

Identificación y evaluación de actividad celulolítica en aislamientos nativos de *Trichoderma* spp obtenidos de biomasa de palma de aceite

Identification and screening of lignocellulosic activity in native isolates of *Trichoderma* spp., obtained from palm oil biomass

Javier Hernández-Fernández*, Elia Elizabeth Pérez**, Yineth Piñeros-Castro***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73693

RESUMEN

Se aislaron previamente ocho cepas nativas de racimos de palma de aceite en descomposición de *Trichoderma* sp. provenientes de la región de Cumaral, Meta, Colombia. Se utilizó la región de los ITS1-ITS4 para la identificación molecular y se determinó la actividad celulolítica (actividad sobre papel filtro) del complejo producido por las cepas utilizando residuos de palma como sustrato. Siete aislamientos nativos presentaron 100% de similaridad con hongos del género *Trichoderma*. Se observó para siete cepas, la presencia de las cinco anclas que identifican hongos del género *Trichoderma*, identificándose cuatro de los hongos nativos como *Trichoderma koningiopsis* (HR-04-89; HR-11-89; HR-19-89; y HR-06-89) y cuatro como *Trichoderma asperellum* (HR-01-89; HR-03-89; HR-16-89; HR-18-89). El bioensayo mostró que las cepas evaluadas de *Trichoderma* son estadísticamente significativas sobre la actividad enzimática de celulasas sobre papel filtro ($p < 0.05$). Además, las cepas HR-01-89, HR-03-89, HR-11-89, HR-04-89 y HR-18-89 no presentaron diferencias en la actividad enzimática. La cepa *Trichoderma reesei* utilizada como referencia, presentó un comportamiento superior y diferente comparado con las cepas nativas. La cepa nativa HR-18-89 (*Trichoderma asperellum*) presentó mayores niveles de actividad enzimática, 78% del valor de la cepa referencia. Es importante identificar y evaluar cepas nativas de *Trichoderma* sp. con novedosas actividades biológicas que permitan degradar la celulosa recalcitrante de los racimos de palma africana.

Palabras clave: ITS1-ITS4, PCR, cultivos monospóricos, celulasas, *Trichoderma*.

ABSTRACT

Previously, there were isolated eight native strains of *Trichoderma* sp. from a cluster of decomposing oil palm from Cumaral, Meta, Colombia. The ITS1-ITS4's region was used for the molecular identification and the cellulase activity (filter paper activity) of the complex produced by strains was determined using palm waste as substrate. Seven native isolations showed between 97-100%

* Profesor asociado II. cPhD. Universidad Jorge Tadeo Lozano-Facultad de Ciencias e Ingeniería-Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales. Carrera 4 No 22 61 Módulo 7A Oficina 402, (0057) 1 2427030 ext. 1880. javier.hernandez@utadeo.edu.co.

** Asistente de Investigación. BSc. Bióloga Marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano-Facultad de Ciencias e Ingeniería-Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales. Carrera 4 No 22 61 Módulo 7A Oficina 402, (0057) 1 2427030 ext. 1880. elizabiomar24@gmail.com.

*** Profesora titular. PhD. Universidad Jorge Tadeo Lozano-Facultad de Ciencias e Ingeniería-Departamento de Ingeniería. Programa de Ingeniería Química. Carrera 4 22 61 Módulo 7A Oficina 402, (0057) 1 2427030 ext. 1444, yineth.pineros@utadeo.edu.co.

similarity with fungi of the genus *Trichoderma*. It was observed for seven of the eight strains the presence of the five anchors which identify fungi of the genus *Trichoderma*, finding five of the native fungi such as *Trichoderma koningiopsis* (HR-04-89; HR-11-89; HR-19-89; y HR-06-89) four as *Trichoderma asperellum* (HR-01-89; HR-03-89; HR-16-89; HR-18-89). The bioassay showed that *Trichoderma* strains tested are statistically significant on the enzymatic activity of cellulases on filter paper ($p < 0.05$). In addition, strains HR-01-89, HR-03-89, HR-11-89, HR-04-89 and HR-18-89 showed no differences in enzymatic activity. The reference strain used, *Trichoderma reesei* produce a superior and different behavior compared with the native strains. The native strain HR-18-89 (*Trichoderma asperellum*) had higher levels of enzyme activity, 78% of the value of the reference strain. It is important to identify and evaluate native strains of *Trichoderma sp.* with innovative biological activities that allow to degrade the recalcitrant cellulose of the African palm clusters.

Keywords: ITS1-ITS4, monospore crops, PCR, cellulases, *Trichoderma*.

