



## POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO Y ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* AISLADAS DEL BAGAZO DE *Agave durangensis*

### BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND CELLULOLYTIC ACTIVITY OF NATIVE STRAINS OF *Trichoderma* ISOLATED FROM *Agave durangensis* BAGASSE

R. Aidé Carrasco-Rubio<sup>1</sup>, Daniel Sierra-Franco<sup>2</sup>, E. Esther Araiza-Rosales<sup>2</sup>, Gerardo A. Pámanes-Carrasco<sup>3</sup>, L. Xóchitl Zelaya-Molina<sup>4</sup> y Esperanza Herrera-Torres<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales, Durango, Durango, México. <sup>2</sup>UJED, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Durango, Durango, México. <sup>3</sup>UJED, Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera, Durango, Durango, México. <sup>4</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro Nacional de Recursos Genéticos, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. <sup>5</sup>Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, Villa Montemorelos, Durango, México.

\*Autor de correspondencia (hetoes99@yahoo.com.mx)

#### RESUMEN

El agave es una planta que se utiliza para la fabricación de bebidas alcohólicas, entre ellas el mezcal. En México se producen 11.36 millones de litros de mezcal por año, por lo que se generan 113,600 toneladas de residuos, ocasionando un impacto negativo en el medio ambiente. Uno de los usos potenciales de este residuo es como sustrato para aislar hongos de interés biotecnológico como lo son los del género *Trichoderma*, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial biotecnológico y la actividad celulolítica de cepas de *Trichoderma* aisladas de bagazo de *Agave durangensis*. Tres colonias de hongos fueron aisladas, a las que se les realizó identificación macro y microscópica, identificación molecular y actividad celulolítica. Los aislados fueron identificados con las siglas HPR, H6R y H8R. De acuerdo con el análisis filogenético, HPR y H8R están relacionadas con *T. azevedoi* y *T. afarasin*, especies con potencial biotecnológico y actividad celulolítica; sin embargo, H6R mostró afinidad con *T. saturnisporum* y *T. longibrachiatum*, las cuales se utilizan para la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos antimicrobianos. La cepa con mayor actividad celulolítica fue HPR, con un diámetro de halo de hidrólisis de 7.6 mm, índice de crecimiento de 1.90 y porcentaje de hidrólisis de 65.32 %. Se concluye que el bagazo de agave *durangensis* se puede utilizar como sustrato para aislar *Trichoderma*, hongo lignocelulolítico que puede ser empleado en procesos biotecnológicos.

**Palabras clave:** actividad celulolítica, bagazo de agave, biotecnología, filogenia, hongo.

#### SUMMARY

Agave is a plant used for production of alcoholic beverages, including mezcal. In Mexico, 11.36 million liters of mezcal are produced annually, resulting in 113,600 tons of waste, causing a negative impact on the environment. One potential use of this residue is as substrate to isolate fungi of biotechnological interest such as those of the genus *Trichoderma*; therefore, the aim of this study was to evaluate the biotechnological potential and cellulolytic activity of *Trichoderma* strains isolated from *Agave durangensis* bagasse. Three fungal colonies were isolated and subjected to macroscopic and microscopic identification, molecular identification, and cellulolytic activity assays. The isolates were identified with the codes HPR, H6R and H8R. According to the phylogenetic analysis, HPR and H8R are related to *T. azevedoi* and *T. afarasin*, species with biotechnological potential and cellulolytic activity; however, H6R showed affinity with *T. saturnisporum* and *T. longibrachiatum*, used for production of hydrolytic enzymes and antimicrobial metabolites. The strain

with the highest cellulolytic activity was HPR, with a hydrolysis halo diameter of 7.6 mm, growth index of 1.90 and hydrolysis percentage of 65.32 %. It is concluded that *Agave durangensis* bagasse can be used as a substrate to isolate *Trichoderma*, a lignocellulolytic fungus that can be employed in biotechnological processes.

