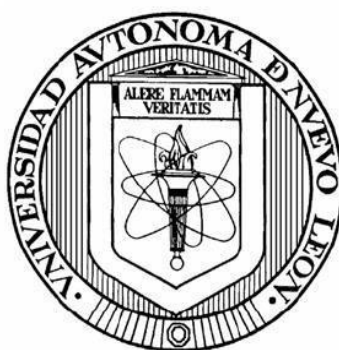


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Descripción de mecanismos de adaptación de cepas de *Trichoderma spp.*
aisladas del Estado de Nuevo León a variaciones en el pH.

Por:


JUAN PABLO CABRAL MIRAMONTES

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en ciencias con
orientación en microbiología

2022

DESCRIPCIÓN DE MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma reesei* spp. AISLADAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN A VARIACIONES EN

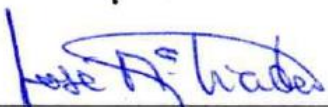
Comité de tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal


Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna


Dr. José Santos García Alvarado


Dr. Hamlet Avilés Arriaut


Dr. José María Viader Salvadó


Sub Director de Posgrado

Dra. Katiushka Arévalo Niño



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

DESCRIPCIÓN DE MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma*
spp. AISLADAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN A VARIACIONES EN EL PH.

Dirección de Tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Director



Dra. Vianey G. Olmedo Monfil

Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres Graciela y José Ángel quienes con su esfuerzo me permitieron llegar a cumplir este gran logro, gracias por inculcar en mi mente la valentía y nunca rendirme ante las adversidades de la vida, gracias por educación brindada que hoy permiten ser un hombre de bien.

Mi más profundo agradecimiento a Karina Díaz por su amor y apoyo incondicional, durante todo este proceso de cambio y crecimiento, eres una guerrera de mil batallas que siempre estas a mi lado, porque aprendimos juntos a ser padres de dos hermosas hijas, por entender mis fallas y mis virtudes para poder crecer personalmente y académicamente, este logro es de los dos.

A mi lita por ser la niña de mis sueños, por esa sonrisa que siempre me inspira seguir adelante para guiarte por el camino del bien, por demostrar que si te tomo de la mano puedo sacar fortaleza para seguir el camino, por enseñarme lo más difícil pero lo más hermoso de esta vida: ser tu padre, por tu perseverancia de querer siempre una hermanita.

A mi bebe Sama, porque ya te esperaba tu hermana Lita, por que llegaste en el mejor momento a completar nuestros corazones, por esa sonrisa eterna que siempre demuestras y me inspira amor y que juntos vamos a cumplir grandes sueños, por confirmar que lo mejor que puedo desarrollar es ser padre.

Mis hermanos José Ángel, por el apoyo emocional, técnico y que tú me motivaste desde siempre en esta aventura que hoy está a punto de hacerse realidad, Cecy por escucharme siempre que lo necesite, y porque me inspiras mucha fortaleza de todo puede ser posible en momentos difíciles, Noé por tu cariño incondicional durante este proceso, por siempre tratar de sacar una sonrisa donde no existe, y porque siempre serás mi mejor amigo, pero siempre unidos con ese lazo de hermandad que nos inculcaron nuestros padres desde muy pequeños.

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento es total a la Dra. Elva Aréchiga por haber confiado en mí desde el primer momento, por todas sus enseñanzas académicas y personales, por sus consejos y apoyo para que esta investigación pudiese culminar con éxito.

De igual manera, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Vianey Olmedo Monfil, principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, aportes oportunos y conocimiento para realizar experimentos para el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca No. 631689 de doctorado otorgada a mi persona para manutención.

A todos los miembros de UMGE, otros que ya no están y algunos perduraron, gracias por los comentarios y la convivencia llevadera a: Katia González, Jesús Mares, Gabriela Sánchez, Alvaro Rios, Debany Valdez, etc. aquellos compañeros que dejaron de ser desconocidos para convertirse en mis amigos.

Llegar hasta aquí no habría sido posible sin el apoyo académico brindado por varios docentes, de la H. Facultad de ciencias Biológicas, a lo largo del doctorado por brindar los conocimientos utilizados.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN.....	13
II ANTECEDENTES.....	16
2.1 Propiedades generales de la rizosfera.....	16
2.1.1 Vegetación en zonas áridas.....	16
2.2 <i>Trichoderma</i> modelo de estudio extremófilo de zonas áridas.....	17
2.3 Generalidades genómicas de <i>Trichoderma</i>	17
2.4 Adaptación de <i>Trichoderma</i> a condiciones ambientales.....	18
2.5 Mecanismos moleculares de adaptación a estrés por pH en <i>Trichoderma</i>	19
2.7 Sideróforos sintetizados por hongos.....	21
2.8 <i>Trichoderma</i> como generador de sideróforos.....	23
III JUSTIFICACIÓN.....	24
IV HIPÓTESIS.....	25
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Datos geográficos y recolección de muestras de rizosfera.....	26
5.2 Análisis Físico-químico del suelo.....	26
5.3 Material biológico.....	26
5.4 Aislamiento de ADN.....	26
5.5 Amplificación de marcadores moleculares y secuenciación.....	26
5.6 Análisis Filogenético.....	27
5.7 Ensayos de tolerancia a variaciones de pH en medio Murashagi y skoog con modificaciones.....	27
5.8 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	28
5.9 Ensayos de confrontación hongo-hongo.....	28
5.10 Interacción planta-hongo y mitigación de sequia.....	28
5.11 Genes específicos de <i>Trichoderma</i> implicados en el control de pH.....	29
5.12 Extracción de ARN y síntesis de cADN.....	30
5.13 Análisis de expresión génica por qRT-PCR.....	30
5.14 Selección de genes codificantes para sideróforos y transportadores regulado por PacC.....	30
5.15 Evaluación de producción de sideróforos por <i>Trichoderma</i>	31
5.16 Cuantificación de unidades de sideróforos.....	32
5.17 Análisis estadístico.....	32

VI. Resultados.....	33
6.1 Análisis fisicoquímico de suelo.....	33
6.2 Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> de rizosfera	33
6.3 Cepas de <i>Trichoderma</i> toleran el pH alcalino.....	36
6.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en condición alcalina	37
6.4 Cepas de <i>Trichoderma</i> inhibieron el crecimiento de fitopatógenos	38
6.5 Interacción planta-hongo y mitigación de la sequía.....	39
6.6 Análisis en la variación de dominios conservados de <i>PacC</i> , <i>NRPS</i> y <i>SIT</i>	42
6.7 Expresión de los genes <i>Pac1</i> en condición de alcalinidad	44
6.8 Producción de sideróforos dependientes de Fe	45
6.9 Cuantificación de sideróforos.....	45
VII DISCUSIÓN.....	47
VIII CONCLUSIÓN	54
IX BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXO 1	64
ANEXO 2	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos empleados como marcadores moleculares	27
Tabla 2: Oligonucleótidos diseñados para la detección de <i>Pac1</i> y experimentos de RT-PCR Y qPCR.....	29
Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados para detección parcial de los genes <i>NRPS</i> y <i>MFS</i>	31
Tabla 4. Abundancia de macronutrientes y micronutrientes en análisis fisicoquímicos en el suelo de Mina, Nuevo León	33
Tabla 5. Porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de los genes <i>Pac1</i> , <i>Sid_N3</i> , y <i>SIT</i> con la cepa de referencia <i>T. harzianum</i> CBS.95.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Relaciones evolutivas de las siete especies secuenciadas de <i>Trichoderma</i>	18
Figura 2.- Vía de activación de Rim101 en <i>Aspergillus nidulans</i>	20
Figura 3.- L-ornitina es el precursor biosintético de los sideróforos en los hongos.	22
Figura 4.- Análisis filogenético de <i>Trichoderma</i> con marcador molecular <i>TEF1</i> y método unión de vecinos (NJ).....	35
Figura 5. Producción de biomasa en cepas ácidas, neutras, alcalinas y cambio de pH afectado en 0.2X MS.	36
Figura 6. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	38
Figura 7.- Cepas de <i>Trichoderma</i> en la actividad micoparasitaria.	39
Figura 8.- Efecto de <i>Trichoderma</i> en la promoción del crecimiento de <i>Sorghum bicolor</i>	40
Figura 9.- Interacciones de <i>Sorgo bicolor</i> con <i>Trichoderma</i>	41
Figura 10.- Selección de genes candidatos a sideróforos del genoma de <i>Trichoderma harzianum</i>	42
Figura 11.- marco de lectura abierto de los genes <i>Pac1</i> , <i>SidD</i> y <i>SIT</i> , señalando los dominios conservados.	43
Figura 12. Perfiles de expresión de los genes <i>Pac1</i> de cepas ambientales de <i>Trichoderma</i> cultivadas en diversas condiciones de pH.	45
Figura 13.- evaluación de producción de sideróforos en cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> en medio CAS.....	45
Figura 14. Cuantificación de unidades de sideróforos.	46

RESUMEN

Las especies de *Trichoderma* son hongos filamentosos que confieren un mejor crecimiento, resistencia a enfermedades y, por ende, tolerancia al estrés abiótico y a la salud de las plantas. El objetivo de este estudio fue describir las características fisiológicas, variaciones de estructura y descripción de cepas de *Trichoderma* de zonas áridas, para evaluar y describir la posible adaptación y modulación en pH alcalino. La demanda de alimento a nivel mundial, y los fitopatógenos obliga a los agricultores a tomar acciones para proteger sus cultivos con el uso excesivo de agroquímicos, lo que provoca un cambio químico en el suelo. Así mismo, se produce una acumulación de elementos químicos, como el sodio y el calcio, provocando suelos fértiles en zonas áridas. Este problema abre la puerta a la búsqueda de microorganismos con sus mecanismos moleculares adaptados para mitigar estos fenómenos y funcionar como bioestimuladores. En nuestro caso, aislamos 11 cepas del hongo *Trichoderma spp.* de muestras mixtas recolectadas de la raíz y rizósfera de dos plantas endémicas de Mina, Nuevo León. Las cepas fueron identificadas con marcadores moleculares hasta averiguar su especie. Posterior se evaluó la resistencia a pH ácido y alcalino, y seleccionamos una cepa capaz de crecer sin afectaciones a pH 9.0. Adicionalmente se probó su capacidad micoparasitaria contra *R. solani AG2*, *AG5* y *Fusarium oxysporium*. Se analizó la expresión del gen *Pac1* que está directamente involucrados en el cambio y soporte de pH alto, y se examinó si en el proceso de adaptación a alcalinidad producía metabolitos como los sideróforos que son quelantes de hierro, elemento que no biodisponible para plantas y microorganismos a estos valores de pH.

Identificamos tres especies principales de *Trichoderma* por características filogenéticas/fenotípicas; solo las cepas de *T. harzianum* mostraron crecimiento y tolerancia al estrés por pH alcalino. También mostraron actividad antagónica contra tres hongos fitopatógenos principales que causan pérdidas de cultivos. Demostramos que el gen *Pac1* encargado de regular el pH está expresado a la baja. Este fenómeno es dado por eventos de adaptación en cepas ambientales, además, localizamos al gen *Sid_D* y su transportador transmembranal, donde su expresión en las cepas de *Trichoderma* produce péptidos de bajo peso molecular como sideróforos, que son causantes de solubilizar hierro. La absorción de este elemento promueve significativamente el crecimiento en plántulas de *Sorghum bicolor* en condiciones de agricultura endémica. En conclusión, los hongos benéficos como *Trichoderma* adaptados a nichos ambientales específicos como zonas áridas mostraron variaciones en sus mecanismos moleculares para sobrevivir a condiciones adversas modulando su metabolismo.

ABSTRACT

Trichoderma species are filamentous fungi that favor better growth, resistance to diseases, and, therefore, tolerance to abiotic stress and plant health. This study aims to describe the physiological characteristics, structure variations, and description of *Trichoderma* strains for arid zones to evaluate and describe the possible adaptation and modulation in alkaline pH. The demand for food worldwide, and phytopathogens, forces farmers to take action to protect their crops with the excessive use of agrochemicals, which causes a chemical change in the soil; likewise, there is an accumulation of chemical compounds such as sodium and calcium, causing fertile soils in arid zones, this problem opens the door to the search for microorganisms with variations and adaptations in their molecular mechanisms involved in mitigating these phenomena and functioning as bio stimulators. In our case, we isolated 11 strains of the fungus *Trichoderma spp.*, from mixed samples collected from the root and rhizosphere of two endemic plants from Mina, Nuevo León. The strains were identified with molecular markers until their species was obtained; later, the resistance to acid and alkaline pH was evaluated, and we selected a strain capable of growing without affectations at pH 9.0.

Additionally, it tested mycoparasitic capacity against *R. solani* AG2, AG5 and *Fusarium oxysporium*. Subsequently, the expression of the *Pac1* gene was analyzed, which is directly involved in the change and support of high pH. It was examined whether, in the process of adaptation to alkalinity, it produced metabolites such as siderophores that are iron chelators, an element that is not bioavailable for plants and microorganisms at these pH ranges.

We identified three main species of *Trichoderma* by phylogenetic/phenotypic characteristics; only *T. harzianum* strains showed growth and tolerance to alkaline pH stress. They also showed antagonistic activity against three primary phytopathogenic fungi that cause crop losses. We demonstrate that the *Pac1* gene responsible for regulating pH is expressed downwards; adaptation events in environmental strains give this phenomenon; in addition, we locate the *Sid_D* gene and its transmembrane transporter, where its expression in *Trichoderma* strains produces peptides of low molecular weight as siderophores, which are responsible for solubilizing iron, the absorption of this element significantly promotes growth in *Sorghum bicolor* seedlings under endemic agricultural conditions; finally, beneficial fungi such as *Trichoderma* adapted to specific environmental niches such as arid zones have variations in its molecular mechanisms to survive adverse conditions by modulating its metabolism.

I INTRODUCCIÓN

Las actividades antropogénicas causan condiciones limitantes del suelo, varios lugares son susceptibles a zonas áridas y semiáridas, sus caracterizadas son baja cantidad de materia orgánica y nula disponibilidad de nutrientes (Cruz-Méndez *et al.*, 2021); en estos lugares, la sequía es el resultado de los efectos adversos del calentamiento global y el conjunto de estos factores determina el bajo rendimiento de la producción agrícola (Cornejo-Ríos 2021). En estas áreas viven plantas que se adaptan a condiciones bióticas y abióticas adversas, estas son asistidas por microorganismos llamados microbiota vegetal (Bona *et al.*, 2021), y están formadas por bacterias, hongos y arqueas que han ajustado su fisiología a las demandas ambientales. permitieron el desarrollo de microambientes, y pueden sobrevivir en lugares remotos. Varios hongos han sido estudiados en detalle, siendo modelos de algunas de las rutas o mecanismos moleculares que activan la supervivencia (Ayangbenro y Babalola 2017).

Los suelos alcalino-salinos se revierten con biofertilizantes a base de microorganismos benéficos como *Trichoderma*, que han habitado ambientes con condiciones extremas durante mucho tiempo; estas cepas tienen una modificación del genoma que da lugar a una buena adaptación metabólica al medio ambiente (Caruso *et al.*, 2020). Raíces en interacción con hongos filamentosos provocan que las plantas mostraron mayor turgencia, este evento es posible debido a la retención de humedad producido por las hifas que es aprovechado por las plantas para mitigar la sequía o baja disponibilidad de agua (Silletti *et al.*, 2021).

Las condiciones de las características fisicoquímicas de la rizosfera influyen en la asociación, estabilidad y proliferación de plantas o microbios, y el pH determina la continuidad de la relación mutua (Husson 2013). El pH influye en la solubilidad de los macro y micronutrientes, por lo que se asocia con el crecimiento de las plantas y los microbios de su comunidad. A pH ácido, las cargas electrostáticas positivas prevalecen con el aumento de la disponibilidad de elementos esenciales, como el carbono y el nitrógeno de materias orgánicas y minerales como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , también conocidos como formadores de ácidos comunes (Neina 2019; Gondal *et al.*, 2021). Este comportamiento es inverso en condiciones alcalinas, también en compuestos químicos con cargas electrostáticas negativas donde K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Cl^- se acumulan en la capa superior del suelo (Pelagio *et al.*, 2017), una acumulación excesiva de sodio y calcio en el suelo provoca el fenómeno denominado sodificación, que generalmente se asocia con un aumento del pH en el suelo, debido a la liberación de iones hidroxilo al suelo (Wang *et al.*, 2009). Para los hongos, el pH es un factor vital que afecta el crecimiento, el desarrollo y la competencia (Hewedy *et al.*, 2020). Estos organismos sobreviven en ambientes con valores extremos de pH, y para mitigar el estrés, adaptan

su ambiente con la secreción de metabolitos extracelulares como: viridiofungina, Trichodermadiona A-C, estas moléculas colaboran con la correcta formación de nichos moleculares para el intercambio de protones benéficos que es esencial para la modificación de valencias en compuestos químicos que luego son absorbidos por microorganismos y plantas como macro y micronutrientes (Yan *et al.*, 2021).

Los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son ampliamente conocidos por su uso biotecnológico como agentes de biocontrol contra varios hongos fitopatógenos, así como por su efecto benéfico sobre la aptitud y el crecimiento de las plantas. *Trichoderma* se encuentra comúnmente en suelos de varios ecosistemas que crecen bajo condiciones bióticas y abióticas multivariadas; Este cambio está relacionado con su morfología fúngica común y dificulta su identificación taxonómica, además se encuentran aislamientos teleomórficos en ambientes naturales de esta especie, la cual presenta un desarrollo in vitro completamente diferente (Cai y Druzhinina 2021). De manera particular, para variaciones de pH o valores extremos, las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos alcalinos presentan mecanismos de control de pH con impacto en cambios sensibles en la traducción de señales para aumentar la tolerancia a condiciones desfavorables y la diversidad de la microbiota, alterando positivamente las propiedades del suelo que sustentan la nutrición de cultivos y comunidades microbianas de plantas (Muñoz-Arenas *et al.*, 2022).

La antibiosis causada por la secreción de metabolitos secundarios inhibe la proliferación de varios patógenos (Mukherjee *et al.*, 2022). Los mecanismos analizados producidos en *Trichoderma harzianum* en contacto con cinco patógenos fúngicos de interés agroindustrial revelaron un incremento en la expresión de genes involucrados en la generación de lipasas, glucanasas, estereasas, quitinanas, que funcionan para generar micoparasitismo. Las cepas de *Trichoderma* son modelos aceptados de actividad de supresión para microorganismos invasores y activación de protección de plantas para diferentes interacciones, primero en la rizósfera y segundo con plantas asociadas (Alfiky y Weisskopf 2021).

En los hongos como *Trichoderma* el pH ambiental es una señal importante para el desarrollo, colonización, colonización del huésped, por lo tanto, esa gran capacidad de los hongos de adaptarse a una amplia gama de ambientes ácidos y alcalinos depende del potencial que presentan las cepas extraídas de ambientes extremos para mediar la expresión de genes a través del factor de transcripción PacC (He *et al.*, 2014). La identificación de cambios y regulación del pH esta mediado principalmente por siete genes *PalA*, *PalB*, *PalC*, *PalF*, *PalH*, *pAll* y el factor de transcripción terminal de dedos de zinc PacC. En *Trichoderma harzianum* este factor de

transcripción promueve la expresión positiva de quinasas, proteasas y glucosa permeasa, entre otros metabolitos secundarios, que resultan ser eficientes para micoparasitismo, producción de antibióticos, acidificación y alcalinización extra e intra celular, lo que confiere en relación con plantas la inducción de resistencia sistemática para adquirir nutrientes, espacio y promover el crecimiento (Trushina *et al.*, 2013).

PacC de *A. nidulans* funciona como represor de genes expresados en ácido y como activador de genes expresados en alcalino (Hervas-Aguilar *et al.*, 2007). Además, PacC regula la expresión de muchos genes fúngicos relacionados con la biosíntesis del metabolismo secundario, como la quelación del hierro (sideróforos). El hierro es un elemento abundante en la corteza terrestre, pero es insoluble en pH neutro a alcalino (Espeso *et al.*, 1997). Los sideróforos pertenecen al grupo hidroxamato, que comparten la unidad estructural *N5-acil-N5-hidroxiornitina* y se dividen en grupos fusarinina, coprogen y ferricromo. En los hongos se sintetizan con la ayuda de péptidos sintetasas no ribosomales (*NRPS*) (Tilburn *et al.*, 1995). Además, varios investigadores sugieren que los transportadores *MFS* (Major facilitator superfamily) pueden funcionar como impulsores de moléculas más diferentes con sideróforos y otros sustratos dentro y fuera de la membrana celular (Renshaw *et al.*, 2002).

II ANTECEDENTES

2.1 Propiedades generales de la rizosfera

La disponibilidad de nutrientes es el principal regulador de crecimiento de los organismos presentes y que se mantienen en el suelo que son plantas y microorganismos, está influenciada por factores bióticos y abióticos relacionados entre sí que determinan el éxito y sobrevivencia de estos, los nutrientes determinan la diversidad de especies que a su vez presenta un rango de tolerancia a condiciones muy particulares a la geolocalización que permite generar una clasificación adecuada. (Lui *et al.*, 2022).

Los factores antropogénicos influyen en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. los cambios en el uso de la tierra son el resultado de demandas humanas que surgen de cambios en los aspectos naturales, económicos o geopolíticos. Las consecuencias son la modificación o la conversión de un tipo de uso de la tierra a otro. (More *et al.*, 2022)

Los suelos ácidos presentan una distribución amplia y abarcan 50% de la tierra cultivable mundial (Malgalhaes *et al.*, 2015). Los suelos ácidos con concentraciones de H^+ elevadas, son tóxicos e inhiben el crecimiento y desarrollo de las organismos vivos en el suelo (Schubert *et al.*, 1990; Luchi *et al.*, 2007). El H^+ en suelos ácidos también está relacionado con muchos otros factores de estrés, como la toxicidad del aluminio (Al^{3+}) y la deficiencia de Pi (Malgalhaes *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2022).

