

Respuesta a estrés en mutantes de *Trichoderma*, afectadas en genes codificantes para proteínas efectoras

Gudiño-Vallejo Samantha, Nava-Marmolejo María Fernanda, Ibarra-Chavira Juan Mauricio, Vargas-Gasca Francisco y Olmedo-Monfil Vianey*

División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México

*vg.olmedo@ugto.mx

Resumen

El género *Trichoderma* incluye hongos filamentosos, que habitan de manera común el suelo y que establecen asociaciones benéficas, con las plantas. Les confieren mayor disponibilidad de nutrientes, promueven su crecimiento y activan las vías de defensa vegetal a través de las fitohormonas (ácido salicílico y jasmónico). Además, las protegen de varios patógenos, mediante su actividad micoparasítica. Nuestro laboratorio se enfoca en estudiar, a nivel molecular, el establecimiento de esta asociación benéfica planta-*Trichoderma*. Hemos descrito algunas proteínas, conocidas como efectores, que son liberadas por el hongo y que tienen un papel importante en modular el proceso de asociación con la planta. Estamos identificando nuevas proteínas efectoras, a partir de datos transcriptómicos y se pretende determinar su función biológica durante la asociación con la planta, así como el posible papel que puedan desempeñar en la fisiología de *Trichoderma*, bajo distintas condiciones de estrés tanto biótico como abiótico. Para esto hemos generado cepas mutantes en los genes *TaMC* y *TaCN*, codificantes para proteínas candidatas a funcionar como efectores y como parte de su caracterización, en este trabajo hemos analizado su respuesta ante estrés abiótico (salino/osmótico y daño a la membrana) y ante la presencia de hongos fitopatógenos (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*) como una condición de estrés biótico, los resultados preliminares indican que las cepas mutantes del gen *TaMC* y *TaNC* presentan una disminución en el comportamiento micoparasítico en comparación a la cepa silvestre, así como una ligera disminución en la resistencia a las tres condiciones de estrés abiótico probadas (osmótico, de membrana y nutricional).

Palabras clave: endófito; biocontrol; estrés.

Introducción

Las plantas son consideradas la base de las cadenas tróficas y están expuestas a las condiciones ambientales que prevalecen en los sitios donde crecen, así como a la presencia de agentes patógenos y plagas que disminuyen su crecimiento, vigor y productividad. En particular en cultivos agrícolas es importante controlar las enfermedades para garantizar el abasto de productos de consumo humano y de ganado (FAO, 2019). Entre los organismos que afectan negativamente a las plantas se encuentran bacterias, hongos e insectos. Para el control de estos organismos nocivos se recurre con frecuencia al uso de diversos compuestos químicos, pero su uso indiscriminado genera daños al ambiente, y serías complicaciones crónicas a la salud humana (Kim, *et al.*, 2017). El control biológico, implica el uso de otros organismos capaces de controlar o eliminar a los agentes patógenos y representa una alternativa para reducir el impacto negativo de los plaguicidas, proporcionando protección a los cultivos. En el caso particular de enfermedades causadas por hongos se encuentran los géneros *Sclerotium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, y *Fusarium spp.*, que afectan una amplia variedad de cultivos vegetales y sobre los que se ha probado el control biológico ejercido por hongos filamentosos del género *Trichoderma* (Mukherjee *et al.*, 2012). Estos hongos biocontroladores están ampliamente distribuidos en todo el mundo por su capacidad para adaptarse a distintos ecosistemas, aunque se ven favorecidos en ambientes húmedos con temperaturas de 25-30°C y pH 4.5 a 6.8 (Singh *et al.*, 2014). Entre los mecanismos de control que presenta *Trichoderma* está el micoparasitismo, es decir el antagonismo contra otro hongo; la antibiosis, produciendo antibióticos o metabolitos tóxicos sobre otro microorganismo sensible a éstos; la competencia directa por el espacio y nutrientes; y la degradación de componentes estructurales de la pared celular de los fitopatógenos, mediante la producción de enzimas quitinasas y proteasas. Adicionalmente, de manera relativamente reciente, se ha reportado el comportamiento del *Trichoderma* como un endófito, capaz de establecer asociación con las raíces de las plantas, estimulando la germinación, incrementando el crecimiento y mejorando la activación de las respuestas de defensa (Schuster & Schmoll, 2010). En conjunto, el efecto benéfico de *Trichoderma* sobre las plantas se da a través de dos

flancos; por la eliminación/control de los fitopatógenos y por la asociación directa con el tejido vegetal. La figura 1 muestra de manera general la interacción de *Trichoderma* con plantas y con hongos fitopatógenos, resaltando los efectos sobre el balance de hormonas vegetales, el crecimiento de la planta y la activación de vías de defensa, a través de la producción de fitohormonas, principalmente ácido jasmónico y salicílico.

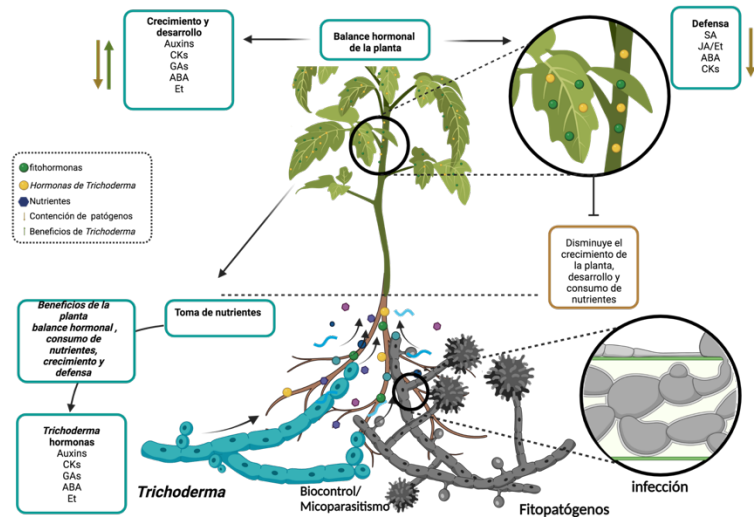


Figura 1. Interacción tripartita entre una planta con *Trichoderma* spp. (azul) con hongos fitopatógenos (gris), resaltando la actividad micoparasítica y el efecto sobre la planta en la toma de nutrientes, producción de hormonas involucradas en crecimiento y desarrollo vegetal (Auxinas, GAs, ABA) y en la defensa de la planta (SA, JA, Et). Esquema tomado y modificado de Ramírez-Valdespino et. al., 2019