**Index words:** Agave bagasse, biotechnology, cellulolytic activity, fungi, phylogeny.

#### INTRODUCCIÓN

El agave es una planta que se ha utilizado desde hace mucho tiempo en la fabricación de bebidas alcohólicas. En México se utilizan aproximadamente 1.5 millones de toneladas de esta planta en la elaboración de bebidas como tequila, mezcal, bacanora y raicilla. De acuerdo con Franco *et al.* (2024) por cada litro de mezcal producido, se generan entre 5 y 12 kg de bagazo húmedo, de tal manera que si se producen 11.36 millones de litros de mezcal por año y considerando un promedio de 10 kg de bagazo por litro de mezcal, se generan 113,600 toneladas de este deshecho al año en México. Esto genera problemas como la contaminación del suelo y cuerpos de agua, además de la emisión de gases de efecto invernadero (Gálvez *et al.*, 2019); sin embargo, este residuo es fuente de componentes lignocelulósicos que pueden ser aprovechados para producir biocombustibles y enzimas industriales mediante procesos biotecnológicos (Perez-Pimienta *et al.*, 2024), así como alimento para el ganado, para lo cual es necesario utilizar microorganismos que degraden estos compuestos lignocelulolíticos.

Con base en lo anterior, es posible utilizar el bagazo como posible sustrato para la producción masiva de cepas de *Trichoderma*, que son microorganismos capaces de convertir los residuos lignocelulósicos en azúcares simples, facilitando su uso en biocombustibles

y mejoradores del suelo (Heredia-Martín *et al.*, 2023). No obstante, las características metabólicas y genéticas de *Trichoderma* varían según su origen, lo que resalta la necesidad de identificar y caracterizar cepas nativas adaptadas a sustratos específicos como el bagazo de *A. durangensis*. También, la variabilidad de las características morfológicas de las especies de *Trichoderma* hace que su clasificación sea difícil, por eso ha sido necesario utilizar técnicas moleculares, en las cuales se ha avanzado en los últimos años, lo cual apoya a los métodos morfológicos (Zorić, *et al.*, 2023). Por lo anterior, este estudio tuvo como objetivo identificar cepas de *Trichoderma* aisladas de *Agave durangensis* y evaluar su actividad celulolítica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del bagazo

El bagazo de *A. durangensis* fue recolectado de la vinata productora de mezcal 'El Diamante' ubicada en el ejido Pino Suárez, a 23.1 km al sureste del municipio de Durango, Durango, México. El material se transportó en condiciones asépticas y se almacenó a 4 °C hasta su procesamiento.

### Aislamiento y purificación de colonias

Para la identificación de los microorganismos presentes en el bagazo, se preparó una suspensión inicial con 1 g de bagazo en 10 mL de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones seriadas a partir de la dilución  $1 \times 10^5$  se tomaron 100  $\mu$ L y se colocaron en una placa de Petri con un medio papa-dextrosa-agar (PDA) (Atlas, 2010). Las placas se incubaron a 30 °C por seis días (Prescott *et al.*, 2016). La purificación de las cepas se realizó a partir de un cultivo monospórico en medio PDA con antibiótico ampicilina al 1 %. Las cepas purificadas se conservaron en glicerol 30 % a -20 °C.

### Caracterización macroscópica y microscópica

Cada aislado fue etiquetado con las siglas HR, y numerado del 1 al 12, de acuerdo con el orden de aislamiento; de estos, solo HPR, H6R y H8R correspondieron al género *Trichoderma*.

El análisis morfológico detallado se realizó siguiendo protocolos estandarizados para hongos filamentosos (Bissett, 1991; Samuels, 2006). Las cepas se cultivaron en PDA y OA a 25 °C durante siete días. Las estructuras reproductivas se montaron en ácido láctico con azul de algodón y se observaron en un microscopio óptico (Modelo CX31, Olympus, Tokio, Japón) equipado con un ocular micrométrico calibrado. Para cada cepa, se midieron

conidióforos, células basales, filídes y conidios ( $n = 20$ ). Los conidios se clasificaron según el sistema de Saccardo considerando tamaño y forma. Las características macroscópicas de los aislados (coloración, zonación, textura) se registraron a los 5 y 7 días de crecimiento.

