hongo dentro del clado 6, pero no permite discriminar entre *T. arundinaceum*, *T. brevicompactum* y *T. turrialbense*. Dado que el porcentaje de identidad de *tef1* es suficiente para clasificar a 2IG2102 como *T. brevicompactum*, solo quedó la realización de una filogenia de *rpb2* para confirmar especie. El producto de PCR de *rpb2* de 2IG2102 corresponde a un fragmento del primer exón que incluye la región filogenéticamente informativa recientemente definida (Cai & Druzhinina, 2021). Sin embargo, existe una alta heterogeneidad en las secuencias de *rpb2* del género *Trichoderma* disponibles en NCBI, esto debido a las combinaciones de oligonucleótidos empleadas para amplificar. Por lo tanto, para la filogenia por máxima verosimilitud se partió de un alineamiento sólo de la región informativa de *rpb2* de 2IG2102 y de secuencias selectas. En esta filogenia se observa que 2IG2102 se agrupa con cepas de *T. brevicompactum* con un valor de soporte de 97% indica que 2IG2102 se agrupa con cepas de *T. brevicompactum* (Fig. 1).

En conjunto, estos resultados permiten clasificar a 2IG2102 como *T. brevicompactum*. Macroscópicamente, el micelio de 2IG2102 es blanco y tras la producción de conidios adquiere una coloración verde o verde olivo en un patrón de anillo a medida que pasa el tiempo. Estos conidios se agregaron formando pústulas. Todas estas características son propias del clado 6 (Degenkolb *et al.*, 2008). Al teñir el micelio con lactofenol-azul de algodón se observaron las características comunes de los conidióforos de *Trichoderma*, con una fiálide en forma de botella que forman grupos de 2 a 5 y conidios subglobosos con una sutil protuberancia (Fig. 1S, material suplementario), cada una longitud promedio de  $3.01 \pm 0.18 \mu\text{m}$ , un ancho promedio de  $2.66 \pm 0.15 \mu\text{m}$ , y una relación longitud/ancho de  $1.12 \pm 0.05 \mu\text{m}$ . Estas medidas se comparten con especies del clado 6 aunque se ajustan a lo reportado para la especie *Trichoderma brevicompactum* (Kraus *et al.*, 2004).

**Tabla 1.** Identidad de las secuencias de la región *ITS* y fragmentos de los genes *tef1* y *rpb2* de 2IG2102.

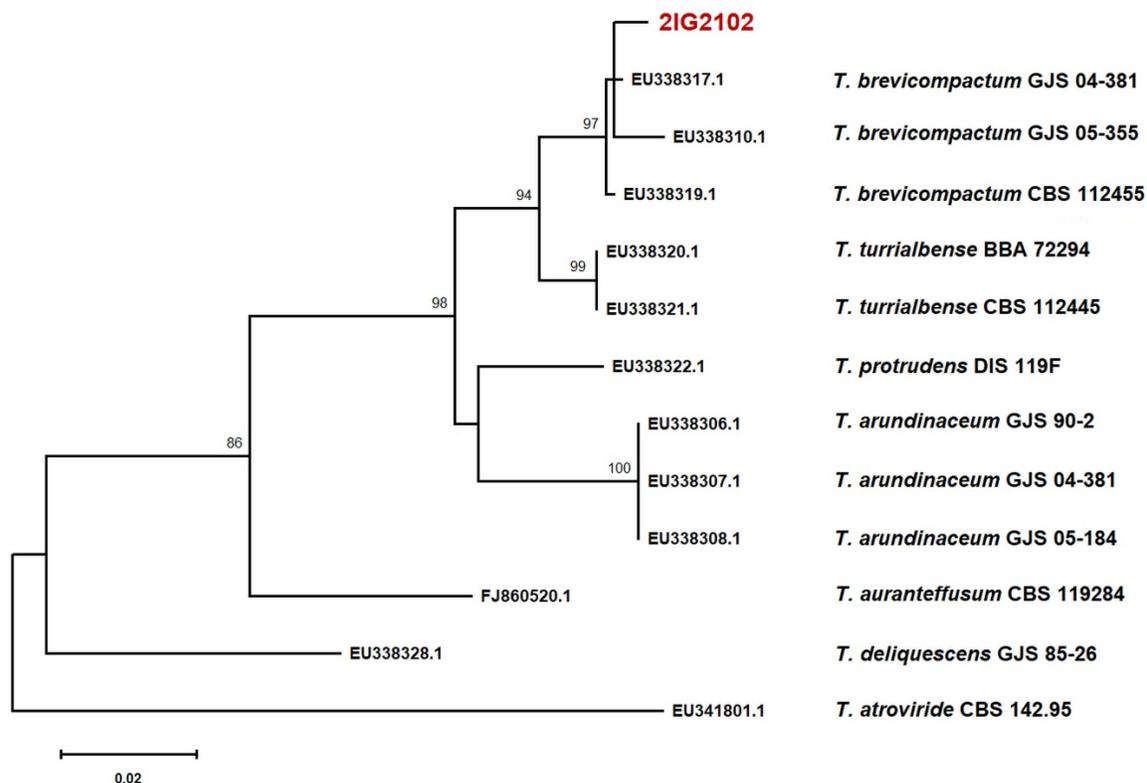
**Table 1.** Identity of the sequences of *ITS* region, *tef1* and *rpb2* gene fragments of 2IG2102

Secuencia	Especie	Acceso	Cobertura	Identidad
<i>ITS</i>	<i>T. turrialbense</i> CBS112445	NR_138448.1	100%	99.45%
<i>tef1</i>	<i>T. brevicompactum</i> T81	CIB EU280057.1	89%	99.23%
<i>rpb2</i>	<i>T. turrialbense</i> 112445	CBS OK813908.1	100%	97.16%

**Tabla 2.** Matriz de distancias de las regiones *ITS* de 2IG2102 y especies de *Trichoderma* del clado 6. Se presenta nombre de la especie y la cepa.

**Table 2.** Distance matrix of *ITS* regions from 2IG2102 and *Trichoderma* species from clade 6. Name of species and strain are presented.