Los mecanismos que utiliza *Trichoderma* para establecer la interacción benéfica con las plantas aún se desconocen en gran medida, una de las principales preguntas a responder es cómo se lleva a cabo la comunicación molecular entre *Trichoderma* y la planta para que suceda la asociación. Se propone la participación de efectores como elementos clave en estas interacciones, tal como ocurre en las micorrizas o en los nódulos fijadores de nitrógeno. Los efectores son descritos como moléculas no estructurales, derivadas de microorganismos que tienen una función moduladora de las vías de defensa vegetal y/o participando en el establecimiento de asociaciones con las plantas (Ramírez-Valdespino et al., 2019). A partir del análisis de genomas completos de tres especies de *Trichoderma*, se propuso un catálogo de proteínas con potencial para funcionar como efector, entre ellos se encuentra la hidrofobina TvHydii1 de *Trichoderma virens*, que ayuda a que las hifas se adhieran mejor a la raíces y puedan colonizarlas (Guzmán-Guzmán et al., 2017) y la proteína Tal6, de *Trichoderma atroviride*, para la cual se ha demostrado de manera experimental su función como efector, protegiendo a las hifas del hongo durante la interacción con la planta y modulando la intensidad de la respuesta de defensa vegetal, lo que permite una mejor colonización de las raíces por parte de *T. atroviride* (Romero-Contreras et al., 2019). Una forma más directa de identificar efectores participando en el evento de asociación con las plantas es buscar genes que se encuentren activos justo en esa condición y es precisamente la información que podemos obtener de un transcriptoma. La eliminación de la función de un gen en particular y, por lo tanto, la ausencia del producto codificado por éste es una de las estrategias experimentales utilizadas para determinar su función biológica. El trabajo actual que se desarrolla en este grupo de trabajo se ha enfocado a analizar los datos disponibles de transcriptomas de *T. atroviride* en interacción con la planta modelo *Arabidopsis thaliana* o con maíz (Villalobos-Escobedo et al., 2020; Taylor et al., 2021), seleccionando nuevos candidatos para analizar su función como efectores y su relevancia en las características biológicas de *T. atroviride*, tales como su nivel de interacción con *A. thaliana*, su capacidad como micoparásito y su respuesta ante las condiciones abióticas que pudieran alterar su desarrollo. Contamos con cepas mutantes nulas para los genes candidatos *TaMC* y *TaCN*, que fueron seleccionados por que se predice en sus productos proteicos la presencia de dominios que les permitirían ser secretados por el hongo para llegar al tejido vegetal, así como por tener mayor cantidad de transcritos cuando el hongo se encuentra creciendo ante la presencia de las plantas, que cuando éste crece solo. Estudiar los procesos de la biología básica de *T. atroviride* nos permite un mayor entendimiento de su fisiología y abre la posibilidad de aplicar este conocimiento en nuevas estrategias de mejora en sus capacidades como biocontrolador y endófito de plantas.

Materiales y Métodos

Material biológico, medios de cultivo y selección de condiciones de estrés

Se utilizaron tres cepas de *Trichoderma atroviride*: silvestre (WT), mutante nula del gen TaMC ($\Delta tamc-3$) y mutante nula del gen TaCN ($\Delta tacn-9$) para observar su comportamiento fenotípico bajo distintas condiciones de estrés abiótico, así como su capacidad de antagonismo frente a dos especies de hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* AG5. Todas las cepas de *Trichoderma* y fitopatógenos se cultivaron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) durante 48 horas a 28° C para obtener dos pre-inóculos de cada cepa. Se realizaron dos réplicas biológicas con duplicado para cada condición. La delección de los genes en cada cepa fue previamente confirmada a nivel molecular.

Ensayos de estrés abiótico

Se aplicaron 5 distintos tratamientos de estrés abiótico a cada cepa: medio PDA como control, PDA + NaCl 0.3M (estrés osmótico), PDA + SDS 0.01% (estrés de membrana), MS 1X y MS 0.2X (estrés nutricional). Se inoculó cada medio con un bocado de 10 mm de micelio en crecimiento activo de cada cepa, incubándose a 28°C por cuatro días, tomándose medidas y registro fotográfico del crecimiento cada 24 horas hasta cumplidas las 96 horas para la mutante $\Delta tam-3c$ y hasta 72 horas para la mutante $\Delta tacn-9$.

Ensayos de estrés biótico

Para las interacciones *Trichoderma*-fitopatógeno se colocó de forma equidistante, en extremos de la caja Petri con medio PDA, un bocado de 10 mm de diámetro con micelio en crecimiento activo de cada hongo. Debido a su menor tasa de crecimiento, se inoculó al patógeno *F. oxysporum* con 24 horas de anticipación, a fin de igualar las condiciones de ambos hongos. Cada confrontación se realizó por duplicado. Se aplicaron 3 diferentes tratamientos para cada cepa: un control confrontando *Trichoderma-Trichoderma*, *Trichoderma-Fusarium oxysporum* y *Trichoderma-Rhizoctonia solani* AG5. Se dio seguimiento a los cultivos, tomando registro fotográfico hasta las 96 horas para la mutante $\Delta tamc-3$ y hasta 48 horas para la mutante $\Delta tacn-9$.

Resultados

Efecto de la mutación del gen TaMC sobre la respuesta al estrés abiótico en *T. atroviride*

El crecimiento del micelio en medio PDA comparado entre la cepa WT y la $\Delta tamc-3$ no mostró diferencias notables, sin embargo, al final de los tiempos de incubación observamos que la cepa $\Delta tamc-3$ tuvo una mayor formación de conidias, cubriéndose la mayor parte de la superficie del cultivo. Los ciclos de conidiación son poco delimitados y de pigmentación amarilla-verde (**fig.2**). Por otro lado, la cepa WT presenta un alto grado de formación de conidias en el centro, de pigmentación amarilla y con ciclos marcados. El crecimiento de la cepa WT fue similar al de la cepa $\Delta tamc-3$ en las primeras 24 horas, con una diferencia de solo 4 mm (**tabla 1**). A las 48 horas se registró una ventaja de 1 cm en la cepa WT con respecto a la mutante. Luego de 72 horas, la cepa WT ya había llegado al límite de su crecimiento, con una diferencia de 5 mm con la mutante. Bajo condiciones de estrés salino, ambas cepas se caracterizaron por la ausencia de conidiación, con micelio delgado y poco denso, carente de pigmentación. En la cepa WT se observaron halos de crecimiento definidos de entre 8 y 6 mm de ancho, mientras que en la cepa $\Delta tamc-3$ los halos son de entre 15 y 20 mm, presentando una pigmentación rosa pálido en la zona de inoculación (**fig. 2**). El crecimiento en ambas cepas se vio retardado en las primeras 24 horas de crecimiento (**tabla 1**). Transcurridas 48 horas el crecimiento de ambas fue similar, siendo ligeramente mayor para la cepa WT (+2mm). A las 96 horas se pudo observar una ventaja de 12 mm en el crecimiento de la cepa silvestre.

En el estrés de membrana con SDS 0.01%, se observaron los ciclos de conidiación en ambas cepas. Sin embargo, la cepa WT presentó ciclos separados físicamente por micelio no diferenciado, de pigmentación amarilla homogénea. En cambio, la cepa $\Delta tamc-3$ presentó dichos ciclos separados únicamente por la pigmentación, de alternancia amarilla y verde, pero no fue posible ver una separación física. A las 48 horas, ambas cepas presentaron crecimiento con micelio aéreo. El crecimiento radial de WT fue ligeramente mayor

que el de $\Delta tamc$ los primeros días de crecimiento. A las 72 horas la cepa WT tuvo una diferencia de 9mm en comparación con la cepa mutante.

Probamos medio MS, ya que es el medio de cultivo empleado para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y en el cual se llevan a cabo experimentos de interacción planta-*Trichoderma*, normalmente se usa la forma diluida 0.2X, para favorecer el evento de asociación endófito. En medio MS 1x, la cepa silvestre mostró ciclos de conidiación definidos, con una separación de 6-8mm y pigmentación predominantemente verde. Por otro lado, $\Delta tamc-3$ presentó un alto nivel de conidiación con ciclos definidos, pero sin separación entre ellos. El crecimiento fue notablemente mayor en la cepa silvestre desde las primeras 24 horas de crecimiento.

En medio MS 0.2x, la cepa silvestre presentó sólo 3 ciclos de conidiación con una separación de entre 10-13mm de ancho y con una pigmentación verde con amarillo en las orillas. El micelio en ambas cepas fue poco denso desde el inicio del crecimiento. La cepa mutante presentó más ciclos de conidiación, de mayor grosor y con menor separación entre ellos, así como una pigmentación verde opaco y amarillo en su mayoría.

Tabla 1. Crecimiento radial promedio en centímetros (cm) de las cepas WT y $\Delta tamc-3$ bajo diversas condiciones de estrés abiótico.

	Control		NaCl		SDS		MS 1x		MS 0.2x	
	WT	$\Delta tamc$	WT	$\Delta tamc$	WT	$\Delta tamc$	WT	$\Delta tamc$	WT	$\Delta tamc$
24 hrs	2.80	2.40	1.00	1.00	1.60	1.40	2.05	1.55	1.90	2.40
48 hrs	6.30	5.20	2.15	1.90	3.00	2.90	4.15	2.70	4.40	4.00
72 hrs	8.00	7.65	3.60	2.90	4.50	3.95	6.25	3.50	7.10	6.35
96 hrs	8.00	8.00	5.40	4.20	6.20	5.30	8.00	4.65	8.00	8.00

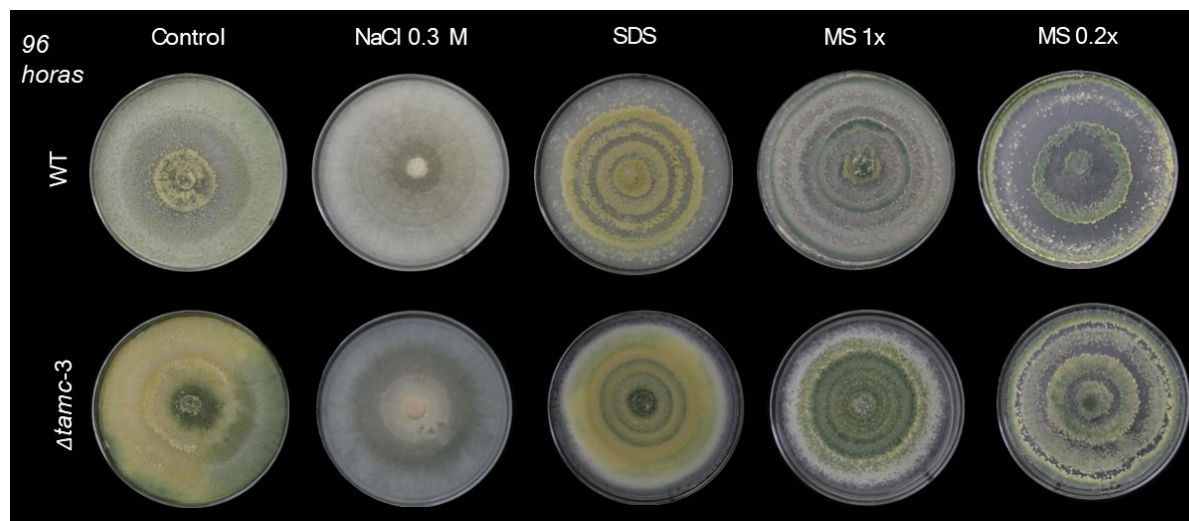


Figura 2. Respuesta al estrés abiótico de las cepas WT y $\Delta tamc-3$. Fotografías representativas de los cultivos a las 96 de incubación. Obsérvese que la mutante presenta mayor conidiación que la cepa silvestre en la condición control, y una menor separación de los ciclos de formación de conidias tanto en estrés de membrana como en limitación nutricional.

Efecto de la mutación del gen TaMC sobre la capacidad antagónica de *T. atroviride*

Al realizar los cultivos duales en confrontación directa hongo-hongo, observamos que la cepa WT presentó un crecimiento mayor durante su reto con *R. solani* (fig.3), ocupando más de la mitad de la superficie del medio de cultivo con relación al fitopatógeno. En la línea de contacto de ambos hongos se observó una franja delgada de micelio blanco de aparente mayor densidad, lo que indica el sobrecrecimiento de *Trichoderma* (fig 4A). El micelio cercano a la línea de contacto es poco denso y muestra signos del inicio de la conidiación. Por otra parte, la cepa $\Delta tamc-3$ tuvo un menor crecimiento frente a *R. solani* en comparación con la cepa silvestre. Fue posible apreciar una franja de aproximadamente 5 mm de ancho donde el crecimiento fue reducido. Bajo el estereoscopio se observó que el micelio de la cepa mutante es de muy poca densidad. Esta disminución de grosor del micelio se incrementó cuanto más cerca se encontraba del fitopatógeno. Adicionalmente, la conidiación se observó con pigmentación amarilla. En ambos casos no se observó un cambio visible en el fenotipo de *R. solani*.

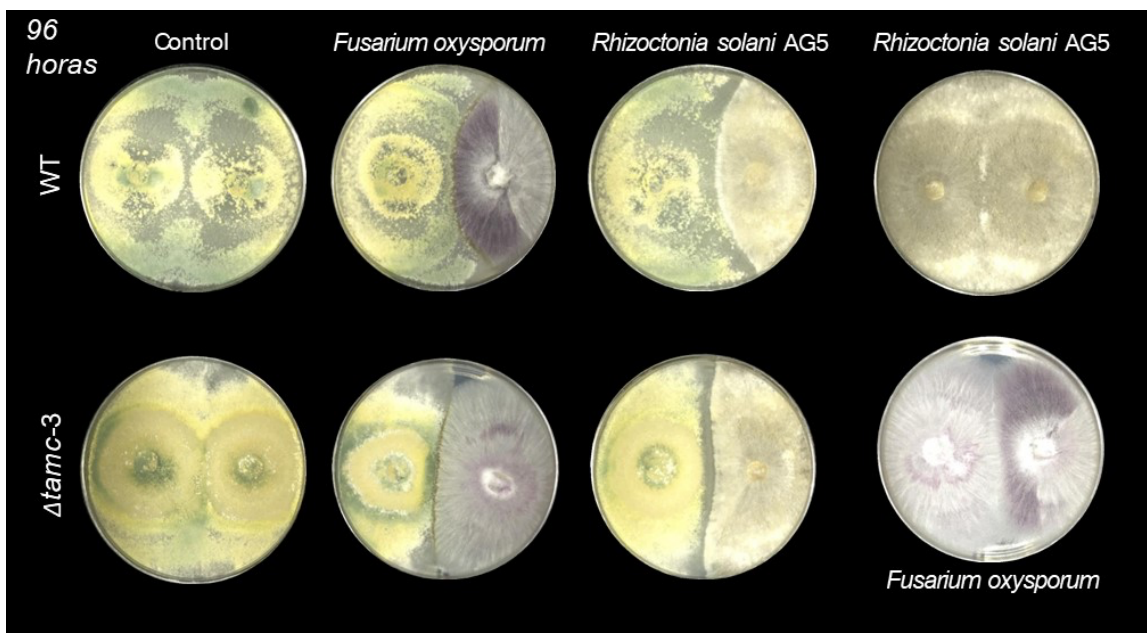


Figura 3. Respuesta al estrés biótico de las cepas WT y $\Delta tamc-3$. Fotografías representativas de los cultivos a las 96 de incubación. La mutante presentó un menor crecimiento frente a los patógenos en comparación con la cepa silvestre.

En la interacción con *F. oxysporum*, la cepa WT creció en más de la mitad de la superficie del medio de cultivo con relación al fitopatógeno. Se presentó una conidiación típica de la cepa (fig. 3). El micelio de la línea de contacto es estable, y puede observarse el sobrecrecimiento de *Trichoderma*, así como una coloración marrón en el micelio de *F. oxysporum*, contrastante con su típica coloración violácea/blanquecina (fig. 4B). En $\Delta tamc-3$ se observaron las mismas características en la línea de contacto que con la cepa WT, sin embargo, la mutante mostró crecimiento ligeramente menor al del patógeno.