### Determinación de actividad celulolítica

La actividad celulolítica de las cepas se determinó mediante el método de tinción con rojo Congo (Thorn *et al.*, 1996), utilizando carboximetilcelulosa (CMC). En cada placa se realizó una perforación de 6 mm de diámetro con un punzón esterilizado y se inocularon 50  $\mu$ L de suspensión del microorganismo a una concentración de  $1 \times 10^6$ , incubándolas a 30 °C durante 48 h. La tinción se hizo con 5 mL de rojo Congo 1 % por 15 min. La actividad celulolítica se determinó por la presencia de halos resultantes de la hidrólisis de celulosa. Se midió el diámetro de los halos y se realizaron los cálculos de acuerdo con las fórmulas descritas en el Cuadro 1.

### Identificación molecular

Los aislados que correspondieron morfológicamente al género *Trichoderma* fueron enviados al Laboratorio de Servicios Genómicos UGA-LANGEBIO-Cinvestav Irapuato, México para identificación molecular, que incluyó la amplificación de la región ITS y secuenciación bidireccional del producto de PCR, mediante secuenciación Sanger. La amplificación de la región ITS se realizó utilizando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

La edición y ensamblaje de las secuencias de nucleótidos se realizaron utilizando el software BioEdit (v.7.2). El análisis filogenético de la región ITS se realizó utilizando un total de 41 secuencias de nucleótidos, de las cuales 37 correspondieron a cepas tipo de diferentes especies del género *Trichoderma*, obtenidas mediante la herramienta BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Todas las secuencias se alinearon utilizando el programa ClustalW integrado en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Los porcentajes de identidad entre las secuencias empleadas en el análisis filogenético se determinaron con el programa MatGAT, versión 2.01. El árbol filogenético se construyó mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando el modelo de Kimura 2-parámetros, el cual se realizó con el programa Find Best DNA/Protein Models (ML) integrado en MEGA7 (Kimura, 1980).

Para evaluar el soporte de los agrupamientos, se realizó un análisis de bootstrap con 1000 réplicas, la especie *Protocrea pallida* se utilizó como grupo externo (outgroup). Las secuencias obtenidas en este estudio se depositaron

**Cuadro 1. Formulas y criterios de evaluación de la actividad celulolítica.**

| Parámetro                         | Fórmula matemática                                 | Símbolos utilizados                                   | Citas                               |
|-----------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| Diámetro del halo de hidrolisis   | $Dh = \frac{dh1 + dh2 + dh3}{3}$                   |   | (Thorn et al., 1996)                |
| Índice de crecimiento             | $IC = Dh / Dc$                                     | dh = diámetro del halo de la repetición               | (Thorn et al., 1996)                |
| Índice de solubilización relativa | $ISR = (Dh + Dc) / Dc$                             | Dh = diámetro del halo<br>Dc = diámetro de la colonia | (Chanchignia-Martínez et al., 2024) |
| Hidrólisis de sustrato celulósico | $HSC = \left(\frac{Dh}{Dh + Dc}\right) \times 100$ |   | (Chanchignia-Martínez et al., 2024) |

en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### Análisis estadístico de los datos

Las variables de actividad celulolítica fueron analizadas mediante un diseño completamente al azar, utilizando el software RStudio, versión 4.2.2 (R Core Team, 2022).

## RESULTADOS

### Aislamiento y caracterización macro y microscópica de hongos

El análisis morfológico mostró que los tres aislamientos (HPR, H6R y H8R) presentaron características microscópicas compatibles con el género *Trichoderma*: conidióforos hialinos, ramificados irregularmente, no verticilados; fiálides agrupadas en parejas o tríadas, y conidios hialinos, unicelulares, de forma ovoide a subglobosa, agrupados en pequeños racimos mucilaginosos en los ápices de las fiálides; sin embargo, presentaron diferencias en coloración de los halos típicos de este género; el aislamiento HPR presentó halos intercalados de color verde y amarillos con beige, H6R presentó halos verde intenso intercalados con blanco brillante, y por último, H8R presentó halos verdes intercalados con halos de color amarillo (Cuadro 2); además, el aislamiento H6R presentó estructuras de mayor dimensión (conidióforos de 68 µm, células basales de 6.1 µm, fiálides de 12 µm, conidios subglobosos de 4.15 µm de largo y 3.15 µm de ancho) en comparación con los demás aislamientos. El aislamiento HPR presentó conidióforos de 55 µm, células basales 5.2 µm, fiálides de 9.8 µm, conidios 3.65 µm de largo y 2.85 de ancho, mientras que H8R presentó conidióforos de 62 µm, células basales 5.6 µm, fiálides de 11 µm, conidios ovoides de 3.9 µm de largo y 3 de ancho.