	1	2	3	4	5	6
1 21G2021						
2 <i>T. brevicompactum</i> T-43	0.00571					
3 <i>T. arundinaceum</i> CBS 112446	0.00571	0.00000				
4 <i>T. turrialbense</i> CBS 112445	0.00571	0.00000	0.00000			
5 <i>T. rodmanii</i> BPI GJS 91-88	0.01345	0.00765	0.00765	0.00765		
6 <i>T. atroviride</i> CBS 142.95	0.07475	0.06822	0.06822	0.06822	0.06822	

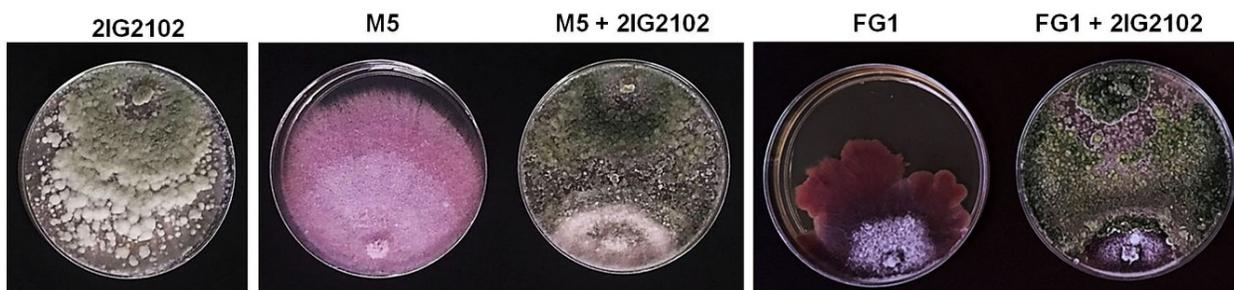


**Fig. 1.** Filogenia de *rpb2* por máxima verosimilitud. A la izquierda de cada cepa se muestra el acceso en NCBI. 2IG2102 se agrupa con secuencias de *T. brevicompactum*. Los valores *Bootstrap* mayores a 80 se muestran sobre las ramas.

**Fig. 1.** Maximum likelihood phylogeny of *rpb2*. Access ID is shown at the left of each strain. 2IG2102 is clustered with sequences from *T. brevicompactum*. Bootstrap values above 80 are shown on the branches.

### 3.2. *Tb* 2IG2102 reprime el crecimiento micelial de M5

En virtud que el micoparasitismo es una de las características más notables del género *Trichoderma*, se realizaron ensayos de confrontación directa con los fitopatógenos M5 y FG1 y se calculó el porcentaje de inhibición que fue de  $75.64 \pm 6.24\%$  para M5 y  $53.76 \pm 8.19\%$  para FG1. En la Fig. 2 se muestran placas Petri representativas de estos experimentos. Estos resultados evidencian que 2IG2102 puede reprimir el crecimiento de los hongos probados por contacto directo.



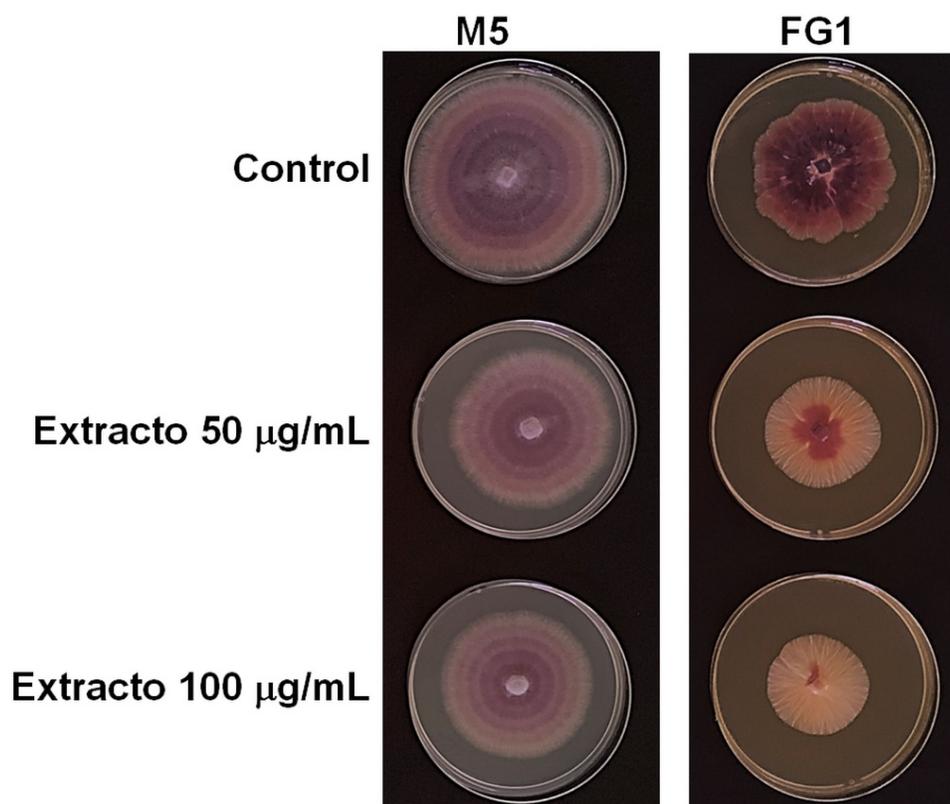
**Fig. 2.** Pruebas de confrontación. A la izquierda 2IG2102, en el panel central M5 y M5 combinado con 2IG2102 y en el panel de la derecha FG1 y FG1 combinado con 2IG2102.

**Fig. 2.** Confrontation tests. 2IG2102 at the left side, M5 and M5 combined with 2IG2102 in the central panel and FG1 and FG1 combined with 2IG2102 in the right panel.

### 3.3. Moléculas solubles en acetato de etilo son parte del mecanismo antagónico de 2IG2102

La producción de tricotecenos es característica para especies del clado 6 (Degenkolb *et al.*, 2008). No obstante que el acetato de etilo puede solubilizar distintas moléculas liposolubles, este solvente se utiliza para la extracción de tricotecenos (Nielsen *et al.*, 2005). Así que se realizó una extracción con acetato de etilo a partir de micelio de la cepa 2IG2102 y se probó como inhibidor del crecimiento micelial de M5 y FG1 al adicionarse en placas de APD a concentraciones de 50  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Se observó que hubo una inhibición en crecimiento micelial de M5 y de FG1 en las dos concentraciones de extracto evaluadas (Figura 3). Bajo condiciones es notable que FG1 pierde la pigmentación por efecto del extracto de 2IG2102. A concentraciones mayores del extracto no se observó incremento en la inhibición del crecimiento micelial (datos no mostrados).

En la tabla 3 se concentran los resultados de porcentaje de inhibición los experimentos con el extracto junto con su desviación estándar. El análisis de comparación de los promedios de porcentajes de inhibición reveló que para los 2 hongos fitopatógenos la inhibición del crecimiento micelial a 100  $\mu\text{g/mL}$  es mayor que a 50  $\mu\text{g/mL}$ .



**Fig. 3.** Fotografías representativas de la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos M5 y FG1 por 2 concentraciones de un extracto de acetato de etilo de 2IG2102.

**Fig. 3.** Representative photographs of the growth inhibition of the phytopathogens M5 and FG1 by 2 concentrations of an ethyl acetate extract from 2IG2102.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición de M5 y FG1 por confrontación con 2IG2102 y por inoculación de 2 concentraciones del extracto de acetato de etilo.

