

***HACIA UNA AGRICULTURA MÁS SOSTENIBLE: EL USO DE
HONGOS DEL GÉNERO *Trichoderma****

***TOWARDS A MORE SUSTAINABLE AGRICULTURE: THE USE OF THE
FUNGI GENUS *Trichoderma*.***

Jorge Poveda Arias

Biólogo (18.533-CL) e Investigador Predoctoral del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Grupo de Fitopatología y Control Biológico, Universidad de Salamanca
Programa de Doctorado en Agrobiotecnología (RD 99/2011)

jorgepoveda@usal.es

RESUMEN

Trichoderma es un género de hongos filamentosos ampliamente estudiado y utilizado como agente de control biológica en agricultura, debido a diferentes mecanismos de acción, que incluyen la capacidad para parasitar hongos fitopatógenos, la liberación de sustancias inhibitoras, la competencia, la promoción del crecimiento vegetal, la inducción de las respuestas defensivas de la planta y el incremento de su tolerancia frente a condiciones adversas. Además, muchos de los genes implicados en estos mecanismos son susceptibles de ser utilizados en la transformación de cultivos transgénicos, con ventajas muy destacables ya observadas.

Palabras clave: *Trichoderma*, control biológico, micoparasitismo, crecimiento, defensa.

ABSTRACT

Trichoderma is a genus of filamentous fungi widely studied and used as a biological control agent in agriculture, due to different mechanisms of action, which include the ability to parasitize phytopathogenic fungi, release inhibitory substances, competition, promoting plant growth, the induction of the defensive responses of the plant and the increase of its tolerance against adverse conditions. In addition, many of the genes involved in these mechanisms are susceptible to be used in the transformation of transgenic crops, with very remarkable advantages already observed.

¿Qué es *Trichoderma*?

Trichoderma es un género de hongos filamentosos con reproducción asexual, alternando la formación de micelios y esporas, que se engloba dentro de la División Deuteromicota y la clase de los Hifomicetos (Webster, 1980; Gams et al., 1987). Su estado perfecto, o estado en el que realiza su reproducción sexual, se englobaría dentro del género *Hypocrea*, ya que *Trichoderma* perdió esa capacidad reproductiva a lo largo de su evolución (Kuhls et al., 1996). Este género fúngico fue descrito hace más de 220 años (Persoon, 1794), sin embargo, su clasificación morfológica derivó en problemas, solventados gracias a las modernas técnicas de biología molecular, por las que en la actualidad este género se encuentra dividido en 16 clados, agrupados en 6 secciones (Rifai, 1969; Atanasova, 2014).

De forma general, la mayoría de especies de *Trichoderma* crecen y se desarrollan rápidamente sobre sustratos de muy diferente origen, produciendo gran cantidad de esporas de color verde y forma ovoide.

¿Dónde podemos encontrarlo?

Estos hongos pueden encontrarse en todos los continentes, siendo muy habituales en suelos agrícolas y forestales, ya que pueden desarrollarse en un amplio rango de temperaturas (Hermosa et al., 2004; Druzhinina et al., 2010). Aunque su forma de vida ancestral era degradando materia orgánica muerta y parasitando a otros hongos, durante su historia evolutiva colonizó la rizosfera vegetal, al encontrar allí un lugar rico en alimento por los exudados de la raíz y en patógenos que pretenden atacar la planta, y son susceptibles de ser parasitados por *Trichoderma* (Kubicek et al., 2011). Además, presentan una ventaja frente a otros hongos en su establecimiento en el sistema agrícola, ya que son resistentes a varios tipos de

fungicidas, como el bencimidazol (Mukherjee et al., 2003).

