

Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas

Vladimir Sánchez López¹, Luciano Martínez Bolaños², Ernesto A. Zavala González³, Mario Ramírez Lepe³

¹Universidad del Papaloapan. Instituto de Biotecnología. Campus Tuxtepec. Circuito central # 200. Colonia Parque Industrial Tuxtepec, Oaxaca, México C.P. 68301. ²Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional del Sureste. Km. 7 Carretera Teapa-Vicente Guerrero, Ranchería San José Puyacatengo, Teapa, Tabasco, México. ³Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Av. M.A. de Quevedo No. 2779 Col. Formando Hogar C.P. 91897 Veracruz, Ver., México

New records of *Trichoderma crassum* for Mexico and its morphological variation in different ecosystems

Abstract. *Trichoderma* fungi are used as biocontrol agents and as a secondary metabolites source. In this study we report the morphological and molecular identification including DNA sequences from ITS and *tef1* genes of six *Hypocrea crassa/Trichoderma crassum* strains isolated from an agricultural ecosystem cultivated with banana (*Musa* spp.) and four from a tropical semi-deciduous forest ecosystem located in the Papaloapan region. The soil physicochemical characteristics of its habitat were determined.

Keywords: *Hypocrea*, taxonomy, morphology, banana, Tuxtepec.

Resumen. Hongos del género *Trichoderma* son utilizados como agentes de biocontrol y como productores de metabolitos secundarios. Se reporta la identificación morfológica y molecular mediante el análisis de la secuencia de los genes ITS y *tef1* de seis cepas de *Hypocrea crassa/Trichoderma crassum* aisladas de un agro-ecosistema cultivado con banano (*Musa* spp.) y cuatro de un bosque tropical subcaducifolio localizados en la región del Papaloapan, así como las características fisicoquímicas edáficas de su hábitat.

Palabras clave: *Hypocrea*, taxonomía, morfología, banano, Tuxtepec.

Received 16 February 2012; accepted 3 December 2012.

Recibido 16 de febrero 2012; aceptado 3 de diciembre 2012.

Introducción

Trichoderma crassum fue descrito por primera vez en 1991 por Bissett (Bissett, 1991) de cepas aisladas de suelos de Canadá y Estados Unidos. Este investigador la reconoció como un miembro de *Trichoderma* sección *Pachybasium* basándose en características del conidioforo, fialides y conidias. Posteriormente, Chaverri y Samuels (2003) identificaron a *Hypocrea crassa* como el teleomorfo de *T. crassum* mediante el análisis de la combinación de características morfológicas y el análisis filogenético de los genes: subunidad II del RNA polimerasa (RPB2) y el factor de

elongación 1-alfa (EF-1 α), de dos cepas de *T. crassum* aisladas en Canadá y Estados Unidos y de una cepa de *H. crassa* colectada en Tailandia. Así mismo, colocaron a *T. crassum*, *T. flavofuscum* y a *T. virens* como miembros del Clado Virens del género *Trichoderma*. *T. crassum* y *T. virens* son filogenéticamente muy cercanos, presentan características morfológicas muy similares tales como: crecimiento rápido, conidióforos tipo *Gliocladium*, conidias anchas de forma elipsoidal obovoide, lisas, de color verde oscuro, formadas en gotas de un líquido verde (Bissett, 1991; Chaverri y Samuels, 2003). *Trichoderma virens* es una de las especies más estudiadas, se utiliza como agente de biocontrol contra enfermedades que afectan a las raíces, incluso existen biofungicidas a nivel comercial que tienen como ingrediente activo esta especie (Paulitz y Bélanger, 2001). El objetivo del

Autor para correspondencia: Vladimir Sánchez
vladimir_vsl@yahoo.com.mx

presente trabajo fue identificar diez cepas de *Trichoderma* aisladas de ecosistemas diferentes en la región del Papaloapan con características morfológicas similares a *T. virens* y *T. crassum* y determinar si existen diferencias morfológicas entre ellas.

Materiales y métodos

Descripción de los sitios de muestreo

Se estudió un agro-ecosistema de banano (*Musa* spp.) localizado en las coordenadas N 18°07'51.4" O 96°08'67.7" a una altitud de 17 m, propiedad de la Finca Mundo Nuevo (km 2.8 carr. Tuxtepec-Puente El Caracol), y un ecosistema natural ubicado en el municipio de San Bartolo en las coordenadas N 18°05'.229" O 96°05'.647, a una altitud de 41 m y con un relieve tipo cerro. Estos dos ecosistemas se encuentran a una distancia de 6.3 km y pertenecen al distrito de Tuxtepec, Oaxaca. El ecosistema cultivado con banano consistió de una superficie de 1 ha y las plantas sembradas fueron de banano cultivar enano gigante, con una densidad de plantación de 1800 plantas/ha y con una edad de las plantas de 10 años. El principal problema fitosanitario de este cultivo es la sigatoka negra causado por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, el cual fue controlado en el año 2009 mediante el fungicida protectante mancozeb y otros fungicidas sistémicos tales como benzimidazoles, triazoles, morfolidinas, y anylopirimidinas, aplicados en el periodo de lluvias. Para la clasificación del tipo de vegetación presente en el ecosistema natural se usó el trabajo reportado por Rzedowski (2006).