**Table 3.** Percentage of inhibition of M5 and FG by confrontation against 2IG2102 and by inoculation of 2 concentrations of the ethyl acetate extract.

	M5		FG1	
Concentración del extracto	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
% Inhibición	17.79 ± 1.67	24.08 ± 0.15 <sup>a</sup>	21.21 ± 4.84	34.07 ± 2.13 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Diferencia estadísticamente significativa respecto a la concentración de 50 µg/mL (prueba t de Student,  $p < 0.05$ ).

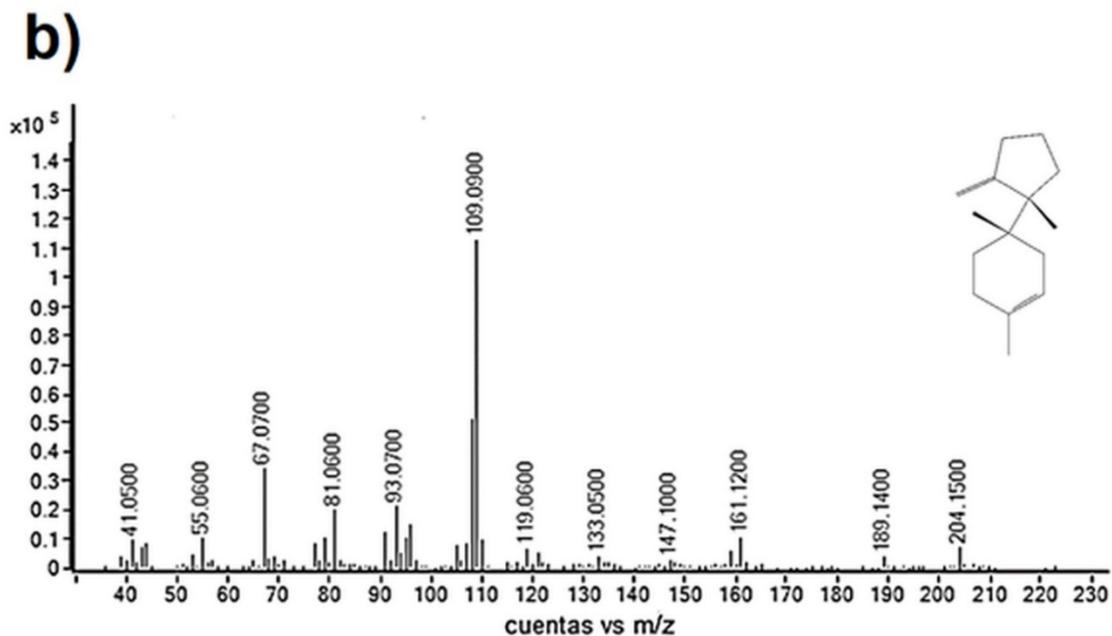
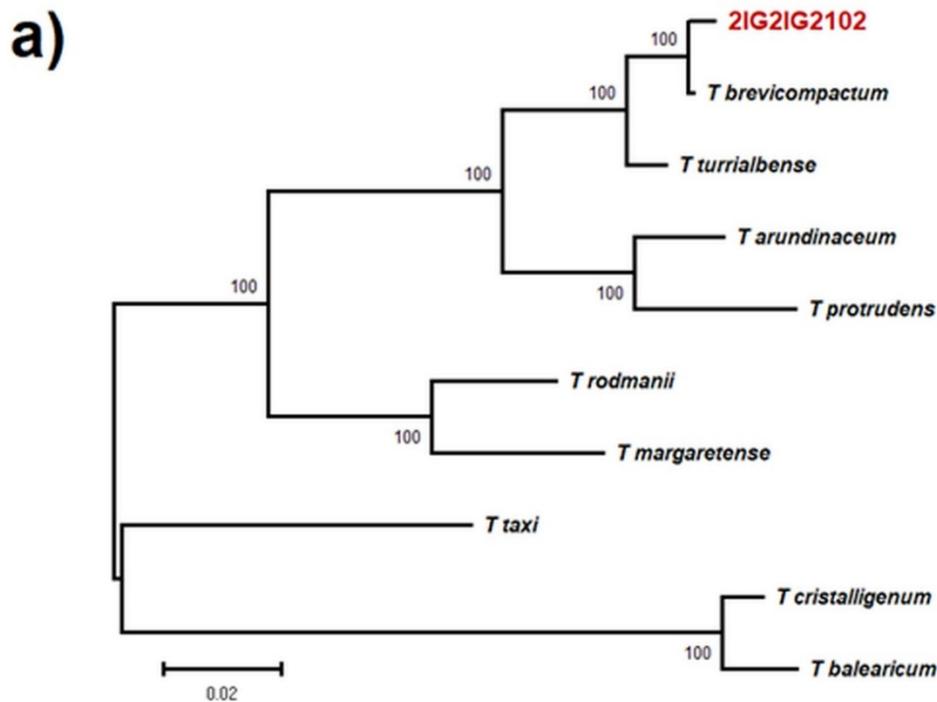
### 3.4. Identificación del gen *tri5* de 2IG2102 y su producto en 2IG2102

La reacción que compromete el flujo metabólico para la biosíntesis de tricotecenos es la ciclización del farnesil difosfato para producir tricodieno, reacción catalizada por la terpeno sintasa TRI5 (Kimura *et al.*, 2007). La detección de este gen (*tri5*) es un primer indicativo de que la biosíntesis de tricotecenos está genéticamente determinada, ya que el tricodieno es precursor exclusivo de tricotecenos. Esta secuencia de 2IG2102 mostró 99.84% de identidad con la secuencia *tri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 y 97.91% con la secuencia *tri5* de *T. turrialbense* CBS 112445. Para tener una idea más completa de la secuencia *tri5* de 2IG2102 en el contexto de las especies del clado 6 y de otros clados, se realizó una filogenia por máxima verosimilitud, la cual evidenció que las secuencias del clado 6 se agrupan entre sí, quedando fuera las secuencias de otras especies (Fig. 4a). La secuencia de 2IG2102 forma un subclado con la secuencia *tri5* de *T. brevicompactum*, que es con la que presenta mayor identidad. El tricodieno es volátil, por lo que puede recolectarse del espacio libre de una placa Petri donde crece el hongo (Taylor *et al.*, 2022). Bajo este principio, se obtuvieron los volátiles presentes en el espacio entre 2 cajas sobrepuestas donde crecía 2IG2102. Dichos volátiles fueron separados por cromatografía de gases, y la posterior fragmentación de uno de los picos mostró por espectrometría de masas, el patrón esperado de tricodieno (Jelén *et al.*, 1995), con un ion molecular de relación m/z de 204.15 (Fig. 4b).