El caso contrario a este efecto es la alcalinización, que en los últimos 20 años tiene aumento debido a la gran demanda de alimentos, el uso irracional de agua y globalmente el cambio climático (Delgado *et al.*, 2022), hasta el momento se sabe que el daño a los organismos generado por los suelos alcalinos es más contundente que el suelo ácido, debido a la acumulación de sales en la parte superior del suelo limita la conductancia del agua, así como la porosidad y la aireación del suelo, La salinidad también afecta las actividades enzimáticas, la función estomática y las tasas fotosintéticas, y aumenta la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan las membranas celulares, los lípidos, las proteínas, el ADN y el ARN, e inducen la muerte celular programada. Finalmente, este factor abiótico promueve el estrés hipertónico debido a la acumulación de Na^+ y Cl^- iones (Jimenes *et al.*, 2022).

2.1.1 Vegetación en zonas áridas

Los recursos forestales no maderables son de gran importancia en zonas áridas y semi áridas, además resultan tener propiedades como bioindicadores de estas áreas que permiten observar el estado de salud de los suelos. El *Agave lechuguilla* es un recurso natural nativo de zona sur de estados unidos de América y su distribución nacional de México comprende en los estados de

Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas. Está demostrado que tiene propiedades fitoquímicas como generación saponinas saponinas, compuestos fenólicos, fructano santivirales antioxidantes y actividad hipocolesterolémica (Carmona *et al.*, 2017). Por otra parte, una especie representativa de regiones subtropicales y desiertos mexicanos es el género *Fouquieriaceae*, dada su anatomía y sus características de adaptación tiene un linaje de ancestros que se adaptaron a sequia estacional y localizarla en desiertos tiene gran importancia debido a que la geolocalización muestra que los nutrientes y condiciones climáticas no son favorables (De-Nova *et al.*, 2020).

2.2 *Trichoderma* modelo de estudio extremófilo de zonas áridas

Trichoderma es un género de hongos que pertenece al phylum Ascomycota, a la clase Sordariomycetes y a la familia Hypocreaceae (fasesexual). Se encuentra en diversos ecosistemas en el mundo y puede ser encontrado en suelos compuestos orgánicos ricos en nutrientes y ambientes extremos (Brewery Taylor, 1981). La supervivencia de los hongos de este género es muy variada (Druzhinina *et al.*, 2011), incluye estrategias nutricionales características de organismos saprófitos, biotróficos y necrotróficos.

La adaptabilidad, fácil aislamiento y manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha facilitado su estudio, debido a que su desarrollo *in vitro* es similar *in vivo*. Estos hongos son oportunistas, simbioses de plantas y pueden comportarse como parásitos y antagonistas de varios hongos fitopatógenos, protegiendo a las plantas. *Trichoderma* es un organismo biocontrolador muy estudiados, comúnmente comercializado y recientemente considerado biofertilizantes (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004a). Diferentes especies de *Trichoderma* pueden colonizar la rizosfera y promover efectos benéficos para las plantas. Los efectos que tiene son favorecen un rápido establecimiento de comunidades microbianas que esto pueden mejorar la salud de la planta y estimular su crecimiento radicular (Harman *et al.*, 2004a).

2.3 Generalidades genómicas de *Trichoderma*

T. reesei / *H. jecorina* fue la primera especie del género secuenciado (Martínez *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2013). Tiene como característica principal la producción de celulasas, pero limitado biocontrolador. Caso contrario de las dos especies de biocontrol *T. atroviride* y *T. virens*, que encontraron en sus genomas de muchos genes únicos involucrados en el micoparasitismo para atacar a otros hongos causante de enfermedades de plantas (Figura #1) (Druzhinina *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2013). Posterior se analizaron los genomas de *T. harzianum* y *T. asperellum*, que son especies de control biológico que pertenecen a otras ramas filogenéticas, y son de gran importancia en el éxito de sistemas agroindustriales. La disponibilidad de dicha información

facilita el análisis de especies y enriquece el conocimiento de tamaños de genes, familias génicas expandidas, que en conjunto son eventos de microevolución que producen diversidad de metabolitos secundarios, proteínas secretadas no caracterizadas que están disponibles en cepas adaptadas a ambientes megadiversos.

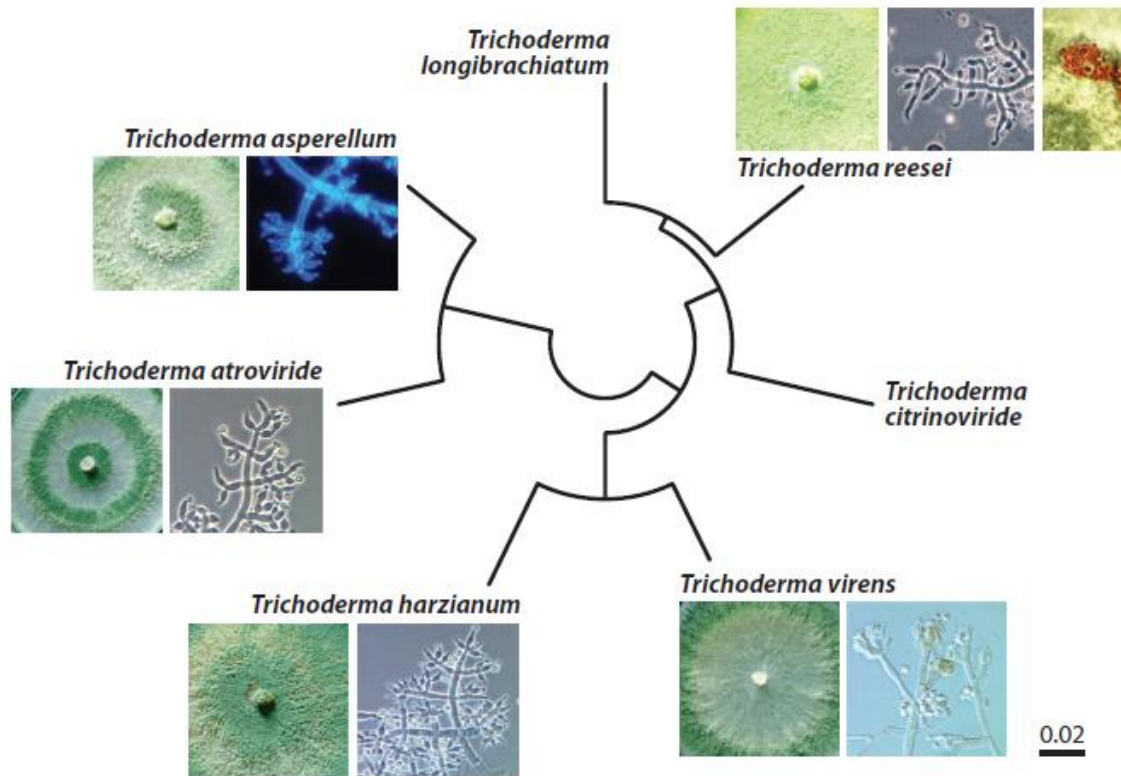


Figura 1.- Relaciones evolutivas de las siete especies secuenciadas de *Trichoderma*. Las imágenes se toman en parte de la base de datos en línea de *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 2012).

2.4 Adaptación de *Trichoderma* a condiciones ambientales

En los microorganismos incluido *Trichoderma*, los factores externos modifican sus características morfológicas como funciones fisiológicas. Entre estos factores, el pH es probablemente el parámetro ambiental más importante que afecta el desarrollo de cepas de *Trichoderma* (Kredics *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2014). La producción de biomasa de *T. harzianum*, *T. viride* y *T. asperellum* se elevó que cualesquiera otras especies en todos los niveles de pH, mientras que *T. longibrachiatum* y *T. atrovirida* mostró una producción moderada de biomasa y un mínimo se observó con *T. koningii* y *T. virens*. (Singh *et al.*, 2014). Con dicha información se manifiesta que cada especie está adaptada de diferente forma a pH diversos. Para sobrevivir y proliferar, los microorganismos deben adaptar su entorno modificando el pH, a un amplio rango de pH requiere no solo un sistema de pH interno homeostático, sino también un medio para garantizar que las moléculas directamente expuestas al medio ambiente como las permeasas, las enzimas secretadas

y los metabolitos exportados se sintetizan a valores de pH en los que pueden funcionar (Peñalva *et al.*, 2008).

2.5 Mecanismos moleculares de adaptación a estrés por pH en *Trichoderma*

la regulación molecular en respuesta al pH ambiental fue descrita en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, denominado como la ruta *Rim101p/Nrg1p*. En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* ya se había reportado el mismo mecanismo como el factor de transcripción PacC, que cuenta con tres dominios de dedos de zinc, como un regulador de otros genes en respuesta a cambios de pH, en concreto a condiciones neutras y alcalinas, pero fue años después que se hizo un análisis comparativo con otros hongos y se encontró que existían los ortólogos de las proteínas involucradas en esta ruta de señalización en respuesta al pH ambiental (Lamb *et al.*, 2001; Eshel *et al.*, 2002; Caracuel *et al.*, 2003; Rollins *et al.*, 2003).

La cascada de señalización en respuesta al pH del medio se representa en la Figura 2, y comienza con la activación del sensor transmembranal *PalH* que, en condiciones alcalinas, transmite una señal a través de la membrana que resulta en la activación de la proteína tipo arrestina, *PalF* esta es fosforilada y después ubiquitinada. Esta modificación recluta al complejo endosomal requerido para el transporte (*ESCRT*) hacia la zona de membrana. Esto da como resultado la polimerización de las proteínas *Vps32* y el reclutamiento de *PalC* a este complejo en formación. La incorporación de la proteína *PalA* permite reclutar a *PacC* a través de los dos motivos *YPx*, que flanquean la caja de señalización de proteasa en este factor de transcripción. PacC puede encontrarse en tres formas, una completa de 72 Kda, una intermedia de 53Kda y una pequeña de 27 Kda. *PalB* es reclutado en un proceso que involucra a *Vps24* y otras proteínas circundantes. *PalB* corta *PacC*⁷² dentro de la caja señalización de proteasa para producir *PacC*⁵³, la forma intermediaria, la cual será cortada por el proteosoma, para obtener *PacC*²⁷, que es la forma completamente procesada y funcional. Esta última forma de PacC deja libre los dominios de dedos de zinc para regular la expresión de genes en respuesta a pH, a través de los promotores que contengan la secuencia diana 5'-GCCARF-3' (Espeso *et al.*, 1997; Galindo *et al.*, 2012).

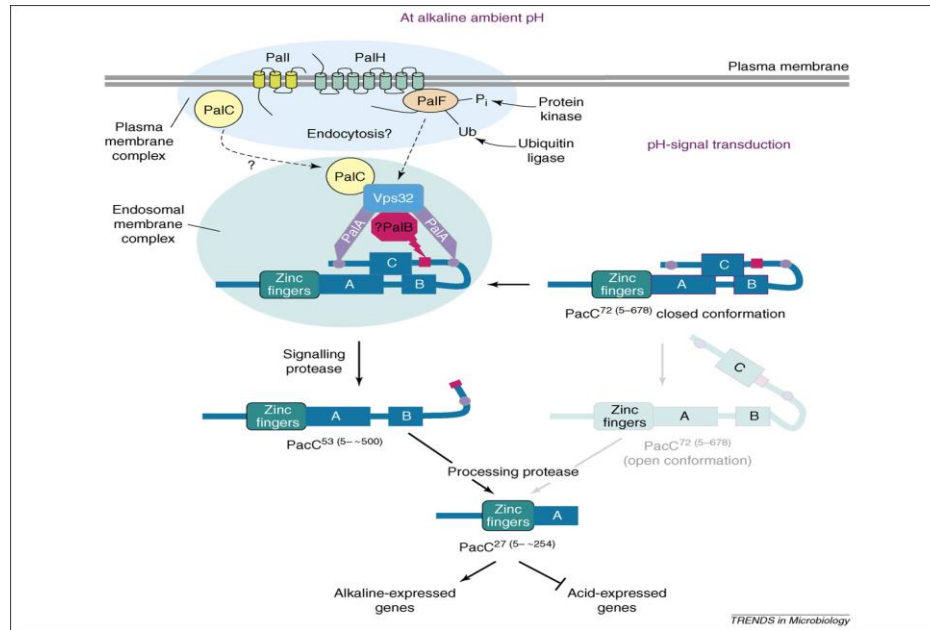


Figura 2.- Vía de activación de Rim101 en *Aspergillus nidulans*. A pH ácido Rim101/PacC se encuentra cerrado, inaccesible para proteólisis. Su activación ocurre a pH alcalino, (Peñalva *et al.*, 2008).

En *T. virens* se ha observado que el 5% del transcriptoma es dependiente del pH extracelular y que de éste un 25% es dependiente de PacC. Dentro del grupo de genes regulados positivamente destacan intercambiadores de Na/H^+ , ATPasa y ATPasa tipo P, simportador de H^+ /oligopéptido, transportador regulado $\text{Fe}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ y transportadores de sideróforos, así como enzimas relacionadas en la síntesis de éstos últimos. Sumado a estos resultados también se observó que PacC es relevante en la capacidad micoparasítica de *Trichoderma* debido a que las cepas deletantes en *PacC* no fueron capaces de sobrecrecer el micelio del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* en confrontaciones *in vitro*, en comparación con la cepa silvestre y la cepa sobreexpresante de este gen (Trushina *et al.*, 2013). Resultados similares sobre la importancia de PacC en la capacidad micoparásita han sido descritos en *T. harzianum*, donde las cepas silenciadas en *Pac1* no podían hacer frente a *B. cinerea*, *R. solani*, *R. meloniy* *P. citrophthora*. El análisis proteómico reveló que *Pac1* regulaba positivamente genes involucrados en antagonismo fúngico, como aquellos codificantes de las quitinasas *chit42* y *quit74*. Un resultado interesante fue que la cepa silvestre y la cepa sobreexpresante *PacC* fueron menos eficientes en los ensayos de antibiosis, en comparación con la cepa silenciante, lo que sugiere una regulación negativa de *Pac1* sobre las vías de síntesis de metabolitos antifúngicos en *T. harzianum* (Moreno, M. *et al.*, 2007).

Los productos de los genes Pal transmiten la señal de pH para estimular cambios en PacC en una forma activa para regular los genes río abajo. En general, a pH ambiente alcalino, el polipéptido PacC de longitud completa da como resultado una forma funcional más corta. Activa genes que

se expresan a pH alcalino y reprime genes que se expresan en condiciones de crecimiento ácido (Tilburn *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2014).

2.6 Genes sensibles a los pH regulados por PacC en Hongos

PacC es un factor de transcripción importante en la regulación del pH en *Trichoderma*, la diversidad de señales que producen los hongos para promover la expresión genes en respuesta a la condición acida o alcalina aún está por descubrirse, pero se están publicados varios datos importantes.

El análisis generado por Häkkinen *et al.*, 2015 revelo que más de 940 genes estaban regulados diferencialmente en respuesta al pH, además, de estos genes dependientes de pH, 346 se expresaron diferencialmente después de la exposición al pH alcalino y 584 se regularon positivamente a pH bajo. PacC regula el 9% de todos los genes que codifican proteínas en hongos, la información toma como referencia la secuencia promotora 5'-GCCARF-3' rio arriba de los genes sensibles y puede activar o reprimir la transcripción de esos genes dependiendo de condiciones acidas o alcalinas.

Los genes sensibles al pH se clasificaron de acuerdo a los grupos funcionales “transporte y metabolismo de iones orgánicos”, “modificaciones postraduccionales, renovación de proteínas chaperonas” y “transporte y metabolismo de aminoácidos”, genes regulados por *Pac1*. Además se realizó un agrupamiento para identificar genes co-regulados, donde destacan los que codifican péptido sintasa no ribosómicas, lipasa/ esterasa de biosíntesis de sideróforos, transportadores ABC, una acetilasa de biosíntesis de sideróforos, una enoil-CoA hidratasa/isomerasa y un transportador de hierro de sideróforos, una oxidoreductasa, transportador MFS, una ligasa de acil-CoA de ácido graso de cadena larga, y genes con funciones desconocidas entre los resultados más representativos.

2.7 Sideróforos sintetizados por hongos

El hierro es un oligoelemento esencial indispensable para la mayoría de los organismos, está involucrado en el transporte de electrones, en procesos metabólicos como la respiración celular y la fotosíntesis, y siendo el cuarto elemento más abundante en la naturaleza su biodisponibilidad es limitada, ya que se oxida rápidamente en contacto con el oxígeno de la atmosfera, tiene un rango muy limitado de biodisponibilidad, a pH acido alcanza su mayor punto de solubilidad debido a que su valencia se encuentra en Fe^{2+} , por lo tanto a pH neutro y alcalino no es soluble (Hider y Kong 2010).

Los hongos son que descomponen y se alimentan de materia orgánica presente en el suelo, sin embargo, cuando las condiciones donde habita tiene déficit de hierro muchos hongos tienen dos respuestas principales (i) síntesis de sideroforos por estrés de hierro, y reductasa de hierro férrico de alta afinidad (Philpott 2006). Los tipos comunes de sideroforos son hidroxamatos, catecolatos y carboxilatos, donde *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* son unos de los organismos que puedes sintetizar las tres diferentes familias estructurales de sideróforos.

La biosíntesis de sideroforos y regulación se realiza por dos vías: la péptido sintetasa no ribosómica (NRPS) dependiente y la NRPS independiente, estos complejos enzimáticos consisten en el dominio de adenilación (A), dominio de thiolación (T), el dominio de condensación (C) y el dominio de tioesterasa (TE) (Crosa y Walsh 2002). Los hidroxamatos tienen vías biosintéticas caracterizada por hidroxiornitina. El primer paso es la hidroxilación de L-ornitina. Este es un precursor de los sideróforos, que se convierte en N-hidroxi-L-ornitina en una reacción catalizada por las enzimas L-ornitina y L-ornitina N⁵-oxigenasa (De luca y Wood 2001; Sah y Singh 2015). El segundo paso es la acilación de N-hidroxi L-ornitina para formar N-acil-N-hidroxi-L-ornitina en presencia de la enzima transacetilasa (Neilands *et al.*, 1987). Como se representa en la Figura #2, el derivado de acil-CoA es un donante de acilo y la reacción es catalizada por acil-CoA: N-hidroxi-L-ornitina N-acil transferasa (Pecorato *et al.*, 2021).

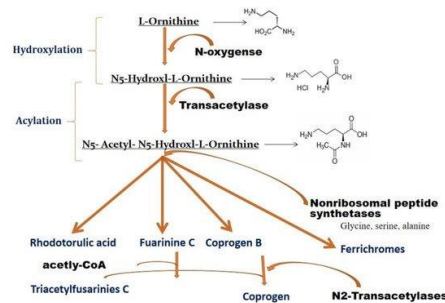


Figura 3.- L-ornitina es el precursor biosintético de los sideróforos en los hongos.

Todas las especies de hongos mantienen un mecanismo extracelular de absorción de hierro conocido como transportador de sideróforo-hierro (SIT). Está constituida por una importante familia de proteínas que facilita la captación de hierro en los hongos, actuando a través de la membrana plasmática, con alta solubilidad y energía, como un simportador acoplado a protones, y liberando sideroforos quelados con hierro durante la actividad celular. Se ha descubierto que la triacetil fusarina C (T AFC) y la fusarinina C (FsC) mejoran la liberación de hierro a través del hidrólisis parcial por la enzima esterasa (Estb) (Howard 1999). Los hongos expresan genes de transportadores específicos para sideroforos secretados por otras especies. Cuando el sideróforo

es abundante, el sistema reductivo de transporte puede catalizar la captación de hierro unido al sideróforo. Más del 50% de los genes se activan transcripcionalmente en condiciones de privación de hierro y están involucrados en la absorción de quelantes de hierro (Hsiang y Baillie 2005; Pecorato *et al.*, 2021).

2.8 *Trichoderma* como generador de sideróforos

En el hongo saprofito *Trichoderma* la información sobre la diversidad de sideróforos producidos es escasa, pero se sabe que la presencia de sideróforos está relacionada con la especie y los factores que activen estos genes. (Lehner *et al.*, 2013). Zhao y colaboradores en 2013 reportan el efecto beneficioso de *T. asperellum* en la promoción del crecimiento del pepino bajo estrés salino y demostraron que los sideróforos pueden desempeñar un papel en el alivio de la deficiencia de Fe inducida por la salinidad. Lehner *et al.*, 2013 reportan que la diversidad de sideróforos en *Trichoderma* corresponde a la ecología de las especies, los resultados identifican que *T. polysporum* y *T. gamsii* que provienen de hábitat de suelo tropical, presentaron 12 sideróforos, a diferencia de *T. reesei* que nunca ha sido aislada de suelo solo presenta una gran capacidad para degradar celulosa. Los sideróforos de *Trichoderma* spp. pertenecen a las familias fusigen, ferrichrome y coprogen, y sus grupos de genes *NRPS* ortólogos involucrados en la síntesis de sideróforos (*SidD* y *NPS6*) se han identificado en *T. atroviride*, *T. reesei* y *T. virens*.

El estudio del mecanismo de adaptación a variaciones de pH del medio llevado a cabo por el factor de transcripción PacC, generara claves en el entendimiento de la capacidad de adaptación de los hongos, las rutas de transducción de señales del medio o el suelo donde crecen, esto para darle una ventaja al crecimiento de las plantas por genes candidatos a síntesis de sideróforos, debido a que el suelo del Estado de Nuevo León se conoce que es alcalino y no favorece el crecimiento de las plantas.

III JUSTIFICACIÓN

El suelo del norte del país presenta características muy particulares. Es árido en su mayoría y la mayor parte del año, el panorama es seco esto se ve reflejado en su tipo de suelo que presenta una marcada tendencia arcillosa y calcárea.