Método de muestreo

En enero de 2010 se realizó el muestreo en el agro-ecosistema y en marzo del mismo año en el ecosistema natural. En cada sitio de muestreo se hizo un corte en el suelo en forma de

prisma rectangular usando una pala ancha, después con la misma pala se tomó una porción de suelo de 5 cm de ancho y 30 cm de profundidad, la cual se guardó en una bolsa de polietileno para ser transportada al laboratorio. En el ecosistema natural se colectaron 6 muestras en zig-zag, incluyendo la parte baja, media y alta del cerro. En el caso del agro-ecosistema, se colectaron 6 muestras compuestas que abarcaron las orillas y la parte media de la plantación. Cada muestra estuvo compuesta por 6 submuestras, las cuales se tomaron al inicio, a la mitad y al final de cada hilera de siembra.

Aislamiento de *Trichoderma*

Las muestras de suelo se diluyeron 1/1000 en agua destilada estéril y 0.1 mL de la dilución se agregó a cajas Petri de plástico estériles conteniendo medio selectivo E de *Trichoderma* (TME): 200 mL de jugo V-8, 800 mL de agua destilada, 20 g de agar, 1 g de glucosa (Papavizas y Lumsden, 1982) y 50 mg de cloranfenicol. Las cajas Petri se incubaron bajo condiciones naturales de luz y oscuridad a temperatura del laboratorio (25-27 °C) durante una semana. Las cepas se conservan en tubos de ensayo con medio harina de maíz agar (CMA) (17 g del medio en 1000 mL de agua destilada) a 5 °C.

Análisis morfológicos de los aislamientos

Los estudios morfológicos se realizaron de colonias de *Trichoderma* creciendo sobre los medios de cultivo: i) harina de maíz dextrosa agar (CMD) (17 g de harina de maíz agar, 20 g de dextrosa en 1000 mL de agua destilada); ii) medio sintético bajo en nutrientes (SNA) (1.0 g de KH_2PO_4 , 1.0 g de KNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl , 0.2 g de glucosa, 0.2 g de sucrosa, 1000 mL de agua destilada, y 20.0 g de agar) (Nirenberg, 1976), y iii) papa dextrosa agar (PDA) (39 g del medio en 1000 mL de agua destilada). Las cajas (9 cm de diám.) se incubaron durante 10 d sobre una mesa de trabajo bajo condiciones naturales de luz y oscuridad a 25-27 °C.

Además del tiempo en que las cepas llegaron a cubrir la superficie del medio, se registraron las características de las colonias tales como color, olor, producción de pústulas, micelio aéreo, y pigmentación del medio. La observación microscópica de los conidióforos y conidias, se realizó mediante laminillas semipermanentes elaboradas con KOH (3%). Se empleó un microscopio compuesto (Leica DM 3000, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemania), con iluminación transmitida de campo claro y contraste de fases. Se midieron al menos 30 unidades de las siguientes estructuras: longitud (L) y ancho (A) de conidias; fiálides (longitud, ancho y la base); ancho de la célula que da origen a la fiálide; y clamidosporas (longitud y ancho). Las mediciones son reportadas como sigue: entre paréntesis el valor mínimo seguido por la media \pm desviación estándar y el valor máximo entre paréntesis. También se determinó un intervalo de confianza (IC) del 95 % para cada estructura. Para la identificación a nivel de especie se utilizó la clave taxonómica reportada por Chaverri *et al.* (2003).

Evaluación del crecimiento micelial

Todas las cepas de *Trichoderma* se inocularon en el centro de la superficie de los medios de cultivo PDA, CMD y SNA en cajas Petri (9 cm de diám.), posteriormente se incubaron en condiciones de oscuridad a 35 °C por 72 h. Después del periodo de incubación se midió el crecimiento radial. El experimento se estableció 3 veces en intervalos de una semana (Samuels *et al.*, 2002).

Análisis molecular

Se seleccionó a la cepa VSL 178 aislada del agro-ecosistema con banano y a la cepa VSL 190 obtenida del ecosistema natural para su identificación molecular. A 100 mL de medio caldo papa dextrosa (PDB, Difco) estéril contenido en un matraz de 250 mL, se inoculó con 1 mL de una solución de 10^6 conidias de *Trichoderma*. Los matraces se incubaron a una

temperatura de 25 °C durante 72 h y en agitación de 100 rpm. Después el micelio se recuperó por filtración, se liofilizó y se molió finamente en un mortero con un pistilo, adicionando nitrógeno líquido. El ADN genómico se extrajo por el método de O'Donnell *et al.* (1998) con algunas modificaciones y se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, EUA). Dos genes: región espaciadora transcrita interna (ITS) y factor de elongación 1-alfa (*tef1*), se amplificaron por PCR usando los cebadores ITS1 e ITS4 para el ITS (White *et al.*, 1990) y los cebadores EF1-728F y TEF1 para *tef1* (Samuels, 2006). El programa de amplificación para ambos genes consistió en los siguientes ciclos: 1 ciclo de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y un ciclo de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1 % y purificados mediante el Kit NucleoSpin Stract II (Macherey-Nagel). Finalmente los amplicones fueron secuenciados por la empresa Macrogen Inc. (Ámsterdam, Holanda). Las secuencias obtenidas fueron visualizadas con el programa Chromas 1.45 y con el software MEGA 5.05 se realizaron los alineamientos de las secuencias, edición y elaboración de arboles filogenéticos. Estas se depositaron en el GenBank y sus números de acceso se muestran en la Figura 2. Posteriormente se realizaron búsquedas de homologías con el programa BLAST del NCBI con cepas de especies correctamente identificadas por expertos en el género. Los arboles filogenéticos se construyeron usando 12 secuencias de especies de *Trichoderma* sección *Pachybasium* (Samuels, 2006; Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009; Druzhinina *et al.*, 2005) mediante el protocolo Neighbour Joining, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas. *T. longibrachiatum* (ATCC 18648) se incluyó como grupo externo.

