

Obtención de cepas puras de *Trichoderma* spp. con fines industriales

Obtaining pure strains of *Trichoderma* spp. for industrial purposes

Edmundo Napoleón Benavides Sotelo¹, Julio Amilcar Pineda Insuasti², Astrid Stefanía Duarte Trujillo³, Claudia Patricia Soto Arroyave⁴, Camilo Alejandro Pineda Soto⁵

¹ Ministerio de Ambiente del Ecuador (MAE), Quito, Ecuador.

² Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

³ Organización Micológica Internacional (OMI), Florencia, Colombia.

⁴ Universidad Católica de Oriente (UCO), Rionegro, Colombia.

⁵ Escuela Politécnica Nacional (EPN), Quito, Ecuador

Autor para correspondencia: napoleon.bensotelo@gmail.com

Recibido: octubre 15 de 2018

Aceptado: diciembre 20 de 2018

RESUMEN

Trichoderma spp. es un moho cosmopolita generalmente empleado como biocontrolador y/o biofertilizante en cultivos agrícolas, por lo cual es importante su conservación en Centros de Recursos Genéticos (CRG). El objetivo de este trabajo es presentar información básica para la obtención de cepas puras de *Trichoderma* spp. que permita el máximo aprovechamiento a la biodiversidad endógena. Se concluyó que, la obtención de cepas puras con fines industriales consta de cuatro etapas: aislamiento, identificación, caracterización y conservación; donde la primera y la cuarta son Puntos Críticos de Control (PCC), ya que una mala identificación asigna erróneamente propiedades a cepas y una mala conservación pone en juego la integridad fenotípica y genómica del hongo. Estos PCC's influyen en la viabilidad económica de la industria.

PALABRAS CLAVE: CRG, cepas viables, aplicaciones industriales, conservación, identificación.

ABSTRACT

Trichoderma spp. it is a cosmopolitan mold usually used as a biocontroller and / or biofertilizer in agricultural crops, so it is important to conserve it in Genetic Resources Centers (CRG). The objective of this work is to present basic information for obtaining pure strains of *Trichoderma* spp. that allows the maximum use to the endogenous biodiversity. It was concluded that obtaining pure strains for industrial purposes consists of four stages: isolation, identification, characterization and conservation; where the first and the fourth are Critical Control Points (CCP), since a bad identification erroneously assigns properties to strains and a bad conservation brings into play the phenotypic and genomic integrity of the fungus. These CCP's influence the economic viability of the industry.

KEYWORDS: CGR, viable strains, industrial implementation, conservation, identification

INTRODUCCIÓN

Se estima que existen en la naturaleza entre medio millón a casi 10 millones (Hawksworth, 2001). Según el Índice Fungorum se han descrito hasta el momento 529 mil especies (Species Fungorum, 2016), lo que demuestra la amplia biodiversidad fúngica y el vasto potencial biotecnológico para el descubrimiento de nuevos metabolitos.

Trichoderma spp. es un género de hongos deuteromicetos pertenecientes a la clase de los Hifomicetos. Se encuentra comúnmente en el suelo, y puede crecer en todos los pisos térmicos, desde los polos hasta los trópicos. Una característica del género es la capacidad de degradar eficazmente una amplia gama de sustratos naturales (Penttilä, Limón, y Nevalainen, 2004), gracias a su producción de celulasas y hemicelulasas (Druzhinina y Kubicek, 2016), por lo que es muy útil en la biotransformación de residuos vegetales en alimento para animales (Valiño, Elías, Torres, Carrasco, y Albelo, 2004). Según el índice fungorum, se han descrito hasta el momento 296 especies (Species Fungorum, 2016), de las cuales la especie más estudiada es *T. harzianum* (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991).

Trichoderma spp se considera uno de los hongos más útiles en la producción de enzimas industriales, la agricultura y la biorremediación (Rey, Llobell, Monte, Scala, y Lorito, 2004). Las investigaciones recientes demuestran que es simbiote de plantas, oportunista no virulento y micopatógeno (Harman, Howell, Viterbo, Chet, y Lorito, 2004). Varias especies del género constituyen agentes de control biológico contra hongos patógenos de cultivos agrícolas y promotores vegetales, tanto de la absorción de nutrientes como de la respuesta inmune (Bailey *et al.*, 2006; Clavijo y Cotes, 1998; Evans, Holmes, y Thomas, 2003); por ello, se comercializan usualmente como biofertilizantes y bioplaguicidas (Chet, 1987; Harman *et al.*, 2004). Se reporta que más del

60% de los biofungicidas disponibles en el mercado, son elaborados a partir de *Trichoderma* spp. (Verma, Brar, Tyagi, Surampalli, y Valéro, 2007).