### 3.5. *Tb* 2IG2102 altera la germinación y el desarrollo post-germinativo de 2 especies vegetales

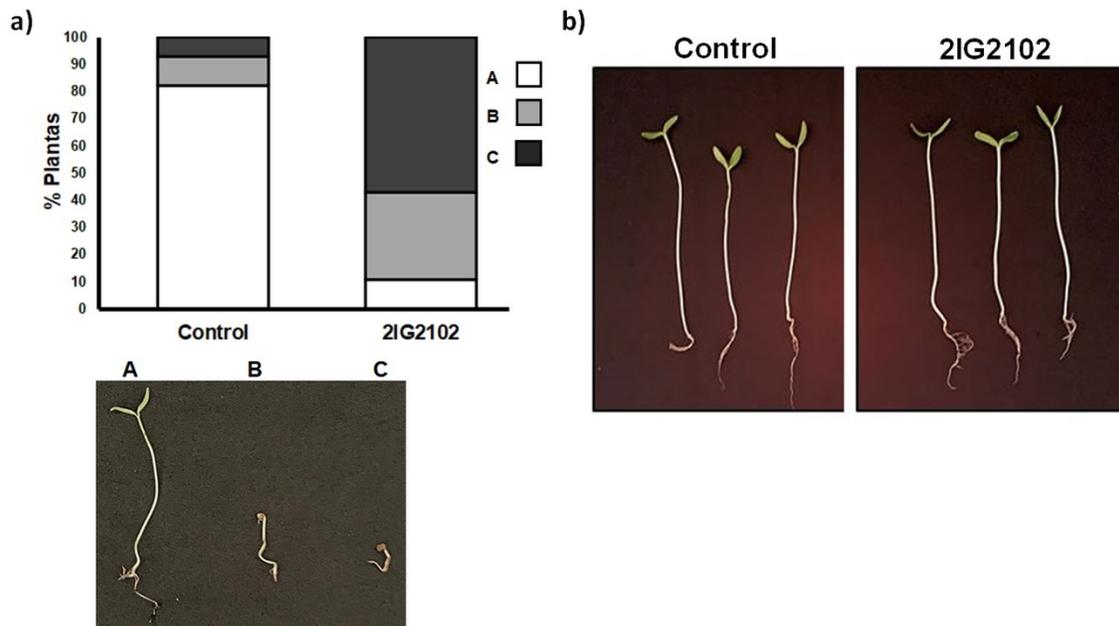
Como residente del suelo, *Trichoderma* puede causar diferentes efectos en plantas, por ejemplo, acelerar la germinación de semillas (Asaduzzaman *et al.*, 2010). Al mezclar semillas de jitomate con conidios de 2IG2102 se observó que este tratamiento incrementa el porcentaje de germinación respecto al testigo, siendo  $67.85 \pm 9.0\%$  y  $55.35 \pm 6.83\%$ , respectivamente. En el caso de pepino, el porcentaje de germinación fue de  $69.64 \pm 10.71\%$  para el testigo y  $80.35 \pm 6.83\%$  para el tratamiento con conidios. De acuerdo con la prueba t de Student, la diferencia en los porcentajes de germinación del control respecto al tratamiento con conidios es estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

Al darle seguimiento al desarrollo de las plántulas de jitomate se observó que el crecimiento se atrofiaba en las plantas inoculadas (Fig. 5a). Se establecieron 3 categorías de severidad para mostrar este efecto post-germinativo, siendo A la ausencia de daño, B plántulas sin cotiledones abiertos e hipocótilo sin elongar, y categoría C arresto del crecimiento y necrosis (Fig. 5a). A los 14 días, más de la mitad de las plantas se clasificó en la categoría C (Fig. 5a). No hubo un efecto visual de daño post-germinativo en pepino (Fig. 5b). Se capturaron los valores de peso seco de las plantas de pepino siendo  $22.18 \pm 4.95$  mg para el control sin tratamiento y  $20.60 \pm 4.26$  mg para el tratamiento con conidios de 2IG2102. Estos resultados no son estadísticamente significativos, pero muestran que no hay un efecto perjudicial por inoculación de la cepa 2IG2102.



**Fig. 4.** a) Filogenia por máxima verosimilitud del gen *tri5* en la cepa 2IG2102. Los valores *Bootstrap* se muestran sobre las ramas. b) Espectro de masas del tricodieno obtenido de compuestos volátiles de la cepa 2IG2102.

**Fig. 4.** a) Maximum likelihood phylogenetic of the *tri5* gene of 2IG2102. Bootstrap values are shown above the branch. b) Mass spectrum of trichodiene obtained from the volatiles compounds of the 2IG2102 strain.



**Fig. 5.** Efecto de inoculación de conidios de 2IG2102 en desarrollo post-germinativo. a) Comparación del control y tratamiento exhiben que conidios de 2IG2102 inducen daño en plántulas de jitomate. La fotografía de abajo muestra las 3 categorías A, B y C establecidas para reflejar este efecto. b) Plántulas representativas de pepino del control y tratamiento no muestran un efecto perjudicial por inoculación de conidios de 2IG2102.

**Fig. 5.** Effect of 2IG2102 conidia inoculation in the post-germination development. a) Comparison between control and treatment exhibits 2IG2101 conidia inoculation induced damage in tomato seedlings. The photograph below shows the 3 set categories A, B and C used to reflect this effect. b) Representative cucumber seedlings from control and treatment did not show any detrimental effect by inoculation of 2IG2102 conidia.

#### 4. DISCUSIÓN

Existe una constante presión de selección en los hongos fitopatógenos para superar los mecanismos de resistencia de la planta y el efecto de fungicidas. Los agentes de control biológico reprimen el crecimiento de hongos fitopatógenos a través de diferentes mecanismos, ya sea al competir por nutrientes, por lisis de la pared celular, producción de metabolitos tóxicos y por inducción de respuestas defensivas en la planta (Pandit *et al.*, 2022). Por tanto, un hongo fitopatógeno no puede revertir con facilidad los efectos multifacéticos de un agente de control. *Trichoderma* es un género comúnmente usado en control biológico, siendo las especies *T. harzianum* y *T. viride* las más comunes en