Análisis edáficos

Con el propósito de conocer las condiciones fisicoquímicas presentes en el hábitat de *Trichoderma*, cada muestra de suelo fue analizada con las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000). El pH se midió con un potenciómetro, la materia orgánica (MO) se determinó con el método de Walkley y Black, la textura por el método de Bouyoucos, la densidad aparente (DAP) con un picnómetro, el N con el procedimiento de micro-Kjeldahl, el P por el procedimiento de Bray y Kurtz, el K por espectrofotometría de emisión de flama, los elementos Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn por espectrofotometría de absorción

atómica, y el B por fotocolorimetría de azometina-H.

Resultados

Características macroscópicas y de crecimiento

Todas las cepas estudiadas mostraron un crecimiento rápido y cubrieron la superficie de los medios de cultivo PDA, CMD y SNA entre 4 y 5 d después de la inoculación. Las cepas obtenidas del ecosistema cultivado con banano tuvieron un mayor crecimiento radial a 35 °C por 72 h que las cepas del bosque tropical subcaducifolio (Tabla 1). Ninguna cepa

Tabla 1. Mediciones de las estructuras y crecimiento micelial de las cepas estudiadas de *T. crassum*

	Hábitat	
	Agro-ecosistema de banano Cepas	Bosque tropical subcaducifolio
	VSL 178, VSL 179, VSL 180, VSL 181, VSL 187, VSL 189 Crecimiento radial (mm) a 35 °C por 72 h PDA de 1-6 mm; CMD y SNA de 2-7 mm, n=18	VSL 190, VSL 196, VSL 197, VSL 208 PDA 0 mm; CMD de 0-1 mm y en SNA de 0-2 mm, n=12
	Anamorfo Conidias	
Largo	(3.18-)3.80-4.62(-5.33)	(3.25-)3.75-4.42(-5.14)
IC	4.15-4.27	4.03-4.15
n	190	120
Ancho	(2.93-)3.39-4.06(-4.70)	(3.05-)3.38-3.92(-4.78)
IC	3.68-3.77	3.60-3.70
n	190	120
L/A	(1.0-)1.05-1.20(-1.39)	(1.0-)1.04-1.19(-1.35)
IC	1.12-1.14	1.10-1.13
n	190	120
Forma	subglobosa a anchamente elipsoidal	globosa a anchamente elipsoidal
Ornamentación	lisa	lisa
	Fiálides	
Largo	(4.83-)6.08-7.99(-9.10)	(4.90-)6.12-8.18(-9.14)
IC	6.90-7.17	6.97-7.34
n	188	121
Ancho	(2.09-)3.15-3.94(-4.82)	(2.62-)3.16-4.10(-4.92)
IC	3.49-3.60	3.55-3.72
n	188	121
L/A	(1.24-)1.61-2.41(-4.04)	(1.26-)1.59-2.40(-3.12)
IC	1.95-2.07	1.92-2.07
n	188	121
Base	(1.36-)1.70-2.53(-3.39)	(1.38-)1.85-2.79(-3.85)
IC	2.06-2.18	2.24-2.40
n	188	121

Tabla 1. Cont.

Ancho de la célula que la origina	(1.65-)2.65-3.84(-5.48)	(2.02-)2.86-3.65(-3.98)
IC	3.16-3.33	3.19-3.33
n	188	121
Clamidosporas		
Largo	(7.18-)9.23-16.84(-21.93)	(7.77-)9.16-13.01(-16.18)
IC	12.60-13.47	10.76-11.40
n	300	140
Ancho	(6.77-)8.61-15.55(-21.53)	(7.45-)8.83-12.37(-14.89)
IC	8.61-15.55	10.31-10.89
n	300	140
L/A	(0.97-)1.00-1.15(-1.44)	(1.0-)0.99-1.09(-1.29)
IC	1.07-1.08	1.03-1.05
n	300	140
Forma	globosa a subglobosa	globosa a subglobosa
Sinanamorfo		
Conidias		
Largo	(5.06-)5.20-7.00(-11.24)	(5.0-)5.14-6.55(-8.59)
IC	5.95-6.25	5.70-5.99
n	138	87
Ancho	(3.76-)4.49-5.79(-7.63)	(3.92-)4.59-5.63(-8.16)
IC	5.03-5.25	5.0-5.22
n	138	87
L/A	(0.99-)1.09-1.27(-1.47)	(1.0-)1.02-1.26(-1.67)
IC	1.17-1.20	1.12-1.17
N	138	87
Forma	subglobosa a anchamente elipsoidal	globosa a anchamente elipsoidal
Ornamentación	lisa	lisa
Fiálides		
Largo	(8.53-)8.79-13.47(-18.41)	(9.16-)9.32-10.35(-10.94)
IC	10.68-11.59	9.60-10.07
N	101	19
Ancho	(2.53-)2.96-3.88(-4.95)	(2.87-)3.27-4.37(-4.73)
IC	3.33-3.51	3.57-4.07
N	101	19
L/A	(2.15-)2.51-4.06(-7.12)	(2.0-)2.21-3.04(-3.46)
IC	3.14-3.44	2.43-2.81
N	101	19
Base	(1.38-)1.89-2.87(-3.85)	(1.76-)2.30-3.35(-3.82)
IC	2.28-2.47	2.59-3.06
N	101	19
Ancho de la célula que la origina	(1.86-)2.42-3.67(-5.10)	(2.44-)2.92-3.81(-3.95)
IC	2.92-3.17	3.17-3.57
N	101	19