En el sector de la salud, *Trichoderma* spp también ha sido de gran importancia que presenta actividad anticancerígena (Saravanakumara *et al.*, 2015) y antitumoral (Li *et al.*, 2011).

Los Centros de Recursos Genéticos (CRG) de hongos son útiles para aislar, identificar y conservar las especies para aplicaciones específicas en el futuro. La comunidad académica y la industria a menudo requieren más que la obtención de cepas, sino también el acceso a información referente a las condiciones de cultivo, conservación y producción de metabolitos de interés. Por lo tanto, los CRG tienen que ajustarse a la demanda (Ryan y Smith, 2004).

Bajo Este contexto, el objetivo de este trabajo es presentar información básica para la obtención de cepas puras de *Trichoderma* spp., mediante una amplia revisión de la literatura, que permita a los CRG ajustarse a los requerimientos de la industria y dar el máximo aprovechamiento a la biodiversidad nativa.

AISLAMIENTO

Recolección

Se ha recolectado a partir de los siguientes sustratos: árbol de *Theobroma* spp. (Bailey *et al.*, 2006); muestra de suelo (You *et al.*, 2016); sedimento marino (Ren *et al.*, 2013); rizosferas de aloe (Zhang *et al.*, 2016), de chile, de mango (Guigón-López *et al.*, 2010), de frijol, de soja (Larralde-Corona *et al.*, 2008); cortezas de mangle (Saravanakumara *et al.*, 2015), de *Taxus baccata* (Adelin *et al.*, 2014); esponjas marinas (Kobayashi, Uehara, Matsunami, Aoki, y Kitagawa, 1993) y mejillones azules (Ruiz *et al.*, 2007).

Para la recolección de las cepas endógenas a partir de plantas que carecen de corteza, tales como las leguminosas, los tejidos sanos (tallos, hojas y raíces) se deben picar en trozos pequeños (3 cm a 5 cm) y enjuagar; posteriormente, se deben esterilizar con hipoclorito de sodio al 1% durante 4 min a 5 min y con tiosulfato de sodio al 2,5% durante 10 min para eliminar el cloro residual; y finalmente se deben enjuagar y pasar por alcohol al 75% durante 1 min. Los tejidos se secan bajo una cámara de flujo laminar, se cortan en trocitos de aproximadamente 0,5 cm y se transfieren a placas de Petri con el medio de cultivo (Wang *et al.*, 2015).

Para la recolección a partir de árboles, se debe retirar un trozo de corteza del tronco a una altura de 1,60 a 1,70 m, y con un objeto corto punzante extraer astillas triangulares de 0,8 cm x 0,5 cm, como indica la figura 1. El material se lleva al laboratorio, donde se escinde con una cuchilla y con pinzas se toman muestras internas, las cuales se depositan en los medios de cultivo (Evans *et al.*, 2003).



Fig. 1. Cortes efectuados en el árbol para la toma de muestras (Evans *et al.*, 2003).

Para recolección de cepas del suelo se suspenden las muestras de rizósfera en solución salina 0,9 % p/v, luego se toman alícuotas para inocular platos de PDA con antibiótico y se hacen repiques hasta obtener la cepa pura en medios selectivos (Larralde-Corona *et al.*, 2008). Otros autores reportan para la suspensión de las muestras de suelo

sólo agua destilada estéril en proporción de 1/1000 (Sánchez López, Martínez Bolaños, Zavala González, y Ramírez Lepe, 2012).

Aislamiento

En la tabla 1 se mencionan los principales medios de cultivo reportados en la literatura para el aislamiento del *Trichoderma* spp.:

Tabla 1. Medios de cultivos reportados para el aislamiento de *Trichoderma* spp.

Medio	Suplemento	Referencia
Agar Peptona Dextrosa	Rosa bengala y estreptomina	(Martin, 1950)
Agar Papa Dextrosa	Penicilina y estreptomina	(Evans <i>et al.</i> , 2003)
Agar Extracto de Malta	Cloranfenicol	(Evans <i>et al.</i> , 2003)
Agar Papa Dextrosa	Cloranfenicol	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
Medio selectivo	Cloranfenicol	(Sánchez López <i>et al.</i> , 2012)

Para el empleo de estos medios de cultivo se reportan tiempos de incubación de una semana a 25 °C (Martin, 1950), ocho semanas a 25 °C (Evans *et al.*, 2003) y cuatro días a 28 °C en condiciones de oscuridad (Zhang *et al.*, 2016).