formulaciones comerciales (Dutta *et al.*, 2022), estas especies pertenecen al clado 1 y 5, respectivamente (Cai & Druzhinina, 2021). Las especies del clado 6 han sido poco exploradas como agentes biocontroladores, ya sea porque no son efectivas, porque son perjudiciales para la planta (e incluso para mamíferos, el humano incluido) o por su baja abundancia en el suelo. El análisis morfológico de los conidios y conidióforos de las especies del clado 6 no permite distinguir con claridad a las especies *T. arundinaceum*, *T. brevicompactum* y *T. turrialbense*, para las otras especies de este clado es posible distinguirlas microscópicamente, además de que tienen fase sexual de reproducción (Degenkolb *et al.*, 2008). Esta cercanía en las 3 especies mencionadas se refleja también en la identidad de las secuencias *ITS* y en los valores de sus distancias genéticas que no permite distinguirlas entre sí (Tablas 1 y 2). La identificación directa de especies de *Trichoderma* se logran cuando los fragmentos de los genes *tef1* y *rpb2* tienen porcentajes de identidad del 97% y 99% respecto a secuencias de cepas tipo (Cai & Druzhinina, 2021). Con base en este criterio, *tef1* define a 2IG2102 como *T. brevicompactum*, pero para *rpb2* fue necesaria una filogenia que agrupa establemente a 2IG2102 y cepas de *T. brevicompactum* en un subclado, pero cercana a secuencias de otras especies del clado 6 a excepción de *T. atroviride* que es del clado 5 (Fig. 1). La especie *T. brevicompactum* ha sido reportada en suelos donde desarrollan plantas de cacao en Tabasco, no es una especie abundante en este agroecosistema y solo se tiene el registro del *ITS* y microscopía óptica para su identificación (Torres De la Cruz *et al.*, 2015). A pesar de que la región *ITS* es el código de barras genético por excelencia de los hongos, no es suficiente para clasificar a nivel especie a aislados de *Trichoderma*, pero en el presente reporte demostramos que la región *ITS* permite clasificar aislados dentro del clado 6. Al igual que el reporte de *T. brevicompactum* en suelos asociados plantas de cacao, la cepa 2IG2102 también proviene de suelo, y en este hábitat, debe de competir con otros hongos por nutrientes y espacio para propagarse, así como utilizar a otros hongos como fuente de carbono y nitrógeno cuando no hay disponibilidad de nutrientes. Al ser la cepa 2IG2102 del género *Trichoderma*, es factible que tenga capacidad micoparasítica, la cual está genéticamente determinada desde el ancestro común del género, y gracias a este atributo se pueden generar formulaciones de control biológico basados en diversas especies (Kubicek *et al.*, 2019). La capacidad antagónica de la cepa 2IG2102 se confirmó por ensayos de confrontación en donde se demostró que su presencia reduce considerablemente el crecimiento micelial de 2 hongos fitopatógenos del género *Fusarium* (Fig. 2). El enrollamiento de hifas de *Trichoderma* alrededor del hongo presa y la producción de enzimas que lisan la pared celular son mecanismos evolutivamente conservados que ejerce *Trichoderma* durante el contacto con otro hongo y que podrían llevarse a cabo por 2IG2102 bajo las condiciones probadas (Mukhopadhyay *et al.*, 2020).

Metabolitos secundarios tóxicos de diferente origen biosintético también son característicos de *Trichoderma*, y favorecen el antagonismo hacia otros hongos y otros organismos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016); además, al secretarse, pueden ejercer acción sobre otros seres vivos sin necesidad de contacto físico o quedar presentes en el hábitat cuando *Trichoderma* pierde viabilidad o esporula. Los tricotecenos son toxinas que producen algunos géneros de ascomicetos como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* y *Trichothecium* (Proctor *et al.*, 2018). Cada especie fúngica produce tricotecenos específicos. En el caso de *Trichoderma*, los tricotecenos trichodermina y harzianum A son característicos de las especies de clado 6, aunque hay

especies de otros clados que también los producen (Gutiérrez *et al.*, 2021). El extracto de micelio de 2IG2102 inhibió el crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. M5 y *Fusarium graminearum* FG1 (Fig. 3). Al usar acetato de etilo para la extracción se asume que está enriquecido con tricotecenos (Safwan *et al.*, 2022), aunque con este método se recuperan otros terpenos que pudieran o no interferir con el crecimiento micelial, incluido el ergosterol, que es abundante por ser el esteroide constituyente de la membrana de los hongos. Los hongos *Fusarium* M5 y FG1 pertenecen a los complejos de especies *oxysporum* y *sambucinum* respectivamente (Aoki *et al.*, 2014). Las especies del complejo *sambucinum* son productoras de tricotecenos necesarios para su virulencia, pero también tienen mecanismos para su detoxificación (Laraba *et al.*, 2021). Un análisis detallado de este extracto es necesario para identificar los compuestos causantes de esta inhibición y resolver si un hongo productor de tricotecenos como FG1 es sensible a estos compuestos producidos por otro hongo. En este trabajo se considera que la posible acumulación de tricotecenos en 2IG2102 es basal, ya que no hubo ningún tratamiento o estrés suministrado que pudiera incrementar el flujo metabólico hacia la producción de estos compuestos, lo cual es necesario ya que el FPP se utiliza constitutivamente para la producción del ergosterol constituyente de la membrana plasmática, y es a partir de la ciclización del FPP se produce el tricodieno (Proctor *et al.*, 2018). El tricodieno es el precursor de todos los tricotecenos y no hay otra familia de compuestos que se deriven a partir de él. Esta reacción es catalizada por la terpeno sintasa TRI5, codificada por el gen *tri5* (Proctor *et al.*, 2018). El tricodieno será sustrato de otras enzimas propias de cada hongo, que resultará en diferentes estructuras. Hasta la fecha se tiene registro de más de 200 diferentes tricotecenos, lo que ilustra el variado repertorio de enzimas biosintéticas de estas toxinas en hongos (Proctor *et al.*, 2020). El gen *tri5* está conservado en las especies del clado 6 a excepción de *T. aurantefussum* que no produce tricotecenos; aunque también se encuentra en especies como *T. taxi*, que pertenece al clado 5 (Gutiérrez *et al.*, 2021). Dado el papel crucial de TRI5 en la biosíntesis de tricotecenos, se realizó la amplificación y secuenciación del gen *tri5* de 2IG2102 para dilucidar una posible y genéticamente determinada producción de tricotecenos en 2IG2102. Su análisis sugiere la posibilidad de producir tricotecenos (Fig. 4a). La secuencia de *T. brevicompactum* es la más cercana a 2IG2102, y no obstante que *tri5* no es un marcador filogenético, todas las secuencias provenientes de especies del clado 6 forman un solo grupo, mientras que divergen las secuencias de *T. taxi*, *T. cristalligium* y *T. balearicum* que pertenecen a otros clados. La secuencia obtenida codifica para un polipéptido funcional (datos no mostrados). Para confirmar este hallazgo, se realizó la captura de volátiles producidos por el micelio de 2IG2102. Los volátiles recolectados se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y se pudo detectar el tricodieno (Fig. 4b). Estos resultados sugieren que *tri5* es funcional en 2IG2102 y contribuye a una producción basal de tricodieno en APD. Quedan por definir los tricotecenos generados a partir de este tricodieno, los cuales pudieran contribuir a la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos en confrontaciones directas (Fig. 2) y en ensayos con el extracto de acetato de etilo (Fig. 3).