Su utilización como agente de control biológico

El control biológico se define como la utilización de organismos beneficiosos con el fin de reducir los efectos negativos causados por organismos fitopatógenos, además de promover respuestas positivas en las plantas (Shoresh et al., 2010). Los mecanismos de acción de *Trichoderma* como agente de control biológico son muy variados:

1.- Parasitar a otros hongos

Trichoderma tiene la capacidad de alimentarse de otros hongos en un proceso denominado como micoparasitismo, y que se lleva a cabo mediante varios eventos secuenciales. En primer lugar, *Trichoderma* reconoce la presencia del hongo fitopatógeno y comienza a crecer hacia él por quimiotropismo (se siente atraído por sustancias químicas). Esto es debido a que reconoce ciertos oligómeros de la pared del patógeno, gracias a que se encuentra liberando de forma constitutiva una exoquitinasa al medio circundante. En segundo lugar, *Trichoderma* alcanza a su presa y enrosca sus hifas alrededor de las suyas, formando unas estructuras de tipo apresorio que perforan su pared celular mediante enzimas (quitinasas, glucanasas y proteasas) y antibióticos. Por último, digiere su contenido intracelular, desintegrando las hifas del hongo fitopatógeno (Benhamou & Chet, 1996; Brunner et al., 2003; Lu et al., 2004; Sanz et al., 2004; Zeilinger et al., 2005; Harman et al., 2006; Mukherjee et al., 2011).

2.- Liberar sustancias al medio externo

El modo de acción de *Trichoderma* en este sentido se va a basar en la denominada como antibiosis, que se define como la capacidad de un organismo de inhibir el crecimiento de otro mediante la liberación al exterior de diferentes compuestos, y sin que exista un contacto físico

entre ambos. Estos compuestos se van a incluir dentro de los denominados como metabolitos secundarios, de los cuales este hongo es capaz de sintetizar miles de distinto tipo. Se ha descrito la antibiosis de *Trichoderma* sobre importantes patógenos de plantas como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium* o *Colletotrichum*. Pero, además, algunos de estos metabolitos presentan potenciales aplicaciones en terapia humana como anticancerígenos o reductores de colesterol, incluídas a su capacidad antimicrobiana contra bacterias y hongos (Hoffmeister & Keller, 2007; Reino et al., 2012; Osbourn, 2010; Tijerino et al., 2011; Mukherjee et al., 2012; Vinale et al., 2012; Kewani et al., 2014; Leevathi et al., 2014).

3.- Competir con el patógeno

Debido a la enorme capacidad y velocidad de colonización de la rizosfera que presenta *Trichoderma*, es capaz de ocupar el espacio necesario para que los fitopatógenos puedan atacar a la planta, impidiendo que estos se asienten. Además, este género de hongos es muy eficiente en la movilización y absorción del carbono, el nitrógeno y el hierro presentes, privando de estos nutrientes a los posibles patógenos (Harman, 2006; Vinale et al., 2008).

4.- Promover el crecimiento de las plantas

Está totalmente comprobada la capacidad de especies del género *Trichoderma* para promover el crecimiento y desarrollo radicular de las plantas, aumentando, por lo tanto, la productividad de los cultivos. Este efecto es debido a que el hongo puede producir una hormona vegetal denominada ácido indolacético, del grupo de las auxinas, incrementando la capacidad fotosintética de las plantas y modificando su estructura radicular, aumentando el número de raíces secundarias y pelos radiculares (Yedidia et al., 2001; Harman et al., 2006; Contreras-Cornejo et al., 2009; Vargas et al., 2009).

5.- Actuando como una “vacuna vegetal”

La forma en la que *Trichoderma* está en contacto con las plantas es colonizando las capas más externas de la epidermis, manteniéndose como un simbionte no patogénico, además de extendiéndose por la rizosfera. En esta situación, la planta reconoce moléculas asociadas al hongo y preactiva una respuesta defensiva, aumentando su resistencia frente al futuro posible ataque de patógenos. Esta respuesta de la planta incluye la síntesis de compuestos de defensa y la activación de las rutas hormonales implicadas en resistir el ataque de patógenos (Monte, 2001; Harman et al., 2004; Lorito et al., 2010; Hermosa et al., 2013).