L/A: Longitud y ancho.

IC: Intervalo de confianza (95%).

produjo el aroma a coco. Se observaron pigmentos difundidos de color amarillo sobre CMD y SNA excretados por todas las cepas. Sobre PDA las colonias fueron ligeramente

algodonosas, con 3-4 anillos concéntricos de color verde oscuro, los conidióforos y conidias crecieron agregados en diminutas pústulas alrededor del punto de inoculación. Sobre

CMD y SNA, la esporulación fue efusa (Figura 1A), con la formación de diminutas pústulas sobre SNA, siendo escasas o nulas sobre CMD, de color verde oscuro.

Características microscópicas

En la Tabla 1 se muestran las mediciones de las estructuras. Se observaron conidióforos parecidos a *Pachybasium* (Figuras 1 B–E) concentrados en diminutas pústulas sobre CMD, con elongaciones mayormente fértiles (Figura 1D) y solo unas pocas estériles (Figura 1E). Las ramificaciones son irregulares con terminaciones en racimos de 1-5 fiálides. Las fiálides cortas en forma ampuliforme, rectas, con base angosta, hinchados en la parte media, atenuados en la punta. Conidias (Figura 1J) de color verde oscuro, lisas, las cepas aisladas del agro-ecosistema de banano con forma subglobosa a anchamente elipsoidal, mientras que las cepas nativas del bosque tropical subcaducifolio de forma globosa a anchamente elipsoidal. Todas las cepas produjeron abundantes clamidosporas (Figura 1L), unicelulares, tanto terminal como intercaladas, de forma globosa a subglobosa. También se observaron conidióforos del sinanamorfo parecidos a *Gliocladium* (Figuras 1 F–I), simples, erguidos en la zona de esporulación efusa, con la formación de una gota de líquido verde en la cabeza, ramificación penicilada terminando en 2–4 fiálides adpresos. Fiálides rectas, de forma lageniformes y ampuliformes, con base angosta, hinchadas en la parte media, atenuadas en la punta. Conidias (Figura 1K) de color verde oscuro, lisas, con forma subglobosa a anchamente elipsoidal las cepas aisladas del agro-ecosistema de banano, mientras que las cepas nativas del bosque tropical subcaducifolio globosa a anchamente elipsoidal. Así mismo, algunas cepas produjeron conidióforos largos sin ramas terminando de 2 a 3 fiálides (Figura 1G). Las cepas aisladas del ecosistema cultivado con banano tuvieron una mayor longitud de clamidosporas, conidias y fiálides del sinanamorfo que las cepas del bosque tropical subcaducifolio.

Con base a estas características morfológicas, el crecimiento radial a 35 °C por 72 h y las mediciones de las estructuras, las diez cepas estudiadas se identificaron como *T. crassum*.

Análisis molecular

Los resultados de la herramienta BLAST mostraron que la secuencia del gen ITS de la cepa VSL 190 tuvo una homología del 100 % a cepas identificadas correctamente como *H. virens/T. virens* (Gli 39, Gli 20 y Gli 21) y a *H. lixii/T. harzianum* (GJS 05-304), 99 % a *H. virens/T. virens* (GJS 95-194) y a *H. crassa/T. crassum* (cepas DAOM 164916 y DAOM 233775), y 98 % a las cepas DAOM 167068 y CBS 336.93 de *H. crassa/T. crassum*. Para el caso de la cepa VSL 178, tuvo una homología del 99 % a cepas de *H. virens/T. virens* (Gli 39, Gli 20, Gli 21 y GJS 95-194), *H. lixii/T. harzianum* (cepa GJS 05-304) y a *H. crassa/T. crassum* (DAOM 164916 y DAOM 233775), y 98 % a las cepas DAOM 167068 y CBS 336.93 de *H. crassa/T. crassum*. Por otra parte, la secuencia del gen *tef1* de la cepa VSL 190 tuvo una homología del 99 % a *H. virens/T. virens* (DAOM 237548), y del 97 % a *H. virens/T. virens* (DAOM 167652 y Gli 39) y a *H. crassa/T. crassum* (DAOM 167063). Mientras que la cepa VSL 178 tuvo una homología del 100 % a la cepa DAOM 237548 de *H. virens/T. virens*, y 97 % a *H. virens/T. virens* (cepas Dis 162 y DAOM 167652) y a *H. crassa/T. crassum* (cepas DAOM 167063 y Gli 39). El árbol filogenético (Figura 2) muestra que con el análisis de la secuencia del gen ITS las cepas VSL 178 y VSL 190 se agruparon con los dos miembros del Clado Virens: *H. virens/T. virens* y *H. crassa/T. crassum*, mientras que con la secuencia del gen *tef1* nuestras cepas se agruparon solamente con *H. crassa/T. crassum*.