Existen especies de *Trichoderma* que han evolucionado para interactuar con plantas y promover su crecimiento (Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). El efecto benéfico se evidencia desde etapas iniciales del desarrollo vegetal, por ejemplo, en la germinación de semillas (Asaduzzaman *et al.*, 2010). Fue posible detectar la promoción de la germinación en dos

especies vegetales de diferentes familias por tratamiento con conidios de 2IG2102 adheridos a las semillas. Este efecto puede atribuirse a la producción de enzimas líticas por parte de 2IG2102 que faciliten el rompimiento de la testa o a la producción de ácido cítrico que acelera la germinación en jitomate (Al-Askar *et al.*, 2021). Estos ensayos fueron en obscuridad, sin embargo, después de transferir las plántulas a fotoperiodo, se observó un evidente arresto del desarrollo post-germinativo de jitomate en diversos niveles de severidad hasta llegar a necrosis (Fig 5a), pero en pepino, aunque no hubo un daño visiblemente detectable, tampoco hubo un efecto significativo en promoción de crecimiento. Hay casos en los que *Trichoderma* causa infecciones oportunistas en humanos (Ram *et al.*, 2018) o tienen actividad nematocida dada la producción de metabolitos secundarios (Fan *et al.*, 2020). Es posible que haya plantas afectadas por especies de *Trichoderma* productoras de tricotecenos, ya que estos metabolitos inhiben la actividad de peptidil transferasa, que está conservada en todos los dominios de la vida (Wang *et al.*, 2021). Los tricotecenos también inhiben la actividad de peptidil transferasa mitocondrial, lo cual conlleva a estrés oxidativo que afecta la viabilidad celular en levaduras (Bin-Umer *et al.*, 2014). Por tanto, la exposición constante de jitomate a tricotecenos producidos por 2IG2102 provocaría decremento en la síntesis de proteínas en citoplasma y mitocondria y con ello muerte celular. La alteración de la función mitocondrial por tricotodermina se ha reportado en células humanas, incluso se reportó que también disminuye la actividad de histona desacetilasa (Chen *et al.*, 2022). Queda por definir si esta función dual de tricotecenos se presenta en plantas. Dada la conservación del sitio de peptidil transferasa, es plausible que los tricotecenos también inhiban la traducción en plástidos y con ellos potenciar su efecto. Existen ARN mensajeros como *rbcL* y *psbA* que son traducidos en plástidos, y que son esenciales para el desarrollo vegetal. La luz activa la traducción de estos mensajeros (Zoschke & Bock, 2018), por lo tanto, su traducción puede inhibirse por tricotecenos. En nuestras condiciones, la transferencia de plántulas a fotoperiodo puede inducir traducción de dichos mensajeros, pero el efecto inhibitorio por la presencia de 2IG2102 y presuntos tricotecenos disminuye la fotosíntesis y fijación de CO<sub>2</sub>, lo que causa pérdida de la viabilidad de los tejidos vegetales.

Harzianum A y su isómero harzianum B son tricotecenos encontrados en una cepa de *T. brevicompactum* que reducen el crecimiento en *Brassica napa* y que fueron tóxicos en especies de monocotiledóneas (Yin *et al.*, 2020). Esto apoya un posible vínculo entre la muerte de plántulas de jitomate por inoculación de 2IG2102. El volátil tricodieno por sí mismo induce la expresión de genes de respuesta a ácido salicílico en jitomate (Malmierca *et al.*, 2015). Diversas mutantes de *Arabidopsis* con altos niveles de ácido salicílico muestran muerte celular espontánea (Radojčić *et al.*, 2018). Por lo tanto, una frecuente exposición a tricodieno y tricotecenos puede contribuir al efecto tóxico de la inoculación de 2IG2102 en jitomate. A pesar de que 2IG2102 no tuvo un efecto significativo en el crecimiento post-germinativo de plántulas de pepino, no hubo un efecto tóxico como en el jitomate (Fig. 5c). Quedará por definir los mecanismos de detoxificación o tolerancia de pepino, que podrían ser por transportadores que remueven las toxinas o por modificaciones químicas que los inactivan. Siendo el pepino un histórico modelo vegetal para el estudio de la interacción planta-*Trichoderma* en donde se ha demostrado su crecimiento asociado a la planta y su capacidad de inducción de respuestas defensivas (Yedidia *et al.*, 1999), a futuro se podrán plantear nuevos experimentos para

verificar posible crecimiento endófito de 2IG2102 y las respuestas que en la planta se ejecutan por la presencia de 2IG2102. También hay que considerar que el acetato de etilo pudiera extraer otros sesquiterpenos y peptaiboles, estos últimos son péptidos no ribosomales, algunos de ellos tienen actividad antimicrobiana (Castro *et al.*, 2023) y también pudiera contribuir en la inhibición.

Si bien, el género *Trichoderma* tiene especies productoras de auxinas o giberelinas como *T.harzianum*, *T. atroviride* y *T. virens* (Nieto-Jacobo *et al.*, 2017; Illescas *et al.*, 2021) éstas especies pertenecen a los clados 1 y 5, y no hay evidencias que *T.brevicomcompactum* o alguna otra especie del clado 6 sea productora de fitohormonas. Futuras investigaciones encaminadas a determinar fitohormonas en especies del clado 6 son necesarias para completar la caracterización de su efecto en plantas. Para efectos de la promoción de crecimiento de pepino, es probable que la sola inoculación de 2IG2102 no sea suficiente. Consorcios de *Trichoderma* tienen un acentuado efecto promotor de la germinación y crecimiento comparado con el efecto de una sola cepa (Hao *et al.*, 2022). La ausencia de daño por 2IG2102 en pepino sugiere que existen especies vegetales en donde esta cepa podría implementarse como un componente de formulaciones control biológico basadas en consorcios de este género o como alternativa para obtener nuevos herbicidas y fungicidas.

Aunque se tenía registro de *T. brevicomcompactum* aislado en suelo mexicano (Torres De la Cruz *et al.*, 2015), en el presente reporte se mostró la clasificación de una nueva cepa de esta especie con base en los 3 marcadores filogenéticos recomendados para el género y complementado por microscopía óptica. Al caracterizar a 2IG2102 se mostró antagonismo hacia 2 fitopatógenos del género *Fusarium* de importancia agrícola. El efecto inhibitorio de un extracto de acetato de etilo, la identificación del gen *tri5* y del tricodieno evidencia que esta cepa pudiera producir tricotecenos como parte de su mecanismo antagónico contra hongos y posiblemente explican en efecto tóxico en plántulas de jitomate y abren la posibilidad de usar esta cepa para control de hongos y malezas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue apoyada por la UMAR (Proyecto 2IG2101). LDMB agradece el apoyo del programa Investigadoras e Investigadores por México (Cátedras CONACYT), proyecto 538. JHVS es apoyado por el programa Investigadoras e Investigadores por México (Cátedras CONACYT), proyecto 1333.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