### Identificación molecular

Las secuencias de la región ITS de las cepas fúngicas HPR, H6R y H8R se compararon con las reportadas en GeneBank y resultaron asociadas con una alta similitud con el género *Trichoderma* (Cuadro 3). Las secuencias generadas en el presente estudio se depositaron en el GenBank con los números PQ596093, PQ596094 y PQ596095.

### Determinación de actividad celulolítica

Las tres cepas de *Trichoderma* generaron halos de degradación producto de la actividad celulolítica mediante el método de tinción de rojo Congo (Figura 2).



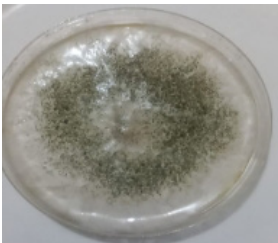
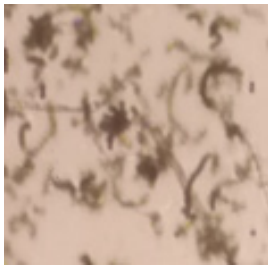
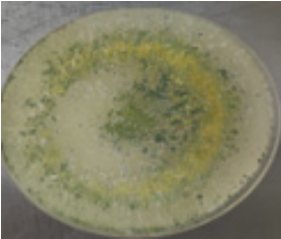
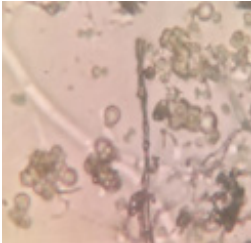
La cepa H6R presentó el menor diámetro de halo de inhibición, índice de crecimiento, índice de solubilización relativa e hidrólisis del sustrato comparado con las otras dos cepas ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

### Aislamiento y caracterización macro y microscópica de hongos

La identificación morfológica permitió ubicar a los hongos identificados dentro del género *Trichoderma*; sin embargo, estas características varían de acuerdo con el origen y su evolución genética, por lo que se observaron diferentes coloraciones en los halos, a pesar de pertenecer al mismo género, mientras que con la identificación molecular las cepas HPR y H8R se agruparon en un mismo clado, lo que sugiere similitudes genéticas significativas, y se relaciona con *Trichoderma azevedoi*, *T. afarasin*, *T. rifaii*, y *T. camerunense*. Por otra parte, la cepa H6R comparte un clado general con *T. saturnisporum*, *T. longibrachiatum* y *T. citrinoviride* (Figura 1). Lo anterior no es concluyente, ya que anteriormente diferentes cepas

**Cuadro 2. Caracterización morfológica de tres cepas de *Trichoderma* sp.**

| Aislamiento | Color de micelio | Color de espora | Imagen macroscópica   | Imagen microscópica (40X)  |
|-------------|------------------|-----------------|---|--|
| HPR         | Blanco           | Verde-amarillo  |   |   |
| H6R         | Blanco           | Verde           |   |   |
| H8R         | Blanco           | Verde-amarillo  |  |  |

**Cuadro 3. Identidad de las secuencias de hongos aislados del bagazo de *Agave durangensis* respecto a las secuencias de cepas tipo empleadas en el análisis filogenético.**

| Cepa | Secuencia de cepa tipo                       | Porcentaje de identidad |
|------|--|-------------------------|
| HR6  | NR_120298 <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | 99.5                    |
|      | NR_103704 <i>Trichoderma saturnisporum</i>   | 99.5                    |
|      | NR_077178 <i>Trichoderma citrinoviride</i>   | 99.2                    |
| H8R  | NR_173287 <i>Trichoderma azevedoi</i>        | 100.0                   |
|      | NR_137300 <i>Trichoderma camerunense</i>     | 99.5                    |
|      | NR_137305 <i>Trichoderma rifaii</i>          | 99.5                    |
|      | NR_137301 <i>Trichoderma afarasin</i>        | 99.2                    |
| HPR  | NR_173287 <i>Trichoderma azevedoi</i>        | 99.7                    |
|      | NR_137300 <i>Trichoderma camerunense</i>     | 99.5                    |
|      | NR_137305 <i>Trichoderma rifaii</i>          | 99.5                    |
|      | NR_137301 <i>Trichoderma afarasin</i>        | 99.2                    |



Figura 1. Árbol filogenético construido con las secuencias de la región ITS de cepas de *Trichoderma* mediante el método de máxima verosimilitud con el modelo de Kimura 2-parámetros. Los valores en las ramas corresponden a porcentajes de re-muestreo obtenidos a partir de 1000 repeticiones. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. *Protocrea pallida* se utilizó como grupo externo.