Por otro lado, la mayoría de las cepas de *Trichoderma* reportadas como útiles en el control de enfermedades de plantas y capaces de promover el crecimiento de estas presentan un comportamiento de acidificación del medio donde crecen. En nuestro grupo de trabajo (Unidad de manipulación genética) hemos encontrado aislados de cepas del Estado de Nuevo León capaces de presentar una predisposición a la alcalinidad y que, al encontrarse asociadas a vegetación que sobrevive a la sequía, generan un gran interés. Los hongos crecen en un rango de pH relativamente amplio y se adaptan al pH extracelular a través de un sistema regulador genético mediado por componentes clave. Existen algunos moduladores de la adaptación al pH que ya han sido descritos en algunos géneros de hongos, pero otros están por descubrirse. Además, demostraremos algunos genes efectores para plantas que estén influenciados por los genes que modulan de pH. En este sentido, ofreceremos una descripción de los mecanismos regulatorios de adaptación que rigen la señalización del pH en hongos aislados del Estado de Nuevo León del género *Trichoderma* y resaltar cómo los hallazgos pueden desempeñar efectos importantes en el crecimiento de plantas.

IV HIPÓTESIS

Cepas de *Trichoderma spp.* aisladas de la zona árida del norte del Estado de Nuevo León tienen la capacidad de adaptarse a condiciones adversas de pH en el suelo y en el proceso producen moléculas que benefician el crecimiento de plantas.

4.1 Objetivo general

Describir los mecanismos que regulan el fenómeno de alcalización y neutralización en algunas cepas silvestres de *Trichoderma*

4.1.1Objetivos específicos

- Aislar cepas de *Trichoderma spp.* en zonas áridas del estado de nuevo león, e identificar con marcadores moleculares su especie.
- Caracterizar el comportamiento fenotípico y genómico de diferentes cepas silvestres del género *Trichoderma* al crecer en medios de cultivo con diferente pH.
- Analizar el patrón de expresión del gen *Pac1* en la cepa ambiental en medios de cultivo con distinto valor de pH.
- Caracterizar los mecanismos moleculares que utiliza *Trichoderma* para cambiar el pH y activar genes para el desarrollo de plantas de interés agrindustrial.

Trichoderma Bio-Fertilizer Decreased C
Mineralization in Aggregates on the Southern North
China Plain

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Datos geográficos y recolección de muestras de rizosfera

La zona de estudio fue en el municipio de Mina, Nuevo León, a una altitud de 589 msnm, en un área topográfica plana, latitud 25° 59' 05.6" y longitud de 100° 37' 10.9". La colección de muestras de suelo fue recuperada de una área de 50m² donde existía diversidad de plantas sanas de *agave lechuguilla* y *Fourquieria splendens* (Ocotillo), dichas especies no se encuentran dentro de organismos protegidos por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Mexicana, N.O. 2010), a las profundidades de 0, 15 y 30 cm, también recolectamos 20 cm. raíz de cada espécimen, y transportado y refrigerado a 4°C, las plantas fueron devueltas a su condición natural.

5.2 Análisis Físico-químico del suelo

Las propiedades del suelo fueron determinadas por un proveedor externo, siguiendo los estatutos de la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2002, especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis (SEMARNAT 2002). Se evaluaron los siguientes parámetros: pH, materia orgánica, textura del suelo, macro y micronutrientes.

5.3 Material biológico

Las cepas de *Trichoderma* de Nuevo León utilizadas en este estudio se aislaron mediante la técnica de placa de dilución, se incubaron en agar papa dextrosa (Difco Laboratories, Detroit, MI) y *Trichoderma solid medium* (TSM) (1% extracto de malta, 0.1% extracto de levadura, quitosano al 0,02%, rosa de bengala al 0,015%, clortetraciclina al 10% 0,6 ml, cloranfenicol al 10% 10 ml y agar al 1,5 %) a 28 °C en oscuridad, las cepas de *Trichoderma* se identificaron por morfología clásica.

5.4 Aislamiento de ADN

La extracción se realizó siguiendo el protocolo reportado por Reader y Broda (1985). El ADN obtenido se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Para revisar la integridad del ADN obtenido de diferentes muestras de *Trichoderma*, se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.5 Amplificación de marcadores moleculares y secuenciación

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando los ADN como molde, se llevó a cabo utilizando cebadores para amplificar mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos empleados como marcadores moleculares, para la amplificación de zonas variadas del genoma de hongos.

Clave	Secuencia 5' - 3'	Referencia
<i>ITS 1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , (1990)
<i>ITS 4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , (1990)
<i>LROR</i>	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Hester (1990)
<i>LR5</i>	TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys & Hester (1990)
<i>ACT 512f</i>	ATGTGCAAGGCCGTTTCG	Carbone & Kohn (1999)
<i>ACT 783r</i>	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	Carbone & Kohn (1999)
<i>Bsens</i>	ATCACWCACTCICTIGGTGGTGG	Vilgalys & Hester (1990)
<i>Brev</i>	CATGAAGAARTGIAGACGIGGG	Vilgalys & Hester (1990)
<i>EF1 728f</i>	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Rehner & Buckley (2005)
<i>EF1 1281r</i>	AACTTGCAGGCAATGTGG	Rehner & Buckley (2005)

Se realizaron amplificaciones de ADN con polimerasa Mytaq TM Bioscience. El producto de PCR se purificó con PureLink® Quick Gel Extraction Kit de invitrogenTM, siguiendo las instrucciones del fabricante y secuenciados en el laboratorio nacional de genómica para la biodiversidad (LANGEBIO).

5.6 Análisis Filogenético

Las secuencias parciales de ADN se analizaron con el programa BioEdit v. 7.0.9.0, se realizaron ajustes manuales si fue necesario con la comprobación del electroferograma. Las secuencias de referencia se recuperaron del GenBank con características homólogas a los marcadores moleculares utilizados, posterior las secuencias se alinearon con MUSCLE y la filogenia de todos los loci se completaron de forma independiente y en combinación con Máxima probabilidad (ML) como modelo de evolución y con unión de vecinos (NJ) como método de agrupamiento. El soporte estadístico de repeticiones se calculó a partir de 1000 bootstrap.

5.7 Ensayos de tolerancia a variaciones de pH en medio Murashagi y skoog con modificaciones

La prueba de sensibilidad al estrés por pH se desarrolló mediante la inoculación de 1×10^6 conidios/ml de cepas de *Trichoderma* en medio 0,2X *Murashagi* y *Skoog* (MS) líquido con sacarosa como fuente de carbono, este medio de cultivo es el mejor candidato por contener macro y micronutrientes requeridos por las plantas y microorganismos Deshaware *et al.*, 2021, cuando cambia el pH de este medio, cambia la disponibilidad de los compuestos químicos. Según lo descrito por Pelagio *et al.*, 2017, nosotros evaluamos la absorción de nutrientes por desarrollo de

biomasa de cepas de *Trichoderma* a valores de pH iniciales de 3,0, 6,0 y 9,0., también evaluamos el desarrollo en medios con amortiguadores de pH, utilizando solución de citratos para pH 3,0, ácido 2-etanosulfónico (MES) para pH 6,0 y ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES) para pH 9,0, (100 mM), incubación a 28 °C, cuantificando la biomasa después de 72 h. Las cepas que presenten un comportamiento importante a valores extremos de pH se utilizaran en ensayos posteriores.

5.8 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

El escaneo SEM se realizó como se describe Dautt-Castro *et al.*, 2020, con modificaciones menores. Las cepas *T. harzianum* T35 y T9_UANL (seleccionadas en este trabajo) se cultivaron en MS + sacarosa en placas de pH 6.0 y 9.0 durante 72 h a 28 °C. Para el análisis SEM, 0,5 cm² de PDA que contenía cada cepa en los tiempos indicados se fijaron en glutaraldehído al 3% en PBS® (solución salina tamponada con fosfato) durante dos horas. Luego, los tapones se enjuagaron tres veces con PBS frío durante 15 minutos y posteriormente se fijaron posteriormente con una solución de OsO₄ al 1 % en PBS durante una hora, seguido de tres secuencias de 15 minutos en PBS. Finalmente, las muestras fueron montadas y recubiertas de oro por pulverización catódica en un Cressington Modelo 108auto, analizadas en un SEM modelo ZEISS. El SEM se ajustó a 4 kV, 5,5 puntos y WD de 10 mm. Las micrografías se tomaron con el electrón secundario (SE) y el detector de retrodispersión circular (CBS) con un aumento de 1500x.

5.9 Ensayos de confrontación hongo-hongo

Las confrontaciones directas se realizaron con las diferentes cepas ambientales de *Trichoderma* y con tres fitopatógenos *Rhizoctonia solani* AG2, *Rhizoctonia solani* AG5, y *Fusarium oxysporum*. En medio Agar Papa Dextrosa (PDA), se colocaron discos de micelio de 72 h de incubación de *Trichoderma* y fitopatógeno en el extremo de la placa en direcciones contrarias. Los cultivos se mantuvieron a 28 °C por un lapso de 10 días (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019).

5.10 Interacción planta-hongo y mitigación de sequía

Se incubaron 1X10⁶ conidias/g de las cepas de *Trichoderma* en recipientes de plástico (7 cm de diámetro × 16 cm de altura) que contenían 150 g. Se evaluaron cuatro condiciones (CP: suelo comercial (Happy Flower mexicana, S.A. de C.V, CDMX, México) sin *Trichoderma*, CN: suelo árido (suelo de Mina, Nuevo León, México) sin *Trichoderma*, AST35: suelo árido con *T. harzianum* T35, ASET9: suelo árido con T9_UANL), mantenido en cámara climática a 28°C, bajo un fotoperíodo de 16 h luz (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$) /8 h oscuridad, y alimentado con dos riegos de 150 mL de agua no esterilizada por semana.

Después de cinco días de incubación de la cepa, se añadieron 25 semillas de *Sorghum bicolor* por lote, las cuales se esterilizaron superficialmente en etanol al 95% (v/v) durante cinco minutos e hipoclorito de sodio al 20% (v/v) durante cinco minutos y se lavaron cinco veces con agua esterilizada. Después de 21 días post interacción, medimos el porcentaje de germinación, la longitud de raíces y tallos y el peso fresco.

El estrés por sequía y plasticidad que brindan las cepas de *Trichoderma* a las plantas de *Sorgo* se determinó de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente con la modificación de reducir en su totalidad el riego por 20 días, el día 21 se regaron las plantas y se almacenaron en cámara de crecimiento para observar su vigor después de 24 h. medimos porcentaje de germinación, longitud de raíz y tallo y peso fresco. Se realizaron cinco determinaciones repetidas por cepa y tres experimentos independientes.

5.11 Genes específicos de *Trichoderma* implicados en el control de pH

Para la búsqueda de los componentes de la respuesta al cambio de pH ambiental se diseñaron oligonucleótidos específicos para identificar variaciones en la estructura completa del gen *Pac1* que codifica para el factor de transcripción PacC mediador de factores extracelulares de condiciones acidas y alcalinas, las reacciones de PCR se realizaron con cebadores para cepas ambientales de *Trichoderma* mostrados en la Tabla 2, la purificación de los fragmentos y secuenciación se efectuaron como se describió anteriormente, la comparación se efectuó con secuencias de referencia reportadas en bases de datos.

Tabla 2: Oligonucleótidos diseñados para la detección de *Pac1* y experimentos de RT-PCR Y qPCR. Se muestra el amplicón esperado a partir de gADN y cADN según corresponda.

Clave	Secuencia 5' - 3'	Tamaño de fragmento
PacC-For-C	GGCCGCGTAACCGTTAGATA	4300 pb
PacC-Rev-C	CTCGTGCTCCTTCCTTCGTT	
Gdpfor	GCTGCCGATGGTGAGCTCAAGGG	189 pb
Gdprev	GAGGTCGAGGACACGCGGGA	
PacC-F-rna	GCCAATGGA ACTCTTGTCGC	220 pb
PacC-R-rna	ATAGTTGGTTCGACGGCTGAG	

Adicionalmente, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región conservada no mayor a 250 pb de *Pac1*, para realizar ensayos de expresión en respuesta a variaciones de pH del medio en las condiciones descritas en el apartado 5.7. para comprobar una diferencia significativa en la expresión de cepas ambientales aisladas de zonas áridas, también se utilizaron oligonucleótidos

correspondientes al gen endógeno *Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GDP)* con expresión constitutiva descritos por Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013.

5.12 Extracción de ARN y síntesis de cADN

La extracción de ARN total se realizó en *T. harzianum* y T9_UANL, que era resistente a pH alcalino. Para ello, los micelios se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido luego de 30 min (T1), 60 min (T2), 24 h (T3) y 48 h (T4) de incubación a 28 °C. La extracción de ARN total fue desarrollada por el método Trizol. El ARN total se trató con ADNasa I libre de ARNasa (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) y el ADNc se sintetizó con transcriptasa inversa omniscrypt® (QUIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.13 Análisis de expresión génica por qRT-PCR

Las reacciones de qRT-PCR se desarrollaron con cebadores específicos de genes (Tabla 2), usando 100 ng de cDNA como plantilla y la mezcla SYBR Green Master (ThermoFisher Scientific). El gen de la GDP se utilizó como gen de mantenimiento y se analizaron tres réplicas técnicas para cada tipo de interacción. Para el análisis de datos se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el software BIO RAD CFX para determinar la expresión de los genes seleccionados.

5.14 Selección de genes codificantes para sideróforos y transportadores regulado por PacC

Wu *et al.*, 2021 analizaron el transcriptoma de mutantes nulas y sobre expresantes de cepas de *Trichoderma reesei* obtenido información de genes codificantes para proteínas no ribosomales péptido sintasa (*NRPS*), también se consideró el análisis de datos de Hakkinen *et al.*, 2014 para determinar posibles genes codificantes de transportadores perteneciente a una súper familia Major Facilitator Superfamily (*MFS*), se seleccionaron secuencias que tuvieran la región promotora 5'-GCCARC-3' del factor de transcripción PacC como criterio principal. Se diseñaron sondas aminoacídicas tomando en cuenta las secuencias de genomas reportados de cuatro principales cepas de *Trichoderma* (*T. virens*, *T. reesei*, *T. atroviride*, *T. harzianum*), de los genes codificantes para sideróforos y su posible transportador transmembranal, se diseñaron oligonucleótidos siguiendo las especificaciones del apartado 5.11 y 5.12 y mostrados en la Tabla 3, para regiones parciales de estos genes.

Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados para detección parcial de los genes *NRPS* y *MFS*. Se muestra el amplicón esperado a partir de gADN y cADN según corresponda.

Clave	Secuencia 5' - 3'	Tamaño de fragmento
Sid-D-For	TGGGGCCAGTATGCTAGGAT	139 pb
Sid-D-Rev	CCACAATCCAAATAGCGGCG	
MFS-For	GCCCGTCTCTTCTTCAGCTA	125 pb
MFS-Rev	ACCACATTCCGATACCCCAT	

5.15 Evaluación de producción de sideróforos por *Trichoderma*

La detección de la capacidad de producir sideróforos de las cepas de *Trichoderma* se evaluó mediante el ensayo Universal CAS (cromo azurol s) en medio sólido (Schwyn y Neilands, 1987). Es el método utilizado para la detección debido al viraje de color como consecuencia de la pérdida de hierro (ferricromogénico).

Todo el material de vidrio utilizado fue lavado con ácido clorhídrico (1 M) para eliminar residuos de hierro. El medio CAS-agar se de las soluciones A y B. La solución A se preparó añadiendo 60.5 mg de cromo azurol s (CAS; Sigma-Aldrich 199532), 10 mL de solución férrica de HCl 10 mM con FeCl₃·6H₂O al 1 mM y 72.9 mg de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA; Sigma-Aldrich H6269) disueltos en 100 mL de agua destilada. El CAS se disolvió en 40 mL de agua destilada para agregar la solución férrica, posterior se observó un viraje de anaranjado rojizo a rojo oscuro, después se adicionó el H.D.T.M.A. obteniendo una solución púrpura. Finalmente, la solución se aforó a volumen final de 100 mL con agua destilada. Solución B, se preparó el medio mínimo 9 (MM9) sólido (10 g/L de glucosa, 0.5 g/L de NaCl, 0.3 g/L de K₂PO₄, 0.1 g/L de NH₄CH₃CO₂, 150mg deL-ornitina, 30 g/L de MES) se ajustó el pH del medio a 6.8 y se agregaron 15 g/L de agar para aforar 900 mL con agua destilada.

Ambas soluciones fueron esterilizadas por separado a 120°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Una vez estériles las soluciones A y B se dejaron enfriar hasta aproximadamente los 40°C y se mezclaron los 100 mL de la solución CAS con los 900 mL de MM9 para obtener 1L de CAS-agar, adquiriendo la característica coloración azul del medio.

El medio se vació en cajas Petri, una vez solidificado se inoculó en el centro un disco micelial de 5 mm de diámetro de un cultivo de 48 horas de crecimiento de cada una de las cepas. Los cultivos se mantuvieron en observación 5 días incubados a 28 °C. La producción de sideróforos se consideró positiva al observar un viraje de azul a amarillo, anaranjado o púrpura dependiendo del

tipo de sideróforos presente (Pérez-Miranda *et al.*, 2007). Como controles se usaron cajas con medio CAS-agar sólido sin inocular. Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.16 Cuantificación de unidades de sideróforos

Para cuantificar las unidades de sideróforos producidas, se utilizó como medio de cultivo el MM9 líquido (10 g/L glucosa 1%, 5 g/L de acetato de amonio, 1.5 g/L de KH_2PO_4 , 2.5 g/L de NaCl) ajustado a pH 5.8. Se transfirieron 100 mL de medio a un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Una vez fríos, cada matraz se inoculó con tres discos miceliares de 5 mm de diámetro de un cultivo de 48 horas de alguna de las cepas. Cada una se inoculó por triplicado. Como control se usaron matraces con medio MM9 sin inocular. Los matraces se incubaron a $28\pm 2^\circ\text{C}$ en agitación a 100 rpm durante 15 días, recuperando alícuotas de 1 ml de sobrenadante cada día. Al final, los cultivos se filtraron y el sobrenadante libre de células se utilizó para los ensayos de identificación y cuantificación de unidades de sideróforos producidos.

La cuantificación de los sideróforos se realizó mediante el ensayo CAS líquido (Schwyn y Neilands, 1987). Para esto, se preparó la solución Fe-CAS con 7.5 mL de CAS 2 mM, 1.5 mL $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, 21.9 mg de HDTMA y 9.76 g de MES en 100 mL y se ajustó el pH a 5.6. Se tomaron 100 μL de sobrenadante libre de células, y se les agregó 100 μL de la solución CAS-Fe en una microplaca de 96 pozos. Para cada cepa se hicieron dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada replica biológica. El medio MM9 sin inocular fue utilizado como control. La absorbancia de las muestras se midió en un lector de placas Multiskansky a 630 nm. Finalmente, las unidades de sideróforos producidos por cada cepa se determinaron de acuerdo a la ecuación propuesta por Sayyed y colaboradores (2005):

$$\% \text{ de unidades de sideroforos} = \frac{(Ar - As)}{Ar} \times 100$$

Donde:

Ar: Absorbancia de referencia (blanco)

As: Absorbancia de la muestra

5.17 Análisis estadístico

El software IBM® SPSS® Statistics analizó estadísticamente los datos mediante un análisis de varianza unidireccional, con un valor de significancia $p \leq 0.05$. Los datos representan determinaciones por triplicado de tres experimentos independientes, y los gráficos se realizaron en la versión OriginLab 2019.

VI. Resultados

6.1 Análisis fisicoquímico de suelo

La textura del suelo fue Franco-Arcillo-Arenoso en todos los sitios colectados (25° 59' 05.6" / 100° 37' 10.9"), las características fisicoquímicas son limitantes tomando como parámetro una óptima nutrición planta-microorganismos (Tabla 4), debido al descubrimiento de baja de disponibilidad nutrientes el sitio en considerado no apto para la proliferación de cultivos agrícolas. Un parámetro relevante en la rizosfera es el pH alcalino ($8,74 \pm 0,24$), además, era moderadamente calcáreo lo que evita la permeabilidad del agua y con un bajo nivel de materia orgánica que resultaba en baja disponibilidad carbónica. Por tanto, con base en los parámetros de la NOM-021-RECNAT-2002, los elementos que superan los niveles del umbral de nutrición y en las concentraciones presentes a pH alcalino resultan tóxicos para los organismos de la rizosfera son: P, Ca, Na, el resto de los elementos analizados se encuentra en cantidades mínimas que son insuficientes para la nutrición de plantas y microorganismos.

Tabla 4. Abundancia de macronutrientes y micronutrientes en análisis fisicoquímicos en el suelo de Mina, Nuevo León.

Lugar de muestra	Textura de suelo	pH	Materia Orgánica	P-Olsen	Ca	K	Cu	CIC
	(USDA)		(%)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	me/100g
Mina, NL	Franco arcillosos arenoso	8.74±0.24	0.43±0.03	26.1±3.0	2947±9.0	116±24.1	0.22±0.02	15.8±0.01
Lugar de muestra	N-NO3	Fe	Na	Zn	Mn	Mg	B	S
	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)
Mina, NL	10.5±4.69	1.74±0.05	77.5±9.1	0.30±0.06	2.37±1.72	51.2±2.9	0.55±0.11	7.91±2.59

6.2 Aislamiento e identificación de *Trichoderma* de rizosfera

Nosotros aislamos 11 cepas de *Trichoderma spp.* A partir de 500 muestras mixtas de suelo radicular y rizosfera. Eran blancas al principio, luego se volvieron amarillentas y verdosas después de tres días de cultivo (Figura 4), por la variación en morfología y microscópica (Anexo 1) realizamos análisis molecular de los aislados ambientales. Evaluamos genes individuales y concatenados para generar una filogenia definida, son obtener dendrogramas concretos (Anexo 2), sin embargo, la resolución más alta se obtuvo con el marcador molecular *TEF1*, generando un árbol filogenético obtenido mediante un análisis de unión de vecinos (Fig. 5) que demostró los siguientes patrones de agrupación: el clado A comprendía principalmente *T. asperelloides* (T1_UANL, T2_UANL y T5_UANL), el clado B representó dos *Trichoderma sp.* aislados

(T7_UANL y T10_UANL), y el clado C mostró ascendencia a *T. harzianum* (T3_UANL, T4_UANL, T6_UANL, T8_UANL, T9_UANL y T11_UANL).