Recibido: agosto 22 de 2017

Aprobado: mayo 28 de 2018

INTRODUCCIÓN

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal y es degradada por microorganismos (bacterias y hongos) los cuales producen un complejo enzimático que comprende por lo menos tres grandes grupos (Rabinovich *et al.*, 2002): Endoglucanasas o endo-1-4- β -glucanasas (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21). Los materiales lignocelulósicos, compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina, son una fuente importante de materias primas para la producción de energía y biomoléculas (Ghosh & Singh 1993; Sánchez 2009), son abundantes y disponibles en los países tropicales. Un sector agroindustrial que genera grandes cantidades de biomasa lignocelulósica es la producción de aceite de palma. Con la producción de más de un millón de toneladas de aceites de palma y de palmiste, Colombia es el cuarto productor de aceite de palma en el mundo y el primer productor en América (Fedepalma, 2018). La palma de aceite está presente en cuatro zonas de Colombia: Norte, Oriental, Central y Suroccidente, que abarcan 122 municipios en 19 departamentos alrededor del país, siendo su área sembrada de 31,563 hectáreas en 2016 (Fedepalma, 2018). La palmicultura es una de las actividades agrícolas más prometedoras como eje para alcanzar el desarrollo nacional (Fedepalma, 2018). En 2017, en Colombia se produjeron 8,6 millones de toneladas de frutos (Fedepalma, 2018) y durante la extracción del aceite se generaron cerca de 3,5 millones de toneladas de materiales lignocelulósicos (Fedepalma, 2018). La producción anual mundial de estos materiales alcanza 184,6 millones de toneladas (Kelly-Yong *et al.*, 2007).

Una de las especies más estudiadas en la producción de celulasas, enzimas importantes para el aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, son los hongos del género *Trichoderma* (*Hypocreales*, *Acomycota*) (Jiang *et*

al., 2011; Juhasz *et al.*, 2005; Liming & Xueliang 2004; Rodríguez & Piñeros 2007; Uusitalo *et al.*, 1991) considerando su alta capacidad y conocimiento de secreción enzimática activa sobre celulosa. La identificación de especies de *Trichoderma* ha tenido una historia accidentada y la identificación taxonómica está en conflicto, ya que el grado de similitud morfológica es bastante alto. Rifai (1969) sugirió que más de una especie de *Hypocrea* produce caracteres similares de *Trichoderma* y la mayoría de especies, como *T. harzianum* se definen como agregados. Por lo tanto, parámetros adicionales más allá de los criterios morfológicos son necesarios para designar la especie y género. El análisis morfológico es altamente propenso a errores y aproximadamente el 50% de *Trichoderma sp.* clasificados por análisis morfológico está erróneamente realizado (Kubicek *et al.*, 2003).

En las últimas décadas se ha dado importancia a la aplicación de técnicas moleculares para la detección e identificación de hongos. Las herramientas moleculares utilizadas para la identificación basada en la secuenciación del ADN son los marcadores ITS1- 5,8S - ITS2, una secuencia parcial de las proteínas que codifican la traducción del gen del factor de elongación (EF-1 α) y la ARN polimerasa subunidad II (RPB2) que han permitido resolver la confusión en la taxonomía de *Trichoderma* (Bouregghda *et al.*, 2008). Estas técnicas han sido usadas en el análisis filogenético del género *Trichoderma*, usando el análisis de la secuencia de la región ITS1 del ADNr (Kindermann *et al.*, 1998).

El objetivo del presente estudio fue establecer género y especie de hongos *Trichoderma sp.* nativos de la región de Cumaral, Meta, Colombia, utilizando el análisis de la secuencia nucleotídica de las regiones ITS1-ITS4 y evaluar la actividad celulolítica de los complejos producidos por las cepas estudiadas usando residuos de palma de aceite como sustrato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Se realizaron cultivos monospóricos de cepas nativas de *Trichoderma* (HR-01-89, HR-03-89, HR-06-89, HR-16-89, HR-18-89, HR-04-89, HR-11-89, HR-18-89) aisladas de racimos vacíos de palma en descomposición, recolectados de la región de Cumaral-Meta (Colombia), y conservadas en glicerol a -80°C. Se utilizó como cepa de referencia a *Trichoderma reesei* (E. Simmons. A CECT 2414) (ATCC 24449).

Extracción de DNA. Se aisló DNA utilizando el kit "Ultra Clean™ Tissue & Cells DNA Isolates" (MO BIO Laboratories Inc). El DNA se reveló en electroforesis de agarosa al 1% y se registró con un fotodocumentador UVP Gel-Doc-IT™ Imaging system (UVP LSC. USA). El DNA se cuantificó en un Nanodrop utilizando el programa ND-1000 V3.7.1. y luego se almacenó a -20°C previo a su utilización.

Amplificación por PCR. Se amplificaron las regiones ITS1-ITS4. Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores directo **ITS1:** 5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3´ y reverso **ITS4:** 5´TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´ (White *et al.*, 1990). La reacción de PCR se realizó en un termociclador MJ Research PTC-100, utilizando 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1X Buffer de reacción, 0.5 µM de oligonucleótidos, 1 U Taq polimerasa y 50 ng de DNA en un volumen final de 20 µL. Las reacciones de PCR incluyeron un ciclo inicial de denaturación a 94°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94°C por un min, 51°C por un min y 72°C por un min, seguido por un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 min. Los productos de la PCR se revelaron en geles de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5X teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100 voltios por 30 min en una cámara horizontal GEL XL ultra V-2 (Labnet International Inc.) y se registró con un fotodocumentador UVP Gel-Doc-IT™ Imaging system (UVP LSC. USA). Las bandas electroforéticas obtenidas se midieron con el programa VisionWorksLS determinando el tamaño en pares de bases (pb).

Purificación del DNA. Los fragmentos amplificados por PCR se purificaron con el kit UltraClean® GelSpin® DNA Extraction (MO BIO Laboratories Inc. USA) y se verificó su calidad por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se registró en el fotodocumentador UVP Gel-Doc-IT™ Imaging system.

Secuenciación del DNA. Los productos purificados, se utilizaron para la reacción de tagDye Deoxy Termina-

tor cycle-sequencing. La secuenciación se realizó de forma automatizada (Applied Biosystems 373A Stretch).

La calidad y ensamblaje de las secuencias obtenidas se analizaron con el programa CLC DNA Workbench 5.6.1 (CLC Bio, Denmark). Luego fueron analizadas por alineamiento con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y en TrichOkey de ISTH y se asignó la especie de acuerdo a los niveles de concordancia para determinar género y especie (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>). De los valores cuantitativos generados, solo se aceptaron las secuencias con el valor más alto para su comparación con las secuencias en estudio y se obtuvo el índice de similitud entre estas.

Alineamiento de las secuencias. Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0 (Hall, 1999). Se obtuvieron 24 secuencias de diferentes especies de hongos previamente reportadas en GenBank de los géneros *Hypocrea* sp, *Fusarium* sp (grupo externo) y *Trichoderma* spp para realizar los análisis correspondientes (Tabla 2).

Evaluación actividad celulolítica. Se realizó cultivo en fase líquida utilizando medio de cultivo Mandels (Mandels & Weber 1969) estéril, el cual se suplementó con 30 g/L de residuos de palma de aceite (racimos vacíos) molidos (1 mm en promedio) como fuente de carbono. Se realizaron cultivos (n=8 para cada cepa) de 20 mL en Erlenmeyer de 100 mL y se inocularon con 2 mL de suspensión de esporas (aproximadamente 1,42 x 10⁸ esporas/mL), posteriormente se incubaron a 30°C en agitación orbital a 150 rpm, durante 5 días. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y al sobrenadante se le determinó la actividad enzimática de celulasas y el contenido de proteína soluble.

Medición de la actividad enzimática. La actividad celular total fue determinada en cada uno de los sobrenadantes (8 por cepa), mediante la cuantificación de azúcares reductores producidos por la acción enzimática sobre papel de filtro Whatman No.1, de acuerdo a lo establecido por la IUPAC (Ghose, 1987). Los ensayos fueron realizados utilizando 0,5 mL de sobrenadante, 1 mL de buffer de citrato 0.05 M a pH 4.8 e incubados a 50°C por 60 min, en presencia de 50 mg de papel Whatman No. 1. Posteriormente el contenido de azúcares reductores fue determinado usando el método de ácido 5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). La actividad se determinó en unidades internacionales UI/mL de sobrenadante (UI en µmol glucosa/min). La concentración de

Tabla 1. Identificación molecular por PCR-ITS1-5,8-ITS4 de genes ribosomales rRNA en ocho cepas nativas de hongos (*Trichoderma spp.*) y una cepa de referencia.

Código Aislamiento	Identificación morfológica	No. de nucleótidos	Género y especie identificada	Hit Genbank	Porcentaje de similitud
HR-01-89	<i>Trichoderma sp</i>	607	<i>Trichoderma asperellum</i>	DQ109538.1	100%
HR-03-89	<i>Trichoderma sp</i>	603	<i>Trichoderma asperellum</i>	FJ412053.1	100%
HR-06-89	<i>Trichoderma sp</i>	593	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	DQ109538.1	100%
HR-16-89	<i>Trichoderma sp</i>	603	<i>Trichoderma asperellum</i>	FJ412053.1	100%
HR-18-89	<i>Trichoderma sp</i>	642	<i>Trichoderma asperellum</i>	KY750349.1	100%
ATCC-241489	<i>Trichoderma reesei/</i>	640	<i>Trichoderma jecorina/</i> <i>Hypocrea jecorina</i>	FJ545237.1	100%
HR-04-89	<i>Trichoderma sp</i>	517	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	KY320641.1	100%
HR-11-89	<i>Trichoderma sp</i>	520	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	KP059116.1	99%
HR-19-89	<i>Trichoderma sp</i>	471	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	KY320641.1	100%

proteína soluble se determinó mediante el método de Bradford. (1976).

Análisis estadísticos. Una vez comprobados los supuestos del análisis de varianza, los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA y prueba de comparación de medias (Test de Tukey) con un nivel de confianza del 95%, mediante el software Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., 1994-2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificó molecularmente a nivel de género y especie ocho cepas nativas de *Trichoderma*, identificadas previamente por morfología hasta género, las cuales en su mayoría presentaron baja actividad celulolítica, en comparación con la cepa de referencia utilizada. Las metodologías utilizadas en este trabajo representan herramientas invaluable para la rápida caracterización de cepas de *Trichoderma*, tanto para su identificación como en su evaluación biológica. Los residuos de palma de aceite en Colombia representan una materia prima utilizable para la producción de azúcares fermentables y por ende de bioetanol. Resulta por esto importante, la evaluación de cepas nativas de hongos tipo *Trichoderma*, con novedosas y más potentes actividades biológicas que permitan la degradación de la celulosa recalcitrante, presente en los racimos de palma de aceite.

Se obtuvieron por PCR bandas electroforéticas del peso esperado, entre 593-640 pb que corresponden a las secuencias completas de las regiones genómicas ITS1-5,8S-ITS2. A partir de éstos se obtuvo la secuencia completa de cada una de las dos cadenas del DNA para las regiones ITS1-5,8S-ITS2 para los ocho aislamientos nati-

vos evaluados. Todas las secuencias se depositaron en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con los números de acceso JN704353.1, JN704351.1, JN704349.1, JN704347.1, JN704354.1, JN704352.1, JN704350.1, JN704348.1 y JN704346.1 (tabla 1).

Al analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas, se verificó la región genómica para todos los aislamientos, obteniéndose la secuencia parcial del gen 18S rDNA, el ITS-1, el gen 5,8 rDNA, el ITS-2 y la secuencia parcial del gen 28S rDNA. Se observó para las ocho cepas la presencia de las cinco anclas que identifican hongos del género *Trichoderma* (tabla 1), identificándose cuatro de los hongos nativos como *Trichoderma koningiopsis* (HR-04-89; HR-11-89; HR-19-89; y HR-06-89) y cuatro como *Trichoderma asperellum* (HR-01-89; HR-03-89; HR-16-89; HR-18-89).

Por último, la secuencia de la cepa de referencia que se utilizó en este estudio (ATCC 24449) fue identificada como *Trichoderma reesei/Hypocrea jecorina* presentando las cinco anclas en las posiciones 78, 101, 281, 439 y 533 en la región ITS secuenciada; resultado que ratifica las bondades de esta metodología.

En estudios previos se ha descrito el aislamiento y caracterización molecular (ITS1 e ITS2 del rDNA) de cepas de *Trichoderma* aisladas principalmente de suelo en el Sudeste Asiático (Kubicek *et al.*, 2003). El estudio de la producción de celulasas por hongos sobre residuos de palma se ha reportado utilizando *Chaetomium globosum* (Umikalsen *et al.*, 1997) *Aspergillus terreus* (Shahriarinnour *et al.*, 2011), *Aspergillus niger* (Prasertsan *et al.*, 1997), *Pycnoporus sanguineus* (Teoh & Mashitah,

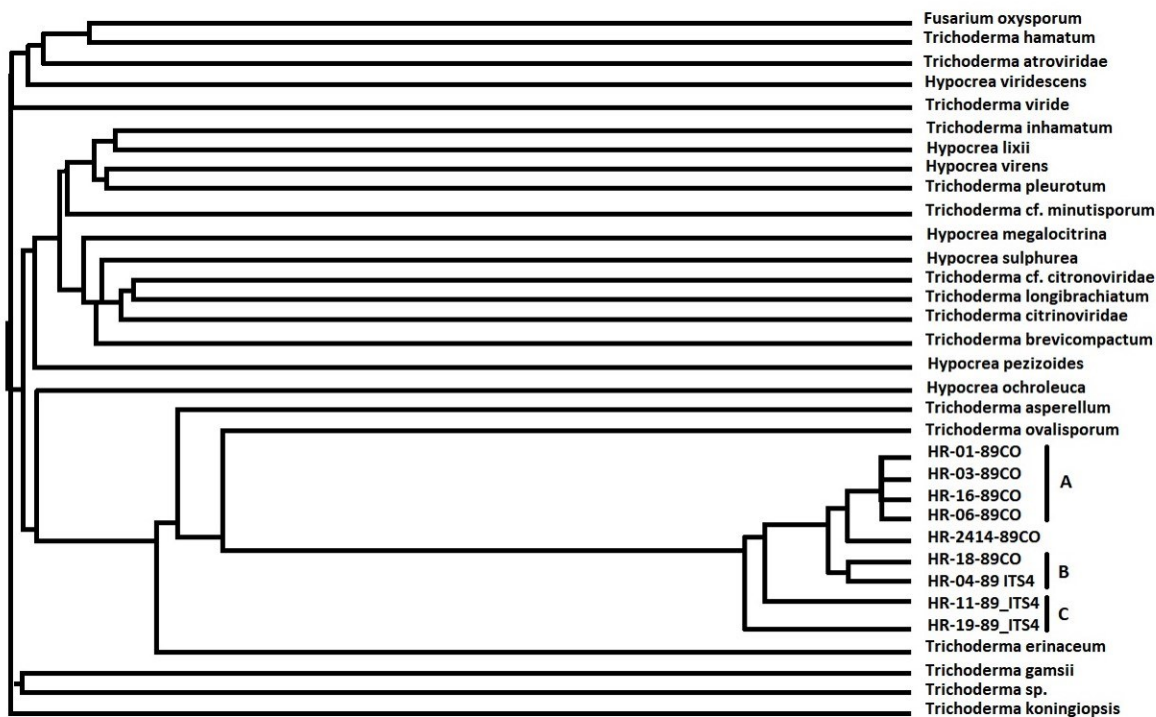


Figura 1. Cladograma basado en secuencias nucleóticas de la región ITS1-ITS4 de cepas nativas de hongos aislados de raquis de palma africana (*Trichoderma* spp) y 24 especies de *Trichoderma*, *Fusarium*, e *Hypocrea* (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) analizadas con el algoritmo Neighbor Joining. Se presentan tres ramas entre las secuencias de los hongos nativos evaluados (A, B y C) bien definidas. La rama A muestra una similitud de las secuencias del 100% entre las cuatro muestras.

2010), *Trichoderma harzianum* (Alam et al., 2009), *Trichoderma viride* (Rodríguez & Piñeros, 2007) y *Trichoderma reesei* (Wahid et al., 2011) entre otros. *Trichoderma harzianum* se ha cultivado sobre los residuos de palma para ser utilizado en control biológico (Kanjamaneesathian et al., 2003).

Alineamiento de secuencias

Se utilizó la secuencia del ITS1-ITS4 del hongo *Fusarium oxysporum* como grupo externo para realizar comparaciones. Se generó un cladograma utilizando el Programa Neighbor Joining (figura 2) que evidencia que los siete aislamientos nativos aislados de *Trichoderma* spp se encuentran más relacionadas entre ellas, así HR-01-89, HR-03-89, HR-16-89, HR-06-89, HR-11-89, HR-18-89, HR-04-89, HR-2414-89 y HR-18-89, formaron un grupo.

Se observa que las cepas HR-01-89, HR-03-89, HR-16-89 y HR-06-89 conforman un solo clado, (clado A) indicando una alta similitud nucleotídica entre ellas, es posible que estas tres cepas pertenezcan a una misma colo-

nia, debido a que se identificaron como *Trichoderma koningiopsis* con las posiciones idénticas para las cinco anclas observadas entre las cepas HR-03-89, HR-16-89 y HR-06-89 y ligeramente diferentes con la cepa HR-01-89 (tabla 1). La cepa de referencia ATCC 24449, *Trichoderma reesei*, presentó una relación más cercana a estas cuatro cepas, mostrando una alta similitud con este clado.

Las cepas HR-18-89 y HR-04-89 forman otro clado (clado B) indicando relación entre ellas y menos relación con las cepas del clado A. Por último, las cepas HR-11-89 y HR-18-89 formaron el clado C. Sin embargo, es importante anotar que la cepa HR-11-89 presentó las cinco anclas en las posiciones 74, 95, 240, 398 y 498 en la región ITS identificándose como *T. koningiopsis*. Por el contrario la cepa HR-18-89 solo presentó la 2da ancla en la posición 18 (tabla 1).

Determinación de la actividad celulolítica

Las cepas identificadas molecularmente se evaluaron biológicamente para determinar su actividad celular.

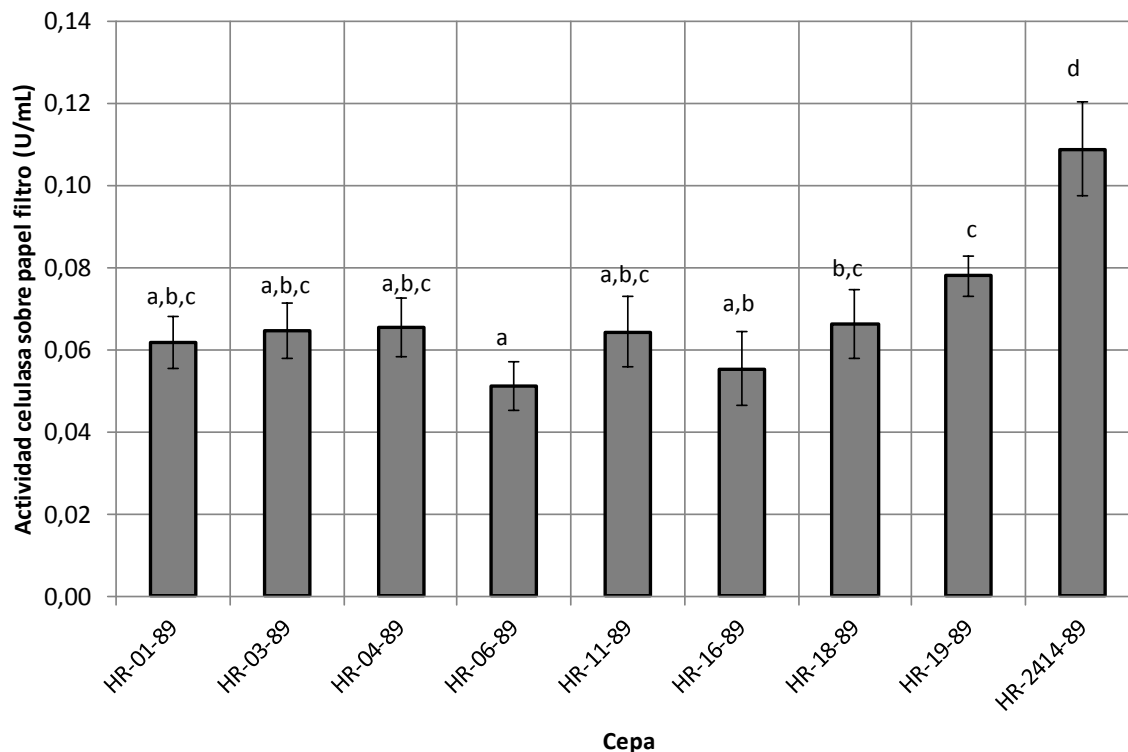


Figura 2. Actividad enzimática sobre papel filtro del complejo producido por cepas de *Trichoderma* spp sobre residuos de palma como sustrato. Barras blancas corresponden a proteína soluble y las negras a actividad enzimática. Las barras de error corresponden al valor de desviación estándar (n=8). Diferentes letras sobre cada columna indican diferencias significativas entre las actividades de las cepas ($p < 0.05$).

En la figura 2 se presentan los resultados de actividad enzimática de los complejos producidos por las cepas estudiadas utilizando residuos de palma como sustrato (valores promedio, n=8). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad celulolítica de los complejos producidos por las cepas estudiadas (ANOVA, $F(8,63) = 39,18$, $p = 0.000$), (Test de Tukey, $n=6$, $p < 0,05$). La prueba de Tukey, mostró que las cepas HR-01-89, HR-03-89, HR-11-89, HR-04-89 y HR-18-89 no presentan diferencias en la actividad enzimática, alcanzando un valor promedio de 0,07 UI/mL. La cepa de referencia HR-2414-89 (*Trichoderma reesei*) presentó mayores valores de actividad enzimática (0,11 UI/mL) comparada con las cepas nativas cultivadas sobre residuos de palma de aceite. La cepa nativa HR-18-89 (*T. asperellum*) presentó los mayores niveles de actividad enzimática, un 78% comparada con el valor de la cepa referencia.

Relacionado con cepas aisladas y evaluadas sobre residuos de palma, recientemente se ha estudiado una nueva cepa de *Trichoderma koningii* D-64 aislada de muestras de suelo de Singapur y se comparó con *Trichoderma*

reesei Rut C30 (ATCC 56765). Se estudió la producción de celulasas sobre celulosa y salvado de trigo (además de otros compuestos), encontrando valores de actividad sobre papel filtro de $1,4 \pm 0,1$ UI/mL y $0,5 \pm 0,1$ UI/mL, respectivamente, actividades superiores a las obtenidas en este trabajo. También se evaluó la capacidad hidrolítica utilizando residuos de palma pretratados químicamente (tratamiento alcalino). Se encontró una mayor capacidad de hidrólisis con enzimas producidas por la cepa de *Trichoderma reesei* Rut C30 comparada con la cepa D-64 aislada. Sin embargo, mediante ajuste de dosis de enzimas se lograron valores similares de hidrólisis enzimática (Wang *et al.*, 2012). En este estudio, se encontró superioridad en la capacidad hidrolítica de enzimas producidas por la cepa de *Trichoderma reesei* sobre las cepas nativas.

En otro trabajo publicado, se describió el aislamiento de microorganismos productores de celulasas en residuos de palma de aceite en descomposición en Malasia específicamente bacterias (Baharuddin *et al.*, 2009) y de hongos degradadores (Abu Bakar *et al.*, 2010). En este último trabajo se aislaron dos cepas de *Trichoderma*

Tabla 2. ITS1-ITS2 de especies de hongos obtenidas de GenBank para el análisis filogenético e identificación molecular de las cepas aisladas de biomasa de palma de aceite (*Trichoderma* sp).

Género y especie	Código de Acceso (NCBI)	Regiones del DNA	No. de pares de bases (pb)
<i>Fusarium oxysporum</i>	EU545538	ITS1-ITS2	496
<i>Trichoderma asperellum</i>	GQ426036	ITS1-ITS2	562
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	GQ426042	ITS1-ITS2	591
<i>Trichoderma erinaceum</i>	GQ426037	ITS1-ITS2	591
<i>Trichoderma pleurotum</i>	FJ418567	ITS1-ITS2	593
<i>Hypocrea lixii</i>	GQ463682	ITS1-ITS2	452
<i>Hypocrea varidescens</i>	AM498407	ITS1-ITS2	548
<i>Trichoderma inhamatum</i>	GQ426033	ITS1-ITS2	602
<i>Trichoderma hamatum</i>	GQ221830	ITS1-ITS2	582
<i>Hypocrea virens</i>	FJ654688	ITS1-ITS2	531
<i>Hypocrea megalocitrina</i>	DQ835511	ITS1-ITS2	489
<i>Hypocrea sulphunea</i>	DQ835510	ITS1-ITS2	506
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	EU821800	ITS1-ITS2	537
<i>Trichoderma cf. citrinoviride</i>	DQ835514	ITS1-ITS2	517
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	FJ462769	ITS1-ITS2	607
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	AM498490	ITS1-ITS2	577
<i>Trichoderma cf. Minutisporum</i>	AM498500	ITS1-ITS2	561
<i>Hypocrea pezizoides</i>	DQ835513	ITS1-ITS2	491
<i>Hypocrea ochroleuca</i>	DQ835512	ITS1-ITS2	486
<i>Trichoderma gamsii</i>	FJ790423	ITS1-ITS2	528
<i>Trichoderma sp</i>	DQ993585	ITS1-ITS2	548
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	GQ229070	ITS1-ITS2	774
<i>Trichoderma viride</i>	GQ229073	ITS1-ITS2	779
<i>Trichoderma atroviride</i>	FJ232697	ITS1-ITS2	607

(SK1 y SK5), con actividades sobre papel filtro produciendo 0,2 y 0,4 UI/mL a los cinco días de cultivo, valores superiores a los obtenidos en este estudio (0,05-0,11) (figura 2). Esto puede deberse a que los residuos de palma de aceite utilizados como sustrato en la producción de las enzimas fueron materiales sin deslignificar, lo que puede haber afectado la generación de las enzimas. Se debe considerar que otras condiciones de cultivo influyen sobre la actividad celulasa de los complejos producidos por hongos *Trichoderma* utilizando residuos de palma como sustrato, dentro de los cuales se ha reportado el tiempo de cultivo, el tamaño del inóculo y la concentración de sulfato amonio (Kubicek et al., 2003).

CONCLUSIÓN

La identificación morfológica de hongos tipo *Trichoderma* spp aunada al uso de técnicas moleculares que confirmen género y especie, representa una metodología rápida, económica y que requiere poca labor, produciendo un conocimiento taxonómico de las cepas con el cual se puede proceder a realizar bioensayos que permitan reconocer las bondades de aislamientos nativos con actividades biológicas de interés para el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos.

Se ha identificado hongos del género *Trichoderma* como productores de enzimas celulolíticas.

Se ha logrado establecer que todos tienen casi la misma actividad, pero la cepa nativa HR-18-89 (*Trichoderma asperellum*) tiene mayor actividad enzimática sobre la celulosa existente en la Palma aceitera. Esta cepa promisorio debe ser estudiada con mayor énfasis en bioensayos específicos, para revelar su verdadero potencial celulósico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación, Innovación y Creatividad de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por el apoyo financiero a este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu, Bakar, N., Abd-Aziz, S., Hassan, M. & Ghazali, F. (2010). Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. *Biotechnology* 9(1):73-78 doi: 10.3923/biotech.2010.73.78.
- Alam, M.Z., Mamun, A.A., Qudsieh, I.Y., Muyibi, S.A., Salleh, H.M. & Omar, N.M. (2009). Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 46(1):61-64 doi: 10.1016/j.bej.2009.03.010.
- Baharuddin, A.S., Kazunori, N., Abd-Aziz, S., Tabatabaei, M., Rahman, N.A., Hassan, M.A., Wakisaka, M., Sakai, K. & Shirai, Y. (2009). Characteristics and microbial succession in co-composting of oil palm empty fruit bunch and partially treated palm oil mill effluent. *The Open Biotechnology Journal* 3:92-100.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254 doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bouregghda, H., Bouznad, Z., & Decock, C. (2008). Cultural and molecular characterizations of some isolates of *Trichoderma* spp. *Arab Journal of Plant Protection*, 26, 75-80.
- Fedepalma. (2018). Sistema de Información Estadística del Sector Palmero - SISPA, Vol. 2012. Revisado, Febrero de 2018.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Ghosh, P. & Singh, A. (1993). Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. *Advances in Applied Microbiology* 39:295-333 doi: 10.1016/S0065-2164(08)70598-7.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Jiang, X., Geng, A., He, N. & Li, Q. (2011). New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111(2):121-127 doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.09.004.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Siika-Aho, M. & Viikari, L. (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* 40(11):3519-3525 doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.057.
- Kanjanamaneesathian, M., Phetcharat, V., Pengnoo, A. & Upawan, S. (2003). Use of *Trichoderma harzianum* cultured on ground mesocarp fibre of oil palm as seed treatment to control *Pythium aphanidermatum*, a causal agent of damping-off of Chinese kale seedling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(8):825-829 doi: 10.1023/A:1026004315223.
- Kelly-Yong, T.L., Lee, K.T., Mohamed, A.R., & Bhatia, S. (2007). Potential of hydrogen from oil palm biomass as a source of renewable energy worldwide. *Energy Policy* 35(11):5692-5701 doi: 10.1016/j.enpol.2007.06.017.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G. J., & Kubicek, C. P. (1998). Phylogeny of the Genus *Trichoderma* Based on Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region 1 of the rDNA Cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 24(3), 298-309.

- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38(3), 310-319.
- Liming, X. & Xueliang, S. (2004). High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology* 91(3):259-262 doi: 10.1016/S0960-8524(03)00195-0.
- Mandels, M. & Weber, J. (1969). The production of cellulases. *Advances in Chemistry* 95, 391-414 doi: 10.1021/ba-1969-0095.ch023.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426-428 doi: 10.1021/ac60147a030.
- Prasertsan, P., Kittikul, A.H., Kungphae, A. & Maneesri, J.S. (1997). Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13(5):555-559 doi: 10.1023/A:1018569426594.
- Rabinovich, M., Melnick, M. & Bolobova, A. (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)* 67(8):850-871 doi: 10.1023/A:1019958419032.
- Rifai. M. A (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1156.
- Rodríguez, I. & Piñeros, Y. (2007). Production of enzymatic complex in solid state fermentation by *Trichoderma* sp. using palm oil empty fruit bunch (EFB) as substrate. *Vitae* 14(2):35-42.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27(2), 185-194 doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.001.
- Umikalsom, M., Ariff, A., Shamsuddin, Z., Tong, C., Hassan, M. & Karim, M. (1997). Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47 (5):590-595 doi: 10.1007/s002530050978.
- Shahriarinnour, M., Wahab, M.N.A., Ariff, A.B., Rosfarizan, M. & Shuhaimi, M. (2011). Effect of various pretreatments of oil palm empty fruit bunch fibres for subsequent use as substrate on the performance of cellulase production by *Aspergillus terreus*. *BioResources* 6(1): 291-307.
- Teoh, Y., Mashitah, M. (2010). Cellulase production by *Pycnoporus sanguineus* on oil palm residues through pretreatment and optimization study. *Journal of Applied Sciences* 10(12): 1036-1043.
- Uusitalo, J.M., Nevalainen, H.K., Harkki, A.M., Knowles, J.K.C. & Penttilä, M.E. (1991). Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *Journal of Biotechnology*, 17(1):35-49 doi: 10.1016/0168-1656(91)90025-Q.
- Wahid, M.Z.A., Salleh, M., Yusof, F., Karim, M.I.A. & Alam, M.Z. (2011). Factors affecting endoglucanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 from solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches using Plackett-Burman design. *African Journal of Biotechnology* 10(46):9402-9409.
- Wang, Z., Ong, H.X. & Geng, A. (2012), Cellulase production and oil palm empty fruit bunch saccharification by a new isolate of *Trichoderma koningii* D-64. *Process Biochemistry* 47(11):1564-1571 doi: 10.1016/j.procbio.2012.07.001.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. Academic Press. San Diego, California.