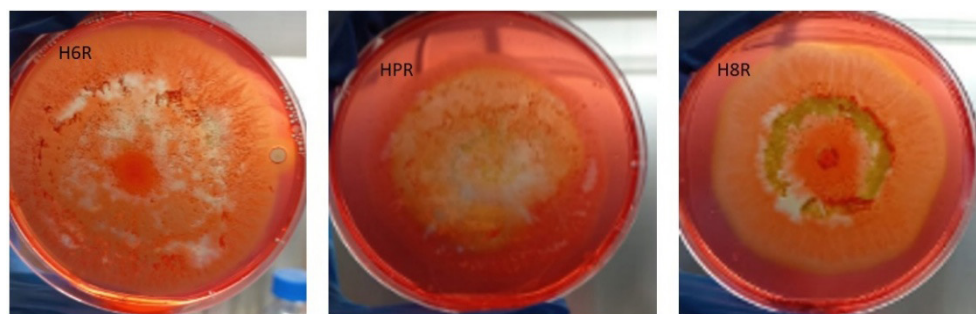


Figura 2. Actividad celulolítica por el método de rojo Congo.

#### Cuadro 4. Evaluación de la actividad celulolítica de tres cepas de *Trichoderma*

| Cepa         | Dh (mm) | IC     | ISR    | HSC (%) |
|--------------|---------|--------|--------|---------|
| PQ596095-HPR | 7.6 a   | 1.90 a | 2.88 a | 65.32 a |
| PQ596094-H6R | 6.4 b   | 1.60 b | 2.63 b | 61.94 b |
| PQ596093-H8R | 7.2 a   | 1.80 a | 2.90 a | 65.45 a |
| E.E.         | 0.14    | 0.03   | 0.05   | 0.67    |

Medias con letra diferente en las columnas no son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.05$ ). Dh: diámetro del halo, IC: índice de crecimiento, ISR: índice de solubilización relativa de celulosa, HSC: hidrólisis de sustrato celulósico, E.E.: error estándar experimental.

de *T. harzianum* se reubicaron en especies como *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. longibrachiatum* utilizando para la descripción las diferencias en las regiones 5.8S del rRNA, ITS1 e ITS2 y otras técnicas (Kullnig *et al.*, 2001); no obstante, su proximidad evolutiva implica que podrían tener comportamientos funcionales similares, como la capacidad de degradar celulosa (Viteri *et al.*, 2016), de ahí la importancia de ubicar taxonómicamente, ya que es el punto de partida que permite evaluar la actividad biológica bajo diferentes condiciones de crecimiento y determinar los mecanismos de acción que desarrollan (Guigón-López, *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en la identificación molecular son aceptables para completarse a nivel de especie (Cuadro 3) debido a que la similitud encontrada en este estudio fue de 99 %; además, Menezes *et al.* (2010) mencionaron que la secuenciación de la región ITS es un método eficiente para la identificación de especies de *Trichoderma*, de tal manera que las cepas HPR y H8R resaltan en este estudio por su relación con *T. azevedoi*, especie conocida por su capacidad para producir celulasas y otros metabolitos hidrolíticos. Este resultado sugiere que HPR y H8R podrían compartir rutas metabólicas similares y pueden tener acción sobre la degradación de residuos lignocelulósicos, lo que coincide con estudios realizados por Druzhinina *et al.* (2012), donde se identificó el potencial de *T. azevedoi* en procesos de biorremediación y en la producción de biocombustibles. Por otra parte, la cepa HR6 mostró mayor cercanía filogenética con

*Trichoderma saturnisporum*, que es reconocida por su acción como agente biocontrolador y bioestimulante (Marchuk *et al.*, 2024).

