

# *Trichoderma:*

## *Cómo realizar una Identificación molecular de especies*

Por Domenico Pavone

Este artículo nace desde la necesidad que he visto en cursos y en el ámbito profesional de conocer cómo se debe realizar una correcta identificación molecular de especies de *Trichoderma*. La información aquí mostrada se basa en la experiencia de haber identificado molecularmente más de 300 aislados de *Trichoderma* y en las actualizaciones que a través de los años realiza encomiablemente la *International Commission on Trichoderma Taxonomy* (ICTT, <https://trichoderma.info/>). Espero que esta información sea relevante y oportuna para quienes hoy en día realizan la labor de identificar molecularmente este fascinante género de hongos.

### ¿Por qué es tan difícil identificar especies de *Trichoderma*?

Durante mucho tiempo, la delimitación taxonómica del género *Trichoderma* (fase asexual de *Hypocrea*, orden *Hypocreales*) dependió casi exclusivamente de la caracterización morfológica de sus estructuras conidiógenas (principalmente la arquitectura del conidióforo y la morfología de las fiálides) y la tasa de crecimiento *in vitro*. Sin embargo, este enfoque de simplificación estructural llevó a clasificaciones limitadas.

Hoy en día, la taxonomía moderna ha revelado que la morfología se queda corta en cuanto a la diferenciación de especies se refiere, debido a la homoplasia de los caracteres físicos y a la extrema simplicidad estructural de estos hongos. En este sentido, las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos han demostrado la existencia de complejos de especies crípticas (poblaciones que, a pesar de ser morfológicamente indistinguibles y compartir hábitats, constituyen linajes filogenéticamente independientes y reproductivamente aislados).

El caso más emblemático es el morfotipo *Trichoderma harzianum* sensu lato, que tras revisiones filogenéticas multilocus rigurosas, fue subdividido en al menos 14 especies distintas (tales como *T. afroharzianum*, *T. simmonsii*, *T. atrobrunneum*, *T. pyramidale* y *T. guizhouense*). La tipificación incorrecta de estas cepas puede acarrear graves consecuencias en la industria biotecnológica, la fitopatología y la propiedad intelectual.

Para resolver este desafío, la comunidad micológica internacional adoptó el Reconocimiento de Especies por Concordancia Genealógica (GCPSR). Formulado originalmente por Taylor et al. (2000), el GCPSR postula que la frontera de una especie se define en la transición de la concordancia entre ramas filogenéticas (aislamiento genético por deriva o selección) a la incongruencia dentro de las ramas (recombinación o flujo génico intraespecífico) de marcadores ortólogos y sus umbrales diagnósticos.

Para aplicar el GCPSR en *Trichoderma*, los investigadores determinaron que es obligatorio analizar tres marcadores moleculares de referencia (códigos de barras de ADN), cada uno con una función diagnóstica y una resolución evolutiva particular:

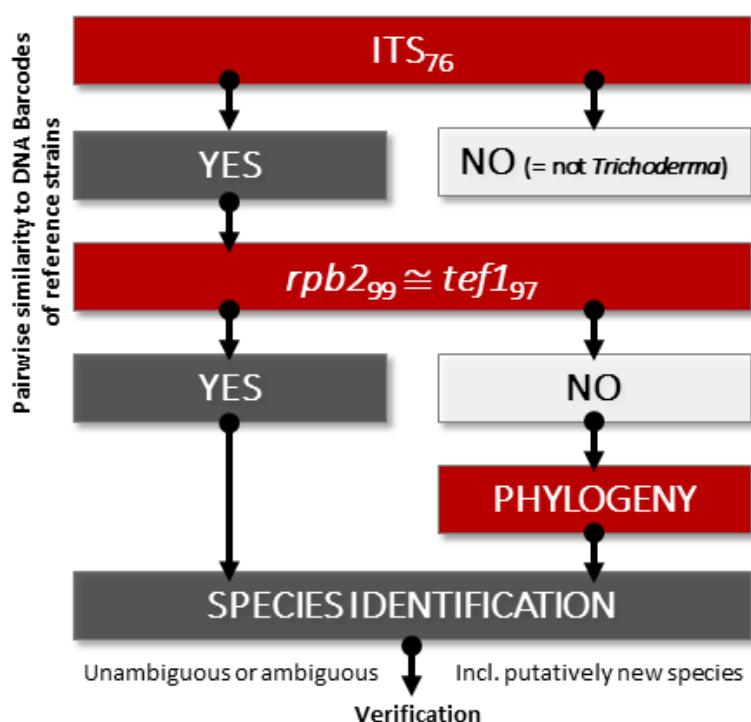
**Región ITS (Internal Transcribed Spacer):** En *Trichoderma*, una secuencia ITS que posea una similitud de 76% respecto a las cepas de referencia, confirma de manera inequívoca la asignación de la cepa al género. No obstante, debido a las tasas de mutación y la saturación de sitios homoplásicos, el locus ITS carece de suficiente resolución para discriminar entre especies hermanas, compartiendo idénticos filotipos en clados enteros.