Características del agro-ecosistema de banano

Las características fisicoquímicas del suelo se muestran en la Tabla 2. El pH del suelo se clasificó como moderadamente

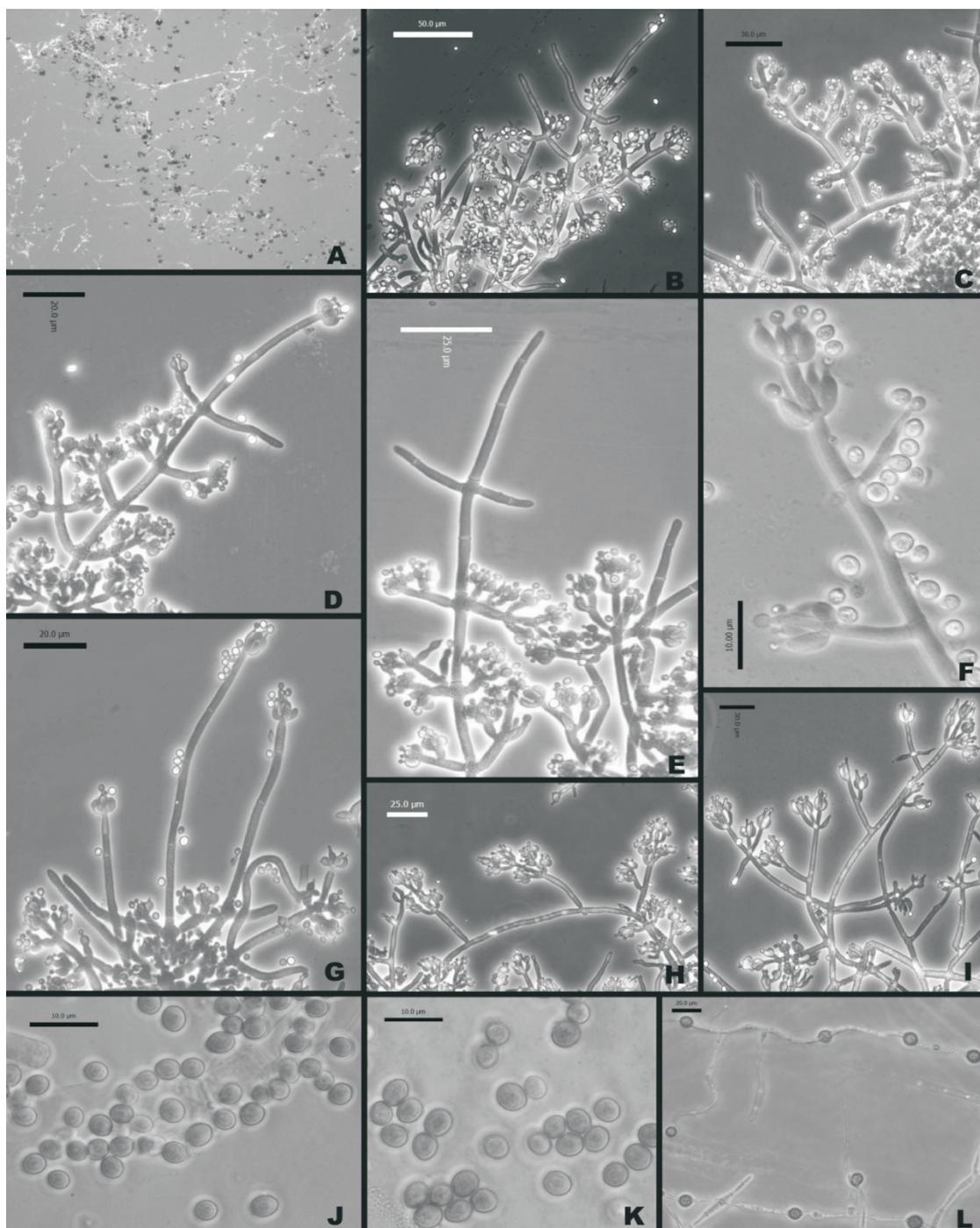
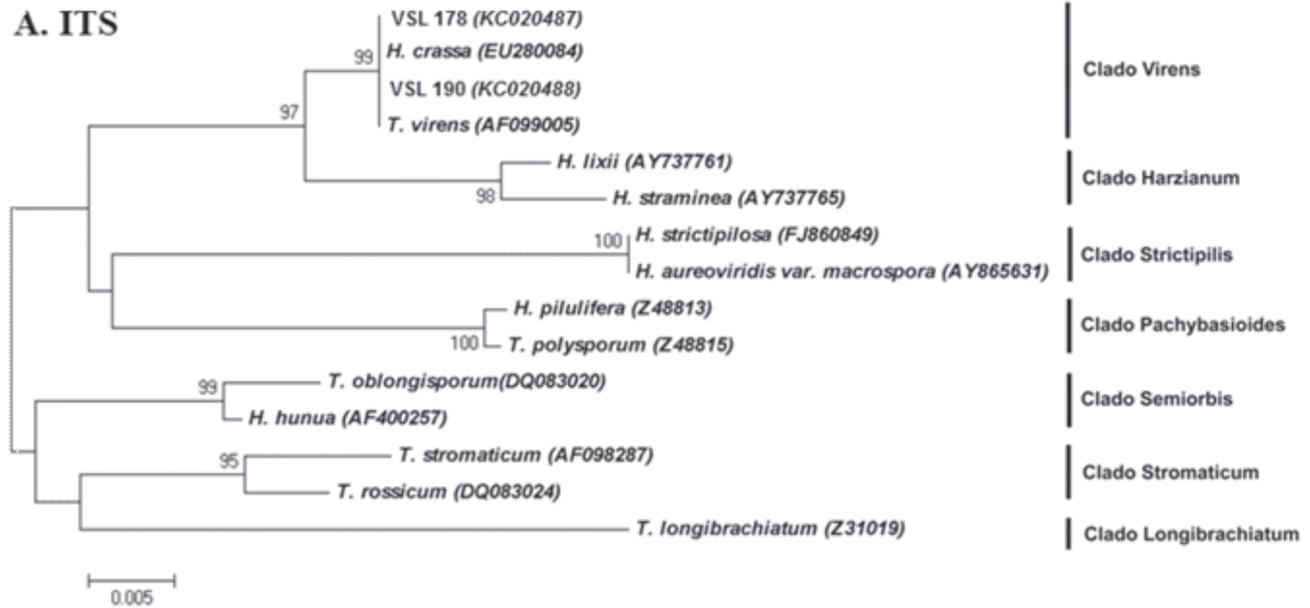