Cabe mencionar que la cepa HR6 también tiene relación con las especies *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride* y *T. euskadiense* ya que se encuentran ubicadas en el mismo grupo lo cual sugiere que podrían compartir características genéticas relacionadas con la producción de enzimas hidrolíticas como celulasas y quitinasas (Kubicek *et al.*, 2019) y la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Mukherjee *et al.*, 2013). Estas similitudes filogenéticas podrían indicar un potencial funcional comparable en aplicaciones biotecnológicas, como la degradación de materia orgánica y el control de fitopatógenos. A nivel global, los análisis filogenéticos y enzimáticos resaltan la importancia de las cepas HPR, HR6 y HR8 como recursos valiosos para la degradación de residuos agroindustriales. Lo anterior permite sugerir el uso de estas cepas en residuos agroindustriales como el bagazo de agave con el objetivo de aumentar la digestibilidad de este alimento para consumo animal y evitar la acumulación del bagazo, el cual ocasiona la lixiviación y contaminación de los mantos freáticos (Ramírez-Cortina *et al.*, 2012).

Por otro lado, los resultados de este estudio confirmaron la capacidad de las cepas de *Trichoderma* de degradar celulosa, así como las relaciones filogenéticas de las cepas

HRP, HR6 y HR8 con diferentes especies de *Trichoderma* que poseen características de interés industrial (Figura 1), tal es el caso de *T. azevedoi*, especie conocida por su capacidad para producir enzimas hidrolíticas como celulasas y quitinasas, esenciales en la biodegradación de materia orgánica; además, HPR y H8R también mostraron relación, aunque más distante, con *T. afarasin*, una especie reportada por su potencial antifúngico y su uso como agente de control biológico (Atanasova *et al.*, 2013).

Finalmente, las diferencias observadas entre las cepas, tanto en sus índices de crecimiento como en su capacidad de hidrólisis de sustrato celulósico, subrayan la importancia de evaluar la variabilidad intraespecífica dentro del género *Trichoderma*. Las diferencias observadas en el halo de inhibición (Cuadro 4) pueden atribuirse a la capacidad de las cepas aisladas de *Trichoderma* para producir enzimas celulolíticas, debido a que la presencia de halos de inhibición indica la hidrólisis de la celulosa y se utiliza para determinar la actividad celulolítica; en este caso, se observa que la cepa identificada como H6R presentó un menor halo, lo cual sugiere una menor capacidad para degradar celulosa, lo cual está altamente relacionado con una baja actividad enzimática, o bien, una menor adaptación al medio (Zhang *et al.*, 2021). En un estudio realizado por Rodríguez-González *et al.* (2018) con *Trichoderma harzarium* observaron el mayor halo de inhibición a los 5 d de incubación.

El método de rojo Congo se utiliza como una herramienta simple y práctica para la identificación de microorganismos productores de enzimas celulasas (Ten *et al.*, 2004); además, esta metodología ha sido utilizada por distintos autores como criterio para seleccionar cepas de hongos productores de enzimas celulasas y xilanasas a través de la fermentación en estado sólido (Arana-Cuenca *et al.*, 2019). Por otro lado, el IC también mostró variaciones entre las cepas. La cepa HPR obtuvo el índice más alto en comparación con H6R. Este índice también es una variable que indica una mayor actividad hidrolítica. De la misma manera, Florencio *et al.* (2012) demostraron que cepas con un IC mayor, obtenido en pruebas en caja Petri, pueden presentar una mayor actividad enzimática en sistemas de FES; por lo tanto, la cepa aislada de bagazo de agave puede ser utilizada posteriormente para producir enzimas hidrolíticas, específicamente celulolíticas.