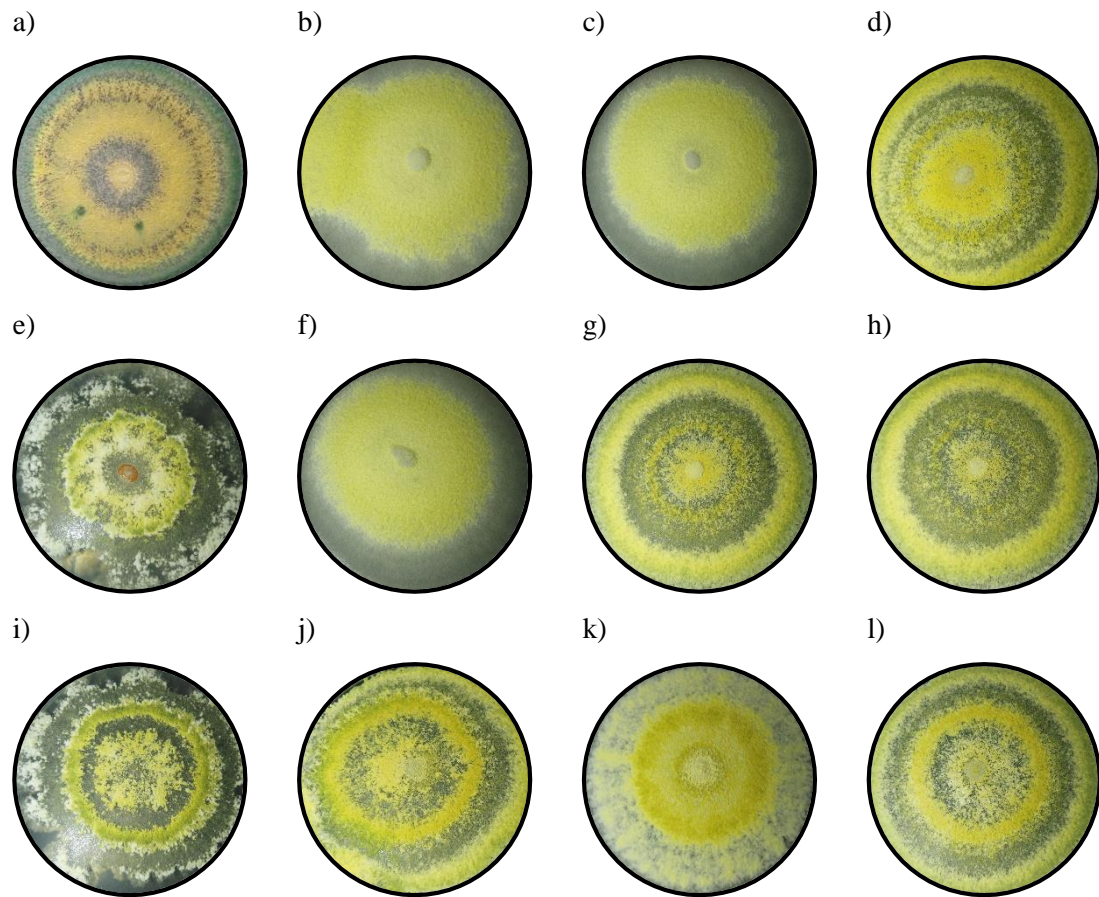


Figura 4.- Características macroscópicas de las cepas ambientales de *Trichoderma* spp. en PDA durante 72 h a 28 °C. a) *T. harzianum* T35, b) T1_UANL, c) T2_UANL, d) T3_UANL, e) T4_UANL, f) T5_UANL, g) T6_UANL, h) T7_UANL, i) T8_UANL, j) T9_UANL, k) T10_UANL, l) T11_UANL.

La importancia de la obtención de las muestras define el comportamiento fisiológico, por lo tanto, se aislaron dos cepas de *Trichoderma* de raíz de plantas de *A. lechuguilla* (T4_UANL y T9_UANL), mientras que de la rizosfera asociada a esta planta se aislaron seis cepas de hongos, consideradas el número más significativo de aislamientos (T1_UANL, T2_UANL, T3_UANL, T6_UANL, T7_UANL, T8_UANL). A partir de plantas de Ocotillo se aislaron tres cepas aisladas (T5_UANL, T10_UANL, T11_UANL), sin cepas aisladas de la rizosfera de esta planta. Los resultados ilustran una excelente variedad de especies de *Trichoderma* independientemente del origen de la muestra, así también afirmamos que la zona de estudio presenta diversidad con nuevas cepas hongos poseedoras de variación genética y adaptadas a ambientes áridos, además, la asociación con raíz y suelos adyacente a plantas endémicas demuestra una interacción mutualista de organismos zonas con características extremas.

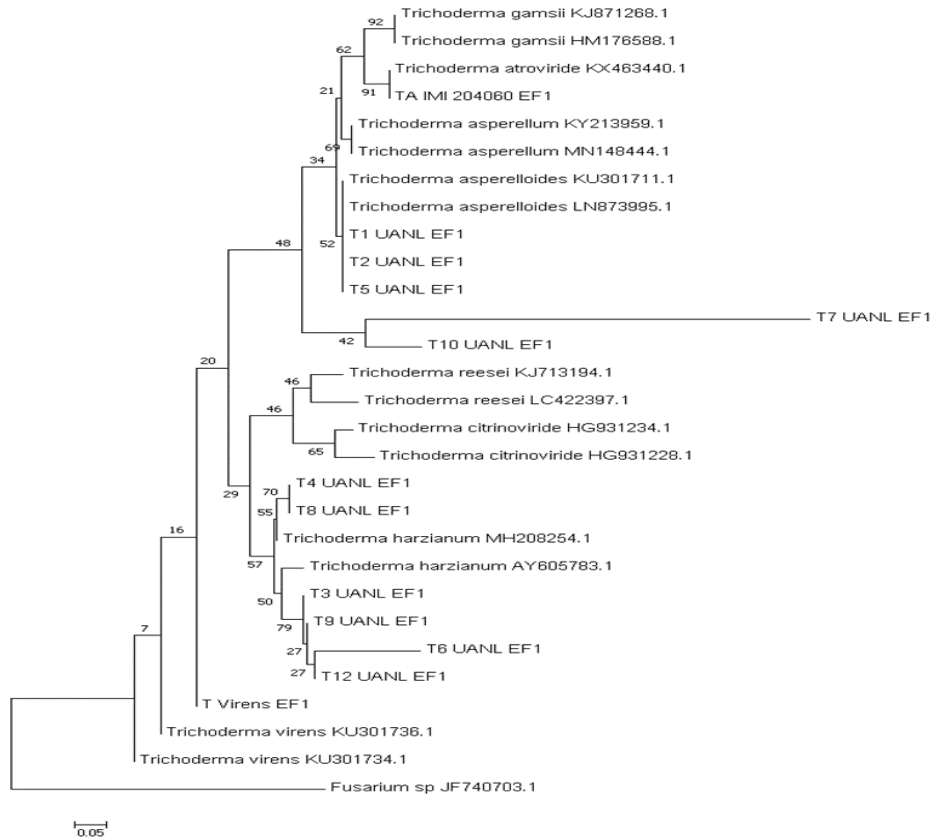


Figura 5.- Análisis filogenético de *Trichoderma* con marcador molecular *TEF1* y método unión de vecinos (NJ). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 2,72. El análisis se realizó en MEGA 7, Porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones).

La importancia de la obtención de las muestras define el comportamiento fisiológico, por lo tanto, se aislaron dos cepas de *Trichoderma* de raíz de plantas de *A. lechuguilla* (T4_UANL y T9_UANL), mientras que de la rizosfera asociada a esta planta se aislaron seis cepas de hongos, consideradas el número más significativo de aislamientos (T1_UANL, T2_UANL, T3_UANL, T6_UANL, T7_UANL, T8_UANL). A partir de plantas de Ocotillo se aislaron tres cepas aisladas (T5_UANL, T10_UANL, T11_UANL), sin cepas aisladas de la rizosfera de esta planta. Los resultados ilustran una excelente variedad de especies de *Trichoderma* independientemente del origen de la muestra, así también afirmamos que la zona de estudio presenta diversidad con nuevas cepas hongos poseedoras de variación genética y adaptadas a ambientes áridos, además, la asociación con raíz y suelos adyacente a plantas endémicas demuestra una interacción mutualista de organismos zonas con características extremas.

6.3 Cepas de *Trichoderma* toleran el pH alcalino

Con base en lo mostrado donde la rizosfera es alcalina y sabiendo que los hongos muestran un amplio nivel de tolerancia a pH adverso, evaluamos la respuesta de pH ácido, neutro y tomando énfasis en alcalino de 11 cepas aisladas de *Trichoderma*, usamos la cepa T35 de *T. harzianum* como control. Todas las cepas crecieron en pH ácido y neutro, mientras que solo tres aislados ambientales T3_UANL, T6_UANL y T9_UANL crecieron en condiciones alcalinas (Fig. 6). A pH 3 con amortiguador, la producción de biomasa después de 72 h fue constante en todos los ascomicetos en esta condición, mientras que en pH neutro se observó una diferencia significativa aumentando hasta 0.92 g por la cepa T9_UANL al final del experimento y destacando que fue la cepa que obtuvo mayor desarrollo micelial, misma tendencia de la cepa ambiental que produjo mayor biomasa en condiciones alcalinas y resaltando que es un comportamiento atípico debido a que la tolerancia a pH 9.0 es diferencial en el resto de las cepas ambientales del presente estudio, las tres cepas que logran desarrollo en alcalinidad no son consideradas cepas alcalófilas, sin embargo pueden ser consideradas alcalino tolerantes.

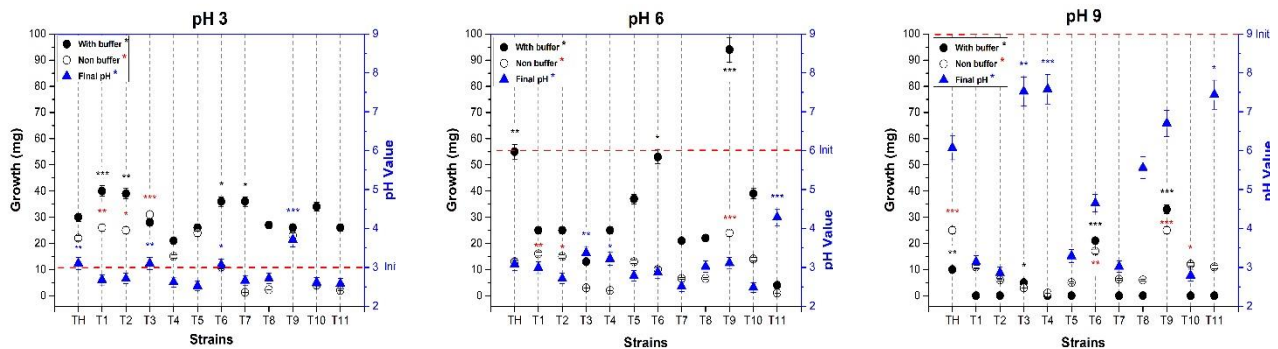


Figura 6. Producción de biomasa en cepas ácidas, neutras, alcalinas y cambio de pH afectado en 0.2X MS. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Diferentes asteriscos en cada elemento designan valores significativamente diferentes para $p < 0,05$ en la prueba de Tukey.

Un análisis detallado del comportamiento en la generación de biomasa en cultivo líquido de 0.2X MS en pH inicial 3.0 con ausencia de amortiguador obtuvo crecimiento de hifas en todas las cepas analizadas; sin embargo, la respuesta al cambio de pH final se encontró que la cepa control (*T. harzianum*) mantiene estabilidad en el valor de pH ácido, mientras que T9_UANL logró elevar el pH final del medio a 3.71 comportamiento que no se detectó en otra cepa evaluada. Evaluando la condición neutra de pH T9_UANL logra la mayor producción de biomasa, seguida de la cepa control *T. harzianum* en el medio sin presencia de amortiguador; sin embargo, al registrar los efectos sobre la modificación del medio por la actividad de las cepas de *Trichoderma* a pH 6.0, se observó que todas las cepas presentaron una modificación con tendencias ácidas cercanas a valores de pH 3.0. Cuando registramos datos a pH inicial 9.0, solo tres cepas ambientales (T3_UANL,

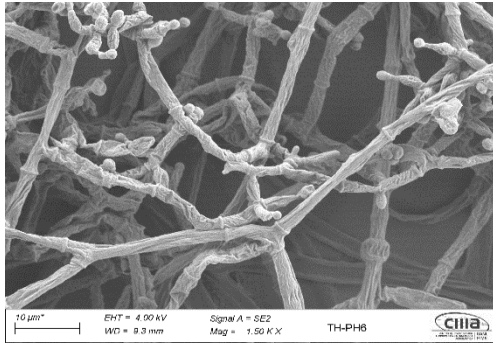
T6_UANL y, T9_UANL) generaron biomasa, estas se identificaron molecularmente como *T. harzianum*, similar a la cepa control que también crece en alcalinidad; por lo tanto, la generación de biomasa es estadísticamente significativa en las cepas *T. harzianum* y T9_UANL, además, se registró una modificación en su pH final cercano al pH neutro, este desarrollo sobresaliente y diferente al resto de las cepas evaluadas es suficiente para proponer a la cepa T9_UANL en ensayos posteriores debido a que presenta una adaptación a condiciones extremas con respecto al resto de cepas evaluadas, la influencia del estrés alcalino reduce la generación de micelio, así que solamente las cepas adaptadas a condiciones extremas de pH son una opción interesante para la mejora de suelos con baja presencia de materia orgánica.

6.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en condición alcalina

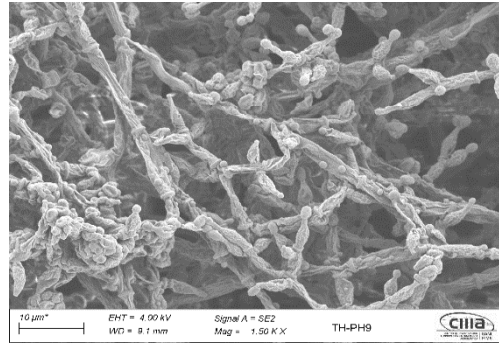
Para comprender los mecanismos en la adaptación a ambientes extremos es indispensable ver cambios en la morfología de la cepa T9_UANL presenta un crecimiento superior en condiciones alcalinas con respecto a los otros aislados ambientales, primero evaluamos su fenotipo contra la cepa de laboratorio *T. harzianum* T35 en pH 6,0. El pH ideal para el desarrollo de hongos filamentosos está en los rangos de 5.5 y 6.5; por lo tanto, nuestro parámetro de control es observar cambios en la estructura de hifas, conidios, fialides comparado con el aislado ambiental. Observamos estructuras de hifas bien definidas en *T. harzianum* T35 (7a), identificándose septos y conidiación basal, esto es elemental para la propagación en hongos filamentosos, en contraste, la cepa en estudio presenta turgencia, agrupamiento y restos atípicos adheridos a las hifas figura 3c; sin embargo, conserva una conidiación basal similar a la reflejada en la cepa de control, lo que indica una dispersión de esporas preestablecida de las especies filamentosas.

La morfología fúngica se analizó en condiciones alcalinas como se describió anteriormente. Curiosamente determinamos que las hifas en la cepa control de *T. harzianum* T35 presentaban estructuras de hifas bien definidas, sin embargo, las estructuras hifales se vuelven turgentes, además como mecanismo de defensa contra este tipo de estrés se agrupan para mitigar la alcalinidad, y finalmente, la cepa mostró hiperconidiación en esta condición (Figura 7b). En comparación con T9_UANL en tiempos y condiciones similares, este aislado en particular produjo hifas flácidas, el fenotipo de crecimiento y desarrollo es opuesto al T35 por lo tanto, el metabolismo reacciona diferencial y su morfología no cambia drásticamente para mitigar un posible daño por iones hidroxilo (Figura 7d); adicionalmente, la cepa ambiental produjo menor conidiogénesis en pH alcalino, todos los descubrimientos son atribuidos a los micro ambientes del suelo donde fueron sustraídas las cepas ambientales de *Trichoderma*.

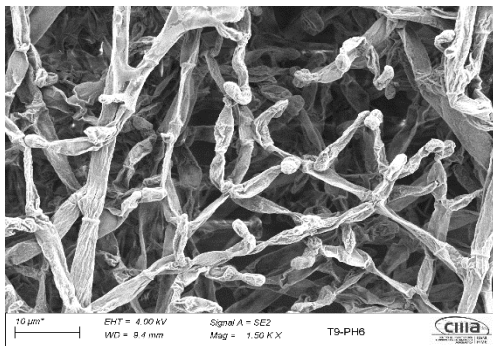
7.a)



7.b)



7.c)



7.d)

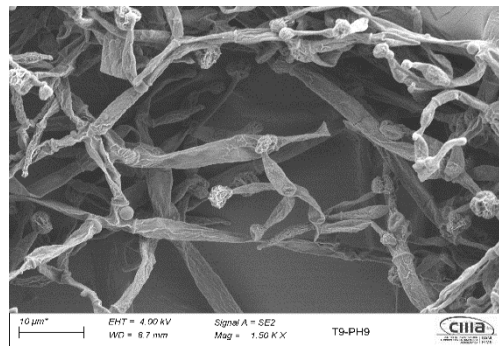


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido (SEM). Microfotografías de (A) *T. harzianum* cultivado en MS+S (control pH 6,0) y (B) condición de estrés pH 9,0 (C) T9_UANL crecimiento en MS+S (control pH 6,0), (D) condición de estrés pH 9,0 a 28°C durante 72 h.

La comparación microscópica de ambas cepas confirmó que cuando *Trichoderma* está en crecimiento a óptimos valores de pH (neutro), la sensibilidad de las hifas no se ve afectada negativamente por lo tanto no cambia la morfología, sin embargo, en condiciones alcalinas se produce un cambio dependiendo de las cepas en estudio, los estímulos más significativos para provocar cambios se dan en la condición alcalina que provoca diferencias fenotípicas entre las cepas de *Trichoderma* analizadas.

6.4 Cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de fitopatógenos

En *Trichoderma* una de las funciones más estudiadas es la actividad micoparásitica sobre diversos hongos, entre ellos muchos clasificados como fitopatógenos de importancia de cultivos agroindustriales. Enfrentamos T9_UANL contra los fitopatógenos *R. solani* anastomosis grupos AG2 y AG5, y *Fusarium oxysporum*, utilizando como cepa de referencia *T. harzianum* T35 y *T. atroviride* IMI204060. Como se muestra en la Figura 8, *T. harzianum* T35 limitó parcialmente el crecimiento de todos los fitopatógenos y, en menor medida, *R. solani* AG2. T9_UANL presenta un patrón de antagonismo similar a T35, excepto que baja su eficiencia contra *R. solani* AG2, con respecto a la cepa de *T. harzianum* control, donde *R. solani* extendiendo su micelio extensamente sobre la placa.

De manera interesante el aislado ambiental seleccionado tuvo un mejor desempeño al ser un biocontrolador eficiente contra *Fusarium oxysporium* donde no permite la colonización completa de la placa, además presenta un comportamiento de encapsulamiento también visto en *T. harzianum* T35, pero no observado en *T. atroviride*. Este comportamiento indica que la cepa T9_UANL tendría efectividad en interacciones micoparasitarias bajo condiciones ambientales o agrícolas precarias; por lo tanto, *Trichoderma* compete con hongos inactivando las quinasas del fitopatógeno, además la expansión y protección de hifas para competir por nutrientes es la respuesta de cómo actúa un biocontrolador eficiente como las cepas de *Trichoderma*.

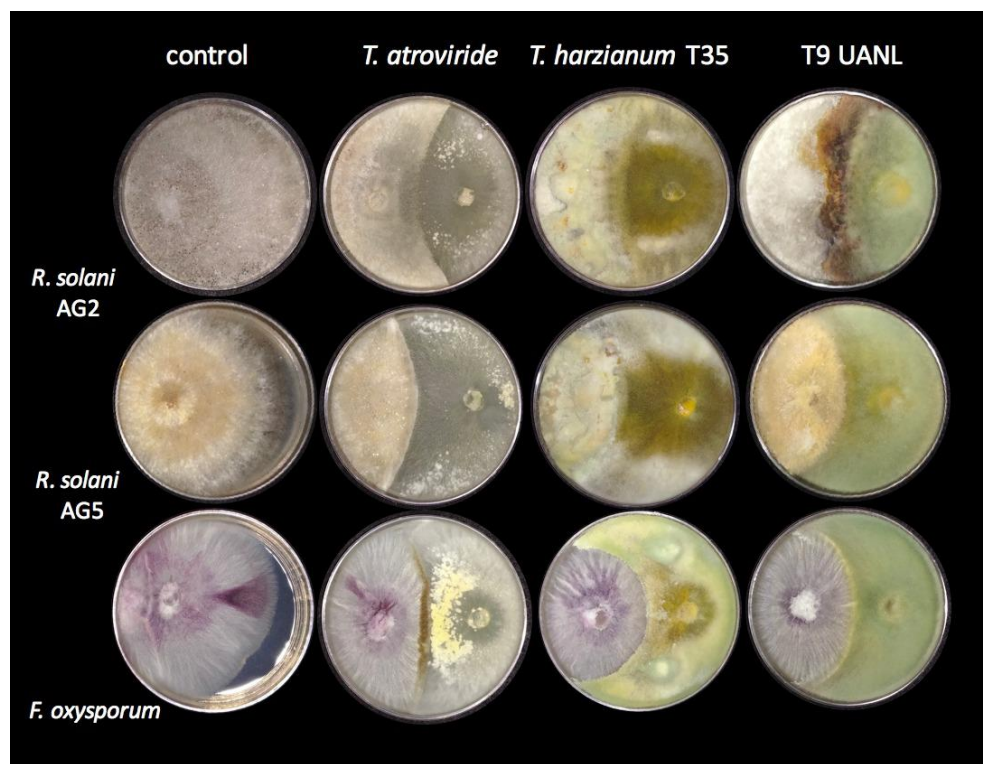


Figura 8.- Actividad micoparasitaria de cepas de *Trichoderma*. Enfrentamientos directos de cepa ambiental y *T. harzianum* T35, y *T. atroviride* IMI204060 contra tres fitopatógenos principales. La prueba se desarrolló por triplicado en PDA durante 72 h a 28 °C.