Figura 1. Morfología de *Trichoderma crassum*. A. Conidiación efusa sobre CMD. B–E. Conidioforos del anamorfo parecidos a *Pachybasium*. F–I. Conidioforos del sinamorfo parecidos a *Gliocladium*. J. Conidias del anamorfo sobre CMD. K. Conidias del sinamorfo sobre CMD. L. Clamidosporas sobre CMD. A. VSL 178. B. VSL 190. C. VSL 179. D. VSL 196. E. VSL 190. F. VSL 179. G. VSL 208. H. VSL 187. I. VSL 196. J. VSL 180. K. VSL 178. L. VSL 208. A. Magnificación 35x. Barra de escala: B = 50 μm ; C, I = 30 μm ; D, G, L = 20 μm ; E, H = 25 μm ; F, J, K = 10 μm .

ácido (6.03 a 6.44), el contenido de MO fue de bajo a medio (1.48 a 1.75 %), es un suelo arcilloso con una DAP de 1.15 a 1.17 g/cm^3 , de textura franco arcillo limosa, el contenido de N (13.4-17.5 mg/kg) bajo, P (5.68-6.29 mg/kg) bajo, K (122-

156 mg/kg) bajo a medio, Ca (811-955 mg/kg) bajo, Mg (250-311 mg/kg) alto, Fe (38.21-78.51 mg/kg) adecuado, Cu (0.58-4.82 mg/kg) adecuado, Zn (2.04-4.04 mg/kg) adecuado, Mn (5.52-27.34 mg/kg) adecuado, y B (0.15-0.60 mg/kg) bajo a

A. ITS



B. *tef1*

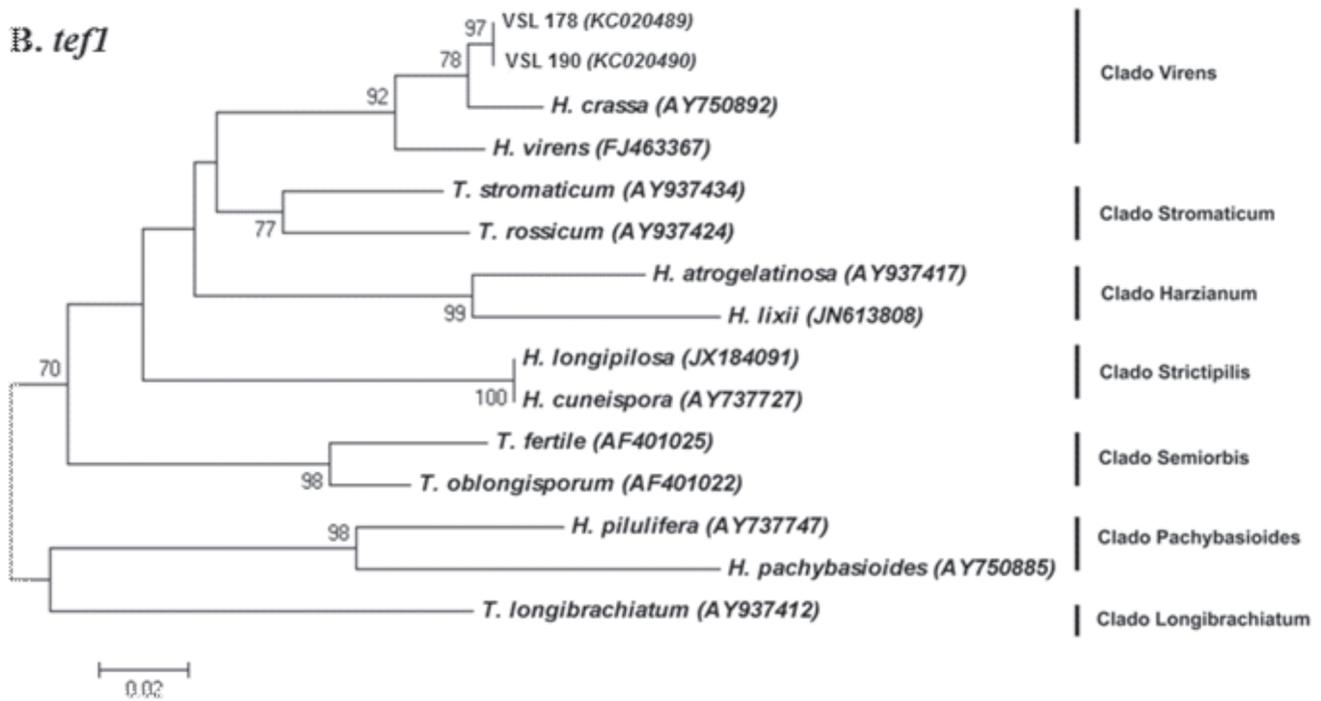


Figura 2. Árbol filogenético elaborado con secuencias del gen ITS (A) y *tef1* (B) de especies de *Trichoderma* sección *Pachybasium* muestra la posición de las cepas VSL 178 y VSL 190. Los números de acceso del GenBank se encuentran entre paréntesis. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el protocolo Neighbour Joining, realizando una prueba de bootstrapping con 1000 réplicas.

medio.

Características del ecosistema natural

El ecosistema natural se clasificó como bosque tropical subcaducifolio. La vegetación está compuesta por árboles

tales como el coyol (*Acrocomia mexicana*), palo mulato (*Bursera simaruba*), puan (*Muntingia calabura*), guácimo (*Guazuma ulmifolia*), huevo de burro (*Stemmadenia donnell-smithii*), parota o guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*), arbustos como el cornizuelo (*Acacia collinsii*) y papaya de

monte (*Carica papaya*), hierbas como dormilonas (*Mimosa pudica*) y helechos. El pH se clasificó como fuerte a moderadamente ácido (4.83 a 5.20), el contenido de MO fue medio (2.7%), por su DAP de 1.10 g/cm³ es un suelo arcilloso, con textura franco arcillosa, con contenido de N (30.6 mg/kg) medio, P (13.1 mg/kg) bajo, K (280 mg/kg) alto, Ca (1362 mg/kg) medio, Mg (250 mg/kg) alto, Fe (40.9 mg/kg) adecuado, Cu (0.84 mg/kg) adecuado, Zn (7.53 mg/kg) adecuado, Mn (179.2 mg/kg) adecuado, y B (0.98 mg/kg) medio (Tabla 2).

Discusión

Este estudio aporta la identificación morfológica y molecular de diez nuevas cepas de *T. crassum* aisladas de dos ecosistemas tropicales: uno agrícola y el otro bosque tropical subcaducifolio. Sus características morfológicas de conidióforos, fiálides, conidias y clamidosporas correspondieron a las descripciones realizadas por Bissett (1991) y Chaverri y Samuels (2003), sin embargo hubo diferencias en las mediciones de algunas estructuras. Las conidias del conidióforo parecido a *Pachybasium* de nuestras cepas fueron de forma subglobosa a anchamente elipsoidal,

mientras que Chaverri y Samuels (2003) reportan conidias elipsoidal u obovoides. En el caso de las conidias del conidióforo parecido a *Gliocladium* sucedió lo mismo, las conidias de nuestras cepas fueron de forma subglobosa a anchamente elipsoidal, y las conidias de las cepas estudiadas por estos investigadores fueron anchamente elipsoidal. Otra diferencia observada fue la longitud máxima de estas conidias, en nuestro estudio fue de 11.24 µm, y en la de ellos fue de 8.0 µm. Debido a que *T. crassum* y *T. virens* tienen características morfológicas muy similares, tuvimos que ser cuidadosos para identificar las diferencias entre estas dos especies, una de ellas es que *T. crassum* produce dos anamorfos: uno semejante a *Pachybasium* y un sinanamorfo parecido a *Gliocladium*, los cuales observamos en las diez cepas analizadas, en cambio *T. virens* solo produce un anamorfo parecido a *Gliocladium*, siendo difícil de distinguirlo con el de *T. crassum*. Otra característica que permitió diferenciar estas dos especies, fue su crecimiento radial a 35 °C por 72 h, *T. virens* el diámetro de las colonias es de 8-42 mm, mientras *T. crassum* es de 0-6 mm (Chaverri y Samuels, 2003), nuestras cepas tuvieron un crecimiento radial de 0-7 mm. Este resultado junto con el análisis de las características morfológicas nos permiten concluir que las diez cepas estudiadas pertenecen a *T. crassum* y son

Tabla 2. Características del hábitat de las cepas de *T. crassum*

Ecosistema/ Localidad	Cepa	Características fisicoquímicas de las muestras de suelo																
		pH	MO (%)	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B	DAP (g/cm ³)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura
Agro-ecosistema de banano/ Tuxtepec	VSL 178	6.03	1.75	13.4	6.16	156	811	311	78.51	4.82	4.04	26.34	0.17	1.17	1.0	59.2	39.8	franco arcillo limosa
	VSL 179 VSL 180 VSL 181	6.44	1.61	17.5	6.29	132	955	250	55.26	4.28	2.82	27.34	0.15	1.15	3.0	57.1	39.9	franco arcillo limosa
	VSL 187	6.33	1.75	18.6	5.80	138	911	310	60.6	3.87	2.93	26.3	0.65	1.17	1.0	57.1	41.9	franco arcillo limosa
	VSL 189	6.35	1.48	14.4	5.68	122	948	280	38.21	0.58	2.04	5.52	0.60	1.16	1.0	59.0	40.0	franco arcillo limosa
Bosque tropical subcaducifolio/ San Bartolo	VSL 190 VSL 196 VSL 197	5.20	2.7	30.6	13.1	280	1362	250	40.9	0.84	7.53	179.2	0.98	1.10	34.1	36.0	29.9	franco arcillosa
	VSL 208	4.83																

MO: Materia orgánica. Los elementos N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, y B son expresados en mg/kg; DAP=densidad aparente.

miembros de *Trichoderma* sección *Pachybasium*.

La herramienta BLAST mostró que la secuencia del gen ITS de la cepa VSL 190 tuvo una homología del 100 % con cepas correctamente identificadas como *T. virens* y *T. harzianum*. Este resultado coincide con lo reportado por Samuels (2006), quien menciona que varias especies de *Trichoderma* sección *Trichoderma* tienen la misma secuencia de este gen. El árbol filogenético hecho con la secuencia del gen ITS agrupó a las cepas VSL 178 y VSL 190 con *H. virens*/*T. virens* y *H. crassa*/*T. crassum*. Nuestro estudio demuestra una vez más que el uso de la secuencia del gen ITS no es suficiente para identificar especies relacionadas cercanamente como es el caso de *T. virens* y *T. crassum*. El gen *tefl* es más variable que el ITS (Samuels, 2006) y esto se confirmó con el árbol filogenético que se construyó con la secuencia de este gen, en el cuál diferenció a *T. virens* y *T. crassum*, además agrupó a nuestras cepas con *T. crassum*.

Existen pocas cepas reportadas como *T. crassum* en la literatura y solo se ha encontrado en América del Norte y América Central. La cepa tipo (DAOM 164916) se aisló del suelo en una plantación de abetos en Quebec, Canadá (Bissett, 1991), y la cepa G.J.S. 95-157 se recuperó de madera descortezada en Nueva York, Estados Unidos (Chaverri y Samuels, 2003). Otras cepas se aislaron del humus del suelo de un bosque de pino-encino y de un suelo con hierba en Guatemala (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009). Como *Hypocrea* la cepa tipo se aisló de madera sin corteza en Tailandia (Chaverri y Samuels, 2003). A nuestro conocimiento este es el primer reporte de esta especie para México.

Con los resultados obtenidos de los análisis morfológicos y moleculares concluimos que las seis cepas aisladas de un agro-ecosistema cultivado con banano (*Musa* spp.) y cuatro de un bosque tropical subcaducifolio pertenecen a *H. crassa*/*T. crassum* y son miembros del Clado Virens de *Trichoderma* sección *Pachybasium* existiendo algunas diferencias en su morfología.

Agradecimientos

Trabajo financiado por el proyecto PROMEP 2008 “Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. de diferentes ecosistemas en la región del Papaloapan”.

Literatura citada

- Bissett, J., 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany 69:2373–2417.
- Chaverri, P., L.A. Castlebury, B.E. Overton, G.J. Samuels, 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. Mycologia 95:1100–1140.
- Chaverri, P., G.J. Samuels, 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (*Ascomycota*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*): species with green ascospores. Studies in Mycology 48:1–116.
- Druzhinina, I.S., A.G. Kopchinskiy, M. Komon, J. Bissett, G. Szakacs, C.P. Kubicek, 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology 42:813–828.
- Hoyos-Carvajal, L., S. Orduz, J. Bissett, 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropical regions. Fungal Genetics and Biology 46:615–631.
- Kullnig-Gradinger, C.M., G. Szakacs, C.P. Kubicek, 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: A multigene approach. Mycological Research 106:757–767.
- Nirenberg, H.I., 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landund Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 169:1–117.
- NOM-021-RECNAT-2000. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik, H.I. Nirenberg, 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:465–493.
- Papavizas, G.C., R.D. Lumsden, 1982. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Plant Disease 66:1019–1020.
- Paulitz, T.C., R.R. Bélanger, 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39:103–133.
- Rzedowski, J., 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
- Samuels, G.J., 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96:195–206.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castlebury, O. Petrini, 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94:146–170.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods, Applications, Academic Press, San Diego, CA. 315–322.