6.- Incrementando su tolerancia a las malas condiciones ambientales

La presencia de *Trichoderma* en la planta es capaz de reducir el efecto adverso que tienen estreses ambientales como la temperatura, la salinidad o la sequía sobre ella, debido a una reducción en los daños oxidativos (Mastouri et al., 2010).

***Trichoderma* como fuente de genes**

Conociendo todos los mecanismos potenciales de biocontrol que tiene este hongo, queda claro que existen gran cantidad de genes y productos génicos implicados en estos procesos, los cuales son susceptibles de ser aislados y utilizados en la transformación de cultivos transgénicos de alto potencial (Nicolás et al., 2014).

Por ejemplo, la introducción y expresión de genes que codifican para enzimas quitinasas de *Trichoderma* en plantas les confiere resistencia frente a gran cantidad de patógenos. Esto se ha podido comprobar con el gen *chit42* de *Trichoderma harzianum* en plantas de patata y tabaco frente a patógenos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* o *Rhizoctonia solani*, pero también en otros cultivos como manzanos,

limoneros o brócoli, frente a otros patógenos (Lorito et al., 1998; Bolar et al., 2000; Distefano et al., 2008). Además, se ha comprobado con genes de otras quitinasas en otros cultivos y frente a otros patógenos, como en arroz, algodón o zanahoria (Baranski et al., 2008; Kumar et al., 2009; Shah et al., 2009).

Por otro lado, existen genes, como el hsp70 de *Trichoderma harzianum*, que le confiere a la planta que lo expresa tolerancia a altas temperaturas, salinidad y sequía (Montero-Barrientos et al., 2010).

Otras aplicaciones de *Trichoderma*

Además de en la agricultura, *Trichoderma* suscita un gran interés en industrias, como la alimentaria, la textil, la farmacéutica y la ambiental. En este sentido, un claro ejemplo es el de la especie *Trichoderma reesei*, cuya capacidad para producir y secretar celulasas le ha otorgado gran cantidad de usos en áreas tan diversas como la alimentación animal, las fermentaciones alcohólicas, los detergentes de lavado de ropa, el blanqueo de papel o la producción de biocombustibles. Por otro lado, se han utilizado especies como *Trichoderma harzianum* y *T. atroviride* en la biorremediación de suelos contaminados con arsénico, e incluso el primero de ellos como bioabsorbente de fluoruros para la descontaminación de aguas subterráneas (Rosgaard et al., 2007; Seidl et al., 2008; Rahman et al., 2009; Schuster et al., 2012; Caporale et al., 2014; Koshe et al., 2016).

Bibliografía

- Atanasova L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* and *Gliocladium* in genome perspective. En *Biotechnology and biology of Trichoderma* (eds. Gupta VS, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I y Tuohy M), Elsevier: Waltham, EE.UU. pp. 25-40.
- Baranski, R., Klocke, E., Nothnagel, T. (2008). Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. *Journal of phytopathology*, 156(9), 513-521.
- Benhamou, N., & Chet, I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*, 86(4), 405-416.
- Bolar JP, Norelli JL, Harman GE, Brown SK, Aldwinckle HS (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Research* 10: 533-543.
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S., Kubicek, C. P. (2003). The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current genetics*, 43(4), 289-295.
- Caporale, A. G., Sommella, A., Lorito, M., Lombardi, N., Azam, S. M., Pigna, M., & Ruocco, M. (2014). *Trichoderma* spp. alleviate phytotoxicity in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) irrigated with arsenic-contaminated water. *Journal of plant physiology*, 171(15), 1378-1384.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579-1592.
- Distefano, G., La Malfa, S., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z., Gentile, A. (2008). Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic research*, 17(5), 873-879.
- Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska, M., Atanasova, L., Seidl, V., Kubicek, C. P. (2010). Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. *PLoS One*, 5(2), e9191.
- Gams W, van der Aa HA, van der Okaats-Niterink AJ, Samson RA y Stalpers JA (1987). *CBS Course of Mycology*. Centralbureau voor Schimmelcultures: Berna, Suiza.
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194.
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194.
- 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.
- Hermosa, M. R., Emma, KECK., Chamorro, I., Rubio, B., Luis, SANZ., Vizcaíno, J. A., Monte, E. (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological research*, 108(08), 897-906.

- Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16(2), 69-80.
- Hoffmeister, D., & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports*, 24(2), 393-416.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(2), 533-544.
- Koshle S, Mahesh S y Swamy SN. (2016). Isolation and identification of *Trichoderma harzianum* from groundwater: An effective biosorbent for defluoridation of groundwater. *Journal Environ Bio* 37: 135-140.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Mukherjee, M. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome biology*, 12(4), 1.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7755-7760.
- Kumar V, Parkhi V, Kenerley CM, Rathore KS (2009). Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. *Planta* 230: 277-291.
- Leelavathi, M. S., Vani, L., Reena, P. (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 3, 96-103.
- Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Tuzun, S. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 7860-7865.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual review of phytopathology*, 48, 395-417.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., Jansson, J. K. (2004). In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3073-3081.
- Mastouri, F., Björkman, T., Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213-1221.
- Monte, E. (2010). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, 4(1), 1-4.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Nicolás, C., Monte, E. (2010). Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of plant physiology*, 167(8), 659-665.
- Mukherjee, M., Hadar, R., Mukherjee, P. K., & Horwitz, B. A. (2003). Homologous expression of a mutated beta-tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *Journal of applied microbiology*, 95(4), 861-867.
- Mukherjee, P. K., Buensanteai, N., Moran-Diez, M. E., Druzhinina, I. S., Kenerley, C. M. (2012). Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology*, 158(1), 155-165.
- Mukherjee, P. K., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., Moran-Diez, M. E., McCluskey, K., Kenerley, C. M. (2010). Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M110.
- Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K., Monte, E. (2014). *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Science*, 228, 71-78.
- Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics*, 26(10), 449-457.
- Persoon CH. (1794). *Dispositio methodica fungorum in Classes, Ordines, Familias et Genera*. *En Neues Magazin für die Botanik* (ed. Römer, JJ), Ziegler und Söhne: Zurich, Alemania. pp. 63-128.
- Rahman, Z., Shida, Y., Furukawa, T., Suzuki, Y., Okada, H., Ogasawara, W., Morikawa, Y. (2009). Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular β -glucosidase I. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(5), 1083-1089.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89-123.
- Rifai MA. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* 116: 1-56.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J. R., Meyer, A. S. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw

- substrates. *Biotechnology progress*, 23(6), 1270-1276.
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., Hermosa, R., Monte, E. (2004). Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current genetics*, 46(5), 277-286.
 - Schuster, A., Bruno, K. S., Collett, J. R., Baker, S. E., Seiboth, B., Kubicek, C. P., Schmoll, M. (2012). A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 1.
 - Seidl, V., Gamauf, C., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., Hartl, L., Kubicek, C. P. (2008). The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC genomics*, 9(1), 327.
 - Shah, J. M., Raghupathy, V., Veluthambi, K. (2009). Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Biotechnology letters*, 31(2), 239.
 - Tijerino, A., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., Hermosa, R. (2011). Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(3), 285-296.
 - Vargas, W. A., Mandawe, J. C., Kenerley, C. M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology*, 151(2), 792-808.
 - Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 48(6), 705-711.
 - Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
 - Webster J. (1980). *Introduction to Fungi*, 2^a Ed., Cambridge University Press: Cambridge, Reino Unido.
 - Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and soil*, 235(2), 235-242.
 - Zeilinger, S., Reithner, B., Scala, V., Peissl, I., Lorito, M., Mach, R. L. (2005). Signal transduction by Tga3, a novel G protein α subunit of *Trichoderma atroviride*. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1591-1597.