El Dh, IC, ISR e HSC mostraron valores menores en la cepa H6R, estos resultados indican que las cepas de *Trichoderma* HPR y H8R tienen mayor capacidad de degradar celulosa, al presentar mayor índice de solubilización. Estos resultados concuerdan con los reportados por Lázaro y Arauzo (1994), quienes comentaron que las celulasas producidas por el hongo *Trichoderma* presentan una mayor actividad. Por

otro lado, Zeilinger *et al.* (2016) reportaron que este hongo sintetiza y libera enzimas celulasas, así como otro tipo de metabolitos de interés industrial, mientras que Hernández-Melchor *et al.* (2019) coinciden en que *Trichoderma* es una fuente de enzimas que pueden ser utilizadas en la industria de los alimentos, como lo son las celulasas, glucanasas, xilanasas, pectinasas, y laminarinasas. En el mismo sentido, los diámetros del halo registrados en este estudio son mayores que los reportados por Guzmán *et al.* (2014) en hongos celulolíticos, quienes encontraron diámetros entre 3 y 5 mm, lo cual indica que el medio de cultivo empleado contiene las concentraciones adecuadas de carbono y nitrógeno para potenciar a las enzimas celulolíticas del hongo.

## CONCLUSIONES

El bagazo de *Agave durangensis* se puede utilizar como sustrato para aislar cepas de *Trichoderma*, y estos hongos pueden ser utilizados por su actividad celulolítica. Las cepas recuperadas tienen uso potencial en la producción de enzimas lignocelulolíticas, según indica la relación genética entre las cepas HPR y H8R con especies industriales como *T. azevedoi* y la cepa H8R con *T. saturnisporum*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana; se reconoce la colaboración del personal del Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP por el acceso a instalaciones y equipos utilizados en la caracterización molecular de las cepas.

## CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de intereses en relación con la realización de este estudio ni con la publicación de los resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arana-Cuenca A., X. Tovar-Jiménez, E. Favela-Torres, I. Perraud-Gaime, A. E. González-Becerra, A. Martínez, ... and A. Téllez-Jurado (2019) Use of water hyacinth as a substrate for the production of filamentous fungal hydrolytic enzymes in solid-state fermentation. *3 Biotech* 9:21, <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1529-z>.
- Atanasova L., S. Le Crom, S. Gruber, F. Couplier, V. Seidl-Seiboth, C. P. Kubicek and I. S. Druzhinina (2013) Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14:121, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-121>.
- Atlas R. M. (2010) Handbook of Microbiological Media. 4th edition. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 2043 p.
- Bissett J. (1991) A revision of genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69:2357-2372. <https://doi.org/10.1139/b91-297>
- Chanchignia-Martínez H. F., L. F. Vera-Benítez, D. N. Tapia-Quintana, A. V. Cedeño-Moreira, E. García-Intriago y C. J. Macías-Holguín (2024)