Purificación

Las cepas se purifican en Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (Thongram, Sarangthem, Gourshyam, y Bharat, 2013), medio Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (YPD, por sus siglas en inglés) (Larralde-Corona *et al.*, 2008) o Agar Zanahoria Papa a 25 °C en condiciones de oscuridad (CPA, por sus siglas en inglés) (Evans *et al.*, 2003) durante 20 días (Lang *et al.*, 2015) y se hacen repiques cuantas veces sea necesario hasta obtener cepas axénicas.

IDENTIFICACIÓN

Las colonias de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* spp. se reconocen fácilmente por su rápido crecimiento y su coloración particular, que varía del blanco-verdoso al amarillo-verdoso. En el área de conidiosporas se observan anillos concéntricos, y por el revés de la colonia puede haber coloración amarilla, ámbar, amarilla verdosa o neutra. En cuanto a características microscópicas, los conidióforos son por lo general hialinos, erectos, ramificados, no verticilados, solitarios o en grupos, con fiálides hialinas en forma de botella. Las conidiosporas están dispuestas en el ápice de las fiálides; su morfología puede variar de subglobosa a oblonga, lisa a espinosa, hialina a verdosa, dependiendo de la especie (Arango, Ordoñez, Castañeda, y Restrepo, 1988; Barnet y Hunter, 1972).

La identificación de especies se puede realizar mediante visualización de patrones de ramificación y morfología tanto de conidios como de conidióforos (Rifai, 1969) mediante observación al microscopio luego de 6 a 7 días de crecimiento en PDA a 25-30 °C (Thongram *et al.*, 2013). Tanto Bissett (1984, 1991) como Barnet y Hunter (1978) establecieron claves taxonómicas para diferenciar las especies del género. Sin embargo, hay pocos caracteres morfológicos útiles, y los existentes son similares entre sí, por lo que la identificación de especies precisa basada en la morfología es difícil (Respinis *et al.*, 2010).

Cada vez más van tomando mayor utilidad las técnicas y herramientas de identificación molecular (Kubicek, Komon-Zelazowska, y Druzhinina, 2008). Para la extracción del ADN se inocula el Caldo de Papa Dextrosa (PDB, por sus siglas en inglés) con tacos de PDA colonizados con micelio aéreo del hongo y se incuba durante 48 h a 24 °C en un agitador orbital, luego se filtra con un embudo Buchner, se lava el micelio con agua estéril y se tritura;

finalmente se procesa según el tipo de técnica molecular escogida (Thongram *et al.*, 2013), tales como, el código de barras de oligonucleótidos (Druzhinina *et al.*, 2005), el análisis en software (MEGA5) versión 5 (Tamura *et al.*, 2011), la toma de huellas dactilares de ADN, los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), la amplificación y secuenciación del Espaciador Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés) (Gams y Bissett, 1998; Lieckfeldt, Kuhls, y Muthumeenakshi, 1998).

Actualmente se han secuenciado los siguientes genomas del género: *T. reesei*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. parareesei*, *T. gamsii*, *T. longibrachiatum* y *T. citrinoviride* (Baroncelli, Zapparata, Piaggieschi, Sarrocco, y Vannacci, 2016; Kubicek *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2008; Mukherjee, Horwitz, Herrera-Estrella, Schmoll, y Kenerley, 2013; Yang *et al.*, 2015). En la figura 2 se observa la variabilidad morfológica del micelio, de acuerdo con el tipo de cepa empleada, aunque tienen en común la esporulación de color verde.

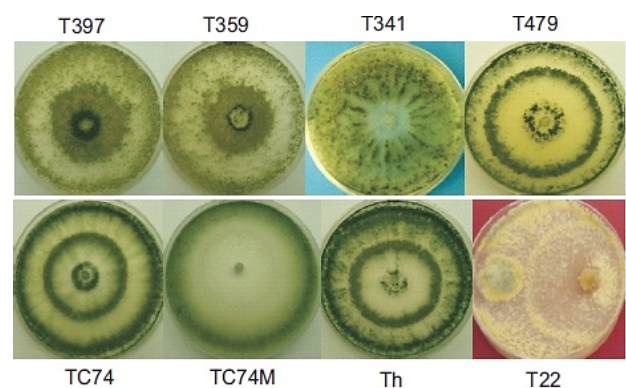


Figura 2. Morfología de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. (Guigón-López *et al.*, 2010).

CARACTERIZACIÓN

La caracterización permite conocer las aplicaciones específicas del hongo con base en los metabolitos producidos (Lieckfeldt, Samuels, Nirenberg, y Petrini, 1999).

Tasas de crecimiento

Se toman tacos de PDA con micelio y se inoculan cajas de Petri con PDA, las cuales son incubadas a 25 °C durante el tiempo necesario hasta que el micelio recubra completamente la superficie de la caja.

El crecimiento radial se mide diariamente y la Tasa de Crecimiento radial (TC) se calcula como sigue (Larralde-Corona et al., 2008):

$$TC = \frac{\text{Crecimiento final} - \text{Crecimiento inicial}}{\text{tiempo de incubación}}$$

Producción de metabolitos

La biosíntesis de metabolitos secundarios en los hongos a menudo implica vías bioquímicas únicas e inusuales que, si se varían sutilmente, pueden originar diversidad de sustancias a

partir de sólo unos precursores clave, provenientes del metabolismo primario como los ácidos, acetil-CoA reductasa, mevalonato y aminoácidos (Demain y Fang, 2000; Keller, Turner, y Bennett, 2005).

Dentro de los metabolitos secundarios derivados se destacan: péptidos no ribosomales como los peptaiboles, sideróforos, micotoxinas, policétidos, terpenos, pironas, entre otros. La producción de estas sustancias depende de la especie y de la cepa con que se esté trabajando, y no meramente de las condiciones de cultivo, aunque el uso de inductores puede ser necesario (Zeilinger, Gruber, Bansal, y Mukherjee, 2016).

En la tabla 2 se consignan algunos de los metabolitos producidos por este género.

Tabla 2. Metabolitos producidos por las especies de *Trichoderma spp.*

Tipo	Metabolito	Especie	Referencia	
Enzima	Celobiohidrolasas	<i>T. viride</i>	(Valiño et al., 2004)	
	Betaglucanasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
	Celulasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
	Poligalacturonasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
	Proteasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
		<i>T. harzianum</i>	(Suárez et al., 2005)	
		<i>T. reesei</i>	(Grinyer et al., 2007)	
	Xilanasas	<i>T. harzianum</i>	(Tseng, Liu, Yang, Lo, y Peng, 2008)	
		β -1,3-glucanasa	<i>T. harzianum</i>	(Tseng et al., 2008)
		β -1,6-glucanasa	<i>T. harzianum</i>	(Tseng et al., 2008)
		Cetoacil sintasa	<i>T. harzianum</i>	(Yao et al., 2016)
		β -1,4-mananasa	<i>T. virens</i>	(Chai, Abu Bakar, Mahadi, y Murad, 2016)
		Acetil-esterasa	<i>T. reesei</i>	(Kremnický, Mastihuba, y Côté, 2004)
Antraquinona		Crisofanol	<i>T. harzianum</i>	(Liu et al., 2016)
Péptido bioactivo	Peptaibiol	<i>T. isocyanide</i>	(Ren et al., 2013)	
	Tricorvina	<i>T. longibrachiatum</i>	(Ruiz et al., 2007)	
Antibiótico	Poliporinas	<i>T. polysporum</i>	(New et al., 1996)	
	Homothallin II	<i>T. harzianum</i>	(Faull, Graeme-Cook, y Pilkington, 1994)	
Ácido orgánico	A. propiónico	<i>T. hamatum</i>	(Baldwin et al., 1985)	
Policétido	Koningininos	<i>T. koningii</i>	(Lang et al., 2015)	
	Trichoharzin	<i>T. harzianum</i>	(Kobayashi et al., 1993)	

Tipo	Metabolito	Especie	Referencia
Terpeno	Harzian tetracíclico	<i>T. atroviridae</i>	(Adelin <i>et al.</i> , 2014)
	Citrinovirina	<i>T. citrinoviride</i>	(Liang, Miao, Song, Liu, y Ji, 2016)
Sesquiterpeno	Pestalotiopsina	<i>Trichoderma spp.</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2015)
Micotoxina	Citocalasina	<i>T. gamsii</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
Alcohol	Etanol	<i>T. harzianum</i>	(Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991)

Efecto antagónico

El mecanismo de acción de *Trichoderma spp.* como biocontrolador se basa en la hidrólisis de la pared celular del patógeno, gracias a las enzimas hidrolíticas exoquitinasas y β -1-3 glucanasas que produce extracelularmente; lo que resulta mortal, ya que la quitina es el principal componente de la pared celular de los hongos, correspondiendo alrededor del 80% (Clavijo y Cotes, 1998).

Para medir el efecto antagónico de *Trichoderma spp.* se utiliza por lo general, el método de cultivos duales (Larralde-Corona *et al.*, 2008), que consta de la confrontación de las

dos cepas en una caja de Petri con PDA, separadas aproximadamente 5cm, bajo unas condiciones de cultivo de 20-25 °C durante 120 h con un fotoperiodo 12:12 (luz:oscuridad). El porcentaje de Inhibición del Crecimiento (IC) de los patógenos se calcula contrastando su tasa de crecimiento en ausencia y en presencia de *Trichoderma spp.* en el medio de cultivo, siendo considerada como el 100 % la tasa de crecimiento del patógeno en el cultivo axénico (Guigón-López *et al.*, 2010).

En la tabla 3 se listan algunos de los patógenos inhibidos por *Trichoderma spp.*

Tabla 3. Fitopatógenos objetivo del Biocontrolador *Trichoderma spp.*

Fitopatógeno	Biocontrolador	Referencia
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>T. koningii</i>	(Clavijo & Cotes, 1998)
	<i>T. harzianum</i>	(Tseng <i>et al.</i> , 2008)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>T. koningii</i>	(Clavijo & Cotes, 1998)
<i>Pythium splendens</i>	<i>T. koningii</i>	(Clavijo & Cotes, 1998)
<i>Moniliophthora roreri</i>	<i>T. ovalisporum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. harzianum</i>	(Bailey <i>et al.</i> , 2006)
	<i>T. ovalisporum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. harzianum</i>	(Bailey <i>et al.</i> , 2006; Evans <i>et al.</i> , 2003)
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>T. harzianum</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>T. citrinoviride</i>	(Liang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>T. harzianum</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>T. citrinoviride</i>	(Liang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>T. harzianum</i>	(Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991)
	<i>T. koningii</i>	(Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991)

CONSERVACIÓN

Su objetivo es la preservación de la pureza, la viabilidad, la capacidad de esporulación y la integridad genómica de la cepa (Smith y Ryan, 2004). El mantenimiento de la integridad

fenotípica y genómica de la cepa es de suma importancia, y puede verse afectada por malas técnicas de preservación (Ryan y Smith, 2004). Kuhls, Lieckfeldt y Börner (1995) notaron que cepas presumiblemente idénticas de

Trichoderma spp obtenidas de diferentes CRG tenían desviaciones en las huellas dactilares por Reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Un científico con poca experiencia puede inadvertidamente trabajar con una cepa degenerada, producir resultados falsos y sacar conclusiones erróneas (Ryan y Smith, 2004). Fuentes no fiables de recursos genéticos fúngicos pueden provocar resultados desastrosos en términos económicos, ya que la cepa puede no ser estable genéticamente o puede estar mal identificada, ocasionando que seguramente no manifieste los resultados esperados tanto en velocidad de crecimiento, como de tipo y cantidad de metabolitos producidos. La necesidad de asegurar la estabilidad de las cepas para aplicaciones biotecnológicas es de suma importancia (Clutterbuck, 2004). Por tanto, los métodos de preservación empleados deben ser reproducibles y garantizar la integridad fenotípica y genómica de las cepas, o por lo menos minimizar su deterioro (Ryan y Smith, 2004).

Se reportan métodos de almacenamiento en glicerol 35 % v/v a 70 °C bajo cero (Larralde-Corona *et al.*, 2008), Agar Harina de Maíz (CMA, por sus siglas en inglés) a 5 °C (Sánchez López *et al.*, 2012), aceite mineral o agua destilada estéril (Gato, Rodríguez, y Elósegui, 2009), subcultivo continuo (repique o transferencia periódica), congelación y liofilización (Ryan, Smith, y Jeffries, 2000). No obstante, el método más adecuado para conservar esporas es la liofilización, pero no se recomienda para conservar micelio, ya que es difícil la

revitalización de las hifas, aunque se pueden añadir lioprotectores como suero, leche desnatada, inositol, glicerol, trehalosa y peptona al medio de suspensión para reducir los daños (Ryan y Smith, 2004). Se recomienda que si la cepa es para uso industrial se empleen métodos de conservación a largo plazo, como la liofilización y la criopreservación en nitrógeno líquido desde -140 a -196 °C, que preservan la estabilidad genética; aunque, debido a su alto costo, no se pueden implementar en laboratorios con recursos limitados (Gato, 2010; Ryan *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Para la obtención de cepas puras con fines industriales se pasa por cuatro etapas: aislamiento, identificación, caracterización y conservación. En el aislamiento se debe emplear medios adecuados para garantizar la obtención de cultivos axénicos. En la identificación, los métodos tradicionales de observación colonial y miceliar arrojan resultados ambiguos, por ende, los métodos más fiables son los de biología molecular. La caracterización va muy ligada a la óptima identificación, ya que se pueden otorgar propiedades a una cepa o especie de forma errónea, generando resultados indeseados en sus aplicaciones. Finalmente, la conservación es un Punto Crítico de Control (PCC) porque influye en la integridad fenotípica y genómica de la cepa, poniendo en juego la viabilidad económica de la empresa que le haya adquirido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelin, E., Servy, C., Martin, M.-T., Arcile, G., Iorga, B. I., Retailleau, P., ... Ouazzani, J. (2014). Bicyclic and tetracyclic diterpenes from a *Trichoderma* symbiont of *Taxus baccata*. *Phytochemistry*, *97*, 55–61. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.016>
- Arango, M., Ordoñez, N., Castañeda, E., & Restrepo, A. (1988). *Manual Hongos contaminantes del laboratorio*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud y Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Bailey, B., Bae, H., Strem, M., Roberts, D., Thomas, S., Crozier, J., ... Holmes, K. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four

- Trichoderma* species. *Planta*, 224(6), 1449–164. <http://doi.org/10.1007/s00425-006-0314-0>
- Baldwin, J. E., Bansal, H. S., Chondrogianni, J., Field, L. D., Taha, A. A., Thaller, V., ... Taylor, A. (1985). Biosynthesis of 3-(3'-isocyanocyclopent-2-enylidene) propionic acid by (*bon.*) bain. aggr. *Tetrahedron*, 41(10), 1931–1938. [http://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96556-1](http://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96556-1)
- Barnet, H. L., & Hunter, B. B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Mycologia*, 64(4), 930–932. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3757954>
- Barnet, H. L., & Hunter, B. B. (1978). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (5th ed.). New York: MacMillan Pub. Company.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Piaggieschi, G., Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2016). Draft Whole-Genome Sequence of *Trichoderma gamsii* T6085, a Promising Biocontrol Agent of Fusarium Head Blight on Wheat. *Genome Announc.*, 4(1), e01747–15. <http://doi.org/10.1128/genomeA.01747-15>
- Bissett, J. (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62(5), 924–931. <http://doi.org/10.1139/b84-131>
- Bissett, J. (1991). Una revisión del género *Trichoderma*. III. sección Pachybasium. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2373–2417. <http://doi.org/10.1139/b91-298>
- Chai, S. Y., Abu Bakar, F. D., Mahadi, N. M., & Murad, A. M. A. (2016). A thermotolerant Endo-1,4- β -mannanase from *Trichoderma virens* UKM1: Cloning, recombinant expression and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 125, 49–57. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.12.011>
- Chen, L., Liu, Y.-T., Song, B., Zhang, H.-W., Ding, G., Liu, X.-Z., ... Zou, Z.-M. (2014). Stereochemical determination of new cytochalasans from the plant endophytic fungus *Trichoderma gamsii*. *Fitoterapia*, 96, 115–122. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.04.009>
- Chet, I. (1987). *Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In I. Chet (Ed.), *Innovative approaches to plant disease control* (pp. 137–160). New York: Wiley. <http://doi.org/10.1086/416163>
- Clavijo, A., & Cotes, A. M. (1998). Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de rhizoctonia solani y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(2), 58–66. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4808934>
- Clutterbuck, A. J. (2004). Stability and Instability of fungal genomes. In D. K. Arora (Ed.), *Handbook of Fungal Biotechnology* (2nd ed., pp. 69–80). New York: Marcel Dekker, Inc. Retrieved from http://fmedicine.ajums.ac.ir/_fmedicine/documents/Handbook_of_fungal_biotechnology_20130416_093503.pdf
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. In A. Fiechter (Ed.), *History of Modern Biotechnology I* (1st ed., pp. 1–39). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol*, 42(10), 813–828. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.007>
- Druzhinina, I. S., & Kubicek, C. P. (2016). Chapter Two – Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. *Advances in Applied Microbiology*, 95, 69–147. <http://doi.org/10.1016/bs.aams.2016.02.001>
- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2(2), 149–160.
- Faull, J. L., Graeme-Cook, K. A., & Pilkington, B. L. (1994). Production of an isonitrile antibiotic by an UV-induced mutant of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry*, 36(5), 1273–1276. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89649-1](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89649-1)

- Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In G. Harman & C. Kubicek (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium, Enzymes, biological control and commercial applications* (2nd ed., pp. 1–34). London: Taylor & Francis.
- Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Revista Fitosanidad*, 14(3), 189–195.
- Gato, Y., Rodríguez, D., & Elósegui, O. (2009). *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34: Métodos de conservación y evaluación de sus formulados. Universidad de La Habana.
- Ghisalberti, E. L., & Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(11), 1011–1020. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90036-J](http://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90036-J)
- Grinyer, J., Kautto, L., Traini, M., Saucés, R. D., Junior, T., Bergquist, P., & Nevalainen, H. (2007). Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. *Current Genetics*, 51(2), 79–88. <http://doi.org/10.1007/s00294-006-0108-8>
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L., ... Lorito, M. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 87–96. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*, 2(1), 43–56. <http://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432. <http://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism [mdash] from biochemistry to genomics. *Nat Rev Micro*, 3(12), 937–947. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Kobayashi, M., Uehara, H., Matsunami, K., Aoki, S., & Kitagawa, I. (1993). Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marine sponge *Micale cecilia*. *Tetrahedron Letters*, 34(49), 7925–7928. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61513-7](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61513-7)
- Kremnický, L., Mastihuba, V., & Côté, G. L. (2004). *Trichoderma reesei* acetyl esterase catalyzes transesterification in water. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(5), 229–239. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.05.007>
- Kubicek, C., Komon-Zelazowska, M., & Druzhinina, I. (2008). Fungal genus *Hypocrea* / *Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9(10), 753–763. <http://doi.org/10.1631/jzus.B0860015>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ... Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), 1–15. <http://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., & Börner, T. (1995). PCR-fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiol Res.*, 150(4), 363–371. [http://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80017-0](http://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80017-0)
- Lang, B.-Y., Li, J., Zhou, X.-X., Chen, Y.-H., Yang, Y.-H., Li, X.-N., ... Zhao, P.-J. (2015). *Koninginins L and M, two polyketides from Trichoderma koningii* 8662. *Phytochemistry Letters* (Vol. 11).
- Larralde-Corona, C. P., Santiago-Mena, M. R., Sifuentes-Rincón, A. M., Rodríguez-Luna, I. C., Rodríguez-Pérez, M. A., Shirai, K., & Narváez-Zapata, J. A. (2008). Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 167–177. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1532-0>

- Li, G.-H., Yang, Z.-S., Zhao, P.-J., Zheng, X., Luo, S.-L., Sun, R., ... Zhang, K.-Q. (2011). *Three new acorane sesquiterpenes from Trichoderma sp. YMF1.02647. Phytochemistry Letters* (Vol. 4).
- Liang, X.-R., Miao, F.-P., Song, Y.-P., Liu, X.-H., & Ji, N.-Y. (2016). Citrinovirin with a new norditerpene skeleton from the marine algicolous fungus *Trichoderma citrinoviride*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.093>
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K., & Muthumeenakshi, S. (1998). *Molecular taxonomy of Trichoderma and Gliocladium and their teleomorphs*. London: Taylor and Francis.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H., & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl Environ Microbiol*, 65(6), 2418–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347022>
- Liu, S.-Y., Liao, C.-K., Lo, C.-T., Yang, H.-H., Lin, K.-C., & Peng, K.-C. (2016). Chrysophanol is involved in the biofertilization and biocontrol activities of *Trichoderma*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 96, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.06.003>
- Martin, J. P. (1950). Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci*, 69(3), 215–232. <http://doi.org/10.1097/00010694-195003000-00006>
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., ... Westerholm-Parvinen, A. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*, 26, 553 – 560. <http://doi.org/10.1038/nbt1403>
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 105–129. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- New, A. P., Eckers, C., Haskins, N. J., Neville, W. A., Elson, S., Hueso-Rodríguez, J. A., & Rivera-Sagredo, A. (1996). Structures of polysporins A-D, four new peptaibols isolated from *Trichoderma polysporum*. *Tetrahedron Letters*, 37(17), 3039–3042. [http://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00463-7](http://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00463-7)
- Penttila, M., Limón, C., & Nevalainen, H. (2004). Molecular Biology of *Trichoderma* and Biotechnological Applications. In D. K. Arora (Ed.), *Mycology, Handbook of Fungal Biotechnology* (2nd ed., pp. 412–426). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Ren, J., Yang, Y., Liu, D., Chen, W., Proksch, P., Shao, B., & Lin, W. (2013). *Sequential determination of new peptaibols asperelines G-Z12 produced by marine-derived fungus Trichoderma asperellum using ultrahigh pressure liquid chromatography combined with electrospray-ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* (Vol. 1309).
- Respinis, S. De, Vogel, G., Benagli, C., Tonolla, M., Petrini, O., & Samuels, G. J. (2010). MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, 9(1), 79–100. <http://doi.org/10.1007/s11557-009-0621-5>
- Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F., & Lorito, M. (2004). 9 – Genomics of *Trichoderma*. In *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 4, pp. 225–248). [http://doi.org/10.1016/S1874-5334\(04\)80012-1](http://doi.org/10.1016/S1874-5334(04)80012-1)
- Rifai, M. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116(1), 1–56.
- Ruiz, N., Wielgosz-Collin, G., Poirier, L., Grovel, O., Petit, K. E., Mohamed-Benkada, M., ... Pouchus, Y. F. (2007). New Trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides*, 28(7), 1351–1358. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.05.012>
- Ryan, M. J., & Smith, D. (2004). Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. *Mycological Research*, 108(12), 1351–1362. <http://doi.org/10.1017/S0953756204001650>
- Ryan, M. J., Smith, D., & Jeffries, P. (2000). A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(2), 183–186. <http://doi.org/10.1023/A:1008910006419>
- Sánchez López, V., Martínez Bolaños, L., Zavala González, E. A., & Ramírez Lepe, M. (2012). Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes

- ecosistemas. *Revista Mexicana de Micología*, 36, 17–26. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802012000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Saravanakumara, K., Raju, V., Boopathy, N. S., Li, Y., Kandasamy, K., & Chen, J. (2015). Anticancer potential of bioactive 16-methylheptadecanoic acid methyl ester derived from marine *Trichoderma*. *Journal of Applied Biomedicine*, 13(3), 199–212. <http://doi.org/10.1016/j.jab.2015.04.001>
- Smith, D., & Ryan, M. J. (2004). Current status of fungal collections and their role in biotechnology. In D. K. Arora (Ed.), *Handbook of Fungal Biotechnology* (2nd ed., pp. 527–538). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Species Fungorum. (2016). Index Fungorum. Retrieved September 4, 2016, from <http://www.speciesfungorum.org/>
- Suárez, M. B., Sanza, L., Chamorro, M. I., Rey, M., González, F. J., Llobell, A., & Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*: Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, 42(11), 924–934. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.08.002>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28(10), 2731–2739. <http://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Thongram, K., Sarangthem, I. D., Gourshyam, T., & Bharat, G. S. (2013). Genetic diversity and species pattern of *Trichoderma* and *Hypocrea* in Manipur using in silico analysis. *Bioinformatics*, 9(2), 106–111. <http://doi.org/10.6026 / 97320630009106>
- Tseng, S.-C., Liu, S.-Y., Yang, H.-H., Lo, C.-T., & Peng, K.-C. (2008). Proteomic Study of Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in Response to *Rhizoctonia solani*. *J. Agric. Food Chem.*, 56(16), 6914–6922. <http://doi.org/10.1021/jf703626j>
- Valiño, E. C., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T., & Albelo, N. (2004). Mejoramiento de la composición del bagazo de caña de azúcar por la cepa *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor de Fermentación en Estado Sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(2), 145–153. https://www.researchgate.net/profile/Verena_Torres/publication/237028159_Mejoramiento_de_la_composicin_del_bagazo_de_caa_de_azcar_por_la_cepa_Trichoderma_viride_M5-2_en_un_biorreactor_de_fermentacin_en_estado_slido/links/54e5d1fe0cf2cd2e028b33c2.pdf
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1–20. <http://doi.org/10.1016 / j.bej.2007.05.012>
- Wada, S., Iida, A., Asami, K., & Fujita, T. (1996). Ion channel-forming property of trichorovin-XII, an 11-residue peptaibol from the fungus *Trichoderma viride*, in planar lipid bilayer membranes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(19), 2275–2278. [http://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00410-6](http://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00410-6)
- Wang, Y., Gao, B. L., Li, X. X., Zhang, Z. Bin, Yan, R. M., Yang, H. L., & Zhu, D. (2015). Phylogenetic diversity of culturable endophytic fungi in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff), detection of polyketide synthase gene and their antagonistic activity analysis. *Fungal Biology*, 119(11), 1032–1045. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.07.009>
- Yang, D., Pomraning, K., Kopchinskiy, A., Aghchegh, R. K., Atanasova, L., Chenthamara, K., ... Druzhinina, I. S. (2015). Genome Sequence and Annotation of *Trichoderma parareesei*, the Ancestor of the Cellulase Producer *Trichoderma reesei*. *Genome Announc.*, 3(4), e00885–15. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00885-15>
- Yao, L., Tan, C., Song, J., Yang, Q., Yu, L., & Li, X. (2016). Isolation and expression of two polyketide synthase genes from *Trichoderma harzianum* 88 during mycoparasitism. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 468–479. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.004>
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of

- Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, 101, 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.006>
- Yu, H., Li, W.-X., Wang, J.-C., Yang, Q., Wang, H.-J., Zhang, C.-C., ... Zhu, H.-J. (2015). Pestalotiopsis C, stereochemistry of a new caryophyllene from a fungus of *Trichoderma* sp. and its tautomerization characteristics in solution. *Tetrahedron*, 71(21), 3491–3494. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2015.03.063>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), 74–90. <http://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., ... Li, C. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100, 64–74. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.017>