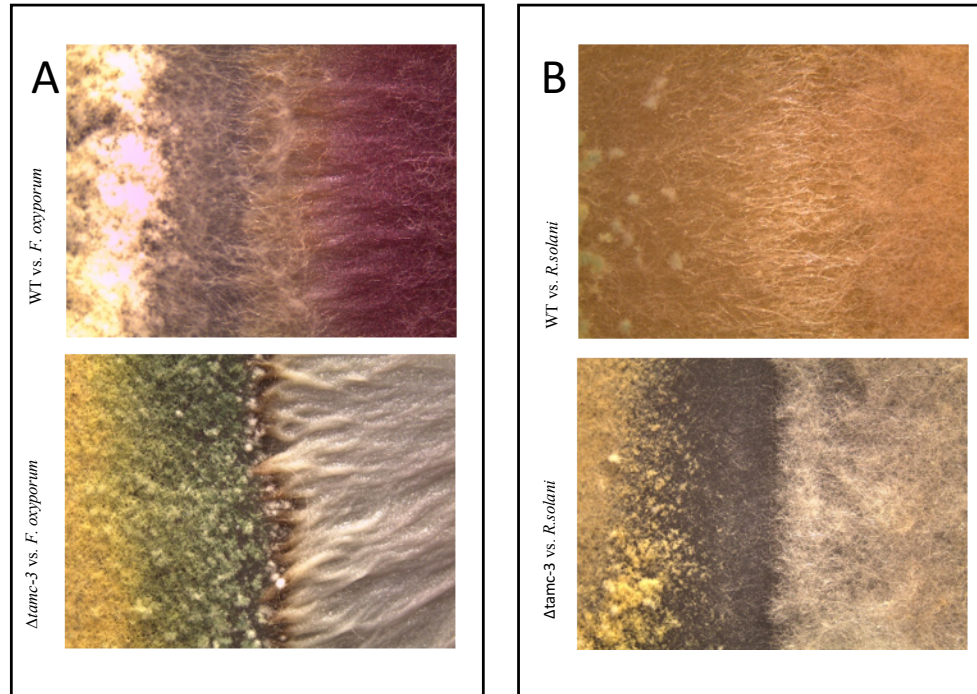


Figura 4. Microscopía de respuesta al estrés biótico de las cepas WT y $\Delta tamc-3$. Fotografías representativas de la línea de contacto de A) WT y $\Delta tamc-3$ frente a *R. solani* y B) WT y $\Delta tamc-3$ frente a *F. oxysporum*, donde se aprecia claramente la línea de contacto.

Efecto de la mutación del gen TaCN sobre la respuesta al estrés abiótico en *T. atroviride*

La confirmación molecular de la cepa mutante del gen *TaCN* aún se encontraba en proceso cuando se inició el proyecto, por lo que para este caso tuvimos menos tiempo disponible para llevar a cabo los análisis de sus respuestas fisiológicas. En las condiciones control en PDA, la cepa WT mostró un crecimiento ligeramente mayor sobre la cepa $\Delta tacn-9$, tras 48 horas de incubación. También se observó en la cepa mutante la formación de conidias blancas.

En el tratamiento de estrés salino tanto la cepa WT como la mutante $\Delta tacn-9$ mostraron retraso en su crecimiento a las 24 horas; en ambos casos tenían un diámetro de 1.2 cm, para seguir creciendo casi a la par a las 48 horas donde la WT tuvo una ventaja de 2 mm ante la cepa mutante. Ambos presentaron ciclos de conidiación blancos, pero con menor densidad que en el medio control de PDA.

En el medio con SDS la cepa WT presentó ciclos de conidiación con pigmentación blanca. En cambio, en la cepa $\Delta tacn-9$ se observaron conidias amarillas. El crecimiento de las cepas resultó ser mayor en la WT por 7.5 mm. Y en ambos casos se observó la presencia de micelio aéreo.

En medio MS 1x la cepa silvestre presentó ciclos de conidiación definidos de pigmentación verde y amarillo pálido, teniendo un diámetro menor que lo observado en el cultivo de PDA control. La cepa $\Delta tacn-9$ mostró ciclos de conidiación diferenciados ampliamente por la coloración de cada uno de ellos, además de que la densidad del micelio fue muy baja. Su crecimiento final a las 48 horas fue de 42 mm.

En medio MS 0.2x, la cepa silvestre presentó ciclos de conidiación con una separación de entre 10 mm de ancho y con una pigmentación verde con amarillo en las orillas. La densidad de las conidias fue muy baja al igual que su micelio. La cepa mutante presentó ciclos de conidiación de mayor grosor y densidad, sin ser separados físicamente por micelio aéreo, así como una pigmentación amarilla en su mayoría. La longitud del diámetro entre ambas cepas presentó una diferencia de 12.5 mm siendo la WT la de mayor tamaño. Estos datos pueden ser observados en la **tabla 2** y la **figura 5**.

Tabla 2. Crecimiento radial promedio en centímetros (cm) de las cepas WT y $\Delta tacn$ bajo diversas condiciones de estrés abiótico.

	Control		NaCl		SDS		MS 1x		MS 0.2x	
	WT	$\Delta tacn$	WT	$\Delta tacn$	WT	$\Delta tacn$	WT	$\Delta tacn$	WT	$\Delta tacn$
24 hrs	3.85	2.95	1.2	1.2	1.70	1.75	2.65	2.00	2.25	1.9
48 hrs	6.95	5.50	2.2	2.00	3.40	2.65	4.95	4.20	4.25	3.00