- Allende-Molar R., Baez-Parra K.M., Salazar-Villa E. Rojo-Báez I. 2022. Biodiversity of *Trichoderma* spp in Mexico and its potential use in agriculture. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 25(3): 088. <https://doi.org/10.56369/tsaes.4297> .
- Al-Askar A.A., Saber W.I., Ghoneem K.M., Hafez E.E. & Ibrahim A.A. 2021. Crude citric acid of *Trichoderma asperellum*: tomato growth promotor and suppressor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plants. 10(2): 222. <https://doi.org/10.3390/plants10020222>.
- Aoki T., O'Donnell K. & Geiser D.M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. Journal of General Plant Pathology. 80(3): 189-201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>.
- Asaduzzaman M., Alam M.J. & Islam M.M. 2010. Effect of *Trichoderma* on seed germination and seedling parameters of chili. Journal of Science Foundation. 8(1-2): 141-150. <https://doi.org/10.3329/jsf.v8i1-2.14637>.
- Bin-Umer M.A., McLaughlin J.E., Butterly M.S., McCormick S. & Tumer, N.E. 2014. Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 111(32): 11798-11803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403145111>.
- Cai F. & Druzhinina I.S. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal Diversity. 107(1): 1-69. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>.
- Cardoza R.E., Malmierca M.G., Hermosa M.R., Alexander N.J., McCormick S.P., Proctor R.H., Tijerino A.M., Rumbero A., Monte E. & Gutiérrez S. 2011. Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthesis genes in filamentous fungi of the genus *Trichoderma*. Applied and Environmental Microbiology. 77(14): 4867-4877. <https://doi.org/10.1128/AEM.00595-11>.
- Castro G. S., Sousa T. F., da Silva, G. F., Pedroso R. C., Menezes K. S., Soares M. A., Dias G.M, Santos A.O., Yamagishi M.E.B., Faría J.V., Januário A.H. & Koolen H. H. 2023. Characterization of Peptaibols Produced by a Marine Strain of the Fungus *Trichoderma endophyticum* via Mass Spectrometry, Genome Mining and Phylogeny-Based Prediction. Metabolites. 13(2): 221. <https://doi.org/10.3390/metabo13020221>.
- Chen H. L., Lo Y. H., Lin C. L., Lee T. H., Leung W., Wang S. W., Lin I.P., Lin M.Y. & Lee C. H. (2022). Trichodermin inhibits the growth of oral cancer through apoptosis-induced mitochondrial dysfunction and HDAC-2-mediated signaling. Biomedicine & Pharmacotherapy. 153: 113351. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113351>.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Del-Val E.K. & Larsen J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere:

interactions with plants. FEMS Microbiology Ecology. 92(4): fiw036. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>.

Degenkolb T., Dieckmann R., Nielsen K.F., Gräfenhan T., Theis C., Zafari D., Chaverri P., Ismaiel A., Brückner H., Von Döhren H. & Thrane U. 2008. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. Mycological Progress. 7(3): 177-219. <https://doi.org/10.1007/s11557-008-0563-3>.

Dutta P., Deb L. & Pandey A.K. 2022. *Trichoderma*-from lab bench to field application: Looking back over 50 years. Frontiers in Agronomy. 4: 932838. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.932839>.

Fan H., Yao M., Wang H., Zhao D., Zhu X., Wang Y., Liu X., Duan Y. & Chen L. 2020. Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Snef1910 for the biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. BMC Microbiology. 20: 299. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01984-4>.

Garreau de Loubresse N., Prokhorova I., Holtkamp W., Rodnina M.V., Yusupova G. & Yusupov M. 2014. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. Nature. 513(7519): 517-522. <https://doi.org/10.1038/nature13737>.

Gutiérrez S., McCormick S.P., Cardoza R.E., Kim H.S., Yugueros L.L., Vaughan M.M., Carro-Huerga G., Busman M., Saenz de Miera L.E., Jaklitsch W.M. & Zhuang W.Y. 2021. Distribution, function, and evolution of a gene essential for trichothecene toxin biosynthesis in *Trichoderma*. Frontiers in Microbiology. 12: 3638. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.791641>.

Halifu S., Deng X., Song X., Song R. & Liang X. 2020. Inhibitory mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. Plants, 9(7): 912. <https://doi.org/10.3390/plants9070912>.

Hao D., Lang B., Wang Y., Wang X., Liu T. & Chen J. 2022. Designing synthetic consortia of *Trichoderma* strains that improve antagonistic activities against pathogens and cucumber seedling growth. Microbial Cell Factories. 21(1): 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01959-2>.

Huang X.G., Li M.Y., Yan X.N., Yang J.S., Rao M.C. & Yuan X.F. 2021. The potential of *Trichoderma brevicompactum* for controlling root rot on *Atractylodes macrocephala*. Canadian Journal of Plant Pathology. 43(6): 794-802. <https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1933602>.

Illescas M., Pedrero-Méndez A., Pitorini-Bovolini, M., Hermosa, R. & Monte E. 2021. Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. Pathogens. 10(8): 991. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080991>.

- Jelén H.H., Mirocha C.J., Wasowicz E. & Kamiński E. 1995. Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(11): 3815-3820. <https://doi.org/10.1128/aem.61.11.3815-3820.1995>.
- Kimura M., Tokai T., Takahashi-Ando N., Ohsato S. & Fujimura M. 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71(9): 2105-2123. <https://doi.org/10.1271/bbb.70183>.
- Kraus G.F., Druzhinina I., Gams W., Bissett J., Zafari D., Szakacs G., Koptchinski A., Prillinger H., Zare R. & Kubicek C.P. 2004. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia*. 96(5): 1059-1073. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832905>.
- Kubicek C.P., Steindorff A.S., Chenthamara K., Manganiello G., Henrissat B., Zhang J., Cai F., Kopchinskiy A.G., Kubicek E.M., Kuo A. & Baroncelli R. 2019. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC genomics*. 20(1): 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>.
- Kumar S., Stecher G., Li, M., Knyaz C. & Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6): 547. <https://doi.org/10.1093/molbev%2Fmsy096>.
- Laraba I., McCormick S.P., Vaughan M.M., Geiser D.M. & O'Donnell K. 2021. Phylogenetic diversity, trichothecene potential, and pathogenicity within *Fusarium sambucinum* species complex. *PLoS One*. 16(1): e0245037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245037>.
- Maldonado-Bonilla L.D., Calderón-Oropeza M.A., Villarruel-Ordaz J.L. & Sánchez-Espinosa A.C. 2019. Identification of novel potential causal agents of *Fusarium* wilt of *Musa* sp. AAB in southern Mexico. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 10(4): e479. [https://doi: 10.24105/2157-7471.10.479](https://doi:10.24105/2157-7471.10.479).
- Malmierca M.G., McCormick S.P., Cardoza R.E., Alexander N.J., Monte E. & Gutiérrez S. 2015. Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. *Environmental Microbiology*. 17(8): 2628-2646. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12506>.
- Matheny P.B. 2005. Improving phylogenetic inference of mushrooms with *RPB1* and *RPB2* nucleotide sequences (*Inocybe*; Agaricales). *Molecular phylogenetics and evolution*. 35(1): 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.11.014>.
- Mayo-Hernández J., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J., Guillén-Cisneros M.L., Rodríguez-Herrera R., Hernández-Castillo F, Flores-Olivas A. & Valenzuela-Soto J.H. 2019. Effects of *Bactericera cockerelli* herbivory on volatile emissions of the three varieties of *Solanum lycopersicum*. *Plants*. 8(11): 509. <https://doi.org/10.3390/plants8110509>.