6.5 Interacción planta-hongo y mitigación de la sequía

Para estudiar la actividad de promoción de crecimiento vegetal con la cepa ambiental seleccionada de *Trichoderma*, se llevó a cabo en suelo extraído de Mina, Nuevo León, donde fue el área de muestreo, y analizar más de cerca el efecto de la inoculación directamente sobre condiciones ambientales endémicas de la zona de estudio. Utilizamos *T. harzianum* T35 y T9_UANL, con semillas de la planta agroindustrial *Sorgo bicolor*.

En primer lugar, analizamos el efecto que tiene la presencia de las cepas de *Trichoderma* sobre la germinación de las semillas. El Sorgo bicolor tratadas con el aislado T9_UANL exhibieron la mayor tasa de germinación (86%) de todo el experimento, la comparación más cercana es la efectuada por el tratamiento control (CP) compuesto por suelo comercial (61%). Las semillas tratadas con el hongo *T. harzianum* T35 (AST35) exhibieron una tasa de germinación del 70% (Fig. 9); este resultado resulta representativo con la comparación con el suelo árido sin microorganismos (CN) que exhibió la menor tasa de germinación (46%) hasta el final del experimento.

9.a)

9.b)

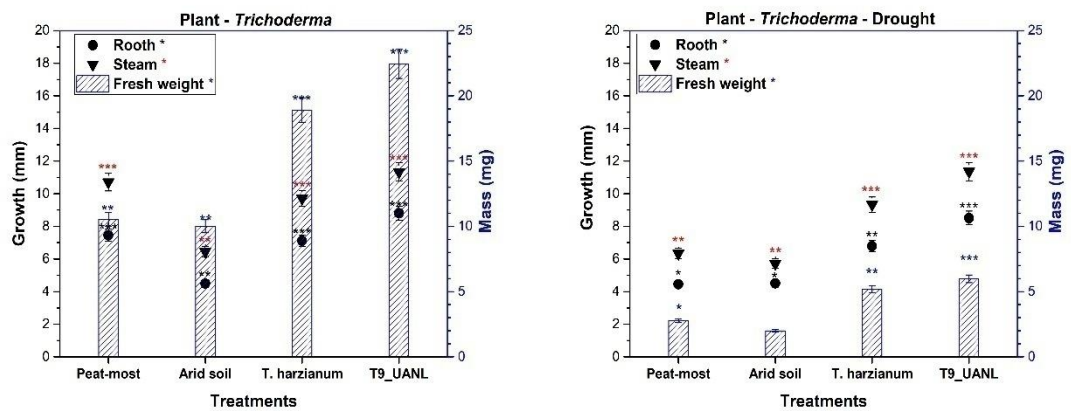


Figura 9.- Efecto de *Trichoderma* en la promoción del crecimiento de *Sorghum bicolor* en suelos de salinidad y alcalina. a) interacción planta-microorganismo en condiciones de agricultura endémica. b) El efecto de los microorganismos para mitigar el estrés causado por la sequía. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Diferentes asteriscos en cada elemento designan valores significativamente diferentes para $p < 0,05$ en la prueba de Tukey.

La longitud de la raíz y la generación de raíces secundarias son esenciales para expandir el área de superficie radicular para la absorción de nutrientes. La inoculación de T9_UANL (ASET9) mejoro la arquitectura del sistema radicular mostrando raíces más largas y con abundantes raíces secundarias con un aumento de 48.98%, así mismo, *T. harzianum* T35 presento un aumento en la densidad de las raíces primarias y secundarias de 29.88%, como se muestra en la Fig. 10; en relación con la comparación directa con tratamiento control de suelo árido (CN), este resultado es significativo estadísticamente lo que impacta en la eficiencia de absorción de nutrientes y el crecimiento de las plantas. En general la presencia de cepas ambientales de *Trichoderma* no afecta negativamente la salud de las plantas, mientras que estimula las respuestas en mostrar raíces vigorosas y uniformes, caso contrario en las condiciones control donde la densidad radicular refleja reducción en valores de peso fresco en suelo árido (CN) y en comparación con la muestra de control utilizando suelo comercial (CP).

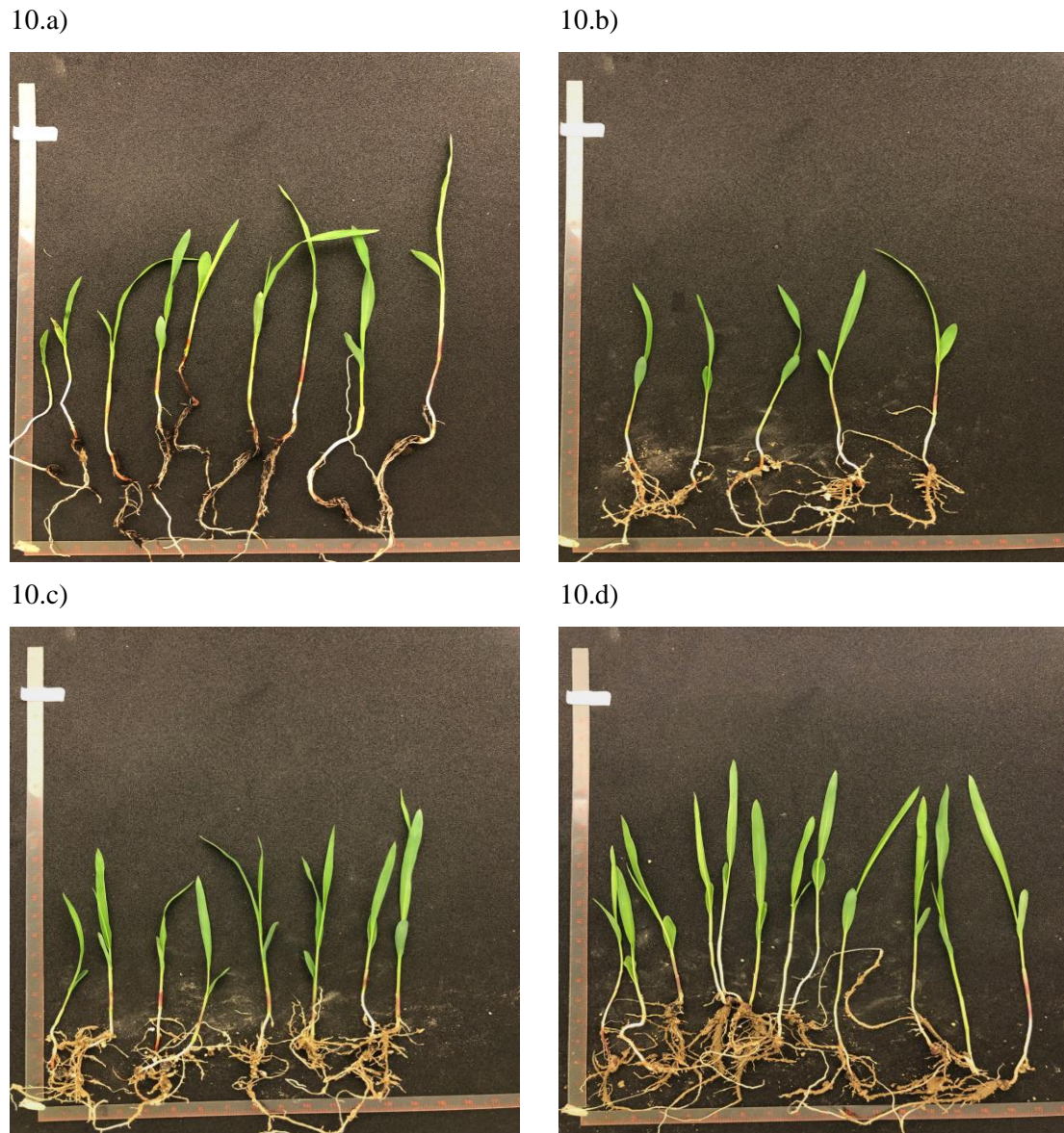


Figura 10.- Interacciones de Sorgho bicolor con *Trichoderma*. Imágenes representativas de las interacciones con plantas a) CP: suelo comercial sin *Trichoderma*, b) CN: suelo árido sin *Trichoderma*, c) AST35: suelo árido con *T. harzianum* T35, d) ASET9: suelo árido con T9_UANL).

El ensayo actual investigo el efecto en la mitigación que proporciona *Trichoderma* ante el efecto que genera la sequía sobre plantas de *Sorgho bicolor*. Se sometió la interacción *Sorgho-Trichoderma* sin riego durante 20 días, este día se efectuó un riego de 150 ml y después de 24 h se seleccionaron plántulas que no se vieron totalmente afectadas en la arquitectura de la planta. Las condiciones de sequía provocó un marchitamiento y la inhibición del crecimiento hasta un 50% en la altura de las plantas en comparación del ensayo anterior en todos los tratamientos efectuados. El efecto de limitación de agua provoca una disminución drástica en la producción de producción de biomasa

vegetal, además, la poca permeabilidad de agua acompañada de la falta de nutrientes en el suelo y el estrés por sequía es un efecto irreversible en tejidos vegetales. La cepa T9_UANL (ASET9) fue el tratamiento mostro valores intermedios de mitigación significativa del daño por sequía un 66,56% frente al tratamiento testigo suelo árido (CN) en donde claramente es el tratamiento donde las plantas presentan el daño más evidente. Sin embargo, la cepa de *T. harzianum* T35 muestra niveles aceptables de mitigación de la sequía, lo que confirma un rendimiento para inhibir la sequía de 40% superior los dos controles: suelos áridos (CN) y suelos comerciales (CP), la sequía disminuye notablemente el crecimiento vegetal, sin embargo el conjunto de sorgo con cepas de *Trichoderma* puede reducir las pérdidas de plantas, debido a que los hongos filamentosos retienen agua que pueden promover la humedad en el suelo que puede ser aprovechado para la turgencia de las plantas, lo que puede aumentar la cantidad de días sin riego en cultivos agrícolas.

6.6 Análisis en la variación de dominios conservados de *PacC*, *NRPS* y *SIT*

El criterio para elegir de las secuencias a analizar a partir de una lista de nueve candidatos reportados por Leher *et al.*, 2013 para especies de *T. virens*, *T. atroviride*, *T. reesei*, fue seleccionar secuencias que tengan sitio de unión al factor de transcripción PacC, este criterio se basó en la consideración de utilizar *T. harzianum* como referencia de aislados ambientales y control. Se obtuvo una secuencia de gen a estudiar que pertenece a Sideróforo sintetasa *SidD*, homólogo a *NPS6* de *Trichoderma* sp. *NRPS SidD* en *A. fumigatus* (XP_748662), transfiere N5-cis-anhidromevalonil-N5-hidroxi-L-ornitina a fusarinina C. en la Figura 11 se alinean clúster de genes localizados en el genoma de *T. harzianum* CBS.95 en GenBank y pertenecientes a la familia de biosíntesis de sideróforos, además buscamos un transportador transmembranal que de igual manera tuviera por lo menos un sitio de unión a PacC, por lo cual, fue elegido el transportador de sideróforos (*SIT*) de la Major Facilitator Superfamily para facilitar el movimiento de moléculas de bajo peso molecular quimiosmóticos.

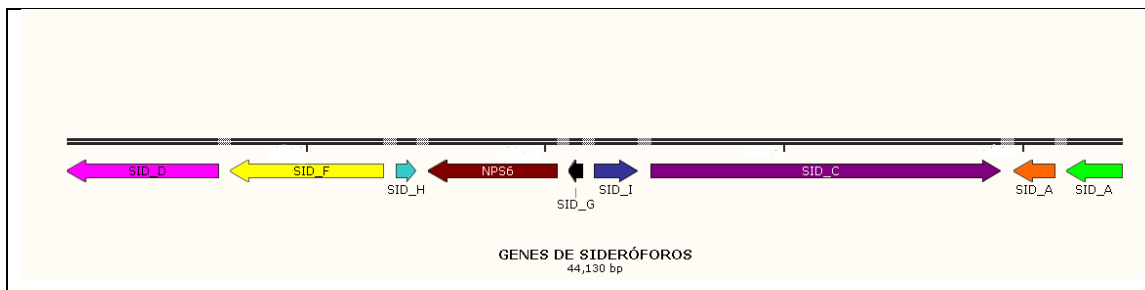


Figura 11.- Selección de genes candidatos a sideróforos del genoma de *Trichoderma harzianum*.

Con la finalidad de obtener un panorama general para describir mecanismos que les permite a las cepas ambientales de mantener su crecimiento bajo condiciones adversas de pH. Buscamos una

región altamente conservada para los genes *Pac1*, *SidD* y *SIT* en los genomas de referencia. En la Figura 12 se señalan las regiones conservadas de los tres genes.

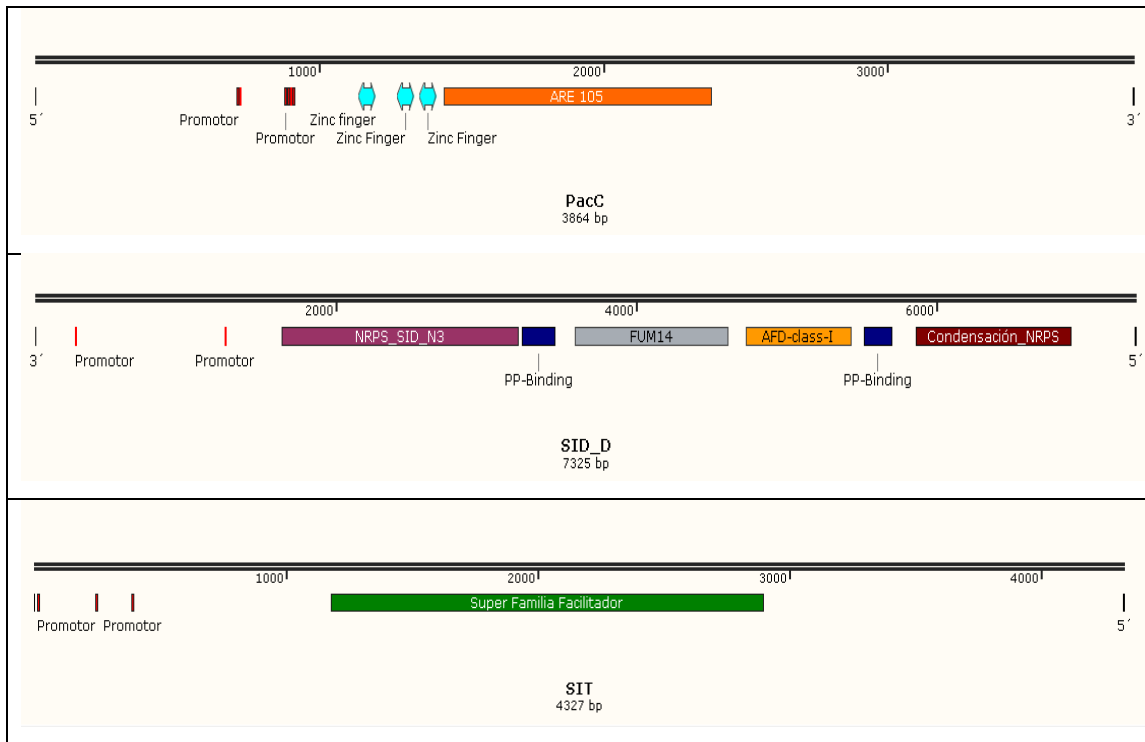


Figura 12.- Marco de lectura abierto de los genes *Pac1*, *SidD* y *SIT*, señalando los dominios conservados.

El alineamiento de secuencias múltiples dio como resultado una lista de identidad de fragmentos como se muestra en la Tabla 5. realizamos análisis comparativos de secuencias para evaluar la homología entre la cepa *T. harzianum* T35 y la cepa ambiental T9_UANL con respecto a los publicado para la cepa *T. harzianum* CBS.95, con el análisis comparativo de la secuencia resultante determinamos que la región más variable es en el dedo de zinc tres y el intrón y la región ARE 105 de la cepa ambiental con variación de 86% de identidad, en lo que corresponde *SidD* y *SIT* no representan variaciones mayores.

Tabla 5.- Porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de los genes *Pac1*, *Sid_N3*, *FUM14* y *SIT* con la cepa de referencia *T. harzianum* CBS.95.

Cepas	<i>Pac1</i>	<i>Sid_D</i>	<i>SIT</i>
<i>T. harzianum</i>	100%	95%	100%
T9_UANL	85%	90%	100%

6.7 Expresión de los genes *Pac1* en condición de alcalinidad

PacC es un factor transcripcional clave en hongos para regular genes que ajustan su respuesta fisiológica en respuesta a cambios en el pH externo. En la Figura 13 se muestra una imagen representativa de los patrones de expresión del gen *Pac1* analizado para ambas cepas de *Trichoderma harzianum* en los tiempos determinados en el apartado de materiales y métodos, a pH 3.0 la cepa T9_UANL presenta una expresión diferencial a los 60 min de interacción en el medio, sin embargo en tiempos largos no representa una mayor expresión en comparación del gen *GDP*, caso contrario a la expresión de la cepa T35 donde el medio ácido no afecta la expresión en ninguno de los tiempos analizados y se mantiene de manera consistente.

En medios con pH 6.0 inicial las cepas T35 y T9_UANL presentaron una expresión promedio consistente en tiempos de 30 y 60 minutos, mientras a tiempos de exposición más largos, de igual manera ambas cepas alcanzaron un umbral promedio de 2.5 con respecto al gen *GDP*, sin embargo, este comportamiento no representa patrones de expresión elevados, considerando que la expresión de *Pac1* puede estar desempeñando cambios mínimos en la respuesta fisiológica ante pH neutro.

Finalmente, el comportamiento a pH 9.0 representa cambios importantes en las interacciones biológicas de *Trichoderma* en estos ensayos, *Pac1* de *T. harzianum* T35 presentaron patrones de expresión a la baja en tiempos cortos, sin embargo, se sabe que la alcalinidad promueve la alteración de los genes de muchos hongos, y es lo que presenta la Figura 12 donde nuestros ensayos describen que para esta cepa el pH alcalino es una condición estresante, además los resultados obtenidos marcan una sobre expresión de este gen con un umbral de hasta 8 veces en comparación con el gen de comportamiento endógeno *GDP*. Nosotros detectamos que la cepa ambiental T9_UANL presenta niveles de expresión atípico y contrario a lo generado por la cepa control, debido a que en tiempos cortos la cepa de *Trichoderma* experimento una expresión al alza (2 lecturas) a los dos primeros tiempos analizados, esta expresión relativa muestra patrones muy similares a los demostrado a pH neutro por la cepa T9_UANL, sin embargo, hubo una diferencia significativa cuando el tiempo de exposición fue prolongado (24 y 48 h), este efecto no se mostró anteriormente en las condiciones evaluada, por este motivo esta cepa no tiene afectaciones por pH 9.0, lo que aporta información que nuevas cepas con adaptaciones a demandas ambientales extremas constituye un efecto positivo para regular genes que albergan sitios de unión a PacC, además que dichos genes pudieran estar involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios cuya expresión es necesaria a pH alto.

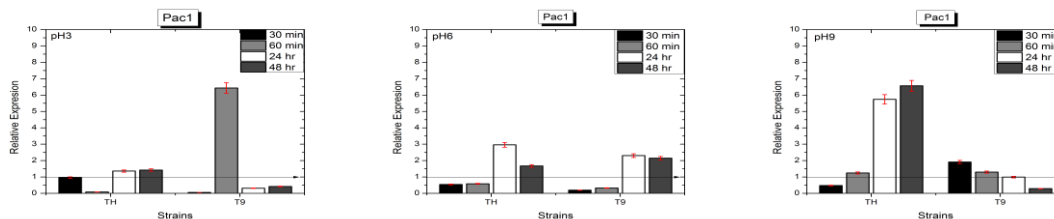


Figura 13. Perfiles de expresión de los genes Pac1 de cepas ambientales de *Trichoderma* cultivadas en diversas condiciones de pH. Se cultivaron en un 0,2X MS + sacarosa 0,6%, conteniendo tampón pH3.0 (100mM de citrato de sodio), pH6.0 (100mM de MES), y pH9.0 (100mM de CHES), análisis de transcripción de (T1= 30 min, T2= 60 min, T3= 24 h, T4= 48 h). Todos los valores se normalizaron a la expresión GDP. Las barras de error indican desviaciones estándar.