- Caracterización bioquímica de rizobacterias endófitas con actividad biocontroladora contra *Phytophthora palmivora* y *Lasioidiplodia theobromae*. *Terra Latinoamericana* 42:e1807, <https://doi.org/10.28940/terra.v42i0.1807>
- Druzhinina I. S., M. Komoń-Zelazowska, A. Ismaiel, W. Jaklitsch, T. Mullaw, G. J. Samuels and C. P. Kubicek (2012) Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49:358-68, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.02.004>
- Franco M. R. I., M. J. Rodríguez-Rosales, A. J. Martínez-Roldán, V. J. Martínez G., A. de la Peña A. y M. G. Contreras H. (2024) El agave en México: residuos orgánicos como adsorbentes para la remoción de contaminantes en el agua. *Agraria*. 21:5-14, <https://doi.org/10.59741/agraria.v21i3.623>
- Florencio C., S. Couri and C. Sanchez F. (2012) Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research* 2012:793-708, <https://doi.org/10.1155/2012/793708>
- Gálvez T. E., J. C. Legua, D. N. Cruz, F. S. Caro y M. S. Inga (2019) Evaluación de abono orgánico de vinaza y bagazo de la caña de azúcar para la producción ecológica de rabanito (*Raphanus sativus* L.). *Aporte Santiaguino* 12:236-249, <https://doi.org/10.32911/as.2019.v12.n2.645>
- Guigón-López C., V. Guerrero-Prieto, F. Vargas-Albores, F. Carvajal-Millán, G. D. Ávila-Quezada, L. Bravo-Luna, ... y M. Lorito (2010) Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp., su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:87-96.
- Guzmán C. A. M., D. E. Zambrano P., A. J. Rondón, M. Laurencio S., M. Pérez Q., R. León A. y R. Rivera F. (2014) Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCUYO* 46:177-189.
- Heredia-Martín J. P. y E. M. Sánchez-Castelblanco (2023) Evaluación de microorganismos y sustratos obtenidos a partir de residuos orgánicos para la producción de celulasas. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 21:50-61, <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.2165>
- Hernández-Melchor D. J., R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón (2019) *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 35:98-112, <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120, <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kubicek C. P., A. S. Steindorff, K. Chenthamara, G. Manganiello, B. Henrissat, J. Zhang, ... and I. S. Druzhinina (2019) Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics* 20:485, <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Kullnig C. M., T. Krupica, S. L. Woo, R. L. Mach, M. Rey, T. Benítez, ... and C. P. Kubicek (2001) Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research* 105:770-772, <https://doi.org/10.1017/S0953756201229967>
- Kumar S., G. Stecher and K. Tamura (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lázaro B. L. y J. Arauzo P. (1994) Aprovechamiento de residuos de la industria de conserva de vegetales. Hidrólisis enzimática. *Revista Zulia* 12:227-240.
- Marchuk L. C. N., G. A. Benítez R., W. J. Sandoval-Espínola, P. D. Arrúa, H. López-Nicora, G. Enciso-Maldonado, ... and A. A. Arrúa (2024) *Trichoderma* as biocontrol agent - in focus. *Revista Sociedad Científica de Paraguay* 29:137-171, <https://doi.org/10.32480/rscp.2024.29.1.137>
- Menezes J. P., M. Lupatini, Z. I. Antonioli, E. Blume, E. Junges y C. G. Manzoni (2010) Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Ciência e Agrotecnologia* 34:132-139, <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>
- Mukherjee P. K., B. A. Horwitz, A. Herrera-Estrella, M. Schmolli and C. M. Kenerley (2013) *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology* 51:105-129, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Perez-Pimienta J. A., Méndez-Acosta H. O., Davis S. C. and Tan D. K. Y. (2024) Editorial: The role of agave as feedstock within a sustainable circular bioeconomy. *Frontiers in Chemical Engineering* 5:1343629, <https://doi.org/10.3389/fceeng.2023.1343629>
- Prescott L. M., J. P. Harley y D. A. Klein (2016) *Microbiología*. 7ª edición. McGraw-Hill. Madrid, España. 1220 p.
- Ramírez-Cortina C. R., M. S. Alonso-Gutiérrez y L. Rigal (2012) Valorización de residuos agroindustriales del tequila para alimentación de rumiantes. *Revista Chapingo Serie Ciencia Forestales y del Ambiente* 18:449-456, <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.08.059>
- R Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
- Rodríguez-González A., P. A. Casquero, V. Suárez-Villanueva, G. Carro-Huerta, S. Alvarez-García, S. Maya-Prieto, ... and S. Gutiérrez (2018) Effect of trichodiene production by *Trichoderma harzianum* on *Acanthoscelides obtectus*. *Journal of Stored Products Research* 77:231-239, <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.05.001>
- Samuels G. J., S. L. Dodd, B. S. Lu, O. Petrini, H. J. Schroers and I. S. Druzhinina (2006) The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* 56: 67-133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>
- Ten L. N., W. T. Im, M. K. Kim, M. S. Kang and S. T. Lee (2004) Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *Journal of Microbiological Methods* 56:375-382, <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.008>
- Thorn R. G., A. Reddy, D. Harris and E. A. Paul (1996) Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4288-4292, <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4288-4292.1996>
- Viteri F. P. A., D. A. Castillo G. y S. E. Viteri R. (2016) Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica* 65:362-367, <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>
- Zeilinger S., S. Gruber, R. Bansal and P. K. Mukherjee (2016) Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30:74-90, <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- Zhang Z., A. M. Shah, H. Mohamed, N. Tsiklauri and Y. Song (2021) Isolation and screening of microorganisms for the effective pretreatment of lignocellulosic agricultural wastes. *BioMed Research. International* 2021:5714745, <https://doi.org/10.1155/2021/5514745>
- Zorić L. Š, L. Janjušević, M. Džisalo, T. Knežić, J. Vunduk, I. Milenković and I. Gadjanski (2023) Molecular approaches for detection of *Trichoderma* green mold disease in edible mushroom production. *Biology* 12:299, <https://doi.org/10.3390/biology12020299>