Mukherjee P.K., Mendoza-Mendoza A., Zeilinger S. & Horwitz B.A. 2022. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*. 39: 15-33. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>.

Mukhopadhyay R. & Kumar, D. 2020. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 30(1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>.

Nielsen K.F., Gräfenhan T., Zafari D. & Thrane U. 2005. Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(21): 8190-8196. <https://doi.org/10.1021/jf051279b>.

Nieto-Jacobo M.F., Steyaert J.M., Salazar-Badillo F.B., Nguyen D.V., Rostás M., Braithwaite M., De Souza J.T., Jimenez-Bremont J.F., Ohkura M., Stewart A. & Mendoza-Mendoza A. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*. 8:102. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>.

Pandit M.A., Kumar J., Gulati S., Bhandari N., Mehta P., Katyal R., Rawat C.D., Mishra V. & Kaur J. 2022. Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens*. 11(2): 273. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020273>.

Proctor R.H., McCormick S.P., Kim H.S., Cardoza R.E., Stanley A.M., Lindo L., Kelly, A., Brow D.W., Lee T., Vaughan M.M. & Alexander N.J., 2018. Evolution of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi. *PLoS Pathogens*. 14(4): e1006946. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006946>.

Proctor R.H., McCormick S.P. & Gutiérrez S. 2020. Genetic bases for variation in structure and biological activity of trichothecene toxins produced by diverse fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(12): 5185-5199. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10612-0>.

Ram R.M. & Singh H.B. 2018. *Trichoderma* spp.: An opportunistic pathogen. *Biotech Today: An International Journal of Biological Sciences*. 8(2): 16-24. <http://dx.doi.org/10.5958/2322-0996.2018.00013.3>.

Radojčić A., Li X. & Zhang Y. 2018. Salicylic acid: a double-edged sword for programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*. 9: 1133. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01133>.

Safwan S., Wang S.W., Hsiao G., Hsiao S.W., Hsu S.J., Lee T.H. & Lee C.K. 2022. New trichothecenes isolated from the marine algicolous fungus *Trichoderma brevicompactum*. *Marine Drugs*. 20(2): 80. <https://doi.org/10.3390/md20020080>.

Sánchez-Espinosa A.C., Villarruel-Ordaz J.L. & Maldonado-Bonilla L.D. 2021. Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants

in Oaxaca, Mexico. *Biotecnia*. 23(1): 127-134.  
<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.1310>.

Taylor L., Gutierrez S., McCormick S.P., Bakker M.G., Proctor R.H., Teresi J., Kurtzman B., Hao G. & Vaughan M.M. 2022. Use of the volatile trichodiene to reduce *Fusarium* head blight and trichothecene contamination in wheat. *Microbial Biotechnology*. 15(2): 513-527. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13742>.

Torres De la Cruz M., Ortiz-García C.F., Bautista-Muñoz C., Ramírez-Pool J.A., Ávalos-Contreras N., Cappello-García S. & De la Cruz-Pérez D. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86(4): 947-961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>.

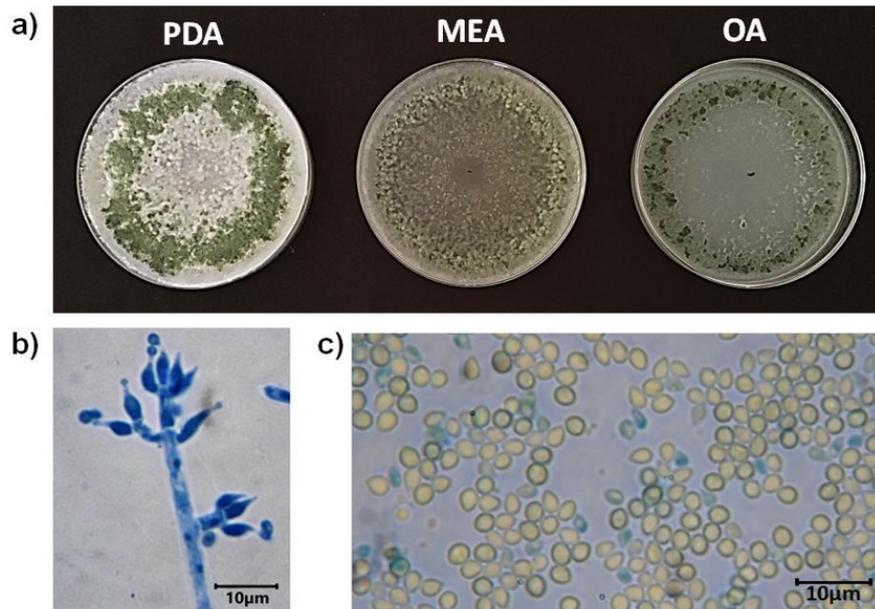
Wang W., Zhu Y., Abraham N., Li X.Z., Kimber M. & Zhou T. 2021. The ribosome-binding mode of trichothecene mycotoxins rationalizes their structure—Activity relationships. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(4): 1604. <https://doi.org/10.3390/ijms22041604>.

Yedidia I., Benhamou N. & Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3): 1061-1070. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1061-1070.1999>.

Yin M., Fasoyin O.E., Wang C., Yue Q., Zhang Y., Dun B., Xu Y. & Zhang L. 2020. Herbicidal efficacy of harzianums produced by the biofertilizer fungus, *Trichoderma brevicompactum*. *AMB Express*. 10:1-8. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01055-x>.

Zoschke R. & Bock R. 2018. Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation. *The Plant Cell*. 30(4): 745-770. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00016>.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



**Fig. 1S.** a) Aspecto de 2IG2102 creciendo en PDA, MEA y OA por 2 semanas, se muestra conidiación en forma de anillos verdes. b) Conidióforo con fiálides en forma de botella, algunos conidios permanecen sujetos a las fiálides. c) Conidios libres. En b) y c) se presenta la escala de 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 1S.** a) Aspect of 2IG2102 growing in PDA, MEA, and OA for 2 weeks, a green ring pattern conidiation is shown. b) Conidiophore with bottle-shaped phialides, some conidia remain attached to the phialides. c) Free conidia. Scale bar of 10  $\mu\text{m}$  is shown in b) and c).