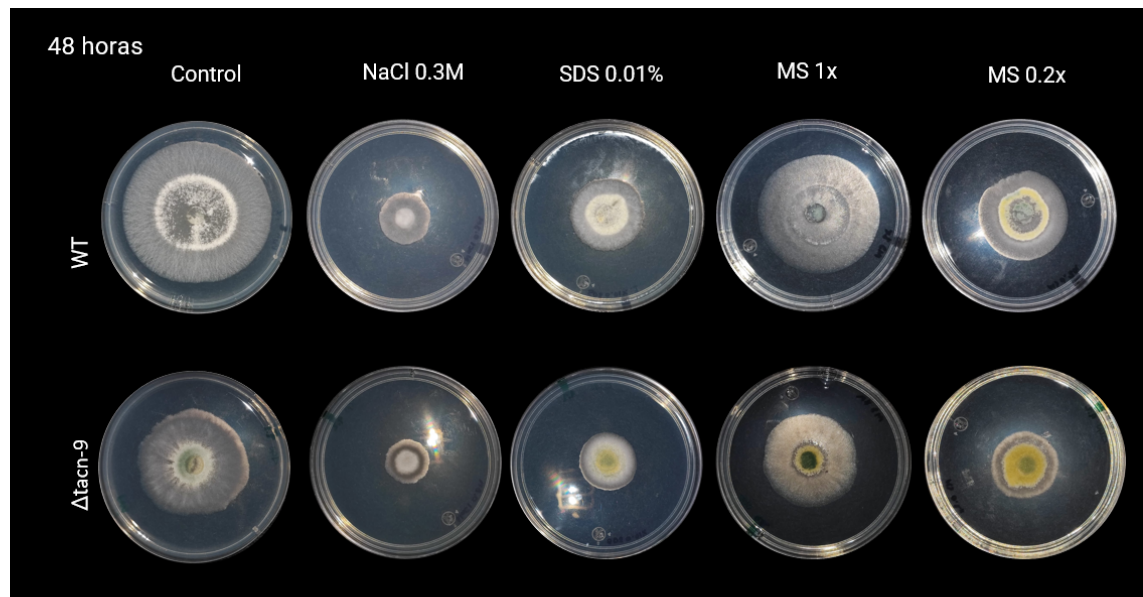


Figura 5. Respuesta al estrés abiótico de las cepas WT y $\Delta tacn-9$. Fotografías representativa de los cultivos tras 72 horas de incubación. Obsérvese el crecimiento retrasado en los medios con perturbaciones abióticas de la $\Delta tacn-9$ en comparación con la WT.

Efecto de la mutación del gen TaCn sobre la capacidad antagonista de *T. atroviride*

Probamos también la confrontación directa con los fitopatógenos y la cepa mutante $\Delta tacn-9$. Pudimos observar que tanto la cepa silvestre como la mutante $\Delta tacn-9$ presentaron mayor crecimiento que sus antagonistas en el espacio de la placa de Petri. La cepa WT mostró un crecimiento ligeramente mayor que la cepa mutante (**Fig. 6**). Ambas cepas, al estar en contacto con *F. oxysporum* generaron una línea café resultante de lo que se supone corresponde a la lisis celular (**Fig. 7 A**). Se pudo observar que la cepa WT limita en gran medida el crecimiento *R. solani*, como se evidencia en la forma de la colonia. Mientras que la cepa $\Delta tacn-9$ mostró menor capacidad para limitar al fitopatógeno, ya que ambas colonias de hongos parecen ocupar la mitad de la placa (**Fig. 6**). Además, se observó que el micelio de la cepa $\Delta tacn-9$ en contacto con *R. solani* fue menos denso que el micelio de la cepa WT en la zona de interacción (**Fig. 7 B**).

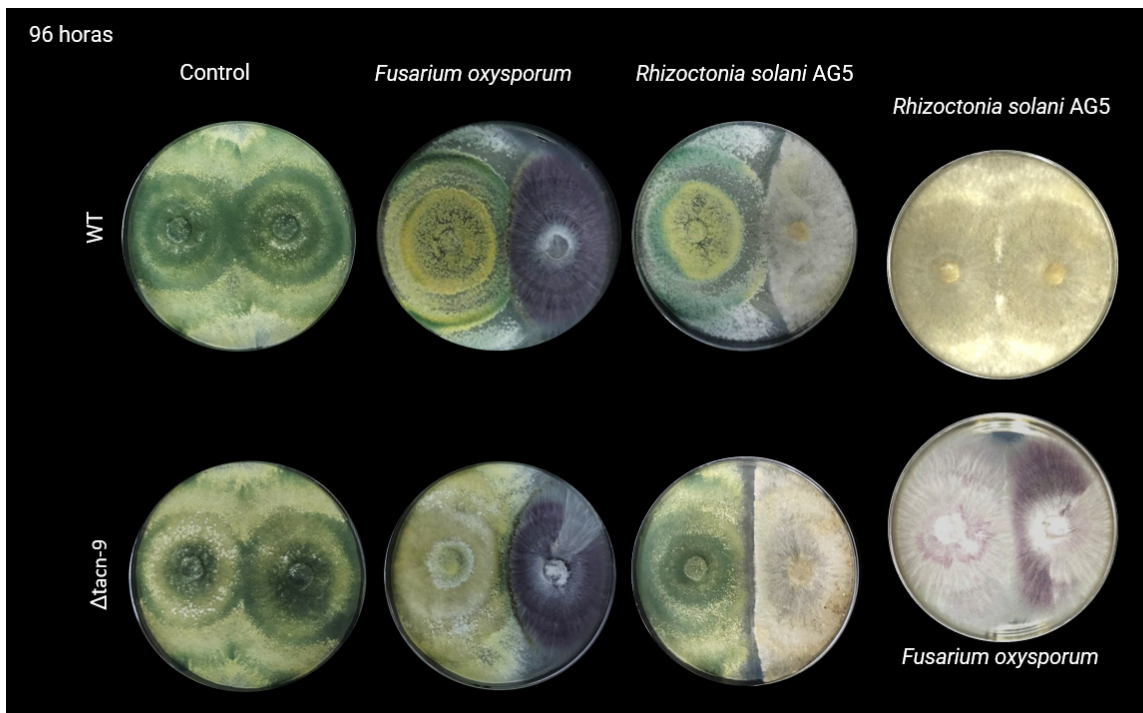


Figura 6. Respuesta al estrés biótico de la cepa WT y la Δ tacn-9 frente a *Rhizoctonia solani* AG5 y *Fusarium oxysporum*. Fotografía representativa de los cultivos tras 96 horas de incubación. El crecimiento de la WT y la Δ tacn-9 fue mayor a la de sus antagonistas.

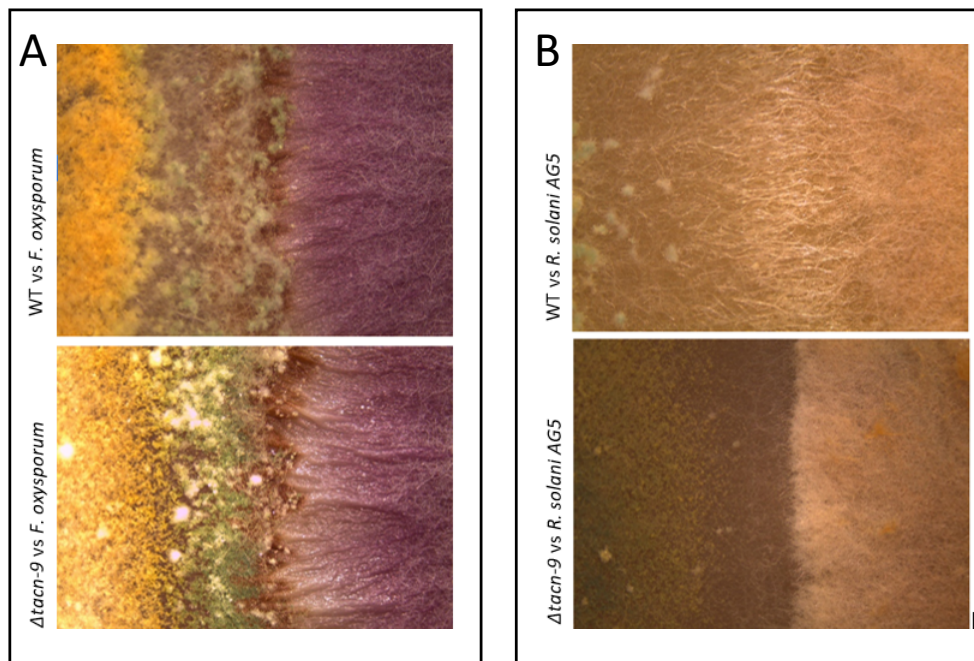


Figura 7. Microscopía de respuesta al estrés biótico de las cepas WT y Δ tacn-3. Fotografías representativas de la línea de contacto de A) WT y Δ tacn-3 frente a *R. solani* y B) WT y Δ tacn-3 frente a *F. oxysporum*, donde se aprecia claramente la línea de contacto.

Discusión

Las mutantes de *T. atroviride* presentan patrones de respuesta al estrés abiótico variados

Ha sido documentado que las especies de *Trichoderma* son capaces de disminuir los efectos del estrés abiótico en plantas. Amairaj *et al.* (2011) encontraron una correlación entre la capacidad protectora frente a estrés abiótico que ofrecen estos hongos a las plantas con la suya propia para resistirlo, por lo que puede decirse que *Trichoderma* presenta una importante resiliencia ante condiciones adversas.

Los ensayos de estrés abiótico mostraron, de forma preliminar, que las cepas mutantes nulas $\Delta tamc-3$ y $\Delta tacn-9$ poseen una menor resistencia a las condiciones probadas con respecto a la cepa silvestre de *T. atroviride*.

En la condición de estrés osmótico, $\Delta tamc-3$ muestra un ligero retraso en su crecimiento con respecto de la cepa silvestre, aunque esta última también tuvo un crecimiento más lento en comparación con el control. Se ha reportado que el estrés osmótico disminuye de forma significativa el crecimiento de *Trichoderma* (Amairaj *et al.*, 2011). En *Trichoderma harzianum* se ha visto que el estrés osmótico induce la expresión de un gen, cuyo homólogo en el modelo de estudio *Neurospora crassa* está encargado de suprimir la conidiación (Delgado-Jarana *et al.*, 2006), lo que podría explicar la ausencia de conidias. La cepa $\Delta tacn-9$ presenta el mismo comportamiento, con un crecimiento retrasado en relación con la cepa WT, y una ausencia de conidiación. La menor resistencia de las cepas mutantes $\Delta tamc-3$ y $\Delta tacn-9$ puede estar relacionada con la ausencia de los productos biológicos codificados por *TaMC* y *TaCN*. Todavía es necesario realizar un tratamiento estadístico a los datos para determinar si existe realmente una diferencia significativa en el crecimiento de ambas cepas mutantes y la cepa silvestre, y para el caso de la cepa $\Delta tacn-9$ es requerido más tiempo de experimentación para poder observar posibles variaciones fenotípicas más allá de las 48 horas de incubación. Es necesario señalar que la respuesta al estrés abiótico de la mutante $\Delta tacn-9$ fue determinada únicamente hasta las 48 horas, debido al tiempo invertido en las pruebas de confirmación molecular, aunque se espera que el crecimiento siga impactado de forma negativa luego de este período de incubación. Respecto al estrés de membrana, tanto la cepa WT como las cepas $\Delta tamc-3$ y $\Delta tacn-9$ mostraron crecimiento aéreo, por lo que el crecimiento radial se vio considerablemente retrasado. Durante las primeras 48 horas de incubación no se registró alguna diferencia importante entre las cepas. Sin embargo, a las 72 horas fue posible notar un incremento de tamaño en la cepa WT, y un retraso considerable para la mutante $\Delta tamc-3$. Además, en todas las cepas los ciclos de formación de conidias se marcaron de forma clara, registrándose más ciclos en la mutante $\Delta tamc-3$ que en la cepa silvestre. El SDS es un detergente capaz de formar poros en la membrana plasmática de las células. En levaduras, este agente detergente limita el crecimiento celular y desencadena la respuesta de integridad de la pared celular (Schroeder & Ikui, 2019). Es posible que estos mismos efectos se presenten también en hongos filamentosos, como es el caso de *T. atroviride*. A diferencia de la cepa $\Delta tacn-9$, la cepa $\Delta tamc-3$ mostró un crecimiento mayor en medio MS reducido (0.2x), aunque la densidad del micelio es relativamente baja. Este crecimiento acelerado, que duplica al registrado en MS completo (1x) puede deberse a que la ausencia de nutrientes lleva a la expansión de las hifas en búsqueda de nutrientes en los alrededores, mientras que en un medio rico el crecimiento es menor debido a que no es necesario expandirse para encontrar nutrientes. Dentro de esta misma condición de estrés se presentó una conidiación más rápida. El incremento en la tasa de formación de conidias puede deberse, en ambos casos, al pH ácido del medio MS, que favorece la conidiación en especies de *Trichoderma* (Steyaert *et al.*, 2010). Así mismo, la presencia abundante de nutrientes en el MS 1x puede contribuir al proceso de diferenciación celular, permitiéndole completarse de forma más eficaz y llevando a una conidiación más rápida.

Las mutantes de *T. atroviride* presentan un micoparasitismo atenuado contra *R. solani* AG5 y *F. oxysporum*

En una confrontación directa entre especies de *Trichoderma* y hongos fitopatógenos existen tres factores principales que componen el antagonismo: la competencia directa por el medio, la antibiosis y el micoparasitismo. *T. atroviride* es una especie más adaptada al uso del micoparasitismo que de la antibiosis. En los ensayos de estrés biótico es posible observar una disminución de la capacidad antagónica de ambas cepas frente a *R. solani* con respecto de la cepa WT, siendo más notorio para la cepa $\Delta tamc-3$. Esta misma cepa también tuvo una disminución de su capacidad antagónica contra *F. oxysporum*. Se puede sugerir que la ausencia de la proteína codificada por el gen *TaMC* tiene efectos en la capacidad antagónica mediada por

micoparasitismo. La mutante $\Delta tacn-9$ no muestra diferencias significativas en su interacción con *F. oxysporum* con respecto de la cepa silvestre, por lo que posiblemente el gen *TaCN* no juega un papel importante para el micoparasitismo sobre esta especie de fitopatógeno. Así mismo, la especie de fitopatógeno parece tener un efecto sobre la respuesta de ambas mutantes. *R. solani* parece conducir a una baja en la densidad del micelio que se encuentra en la zona de contacto en ambas mutantes, fenómeno no observado con la cepa WT, donde es posible ver el sobrecrecimiento de *T. atroviride*. Sin embargo, aunque la capacidad antagonica de $\Delta tamc-3$ contra *F. oxysporum* es ligeramente menor, no se presenta un adelgazamiento en el micelio del área de interacción, si bien el nivel de sobrecrecimiento es más bajo. La mutación parece entonces afectar el rendimiento de *T. atroviride* en particular contra *R. solani*, al parecer por una mayor susceptibilidad a las moléculas de defensa que pudiera producir el fitopatógeno.

Conclusión

De acuerdo con los datos experimentales, las cepas mutantes $\Delta tamc-3$ y $\Delta tacn-9$ de *T. atroviride* presentan una menor resistencia a las condiciones de estrés abiótico que la cepa WT, particularmente ante el estrés osmótico. La cepa $\Delta tamc-3$ exhibe un mejor crecimiento en reducción de nutrientes y, de forma preliminar, puede establecerse que tiene una resiliencia mayor al estrés abiótico que la cepa $\Delta tacn-9$, considerando la tendencia de crecimiento de esta última. De igual forma, la actividad micoparasítica de las cepas $\Delta tamc-3$ y $\Delta tacn-9$ resultó afectada negativamente, en especial para la cepa $\Delta tamc-3$, cuyo nivel de antagonismo se vio reducido con las dos especies de fitopatógenos probadas. Este fenómeno puede estar relacionado con la ausencia de los productos biológicos codificados por *TaMC* y *TaCN*. Es necesario replicar estas pruebas de estrés, así como realizar su comparación con cepas mutantes de los mismos genes que procedan de eventos de transformación independientes que nos permitan determinar la relevancia de ambos genes en la fisiología de *T. atroviride*.

Referencias

- Amalraj, L.D., Kumar, P., Desai, S., & Ahmed, M.H. (2011). *In vitro* Characterization of *Trichoderma viride* for Abiotic Stress Tolerance and Field Evaluation against Root Rot Disease in *Vigna mungo* L. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides* 2(3): 1-5. DOI=10.4172/2155-6202.1000111.
- Delgado-Jarana J, Sousa S, González F, Rey M, Llobell A. (2006). ThHog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 152(Pt 6):1687-1700. doi: 10.1099/mic.0.28729-0. PMID: 16735732.
- FAO. 2019. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M. I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A., and Olmedo-Monfil, V. (2017). Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genet.* 18:16. doi: 10.1186/s12863-017-0481-y.
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575:525-535.
- Mukherjee M., Mukherjee P.K., Horwitz B. A., Zachow C., Berg G., Zeilinger S. (2012). *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian J Microbiol* 52:522–529 DOI 10.1007/s12088-012-0308-5.
- Ramírez-Valdespino CA., Casas-Flores S. and Olmedo-Monfil V. (2019). *Trichoderma* as a Model to Study Effector-Like Molecules. *Front. Microbiol.* 10:1030. doi: 10.3389/fmicb.2019.01030.
- Romero-Contreras, Y.J., Ramírez-Valdespino, C.A., Guzmán-Guzmán, P., Macías-Segoviano, J.I., Villagómez-Castro, J.C. & Olmedo-Monfil, V. (2019). *Tal6* from *Trichoderma atroviride* is a LysM effector involved in mycoparasitism and plant association. *Front. Microbiol.* 10:2231.
- Schroeder, L., & Ikui, A. E. (2019). Tryptophan confers resistance to SDS-associated cell membrane stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, 14(3), e0199484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199484>
- Schuster, A. & Schmoll, M. (2010). Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbial Biotechnology.* 87: 787-799.

- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., & Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology and Mycology*, 3:127-134.
- Steyaert, J.M., Weld, R. & Stewart, A. (2010). Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biology* 114(2-3): 198-208.
- Taylor J.T., Ken-Der W., Horwitz B., Kolomiets M. and Kenerley C.M. (2021). Early Transcriptome Response of *Trichoderma virens* to Colonization of Maize Roots. *Front Fungal Biol.* 2: 718557. DOI=10.3389/ffunb.2021.718557.
- Villalobos-Escobedo J.M., Esparza-Reynoso S., Pelagio-Flores R., López-Ramírez F., Ruíz-Herrera L.F., López-Bucio J. and Herrera-Éstrella A. (2020). The fungal NADPH oxidase is an essential element for the molecular dialog between *Trichoderma* and *Arabidopsis*. *Plant J.* 103,2178–2192 doi: 10.1111/tbj.14891.