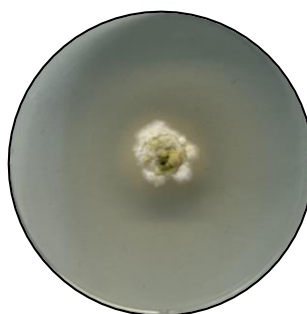
6.8 Producción de sideróforos dependientes de Fe

El pH afecta directamente la concentración de hierro ya que el pH ácido aumenta la disponibilidad de hierro soluble (Fe^{2+}), y a pH alcalinos el hierro insoluble (Fe^{3+}) se presenta en valencias para no ser absorbido por organismos. La producción de sideróforos en medio CAS de las cepas de *Trichoderma* se observaron a los tres días de incubación, el cambio de coloración del medio azul a naranja indica la producción de sideróforos alcalinos, mientras la coloración de rojizo- morado indica naturaleza acida de los sideróforos que son secretados al medio por los microorganismos. La producción máxima de quelantes de hierro fue detectada a los cinco días de cultivo, así mismo, en la Figura 14 observamos un viraje de color CAS a una tonalidad amarilla, sin llegar a color naranja, lo que puede indicar la producción únicamente de hidroxamato. La porción de medio ocupado por el área del halo indicador hasta al final del tratamiento de 16 mm en la cepa T9_UANL frente a 14 mm de *T. harzianum* T35.

14.a)



14.b)



14.c)



Figura 14.- Evaluación de producción de sideróforos en cepas de *Trichoderma harzianum* en medio CAS después de tres días de incubación.

6.9 Cuantificación de sideróforos

La cinética de crecimiento-producción para verificar la producción de unidades de sideróforos se evaluó a los 10 días, considerando las concentraciones 0, 10 y 100 mM de $FeCl_3$, en el medio descrito en apartado 5.16. los resultados obtenidos en las dos cepas de *Trichoderma* (T35 y T)_UANL) muestran una relación directa entre la concentración de $FeCl_3$ y el crecimiento celular,

a concentración alta de 100mM el desarrollo micelial fue deficiente, además, no presenta la producción de sideróforos, esto se debe a que la gran cantidad de iones de Fe presentes en el medio, a dichas concentraciones *Trichoderma* no tiene la necesidad fisiológica de expresar genes para la bio-producción de sideróforos, por lo tanto, en la Figura 15 solo se detectan valores cercanos o lo que fue agregado al inicio del experimento. El porcentaje de unidades de sideróforos entre las cepas *T. harzianum* fue similar de 80 unidades de sideróforos al día cinco, sin embargo, al día 6 existe una diferencia notoria de la cepa control contra la cepa ambiental, donde T9_UANL disminuyó 40 unidades y decretando un descenso considerable hasta el final del experimento.

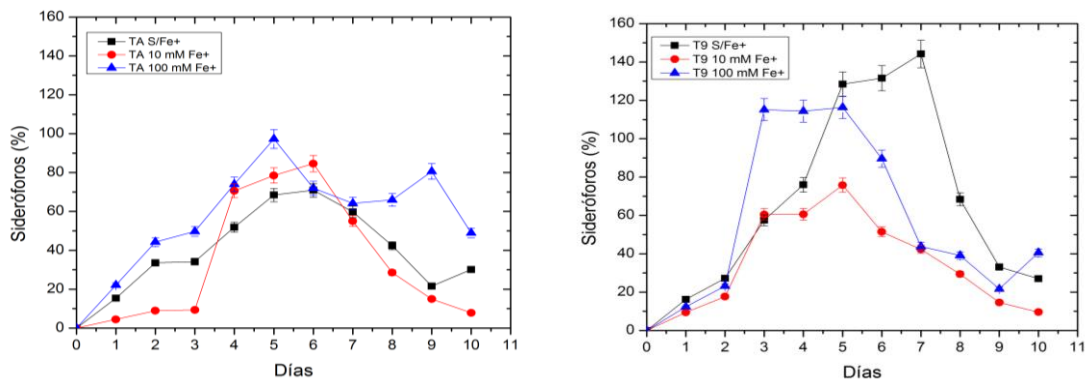


Figura 15. Caracterización de la producción de unidades de sideróforos. Medio líquido MM9 a pH 6.8, y una adaptación en medio con FeCl_3 10 mM y FeCl_3 100 mM para medir la absorción y biosíntesis de quelantes de hierro, a 140 rpm durante 10 días, recuperando alícuotas de 1 ml de sobrenadante. La solución indicadora fue Fe-CAS, tomando 100 μL de sobrenadante libre de células y agregando 100 μL de la solución indicadora midiendo la absorbancia en un lector Multiskansky a 630 nm.

Las diferencias significativas se mostraron donde las concentraciones de Fe en MM9 eran nulas, en la inanición los microorganismos necesitan la síntesis de sideróforos, por lo tanto, podemos observar los niveles producidos, la generación más representativa se puede ver en la cepa T9_UANL a los siete días de inoculación, el efecto de la producción aumenta un 50% con respecto a la cepa que se utilizó como control, hemos demostrado que las unidades de sideróforos en *Trichoderma* aumentan con el tiempo de incubación, en ausencia de Fe^+ el hongo reemplaza esta ausencia probablemente con la expresión de genes localizados en el genoma como lo son las péptido sintasas para síntesis de sideróforos.

VII DISCUSIÓN

Las condiciones del suelo tienen un impacto directo en los aislamientos de las cepas de *Trichoderma* debido a que en lugares con nutrientes abundantes en número de microorganismos es más abundante, mientras en suelos de lugares remotos y por las condiciones precarias es poco probable la obtención de microorganismos, Mirkhani *et al.*, 2015 encontró 122 cepas de *Trichoderma* en suelos de bosques; este tipo de lugares presentan nutrientes abundantes para la proliferación de organismos, mientras que suelos alcalinos con déficit de nutrientes y condiciones desfavorables Zhou *et al.*, 2020 encontró 161 cepas de *Trichoderma*, de nueve diferentes especies entre las más destacadas son *T. atroviride*, *T. pseudoharzianum*, *T. virens*, en la presente investigación aislamos 11 cepas de *Trichoderma* (Figura 4) en 50m² donde existía abundancia de mínimo 100 unidades de dos plantas endémicas de zonas áridas de Mina, Nuevo León, esta información brinda indicios de que el área de estudio cuenta con diversidad ecológica de microorganismos en relación mutualista con plantas endémicas, cabe mencionar que hasta la fecha no se encuentra reportes similares de aislamiento de *Trichoderma* con procedencia de *Agave lechuguilla* y *Fourquieria splendens*.

La identificación molecular de especies de aislamientos de ambientes extremos es uno de los retos a superar debido a que los eventos evolutivos que impactan en el genoma de los microorganismos alteran la agrupación por especies, por lo que los marcadores moleculares jugaron un papel vital en el estado filogenético de *Trichoderma* y sus teleomorfos; los *ITS* ya no son los marcadores más eficientes para muchas cepas de *Trichoderma* y desde luego para cepas de ambientes áridos (Sharna *et al.*, 2017). El uso de múltiples intrones de genes que codifican para proteínas nucleares como la β -tubulina, la γ -actina y el factor de elongación (*TEF1*) son esenciales para determinar las especies (Stielow *et al.*, 2015). En congruencia con lo predicho por varios investigadores, observamos que varias regiones ribosómicas no podían discernir en la clasificación de especies sobre aislamientos ambientales a nivel de especie en *Trichoderma* (Figura 5); Además, mostramos que el árbol tenía politomía con las secuencias consenso de referencia de las bases de datos de los marcadores moleculares *TUB2* y *ACT*, en contraste con lo informado por Inglis *et al.*, 2020 donde estos genes mostraron buena resolución para especies. Nosotros afirmamos que *TUB2* y *ACT* no se encuentran entre los genes con mejor desempeño para aislados de ambientes áridos. El análisis de loci sugiere que el uso simultáneo de (i) el intrón grande *TEF1* y el último exón grande como regiones de diagnóstico puede conducir a la filogenia más confiable (Rehner y Buckley 2005). En el presente estudio en Mina Nuevo León logramos determinar una diversidad baja de especies, evento que es descrito por la eficiencia para agrupar especies con el marcador molecular *TEF1* generando dendogramas de alta resolución (Figura 5), cuyas especies dominantes fueron *T.*

harzianum, *T. Asperelloides* y *Trichoderma sp.* la dificultad para discernir entre especies la atribuimos a la naturaleza de los aislados; además aseguramos que los marcadores ribosomales no son efectivos para cepa de *Trichoderma* que provienen de ambientes austeros, asumimos que los recursos genéticos disponibles en condiciones extremas tienen características distintivas que no permiten agrupar especies de manera canónica.

Las características físico químicas de la rizósfera determinan la disponibilidad de nutrientes, estos factores son fundamentales para decidir sobre la supervivencia de plantas y microorganismos, el suelo estudiado en el presente trabajo presenta déficit de macronutrientes, micronutrientes y pH alcalino (Tabla 4). Por su parte los hongos filamentosos para sobrevivir a ambientes extremos evolucionaron en su genoma y logran crecer en condiciones de pH ácido y alcalino; estos hongos cambian su fisiología para generar moléculas que modifican su hábitat y así poder subsistir; entre las acciones que realizan los hongos es la generación de biomasa y/o agrupamiento de micelio para tolerar algún tipo de estrés abiótico. *Trichoderma harzianum* T22 Rifai tiene como método de adaptación acidificar el medio, permitiendo la solubilización como óxidos metálicos de Mn, Fe, Cu, Zn y roca fosfórica, todo esto demostrado en condiciones *in vitro*, Pelagio *et al.*, 2017 informó que cuando *T. atroviride* acidifica el medio, provoca daño a la germinación y desarrollo de plantas de *A. thaliana* cuando la interacción *in vitro* no fue amortiguada en el pH. Nuestros datos indican que el comportamiento de *T. harzianum* (T9_UANL) en la producción de biomasa no se alteran en condiciones ácidas o alcalinas; sobre todo cuando los medio de cultivo fueron acondicionados con amortiguador de pH, además, reportamos que son escasas las cepa que tienen una adaptación a pH alto, como T3_UANL, T6_UANL y T9_UANL, la mayoría de las cepas evaluadas tienen la facilidad de adaptar el pH del medio a rangos de pH ácido con la secreción de ácidos orgánicos para obtener un desarrollo óptimo (Figura 6), como lo menciona Tandon *et al.*, 2021 donde determinaron la presencia de la enzima lacasa en cepas de *T. koningiopsis* (NBRI-PR5) y *T. asperellum* (NBRI-K14) para reducir el pH de suelos sódicos de 9.6 a 7.8 ; por lo tanto, los efectos del pH alcalino no inhiben el crecimiento del micelio en tres aislados ambientales, la generación de biomasa sirve como soporte para establecer la correlación planta-microbio, porque da estabilidad a las raíces de las plantas y proporcionar nutrientes que producen una relación mutualista. En este estudio, el comportamiento de las cepas ambientales de estudio a pH ácido es basal, mientras a pH alcalino es una adaptación endógena de cepas de *Trichoderma*.

Cuando hongos como *Trichoderma* interactúan en ambientes donde el pH es desfavorable, modifican su fisiología, lo que provoca cambios notables en la morfología. Este efecto es más evidente en condiciones alcalinas que en estados neutros. Los resultados muestran que las

diferencias fenotípicas son una respuesta aparente al efecto causado por el pH en *Trichoderma*; el análisis comparativo entre las cepas *T. harzianum* T35 y T9_UANL proporciona datos esenciales que a pH 6.0 las estructuras de hifas, conidióforo y fialides (Figuras 7a y 7c) no se afectan, por lo tanto se conserva la morfología basal; en este pH los mecanismos de regulación se mantienen constantes por lo tanto las estructuras morfológicas y las estructuras de reproducción asexual se encuentran bien definidas en las micrografías de las cepas de *Trichoderma*, lo cual concuerda con lo reportado por Zehra *et al.*, 2017, quienes mencionan que cepas de *Trichoderma* tienen un óptimo desarrollo y formación de conidióforos a valores de pH cercanos a 6.0. Los hongos como *Trichoderma* asimilan diversas condiciones de crecimiento relacionadas con el pH ambiental extremo para mantener estabilidad en su metabolismo (Miao *et al.*, 2020); mientras que las alteraciones fisiológicas en las cepas de *Trichoderma* se debe a la expresión diferencial de genes de señalización metabólica como estrategia principal para modular el estrés abiótico (Hirasawa *et al.*, 2019). Nuestros datos muestran que, dentro de las 72 h de la interacción, la cepa control *T. harzianum* T35 presenta turgencia hifal pero sin modificación en las fialides y conidiación a pH 9.0; sin embargo, en T9_UANL, notamos en la Figura 6d que el 70% de sus hifas se encuentran flácidas y con aparentes modificaciones en estructuras de reproducción asexual. El procesamiento de enzimas extracelulares en hongos representa importancia biológica para soportar el estrés por pH, de manera celular es de suma importancia sobrevivir a través de modificar su entorno a sus requerimientos, por lo cual los cambios morfológicos en condición alcalina de las cepas ambientales de *Trichoderma* resulta evidente, pero interesante relacionar esta adecuación a eventos evolutivos adquiridos por su micro ambiente, en condiciones de estrés los exudados orgánicos pueden limitar el desarrollo de los organismos, sin embargo hongos adaptados a ambientes extremos dependientes de pH presentan una clasificación taxonómica deficiente debido a los cambios en su morfología provocado por medios poco favorables.

La antibiosis que provoca el género *Trichoderma* cubre una amplia gama de especies patógenas; esto estará dado por la compatibilidad molecular y bioquímica de metabolismos complejos que producen moléculas que generan el fenómeno de biocontrol (Fu *et al.*, 2021). Este trabajo observó que el comportamiento de *Trichoderma* inhibe la germinación de patógenos específicos como *R. solani* AG2. Las cepas *T. harzianum* T35 y T9_UANL son mejores biocontroladores que la especie *T. atroviride* IMI204060 debido a que generaron una cobertura sobre el patógeno, lo que concuerda con Nofal *et al.*, 2021, donde en la comparación del antagonismo *T. harzianum* resulta ser más eficaz contra *Rhizoctonia* que *T. atroviride*. Por otro lado, ambas cepas (T35 y T9_UANL) mostraron control el crecimiento de *F. oxysporum* (Figura 8), es determinante que este comportamiento de encapsulando para limitar el desarrollo del fitopatógeno se debe a la expresión

de genes relacionados para la secreción de enzimas líticas que evitan la proliferación masiva de estos hongos; Langa-Lomba *et al.*, 2022 informa que *T. harzianum* inhibe el desarrollo de este fitopatógeno donde el efecto fue notable, donde abarca un 70% del total de la placa después de seis días de interacción. Es crucial determinar la capacidad antagónica de los aislados ambientales para plantear aplicaciones contra patógenos específicos en condiciones ambientales extremas.

Las comunidades fúngicas mejoran las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que también influye en el ciclo de nutrientes para la absorción de las plantas Tyśkiewicz *et al.*, 2022. Cepas de *Trichoderma* adaptado a ambientes extremos muestra un crecimiento sobresaliente, además, promueve la generación de biomasa fúngica que contribuye al fortalecimiento y soporte de las plantas de *Sorghum bicolor*, provocando un aumento del 50% en las dimensiones de las plantas, como se muestra en la Figura 9a, el suelo salino-alcalino altera significativamente la solubilización de nutrientes que son esenciales para la abundancia de microorganismos y plantas; Por lo tanto, las cepas de *Trichoderma* adicionadas a este tipo de suelo cambian la disponibilidad de nutrientes, mismas que tras la generación de metabolitos secundarios puede aumentar la concentración de compuestos químicos promotores del crecimiento de las plantas Pelagio *et al.*, 2022. Mientras Fu *et al.*, 2021 mencionan que la presencia de *T. asperellum* en suelos alcalinos incrementó la actividad enzimática como la ureasa, la fosfatasa alcalina, la sacarasa y la peroxidasa de hidrógeno de las plantas de maíz y mejoró su entorno.

La sequía es un estrés abiótico que afecta a las comunidades vegetales, reduce el desarrollo de las raíces, provoca una baja adquisición de nutrientes y afecta directamente a la microbiota presente en la rizosfera Pelagio *et al.*, 2022. Los endófitos asociados a suelo áridos son esenciales para generar microhábitats para las plantas y mitigar el estrés biótico y abiótico (Fu *et al.*, 2021). En este trabajo desarrollamos la interacción planta-*Trichoderma* en suelos áridos; confirmamos lo reportado por Racic *et al.*, 2018, donde las plantas de tomate tratadas con *Trichoderma brevicompactum* son un 25% más efectivas para reducir la sequía, lo cual concuerda con lo conseguido en la Figura 9b donde la presencia de *T. harzianum* redujo el déficit hídrico en un 50% en las plantas de *Sorgo*, las plantas seleccionadas para condiciones extremas son esenciales para el éxito del cultivo; por ejemplo, el *Sorgo* acumula prolina producida por *Delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS)*, que es crucial para la tolerancia al estrés salino-alcalino (Huang *et al.*, 2018). Además, en el análisis de datos de Bashyal *et al.*, 2021, donde la inclusión de cepas de *T. harzianum* reduce la sequía en las plantas de arroz, registraron la expresión de genes para el metabolismo del glutatión, la biosíntesis de esteroides, el metabolismo del carbono y las vías de la fotosíntesis, que son rutas metabólicas críticas para el desarrollo en estrés por sequía. Por lo

tanto, la presencia de hongos metabólicamente adaptados en la rizosfera aumenta las propiedades químicas, aporta nutrientes, genera estabilidad radicular, conserva la humedad, previene el daño a las plantas por sequía, aumenta los rendimientos de los cultivos de *Sorgo* en condiciones salino-alcálicas, y es un potencial biofertilizante para proyecciones agrícolas sustentables.

PacC es el factor transcripcional clave en hongos para regular genes que ajustan su respuesta fisiológica a través de generación de moléculas que modifican y adaptan el pH externo. Zeilinger *et al.*, 2016 analizaron la presencia de la secuencia “CGGARG” de los genes que contienen el motivo de unión, informando que en el genoma de *T. reesei* el 65% de los genes albergan el sitio en sus promotores. En este estudio el crecimiento de hongos se observó en pH ácido, neutro y alcalino, sin embargo a pH 9.0 la expresión del gen *Pac1* no se ve afectado en las cepas de *Trichoderma harzianum* (Figura 13), dicha adaptación se debe a al rigen alcalino de las cepas, este comportamiento fue observada en cepas ambientales como *Clonostachys rosea* (Zou *et al.*, 2010), *Aspergillus nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995), *Fusarium graminearum* (Merhej *et al.*, 2011), *Beauveria bassiana* (Luo *et al.*, 2017) and *Valsa mali* (Wu *et al.*, 2018), Es de destacar que lo reportado por Zhang *et al.*, 2020 donde en cepas de *Metarhizium acridum* disruptivas de PacC, confiere tolerancia a rayos UV-B y a temperaturas elevadas, en nuestro estudio encontramos afinidad de T9_UANL a pH 9.0, además que *Pac1* está regulado regulada negativamente de manera diferencial en la condición alcalina, mientras tanto en la cepa *T. harzianum T35* su regulación era de forma positiva con forme al tiempo de exposición. Este comportamiento podría deberse a adaptaciones evolutivas para tolerar pH alto.

La adenosina cíclica 3'5' monofosfato (*AMP*) es un mensajero importante en eucariotas donde actúa en varios procesos incluidos factores de transcripción, *AMP* son componentes que se localizan río arriba de los FT, que a través de la fosforilación actúan como activadores de genes que codifican para factores de transcripción de dedos de zinc (Sun *et al.*, 2022). Modificación en alguno de estos dos importantes sistemas de señalización provocan cambios importantes en la expresión de genes río abajo, por ejemplo, en *Beauveria bassiana*, los FT con dedos de zinc son de gran importancia en el control biológico, por lo tanto, la eliminación de los genes BbTpc1 y BbThm1 de Zn(II)2Cys6 TF, influiría en la virulencia del mutante para las larvas de *Galleria mellonella* (Wang *et al.*, 2020). Por otra parte, En *Coniothyrium minitans*, la eliminación del gen PacC TF *CmpacC* redujo la actividad micoparasitaria contra *S. sclerotiorum* y las actividades de quitinasa y β -1,3-glucanasa Luo *et al.*, 2015. Se han encontrado resultados similares en *Trichoderma* y *Clonostachys*, donde la delección de un gen TF *pacC* en *T. virens* afecta el antagonismo contra *R. solani* y *S. rolfisii* (Trushina *et al.*, 2013). La interrupción de los genes

TF *pacC* en *C. rosea* atenuó su virulencia frente a los nematodos (Zou *et al.*, 2010). Actualmente, nuestro estudio no está centrado en componentes de señalización, sin embargo, no descartamos que numerosos genes que son componentes de señalización estén involucrados en los cambios del comportamiento de cepas ambientales de *Trichoderma*.

Los resultados de la expresión diferencial del gen antes mencionado sugieren una función muy importante mediando la interacción de *Trichoderma* con el medio de cultivo a pH adverso donde es sometido, T9_UANL reprimió la expresión de *Pac1* en los tiempos largos probados a pH 9.0, esta respuesta pudiera estar mediada por la evolución en el genoma de las cepas, o la participación de genes involucrados en la neutralización del pH, por ejemplo la ATPasa de tipo *ENA1* en *Fusarium oxysporum* que es necesaria para la tolerancia a pH alcalino y estrés por NaCl. La integridad de la pared celular es vital a pH 9.0, Trushina y colaboradores en 2013 reportan genes adicionales como *DFG5* regulados por PacC en *Canidad albicans*, donde se regula 324 veces más en alcalinidad, lo que sugiere este tipo de genes están regulados exclusivamente a pH alto por PacC.

Sánchez-Arreguin *et al.*, 2021 informan de *NRG1* es un represor transcripcional en *Ustilago maydis*, que actúa al contrario de PacC, esta proteína regula negativamente la expresión de bombas de calcio *PMR1* para controlar el pH, otra función relacionada es el equilibrio reducción-oxidación en células fúngicas con la activación de genes *WCO1*, donde este gen también está involucrado en expresar genes para respuesta a luz UV (Brych *et al.*, 2016). Así mismo, se reporta que regula la respuesta al estrés hiperosmótico principalmente mediante la vía de señalización del glicerol de alta osmolaridad en levaduras.