**rpb2 (Subunidad II de la ARN Polimerasa):** Este gen codifica para la segunda subunidad más grande de la enzima ARN polimerasa II. Es un marcador ortólogo altamente conservado que permite estructurar la filogenia general y el esqueleto evolutivo del género. El

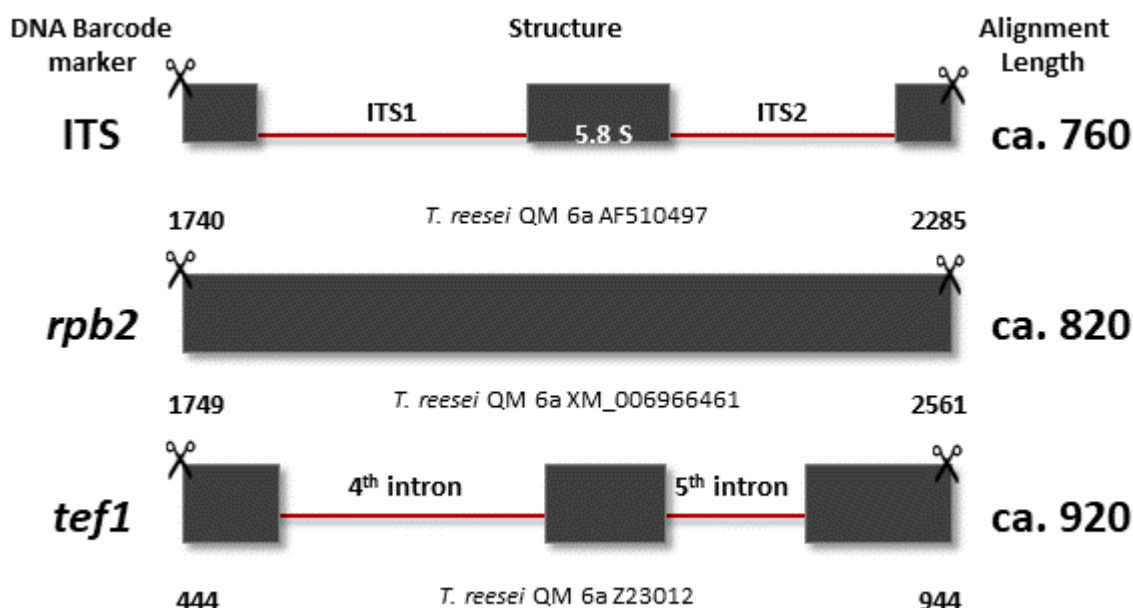
estándar molecular establece que una cepa pertenece a una especie existente conocida si comparte una similitud de 99% de la secuencia diagnóstica (aproximadamente 820 pb de longitud recortada) con la cepa ex-tipo.

**tef1 (Factor de Elongación de la Traducción 1-alfa):** Específicamente la región correspondiente al cuarto intrón largo. Debido a su alta tasa de polimorfismo, tef1 posee el mayor poder discriminatorio para separar especies estrechamente relacionadas en *Trichoderma*. El umbral de similitud para la asignación de especie es 97% en la secuencia diagnóstica (aproximadamente 920 pb de longitud recortada).

Una identificación a nivel de especie se considera robusta y unívoca únicamente si tanto rpb2 (99%) como tef1 (97%) apuntan de manera concordante al mismo taxón de referencia.



Flujograma para la identificación molecular de especies de *Trichoderma*. Imagen original en: <https://trichoderma.info/2021/04/26/molecular-identification-protocol-for-trichoderma/>.



Estructura de los loci de códigos de barras de ADN recortados para la identificación molecular. Los números debajo de cada locus muestran las posiciones 5' y 3' en el fragmento recortado adecuado para la identificación molecular utilizando loci de referencia de *T. reesei*/QM 6a (Druzhinina et al., 2005, 2010, Cai y Druzhinina, 2021).

Imagen y texto original en: <https://trichoderma.info/2021/04/26/molecular-identification-protocol-for-trichoderma/>.

## Protocolos y recomendaciones para Identificar especies de *Trichoderma*

Para obtener secuencias reproducibles que cumplan con los estándares exigidos por la ICTT, se debe seguir un riguroso protocolo analítico, algunos de estos detalles se mencionan a continuación:

### Cultivo monospórico

El crecimiento y extracción de ADN de la cepa a identificar debe realizarse a partir de un cultivo monospórico, es decir el aislado debe provenir del crecimiento de una única espora. Esto se realiza para garantizar la pureza genética y evitar aislados quiméricos ya que, debido a las semejanzas morfológicas, es posible que en un mismo aislado convivan dos o más especies. Al

provenir de una sola espora, se garantiza que hay una sola especie. Esencialmente, el protocolo usa suspensiones muy diluidas de esporas sembradas en placas de agar que luego de 16 a 24 horas es posible ver germinando al microscopio. Si las esporas germinando están lo suficientemente separadas entre sí, es posible cortar el pequeño trozo de agar que la contiene (solo una espora) y colocarlo en una placa de agar nueva para que continúe su crecimiento. No es recomendable utilizar fungicidas selectivos como el Rosa de Bengala en el medio de aislamiento, ya que inhiben drásticamente el desarrollo de especies raras. Si deseas conocer nuestro protocolo para obtener cultivos monospóricos, revisa el trabajo de [Pavone y Dorta 2012](#).

### Crecimiento y extracción de ADN

Una vez que tengamos nuestra cepa debemos hacerla crecer para que a partir de la biomasa podamos extraer el ADN. En nuestro caso lo hicimos a partir de biomasa (micelio) en caldo patata dextrosa con agitación orbital. Para la extracción de ADN, existen muchos protocolos en trabajos científicos y kits comerciales que facilitan el trabajo. Nosotros usamos el protocolo modificado de Aljanabi y Martínez (1997). Todos los detalles los puedes ver en [Pavone y Dorta 2012](#).

### Amplificación de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Con el ADN extraído y verificada su calidad por electroforesis en gel de agarosa, se procede a realizar la amplificación de los genes de interés en reacciones de PCR por separado. En nuestro caso, el producto de la extracción solía estar muy concentrado y a veces la PCR daba negativa. Para resolver esto, se puede diluir la muestra de ADN 1/10 a 1/50 ó inclusive hacer un paso de purificación adicional con cloroformo, fenol y alcohol isoamílico. Para las reacciones de PCR, se deben usar las instrucciones del kit que se haya adquirido para ello, utilizando los siguientes cebadores y condiciones de reacción para cada gen a amplificar:

| Iniciadores / Cebadores / Oligos / Primers                                               | Condiciones de reacción                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| ITS:<br>ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')<br>ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').        | 95 C x 3'<br>(95 C x 15" / 53 C x 15" / 72 C x 1') x 32 ciclos<br>72 C x 5' |
| rpb2:<br>fRPB2-5f (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3')<br>fRPB2-7cr (5'-CCCATRGCTTGTYRCCCAT-3'). | 95 C x 3'<br>(95 C x 15" / 58 C x 15" / 72 C x 1') x 32 ciclos<br>72 C x 5' |
| tef1:<br>EF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3')<br>EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3').          | 95 C x 3'<br>(95 C x 15" / 53 C x 15" / 72 C x 1') x 32 ciclos<br>72 C x 5' |

Cebadores y condiciones de reacción para la identificación molecular de especie de *Trichoderma*. Fuente: <https://trichoderma.info/2021/04/26/suggested-primers-for-trichoderma-diversity-research/>.

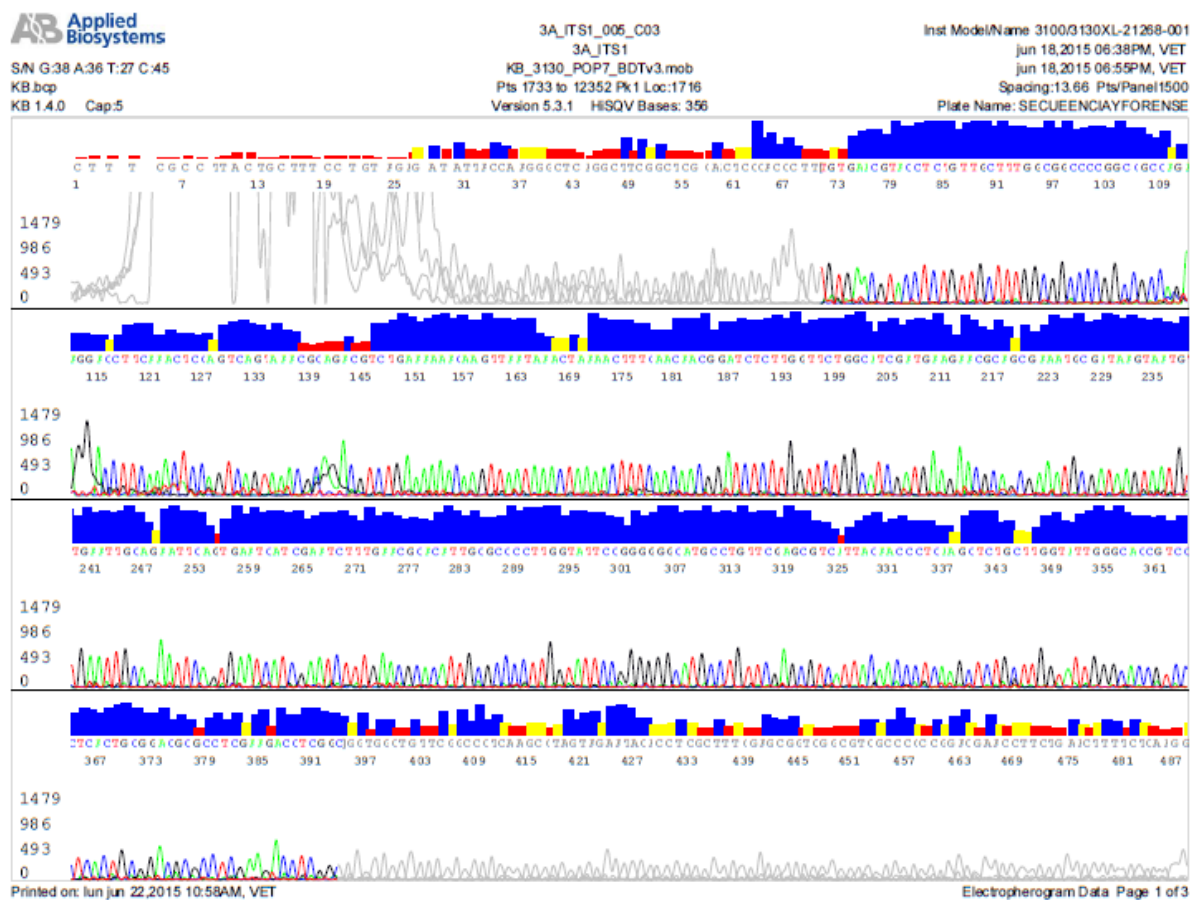
### Purificación del producto de PCR y secuenciación.

Antes de enviar a secuenciar tu producto de PCR, es de crucial importancia purificarlo. Adquiere un kit especial para ello, con el objeto de eliminar los restos de enzima, y otros componentes de la reacción que pudieran afectar el normal curso de la reacción de secuenciación.

Para la secuenciación escoja el servicio de su preferencia (si no posee en su centro un secuenciador) y pídale las instrucciones específicas de cómo debe enviar la muestra. Normalmente le pedirán los iniciadores que usó para hacer la PCR.

### Procesamiento de las secuencias: TrichoMARK

El laboratorio de secuenciación nos enviará el electroferograma y un archivo .txt con la secuencia obtenida. Tome en cuenta que es un error metodológico comparar secuencias crudas obtenidas directamente del secuenciador, dado que las regiones terminales de baja calidad falsean los alineamientos y distorsionan los porcentajes de similitud. Se debe recortar la secuencia al tamaño exacto de la región diagnóstica de referencia utilizando la herramienta bioinformática TrichoMARK.



```

>8_ITS1_H09.ab1
CATTACGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGTTT
CGACGGCCGCGGGGAGGCTTGCGCCCCCGGGCCCGCGCCGCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATG
CAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGATTCCG
GGGGGATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGA
CGGGCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTGTGATAGGCCGCGCG
GCGCCAGCCGACACCAACTTTATTTTCTAAGGTTGACCTCGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAG
  
```

Ln 1, Col 1 589 caracteres. Texto sin formato 100% Windows (CRLF) UTF-8

Electroferograma (arriba) y secuencia en formato .txt (abajo) de secuencias de *Trichoderma*. Imágenes de D. Pavone.

## ¿Por qué no se debe usar el Genbank del NCBI para comparar las secuencias de *Trichoderma*?

Uno de los errores más comunes es realizar una identificación automatizada mediante una búsqueda BLAST directa en GenBank (NCBI) utilizando una sola secuencia. Aproximadamente el 40% de las secuencias de *Trichoderma* depositadas en el repositorio público de NCBI contienen asignaciones específicas incorrectas. Esto se debe a depósitos históricos desactualizados (como cientos de secuencias rotuladas bajo el sinónimo obsoleto *Hypocrea lixii* que corresponden a *T. harzianum* o *T. afroharzianum*), o a identificaciones preliminares erróneas que nunca fueron corregidas tras las revisiones de los complejos de especies. Por lo tanto, la búsqueda de similitud de secuencia debe realizarse de manera dirigida contra repositorios curados por especialistas: [www.trichoderma.info](http://www.trichoderma.info), sitio web oficial de la ICTT que alberga el inventario global unificado de nomenclatura taxonómicamente válida. El servicio [www.trichokey.com](http://www.trichokey.com), aloja herramientas como TrichoMARK para el recorte de secuencias y TrichoBLAST, una base de datos curada de secuencias diagnósticas derivadas exclusivamente de cepas tipo y ex-tipo verificadas. En <https://trichoderma.info/2021/04/26/molecular-identification-protocol-for-trichoderma/> hay más detalles de cómo usar estos servicios. Además, el sistema MIST (Multiloci Identification System for *Trichoderma*) que está localizado en <http://mmit.china-cctc.org/>, permite

realizar búsquedas de similitud multilocus cruzadas contra una base de datos de referencia constantemente actualizada.

## El Enfoque Polifásico Integrador de John Bissett

La taxonomía filogenética contemporánea ha validado la visión pionera del micólogo canadiense John Bissett (1948–2020), quien argumentó que los datos de secuenciación molecular alcanzan su máximo valor predictivo cuando se unifican con la caracterización ecofisiológica y biogeográfica del hongo vivo. Este enfoque polifásico promueve la integración de: Genealogía Molecular como filtro primario de asignación junto con perfiles nutricionales semicuantitativos, como el uso de microplacas de fenotipado (Phenotype MicroArrays) que evalúan simultáneamente la capacidad del hongo para metabolizar 95 fuentes de carbono distintas. Esto permite mapear con precisión el nicho metabólico de la cepa y diferenciar especies filogenéticamente cercanas, pero metabólicamente divergentes.

Además, la incorporación de plataformas de inteligencia artificial como REPAINT para cuantificar el potencial de conidiogénesis y crecimiento a diferentes temperaturas, permite a los biotecnólogos agrícolas predecir con exactitud el comportamiento de cepas seleccionadas para el control biológico en el suelo o la rizosfera (ambientes altamente competitivos), evaluando su estabilidad genotípica y garantizando su bioseguridad en el campo.

Con toda esta información es posible hacer acercamientos precisos a la identificación de aislados de *Trichoderma*. Es crucial manejar muy bien todas estas técnicas y ser rigurosos en su aplicación. Si te surgen dudas, la ICTT tiene puntos de contactos y toda la disposición para ayudarte, consulta más en <https://trichoderma.info/>.

Cuéntanos tu experiencia identificando cepas de *Trichoderma*.  
Te leemos en el [Grupo de Facebook: Microbiología Agrícola](#).



Domenico Pavone es biólogo y especialista en protección vegetal. 20 años como profesor universitario y autor de artículos científicos en microbiología, biotecnología, biocontrol de plagas y enfermedades agrícolas.