Häkkinen *et al.*, 2015 identifican un grupo de genes co-regulados que están regulados positivamente a pH alto e incluyen un transportador ABC, una oxidoreductasa, un transportador MFS, una biosíntesis de sideróforo acetilasa, un ácido graso de cadena larga acil-CoA ligasa y un no- péptido sintasa ribosomal. debido a estos descubrimientos llevamos a cabo experimentos para determinar la función de *pacC* en la biosíntesis de metabolitos secundarios cuya expresión es necesaria a pH alto. El pH afecta la concentración de hierro ya que el pH ácido aumenta la disponibilidad de hierro soluble (Fe^{2+}), y a pH alcalinos el hierro insoluble (Fe^{3+}) se presenta en concentraciones más altas. Los resultados que se muestran en la Figura 14(a, b y c) predicen que *Trichoderma* T9_UANL tiene la capacidad de quelar el hierro en presencia de MM9 libre de Fe. Esta cepa aumenta la producción de sideróforos en un 56%, aumento similar al reportado por Zhao *et al.*, 2014, en suelo inoculado con la cepa T6 de *T. asperrellum*, detectaron un aumento en la presencia de sideróforos del 57%. Los inductores para la producción sideróforos son aminoácidos

como glicina, L-serina, L-alanina y L-ornitina que promueven la generación de sideróforos, Asai y colaboradores en 2022 determinaron los niveles de expresión de los genes Sid1 y Sid2 en medio sin presencia de Fe, pero adicionando 2,2'-dipiridilo (DIP) con la cepa de *Acremonium persicinum*, reportando que los niveles de mRNA se incrementaron 89 veces en Sid1 con la presencia de DIP, mientras Sid2 no se vio afectado con la presencia de dicho inductor. Los metabolitos secundarios de *Trichoderma* a pH alto involucran la activación de clúster de genes co-regulador por el factor de transcripción PacC, por lo tanto, es necesario estudiar a detalle las secuencias de los genomas para ver los mecanismos utilizados y la funcionalidad de las moléculas generadas en especies ambientales que le permiten adaptar su metabolismo y producir sustancias con aplicación biotecnológica.

VIII CONCLUSIÓN

En este estudio generamos información detallada sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo árido de Mina, Nuevo León; adicionalmente, en la rizosfera de dos plantas endémicas, encontramos la presencia del hongo benéfico del género *Trichoderma*, el cual es sometido a crecimiento, imitamos las características alcalinas de donde se obtuvieron, determinamos que todas las cepas disminuyen drásticamente el pH inicial a valores de acidez considerados basales en el desarrollo de los hongos. Mostramos que tres aislamientos ambientales crecen a pH alcalino, describimos que estos cambios fisiológicos entre especies son evoluciones adquiridas en condiciones de rizosfera endémica, y el pH es uno de los factores que más ha modificado el comportamiento de las cepas ambientales de *Trichoderma*. Además, demostramos que *Trichoderma harzianum* es un potencial biofertilizante para cultivos agroindustriales en territorios con déficit nutricional y zonas con problemas de sequía en México.

Determinamos que la cepa alcalinotolerante T9_UANL es productora de sideróforos del tipo hidroxamato, además su adaptación al estrés alcalino puede estar relacionada con su capacidad para quelar o solubilizar hierro, por lo que también se identificó la presencia de NRPS en el genoma involucrado en la producción de estas moléculas, asumimos puede estar involucrado un transportador MFS en el movimiento intra o extracelular de las partículas detectadas, finalmente, afirmamos que la cepa T9_UANL mitiga el estrés abiótico para promover el crecimiento vegetal de *Sorgo Bicolor*.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Alfiky, A. & Weisskopf, L. Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi* 2021, 7(1), 61.
- Alkan, N.; Espeso, E. A.; Prusky, D. Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxid and Redox Signal* 2013, 19(9), 1012-1025.
- Altomare, C.; Norvell, W. A.; Bjorkman, Thomas; Harman, G. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and environmental microbiology* 1999, 65(7), 2926-2933.
- Asai, Y., Hiratsuka, T., Ueda, M., Kawamura, Y., Asamizu, S., Onaka, H., ... & Yoshida, M. (2022). Differential Biosynthesis and Roles of Two Ferrichrome-Type Siderophores, ASP2397/AS2488053 and Ferricrocin, in *Acremonium persicinum*. *ACS Chemical Biology*, 17(1), 207-216.
- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 94.
- Bashyal, B. M.; Parmar, P.; Zaidi, N. W.; Aggarwal, R. Molecular programming of drought-challenged *Trichoderma harzianum*-bioprimered rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in microbiology* 2021, 12.
- Bogati, K.; & Walczak, M. The Impact of Drought Stress on Soil Microbial Community, Enzyme Activities and Plants. *Agronomy*, 12(1) 2022, 189.
- Bona, E. Massa, N. Toumatia, O. Novello, G. Cesaro, P. Todeschini, V. & Gamalero, E. Climatic zone and soil properties determine the biodiversity of the soil bacterial communities associated to native plants from desert areas of North-Central Algeria. *Microorganisms* 2021, 9(7), 1359.
- Brych, A.; Mascarenhas, J.; Jaeger, E.; Charkiewicz, E.; Pokorny, R.; Bölker, M.; Doehlemann, G.; Batschauer, A. White collar 1-induced photolyase expression contributes to UV-tolerance of *Ustilago maydis*. *Microbiologyopen* **2016**, 5, 224–243.
- Cai, F. & Druzhinina, I. S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity* 2021, 107(1), 1-69.
- Caracuel, Z., Casanova, C., Roncero, M. I. G., Di Pietro, A., & Ramos, J. (2003). pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na⁺-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell*, 2(6), 1246-1252.
- Carbone, I.; & Kohn, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 1999, 91(3), 553-556.
- Carmona, J. E., Morales-Martínez, T. K., Mussatto, S. I., Castillo-Quiroz, D., & Ríos-González, L. J. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.). *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8(42), 100-122.

- Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E. U., Villalobos-Escobedo, J. M., Abreu-Goodger, C., & Herrera-Estrella, A. (2013). The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Molecular Microbiology*, 89(1), 96-112.
- Caruso, G. El-Nakhel, C. Roupheal, Y. Comite, E. Lombardi, N. Cuciniello, A. & Woo, S. L. *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. yield and quality as influenced by cropping season, protein hydrolysates, and *Trichoderma* applications. *Plants* 2020.
- Cornejo-Ríos, K. Osorno-Suárez, M. D. P. Hernández-León, S. Reyes-Santamaría, M. I. Juárez-Díaz, J. A. Pérez-España, V. H. & Saucedo-García, M. Impact of *Trichoderma asperellum* on Chilling and Drought Stress in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Horticulturae* 2021, 7(10), 385.
- Cruz-Méndez, A. S. Ortega-Ramírez, E. Lucho-Constantino, C. A. Arce-Cervantes, O. Vázquez-Rodríguez, G. A. Coronel-Olivares, C. & Beltrán-Hernández, R. I. Bam-boo Biochar and a Nopal-Based Biofertilizer as Improvers of Alkaline Soils with Low Buffer Capacity. *Applied Sciences* 2021, 11(14), 6502.
- Crosa, J.H.; Walsh, C.T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66, 223–249.
- Dautt-Castro, M.; Estrada-Rivera, M.; Olguin-Martínez, I.; del Carmen Rocha-Medina, M.; Islas-Osuna, M. A.; Casas-Flores, S. TBRG-1 a Ras-like protein in *Trichoderma virens* involved in conidiation, development, secondary metabolism, mycoparasitism, and biocontrol unveils a new family of Ras-GTPases. *Fungal Genetics and Biology* 2020, 136, 103292.
- Delgado-González, C. R., Rodríguez-Laguna, R., Capulín-Grande, J., Madariaga-Navarrete, A., & Islas-Pelcastre, M. (2022). Caracterización fisicoquímica de suelos salinos agrícolas, en la localidad de Chicavasco, estado de Hidalgo, México: Physicochemical characterization of saline agricultural soils in the town of Chicavasco, Hidalgo State, Mexico. *South Florida Journal of Development*, 3(1), 335-344.
- De Luca, N.G.; Wood, P.M. Iron uptake by fungi: Contrasted mechanisms with internal or external reduction. *Adv. Microb. Physiol.* 2001, 43, 39–74
- De-Nova, J. A., Aguirre-Liguori, J. A., & Eguiarte, L. E. (2020). How Did *Fouquieria* Come to the Chihuahuan Desert Phylogenetic and Phylogeographic Studies of *Fouquieria shrevei* and *F. splendens* and the Role of Vicariance, Selection, and Genetic Drift. In *Plant Diversity and Ecology in the Chihuahuan Desert* (pp. 95-107). Springer, Cham.
- Deshaware, S.; Marathe, S. J.; Bedade, D.; Deska, J.; & Shamekh, S. Investigation on mycelial growth requirements of *Cantharellus cibarius* under laboratory conditions. *Archives of Microbiology* 2021, 203(4), 1539-1545
- Dos Santos Castro, L., Pedersoli, W. R., Antoniêto, A. C. C., Steindorff, A. S., Silva-Rocha, R., Martinez-Rossi, N. M., ... & Silva, R. N. (2014). Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 1-18.

- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., ... & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews microbiology*, 9(10), 749-759.
- Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinooor, A., & Prusky, D. (2002). pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(8), 774-779.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Sánchez-Pulido, L., Brown, C. V., Valencia, A., Arst Jr, H. N., & Peñalva, M. A. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *Journal of molecular biology*, 274(4), 466-480.
- Fu, J.; Xiao, Y.; Wang, Y. F.; Liu, Z. H.; Yang, K. Saline-alkaline stress in growing maize seedlings is alleviated by *Trichoderma asperellum* through regulation of the soil environment. *Scientific reports* 2021, 11(1), 1-11.
- Fu, J.; Xiao, Y.; Wang, Y. F.; Liu, Z. H.; Zhang, Y. F.; Yang, K. J. *Trichoderma asperellum* alters fungal community composition in saline-alkaline soil maize rhizospheres. *Soil Science Society of America Journal* 2021, 85(4), 1091-1104.
- Galindo, A., Calcagno-Pizarelli, A. M., Arst Jr, H. N., & Peñalva, M. Á. (2012). An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *Journal of cell science*, 125(7), 1784-1795.
- Gondal, A. H., Hussain, I., Ijaz, A. B., Zafar, A., Ch, B. I., Zafar, H., & Usama, M. Influence of soil pH and microbes on mineral solubility and plant nutrition: A review. *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2021. 5(1), 71-81.
- Häkkinen, M., Sivasiddharthan, D., Aro, N., Saloheimo, M., & Pakula, T. M. (2015). The effects of extracellular pH and of the transcriptional regulator *PACI* on the transcriptome of *Trichoderma reesei*. *Microbial cell factories*, 14(1), 1-15.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377-393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
- He, R., Ma, L., Li, C., Jia, W., Li, D., Zhang, D., & Chen, S. (2014). TrPac1, a pH response transcription regulator, is involved in cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Enzyme and microbial technology*, 67, 17-26.
- He, C.; Liu, C.; Liu, H.; Wang, W.; Hou, J.; Li, X. Dual inoculation of dark septate endophytes and *Trichoderma viride* drives plant performance and rhizosphere microbiome adaptations of *Astragalus mongholicus* to drought. *Environmental Microbiology* 2022.
- Hervás-Aguilar A, Rodríguez JM, Tilburn J, Arst HN, Peñalva MA. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J Biol Chem*. 2007;282:34735-47.

- Hewedy, O. A.; Abdel Lateif, K. S.; Seleiman, M. F.; Shami, A.; Albarakaty, F. M.; M El-Meihy, R. Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. *Biology* 2020, 9(8), 189.
- Hider RC, Kong XL. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27:637-657
- Hirasawa, H.; Shioya, K.; Mori, K.; Tashiro, K.; Aburatani, S.; Shida, Y.; Ogasawara, W. Cellulase productivity of *Trichoderma reesei* mutants developed in Japan varies with varying pH conditions. *Journal of bioscience and bioengineering* 2019, 128(3), 264-273.
- Howard, D.H. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12, 394-404
- Huang, R. D. Research progress on plant tolerance to soil salinity and alkalinity in *sorghum*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(4) 2018, 739-746.
- Husson, O. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant soil* 2013, 362,389-417.
- Hsiang, T.; Baillie, D.L. Comparison of the Yeast Proteome to Other Fungal Genomes to Find Core Fungal Genes. *J. Mol. Evol.* 2005, 60, 475-483.
- Inglis, P. W.; Mello, S. C.; Martins, I.; Silva, J. B.; Macêdo, K.; Sifuentes, D. N.; Valadares-Inglis, M. C. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *PloS one* 2020, 15(3), e0228485.
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., ... & Kobayashi, M. (2007). Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9900-9905.
- Jiménez-Mejía, R., Medina-Estrada, RI, Carballar-Hernández, S., Orozco-Mosqueda, M., Santoyo, G., & Loeza-Lara, PD (2022). Trabajo en equipo para sobrevivir en suelos hostiles: uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal para mejorar el estrés por salinidad del suelo en los cultivos. *Microorganismos*, 10 (1), 150.
- Kredics, L., Manczinger, L., Antal, Z., Péntzes, Z., Szekeres, A., Kevei, F., & Nagy, E. (2004). In vitro water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 491-498.
- Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A., & Mitchell, A. P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1850-1856.
- Langa-Lomba, N.; Martín-Ramos, P.; Casanova-Gascón, J.; Julián-Lagunas, C.; & González-García, V. Potential of Native *Trichoderma* Strains as Antagonists for the Control of Fungal Wood Pathologies in Young Grapevine Plants. *Agronomy* 2022, 12(2), 336.
- Lehner, S. M., Atanasova, L., Neumann, N. K., Krska, R., Lemmens, M., Druzhinina, I. S., & Schuhmacher, R. (2013). Isotope-assisted screening for iron-containing metabolites reveals a

high degree of diversity among known and unknown siderophores produced by *Trichoderma spp.* Applied and environmental microbiology, 79(1), 18-31.

Liu, S., He, F., Kuzyakov, Y., Xiao, H., Hoang, D. T. T., Pu, S., & Razavi, B. S. (2022). Nutrients in the rhizosphere: A meta-analysis of content, availability, and influencing factors. Science of The Total Environment, 153908.

Luo ZB, Ren H, Mousa JJ, Rangel DE, Zhang YJ, Bruner SD, Keyhani NO (2017) The PacC transcription factor regulates secondary metabolite production and stress response, but has only minor effects on virulence in the insect pathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. Environ Microbiol 19(2):788–802. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13648>

Magalhaes, J. V. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 571-98.

Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., ... & Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature biotechnology*, 26(5), 553-560.

Merhej J, Richard-Forget F, Barreau C (2011) The pH regulatory factor Pac1 regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. Fungal Genet Biol 48(3):275–284. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.008>

Miao, Y.; Chen, X.; Li, T.; Zhu, H.; Tang, S.; Liu, D.; Shen, Q. Proteomic analysis reflects an environmental alkalization-coupled pH-dependent mechanism of regulating lignocellulases in *Trichoderma guizhouense* NJAU4742. *Biotechnology for biofuels* 2020, 13(1), 1-15.

Mirkhani, F.; Alaei, H. Species diversity of indigenous *Trichoderma* from alkaline pistachio soils in Iran. *Mycologia Iranica* 2015, 2(1), 22-37.

More, S. B., Deka, P. C., Patil, A. P., & Naganna, S. R. (2022). Machine learning-based modeling of saturated hydraulic conductivity in soils of tropical semi-arid zone of India. *Sādhanā*, 47(1), 1-15.

Mexicana, N. O. (2010). NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. SEMARNAT. Diario Oficial de la Federación.

Moreno-Mateos, M. A., Delgado-Jarana, J., Codon, A. C., & Benítez, T. (2007). pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(12), 1355-1367.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annu Rev Phytopathol*, 51(1), 105-129.

Mukherjee, P. K. Mendoza-Mendoza, A. Zeilinger, S. & Horwitz, B. A. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews* 2022, 39, 15-33.

Muñoz-Arenas, L. C.; Fusaro, C.; Hernández-Guzmán, M.; Dendooven, L.; Estrada-Torres, A.; Navarro-Noya, Y. E. Soil microbial diversity drops with land use change in a high mountain temperate forest: a metagenomics survey. *Environmental microbiology re-ports* 2020, 12(2), 185-194.

Neina, D. The role of soil pH in plant nutrition and soil remediation. *Applied and Environmental Soil Science*, 2019.

Neilands, J.B.; Konopka, K.; Schwyn, B.; Coy, M.; Francis, R.T.; Paw, B.H.; Bagg, A. Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. In *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*; Winkelmann, G., Winge, D.R., Eds.; VCH Weinheim: New York, NY, USA, 1987; pp. 3–34.

Nofal, A. M.; El-Rahman, M. A.; Abdelghany, T. M.; & El-Mongy, A. Mycoparasitic nature of Egyptian *Trichoderma* isolates and their impact on suppression *Fusarium* wilt of tomato. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 2021, 31(1), 1-8.

Pecoraro, L., Wang, X., Shah, D., Song, X., Kumar, V., Shakoore, A., ... & Rani, R. (2021). Biosynthesis Pathways, Transport Mechanisms and Biotechnological Applications of Fungal Siderophores. *Journal of Fungi*, 8(1), 21.

Pelagio Flores, R.; Esparza Reynoso, S.; Garnica Vergara, A.; Lopez Bucio, J.; Herrera Estrella, A. *Trichoderma* induced acidification is a early trigger for changes in *arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulantion. *Plant Sci* 2017, 8, 822.

Pelagio Flores, R.; Esparza Reynoso, S.; Garnica Vergara, A.; Lopez Bucio, J.; Herrera Estrella, A. *Trichoderma* induced acidification is a early trigger for changes in *arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulantion. *Plant Sci* 2017, 8, 822.

Pelagio-Flores, R.; Esparza-Reynoso, S.; López-Bucio, J. S.; López-Bucio, J. Exploiting biostimulant properties of *Trichoderma* for sustainable plant production. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering 2022*, Elsevier, 17-32.

Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochimica et Biophysica Acta (bba)-molecular cell research*, 1763(7), 636-645.

Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in microbiology*, 10, 1030.

Racić, G., Vukelić, I., Prokić, L., Čurčić, N., Zorić, M., Jovanović, L., & Panković, D. (2018). The influence of *Trichoderma brevicompactum* treatment and drought on physiological parameters, abscisic acid content and signalling pathway marker gene expression in leaves and roots of tomato. *Annals of Applied Biology*, 173(3), 213-221.

Raeder, U., & Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1985, 1(1), 17-20.

Rehner, S. A.; Buckley, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear *ITS* and *EF1*- sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 2005, 97(1), 84-98.

Renshaw JC, Robson GD, Trinci APJ, Wiebe MG, Livens FR, Collison D, Taylor RJ. 2002. Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycol. Res.* 106:1123-1142

Rollins, J. A. (2003). The *Sclerotinia sclerotiorum* Pac1 gene is required for sclerotial development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(9), 785-795.

Sah, S.; Singh, R. Siderophore: Structural and functional characterization—A comprehensive review. *Agriculture* 2015, 61, 97–114

Schubert, S., Schubert, E., & Mengel, K. (1990). Effect of low pH of the root medium on proton release, growth, and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). In *Plant nutrition—physiology and applications* (pp. 443-448). Springer, Dordrecht.

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.

SEMARNAT (Ministry of the Environment and Natural Resources). NOM-021-RECNAT-2002, which establishes the specifications for fertility, salinity and soil classification. Studies, sampling and analysis. 2002.

Sánchez-Arreguin, J. A., Ruiz-Herrera, J., Mares-Rodriguez, F. D. J., León-Ramírez, C. G., Sánchez-Segura, L., Zapata-Morín, P. A., ... & Aréchiga-Carvajal, E. T. (2021). Acid pH strategy adaptation through NRG1 in *Ustilago maydis*. *Journal of Fungi*, 7(2), 91.

Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF, McCray EB. 2012. *Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*. Washington DC: USDA-ARS. <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>

Sharma, V.; Salwal, R. Molecular markers and their use in taxonomic characterization of *Trichoderma* spp. In *Molecular Markers in Mycology Springer, Cham* 2017,37-52

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. *Virol. Mycol*, 3(127), 2161-0517.

Silletti, S. Di Stasio, E. Van Oosten, M. J. Ventorino, V. Pepe, O. Napolitano, M. & Maggio, A. Biostimulant Activity of *Azotobacter chroococcum* and *Trichoderma harzianum* in Durum Wheat under Water and Nitrogen Deficiency. *Agronomy* 2021, 11(2), 380.

Stielow, J. B.; Levesque, C. A.; Seifert, K. A.; Meyer, W.; Iriny, L.; Smits, D.; Robert, V. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 2015, 35, 242.

Sun, Z. B., Yu, S. F., Wang, C. L., & Wang, L. (2022). cAMP Signalling Pathway in Biocontrol Fungi. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(6), 2622-2634.

Tandon, A., Anshu, A., Kumar, S., Yadav, U., Mishra, S. K., Srivastava, S., ... & Singh, P. C. (2022). *Trichoderma*-primed rice straw alters structural and functional properties of sodic soil. *Land Degradation & Development*, 33(5), 698-709

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., ... & Arst Jr, H. N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*, 14(4), 779-790.

- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ściśeł, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329.
- Trushina, N., Levin, M., Mukherjee, P. K., & Horwitz, B. A. (2013). PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC genomics*, 14(1), 1-21.
- Van Der Meer, J.J. The Nature and Properties of Soils. *Sedimentology* 2000, 47(6), 1230-1230
- Vilgalys, R.; & Hester, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of bacteriology* 1990, 172(8), 4238-4246.
- Wang, L.; Seki, K.; Miyazaki, T.; Ishihama, Y. The causes of soil alkalization in the Songnen Plain of Northeast China. *Paddy Water Environ* 2009. 7:259-270.
- Wang, ZL; Pan, HB; Huang, J.; Yu, XP Los factores de transcripción de dedos de zinc Bbctf1alpha y Bbctf1beta regulan la expresión de genes implicados en la degradación de lípidos y contribuyen a la tolerancia al estrés y la virulencia en un insecto patógeno fúngico. *Parásito. Administrar ciencia* 2020, 76, 2589–2600.
- Wu YX, Yin ZY, Xu LS, Feng H, Huang LL (2018) VmPacC is required for acidification and virulence in *Valsa mali*. *Front Microbiol* 9:1981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01981>
- Wu, P. C., Chen, Y. K., Yago, J. I., & Chung, K. R. (2021). Peroxisomes Implicated in the Biosynthesis of Siderophores and Biotin, Cell Wall Integrity, Autophagy, and Response to Hydrogen Peroxide in the Citrus Pathogenic Fungus *Alternaria alternata*. *Frontiers in microbiology*, 12, 645792.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. J. W. T.; & Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 1990, 18(1), 315-322.
- Yan, S., Xu, Y., & Yu, X. W. From induction to secretion: a complicated route for cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Bioresources and Bioprocessing* 2021, 8(1), 1-15.
- Ye, JY, Tian, WH y Jin, CW (2022). Nitrógeno en plantas: de la nutrición a la modulación de la adaptación al estrés abiótico. *Biología del estrés*, 2 (1), 1-14.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. *Fungal biology reviews*, 30(2), 74-90.
- Zehra, A.; Dubey, M. K.; Meena, M.; & Upadhyay, R. S. Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. *Journal of Environmental Biology* 2017, 38(2), 197.
- Zhang, M., Wei, Q., Xia, Y. *et al.* MaPacC, a pH-responsive transcription factor, negatively regulates thermotolerance and contributes to conidiation and virulence in *Metarhizium acridum*. *Curr Genet* 66, 397–408 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01032-3>

Zhao, L., Wang, F., Zhang, Y., & Zhang, J. (2014). Involvement of *Trichoderma asperellum* strain T6 in regulating iron acquisition in plants. *Journal of Basic Microbiology*, 54(S1), S115-S124.

Zhou, C.; Guo, R.; Ji, S.; Fan, H.; Wang, J.; Wang, Y.; Liu, Z. Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. *Microbiological research* 2020, 231, 126371.

Zou CG, Tu HH, Liu XY, Tao N, Zhang KQ (2010) PacC in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* controls virulence to nematodes. *Environ Microbiol* 12(7):1868–1877. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043653-0>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140196304002423>

ANEXO 1

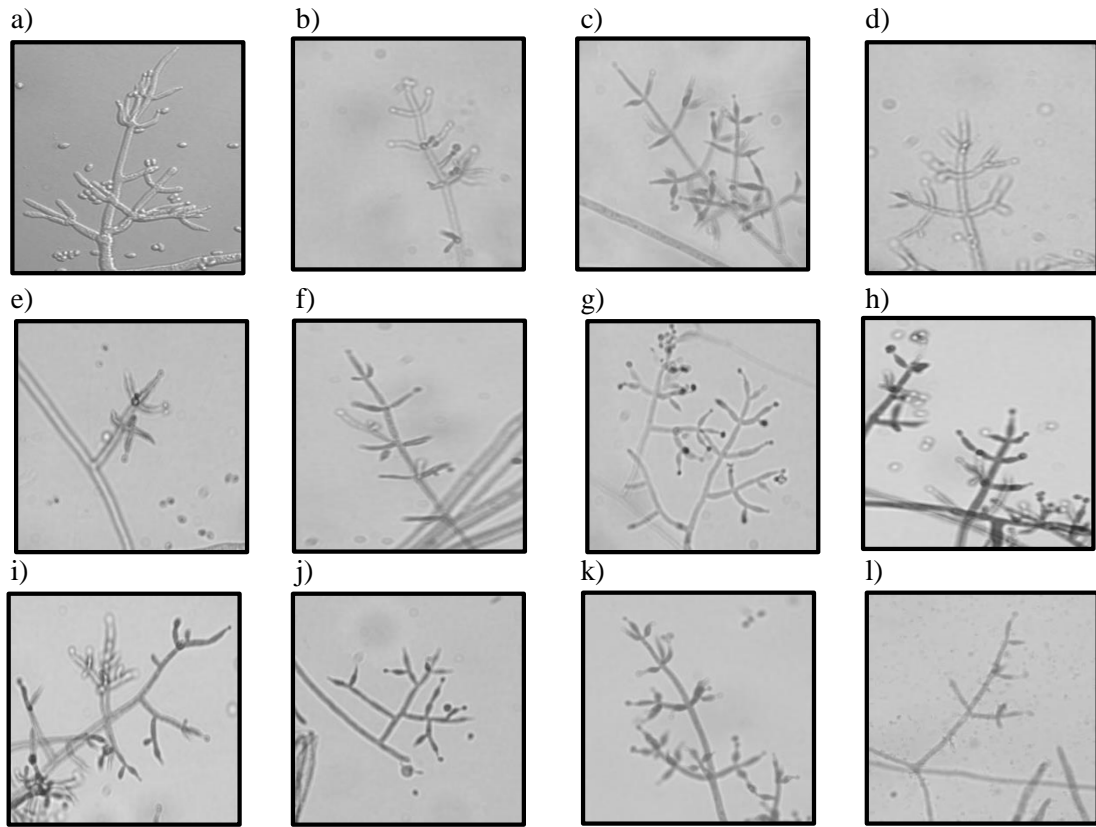


Figura 16.- Características microscópicas de las cepas ambientales de *Trichoderma spp.* en PDA durante 72 h a 28 °C. a) *T. harzianum* T35, b) T1_UANL, c) T2_UANL, d) T3_UANL, e) T4_UANL, f) T5_UANL, g) T6_UANL, h) T7_UANL, i) T8_UANL, j) T9_UANL, k) T10_UANL, l) T11_UANL.

ANEXO 2

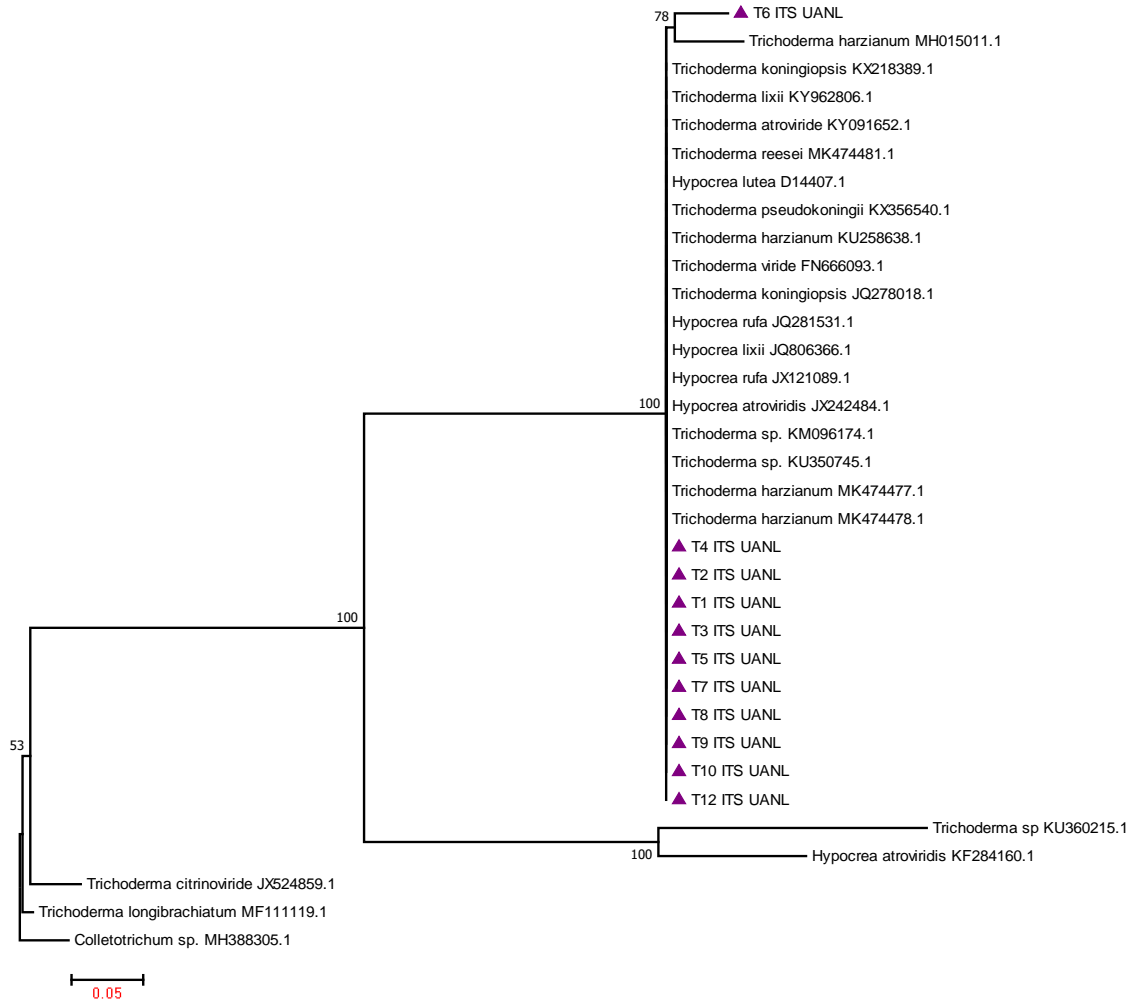


Figura 17.- Análisis filogenético de *Trichoderma* con marcador molecular ITS1 Y ITS4 y método unión de vecinos (NJ). El análisis se realizó en MEGA 7, Porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones).

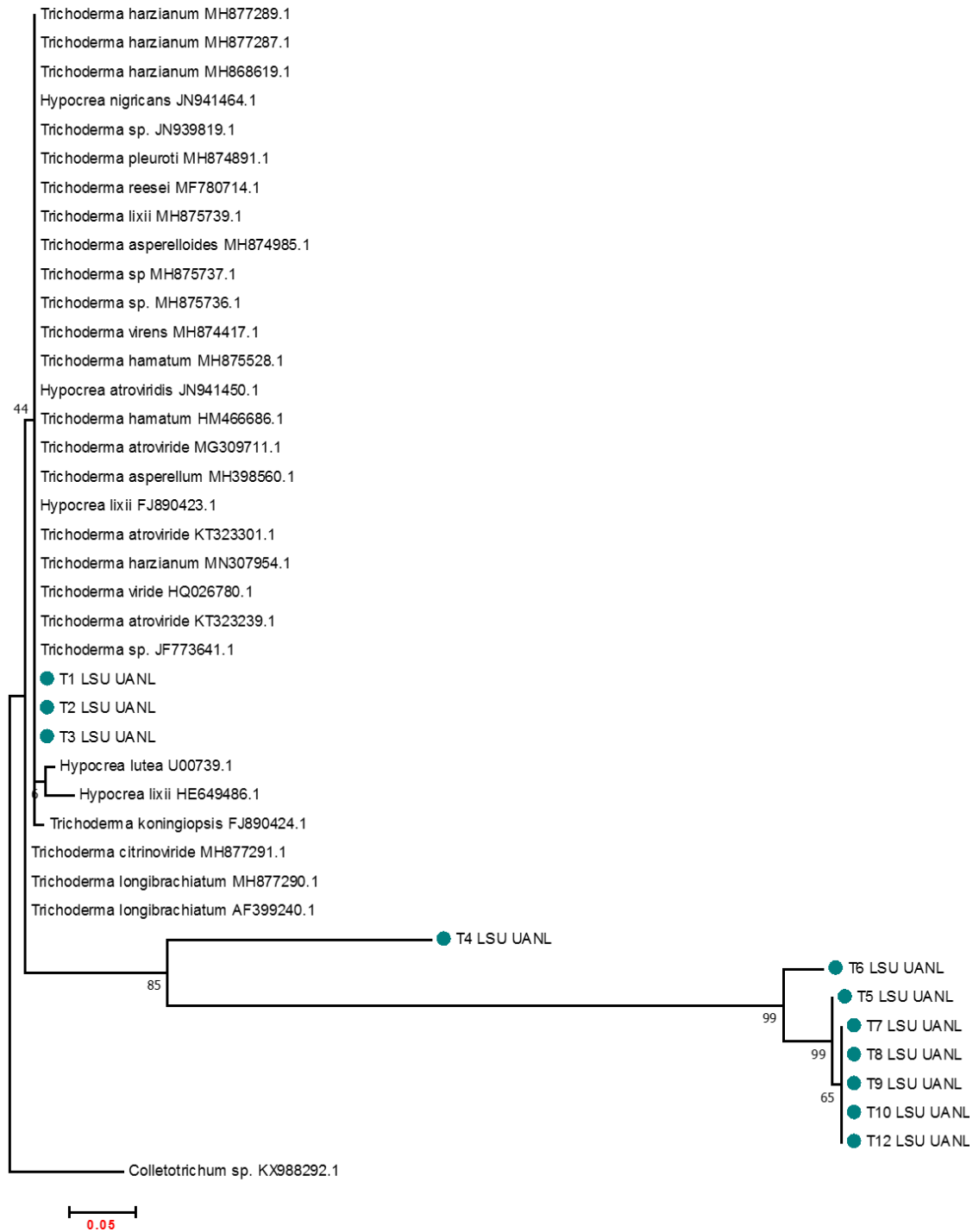


Figura 18.- Análisis filogenético de *Trichoderma* con marcador molecular LROR y LR5 método unión de vecinos (NJ). El análisis se realizó en MEGA 7, Porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones).

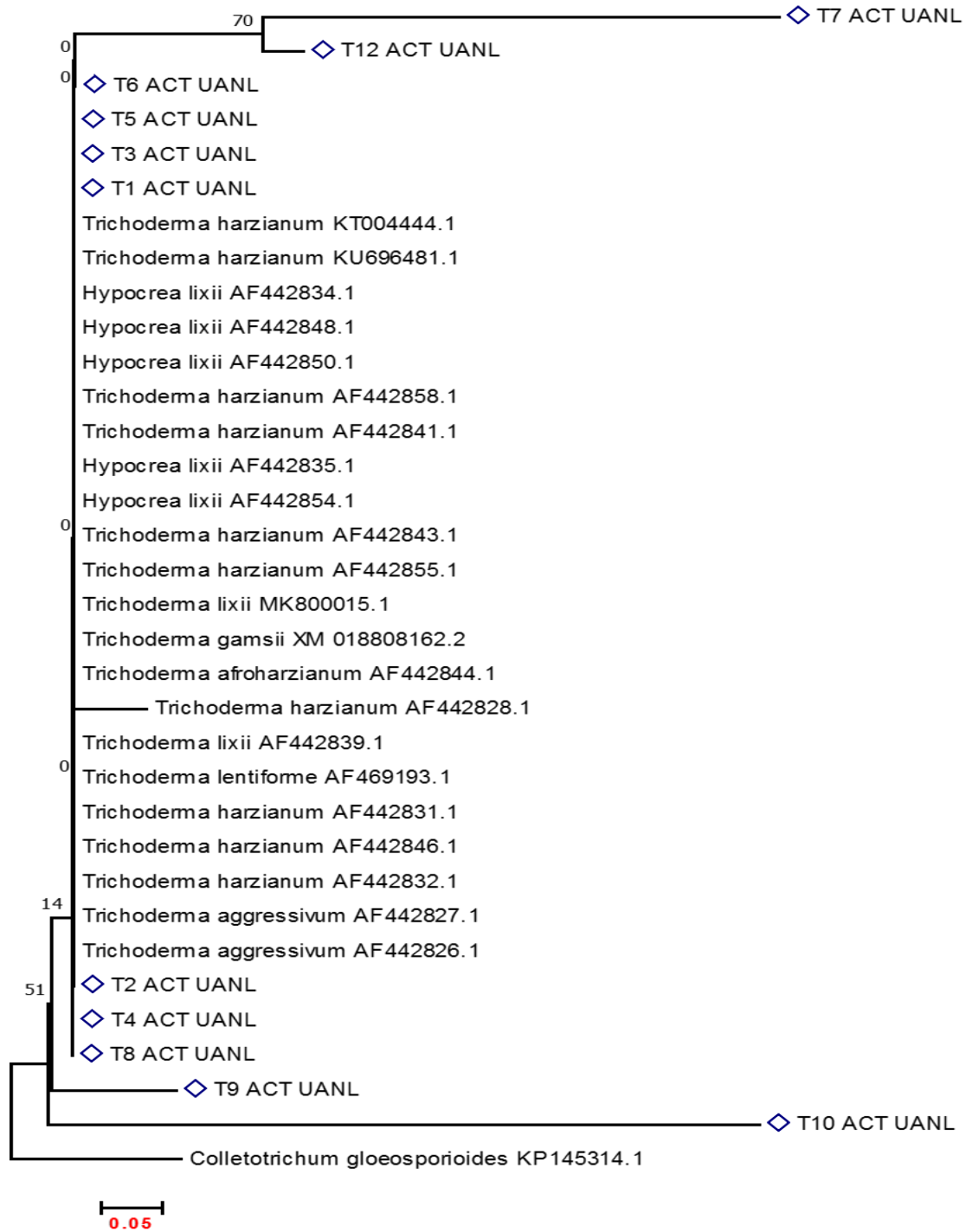


Figura 19.- Análisis filogenético de *Trichoderma* con marcador molecular ACT512f y ACT783r método unión de vecinos (NJ). El análisis se realizó en MEGA 7, Porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones).

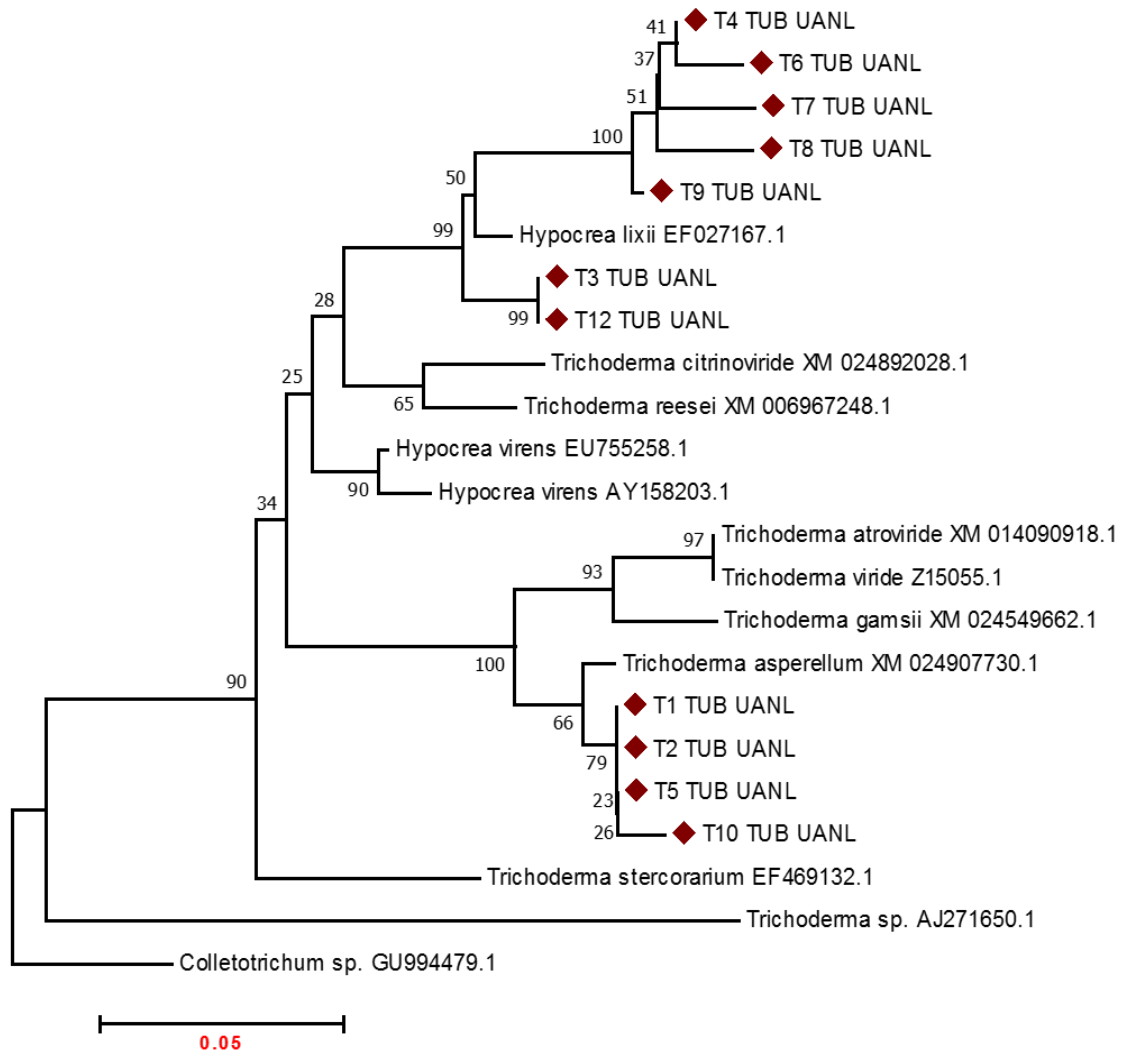


Figura 20.- Análisis filogenético de *Trichoderma* con marcador molecular Bsens - Brev método unión de vecinos (NJ). El análisis se realizó en MEGA 7, Porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones).