



## Caracterización molecular de *Trichoderma* spp. en arveja *Pisum sativum* L.

Molecular characterization of *Trichoderma* spp. in pea *Pisum sativum* L.

Oscar Eduardo Checa C.<sup>1</sup>; Jessica Andrea Descance V.<sup>2</sup>; Maribel Xiomara Toro C.<sup>2</sup>;  
Sandra Lorena Álvarez<sup>3</sup>; Claudia Salazar G.<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo, Ph.D. Universidad de Nariño. Colombia, cicagrarias@hotmail.com.

<sup>2</sup> Ingenieras Agrónomas. Universidad de Nariño. Colombia, masyemmanueltoro@hotmail.com

<sup>3</sup> Bióloga, M.Sc. Universidad de Nariño. Colombia.

<sup>4</sup> M.Sc. Fitotecnia. Universidad de Nariño. Colombia.

**Citar:** CHECA, O.; DESCANSE, J.; TORO, M., ALVAREZ, S.; SALAZAR, C. 2015. Caracterización molecular de *Trichoderma* spp. en arveja *Pisum sativum* L. Rev. Cienc. Agr. 32(2):3 - 12

Fecha de recepción: Junio 6 de 2015

Fecha de aceptación: Octubre 10 de 2015

### RESUMEN

Mediante marcadores RAPDs se determinó la variabilidad genética de aislamientos de *Trichoderma* spp. encontrándose alto polimorfismo con los primeros OPA 03, OPD 05, OPA 01 y OPB 01. La variación molecular observada fue baja (26%) entre las poblaciones de *Trichoderma* spp. identificadas por su origen geográfico como Ipiales, Pupiales y Gualmatán. En contraste la variación dentro de las poblaciones fue alta, superando el 70%. Las especies de *Trichoderma* spp. encontradas no mostraron una relación con el origen geográfico. Los aislados se agruparon con base en la diversidad genética de Jaccard. El rango de distancia genética entre los distintos aislamientos estuvo entre 0,37 y 1,42. La especie más frecuente fue *T. harzianum* que mostró alta variación al estar presente en todos los agrupamientos.

**Palabras clave:** Diversidad genética, hongo benéfico, RAPDs.

### ABSTRACT

The genetic variability of *Trichoderma* spp isolates was determined through RAPD markers. A high polymorphism was found with primers OPB 01, OPC 01, OPA 03, OPD 05, and OPA 01. The observed molecular variation was

low (26%) among *Trichoderma* spp populations, which were identified by their geographical origin as Ipiales, Pupiales, and Gualmatán. In contrast, variation within populations was high, exceeding 70%. The *Trichoderma* spp. species showed no relationship with their geographical origin. The isolates were grouped based on Jaccard's genetic diversity. The range of genetic distance between the different isolates was between 0.37 and 1.42. The most frequent species was *T. harzianum*, which showed a high variation in all clusters.

**Key words:** Genetic diversity, beneficial fungus, RAPDs.

## INTRODUCCIÓN

Las pudriciones de raíz se encuentran entre las más importantes fitopatologías que mundialmente causan significativas pérdidas económicas en diferentes cultivos agrícolas. Aunque los productos químicos sintéticos son aún la principal herramienta de control para estas enfermedades, los agentes biológicos son una manera efectiva para proporcionar un control más rápido y más seguro, además pueden ser incluidos dentro del control integrado de plagas y enfermedades (Verma *et al.*, 2007).

La principal estrategia para el biocontrol, ha sido la identificación de microorganismos del suelo que sean antagonistas efectivos, estrategia que ya cuenta con resultados exitosos (Alabouvette y Steinberg, 2006; Sánchez *et al.*, 2008). *Trichoderma* spp. es un organismo de vida libre en suelos y ecosistemas de raíz, donde se pueden observar interacciones complejas entre la planta huésped, los patógenos y diversos factores del ambiente (Harman, 2006; Woo *et al.*, 2006). Éste es un hongo fácil de aislar en medios de cultivo naturales o semisintéticos (Rey *et al.*, 2000).

Diversas especies de *Trichoderma* spp., son utilizadas en la agricultura para el manejo de fitopatógenos, ya que limitan el desarrollo de hongos dañinos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae* (González *et al.*, 2005). Los factores clave, que contribuyen

al efecto antagónico de estos organismos son su rápido crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos y sus características fisiológicas, sin embargo, para una adecuada comprensión de las propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas se requiere de la acertada ubicación taxonómica de estos organismos (Kullnig *et al.*, 2001).

La variabilidad de las características morfológicas de las especies de *Trichoderma*, hace que su clasificación sea difícil, no obstante, con el desarrollo de técnicas moleculares la sistemática de este género ha avanzado sustantivamente en los últimos años y es debido a este avance que la importancia de métodos morfológicos ha disminuido paulatinamente (Kullnig *et al.*, 2001; Kredics *et al.*, 2006). La presente investigación tuvo como objeto caracterizar molecularmente 12 cepas de *Trichoderma* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los bioensayos se realizaron en el laboratorio de sanidad vegetal pertenecientes a la Universidad de Nariño, a una altitud de 2.540 msnm, 01°12'13" LN y 77°15'23" LO. El trabajo parte de una colección de cepas nativas de *Trichoderma* provenientes de los municipios de Gualmatán, Pupiales e Ipiales, identificadas morfológicamente por el programa de biología de la Universidad de Nariño (Tabla 1).

Tabla 1. Procedencia, fuente e identificación morfológica de los aislamientos colectados en diferentes localidades productoras de arveja en Nariño.

Aislamiento	Localidad	Identificación
C1	Pupiales	<i>T. harzianum</i>
C2	Pupiales	<i>T. harzianum</i>
C3	Pupiales	<i>T. asperellum</i>
C4	Pupiales	<i>T. asperellum</i>
C5	Gualmatán	<i>T. harzianum</i>
C6	Gualmatán	<i>T. longibrachiatum</i>
C7	Gualmatán	<i>T. harzianum</i>
C8	Gualmatán	<i>T. harzianum</i>
C9	Ipiales	<i>T. longibrachiatum</i>
C10	Ipiales	<i>T. harzianum</i>
C11	Ipiales	<i>T. harzianum</i>
C12	Ipiales	<i>T. harzianum</i>

## Identificación molecular

**Multiplicación del hongo para extracción de ADN.** Aislamientos de *Trichoderma* se cultivaron durante seis días en medio líquido (200g papa, 20g sacarosa, 1000 ml de agua destilada), a temperatura ambiente. Se hicieron seis repeticiones por aislamiento éstos se dejaron crecer diez días. El mi-

celio obtenido de cada aislamiento fue secado en cámara de flujo laminar mediante bomba de vacío, posteriormente macerado con nitrógeno líquido y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 1).

**Extracción de ADN.** La extracción de ADN de los aislamientos de *Trichoderma* spp. se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Nariño, empleando el protocolo de extracción directa establecido por Griffith y Shaw (1998).

Empleando el micelio de *Trichoderma* almacenado, se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción CTAB (NaCl 1.4M, EDTA pH 8.0 20mM, Tris HCl 100mM pH 8.0, CTAB 2%) agitando en vortex, luego aplicar 1.5  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K en cada muestra y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por una hora. Posteriormente, se agregaron 600 $\mu\text{L}$  de cloroformo agitando en vortex (10 min), solución que se centrifugó a 17.000 gravedades durante diez minutos de la cual se tomaron 600 $\mu\text{L}$  de la fase superior y se transfirieron a un tubo nuevo adicionando 0,6 volúmenes de isopropanol. Posteriormente se dejó en posición vertical a temperatura ambiente durante cinco minutos y se centrifugó a 17.000 gravedades



**Figura 1.** A: Aislamiento de *Trichoderma* en medio de cultivo líquido, B: Secado de micelio por filtración, C: Micelio macerado con nitrógeno líquido.

(10 min) eliminando el sobrenadante. El pellet fue lavado con un mililitro de etanol (70%), se agitó y se dejó a 65°C durante 20 minutos, luego se centrifugó a 17.000 gravedades (10 min) y se dejó a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente para remover cualquier traza de etanol. Finalmente, se resuspendió en 200µL de buffer TE 1X y se agregaron 3µL de ARNasa (10 mg/mL) dejándose durante dos horas a 37°C. El ADN obtenido se almacenó a -20°C. La integridad del ADN extraído se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con 3µL de Bromuro de Etidio (10mg/mL).

**Análisis de variabilidad genética de *Trichoderma* spp. mediante marcadores RAPDs.** La reacción de los RAPDs se llevó a cabo usando siete oligonucleótidos decaméricos de secuencias al azar (Tabla. 2). Los cebadores se utilizaron en reacciones individuales para la amplificación de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp.

Se amplificó un volumen de 15 µL para cada una de las muestras, en cada oligonucleótido se preparó una mezcla con todos los reactivos excepto el ADN,

posteriormente se transfirieron 10 µL de la mezcla a cada uno de los tubos de PCR, finalmente se agregó 5 µL de ADN. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un Termociclador Nyx Technik Amplitronix de serie seis. Para todos los cebadores RAPDs se siguieron las condiciones de amplificación Lardner *et al.* (1999). No se utilizaron controles positivos. La separación de los productos amplificados se realizó en cámara de electroforesis utilizando geles de agarosa al 2%, preparados con buffer TBE al 0,5% y teñidos con 3 µL de bromuro de etidio 0,5 mg/mL.

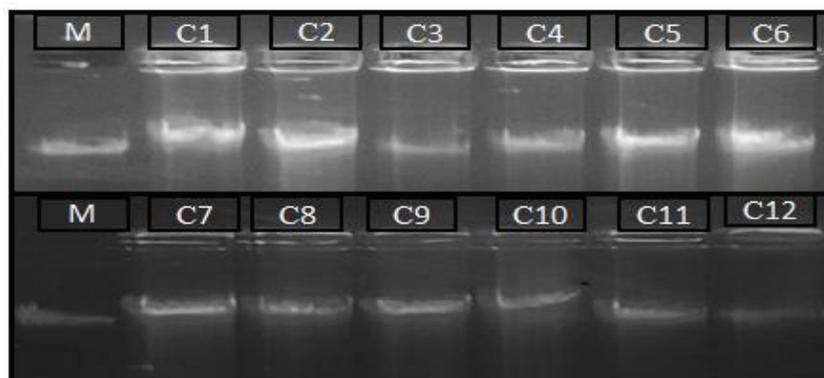
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización Molecular

**Extracción de ADN.** Se obtuvo ADN de buena calidad. En concentraciones entre 80 y 200 ng siguiendo el protocolo de Griffith y Shaw (1998). Se sembró simultáneamente un juego de seis cepas en la parte superior del gel (C1 a C6) y segundo juego en la parte inferior del gel (C7 a C12) (Figuras 2 y 3).

**Tabla 2.** Características de los 10 oligonucleótidos utilizados para determinar la variabilidad genética de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp.

Cebador	Secuencia (3 → 5)	Peso molecular g/mol	Contenido de CG %	Temperatura °C
OPA 03	AGT CAG CCA C	2996,9	70,0	34,0
OPE 01	CCC AAG GTC C	2972,9	70,0	34,0
OPD 05	TGA GCG GAC A	3077,0	60,0	32,0
OPA 01	CAG GCC CTT C	2963,9	70,0	34,0
OPB 01	GTT TCG CTC C	2969,9	60,0	32,0
OPC 01	TTC GAG CCA G	3028,0	60,0	32,0
OPD 06	ACC TGA ACG G	3037,0	60,0	32,0



**Figura 2.** Amplificación de ADN de *Trichoderma* spp. Obtenido de muestras de rizosfera en arveja de acuerdo al protocolo de Griffith y Shaw (1998). Carriles C1, C2, C5, C7, C8, C10, C11 y C12 de *T. harzianum*., carriles C3 y C4 de *T. asperellum*., carriles C6 y C9 de *T. longibrachiatum*.



**Figura 3.** Dilución de ADN de doce aislamientos de *Trichoderma* en gel de agarosa al 2%. Carriles 1, 2, 5, 7, 8, 10, 11 y 12 de *T. harzianum*., carriles 3 y 4 de *T. asperellum*., carriles 6 y 9 de *T. longibrachiatum*.

**Análisis de la variabilidad mediante marcadores RAPD.** Se evaluaron 12 aislamientos de *Trichoderma* spp. empleando siete cebadores decaméricos

de secuencias al azar. Los patrones de bandas presentaron diferencias polimórficas, amplificándose 46 fragmentos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Número de loci totales generados con cebadores: OPA 03, OPE 01, OPD 05, OPA 01, OPB 01, OPC 01, OPD 06 en la caracterización molecular de cepas de *Trichoderma*.

Cebador	Bandas totales (BT)	Bandas polimórficas (BP)	Porcentaje de polimorfismo (%P)
OPA 03	7	6	85
OPE 01	4	3	75
OPD 05	3	3	100
OPA 01	5	4	80
OPB 01	10	9	90
OPC 01	10	5	50
OPD 06	5	3	60
TOTAL	44	33	77,14

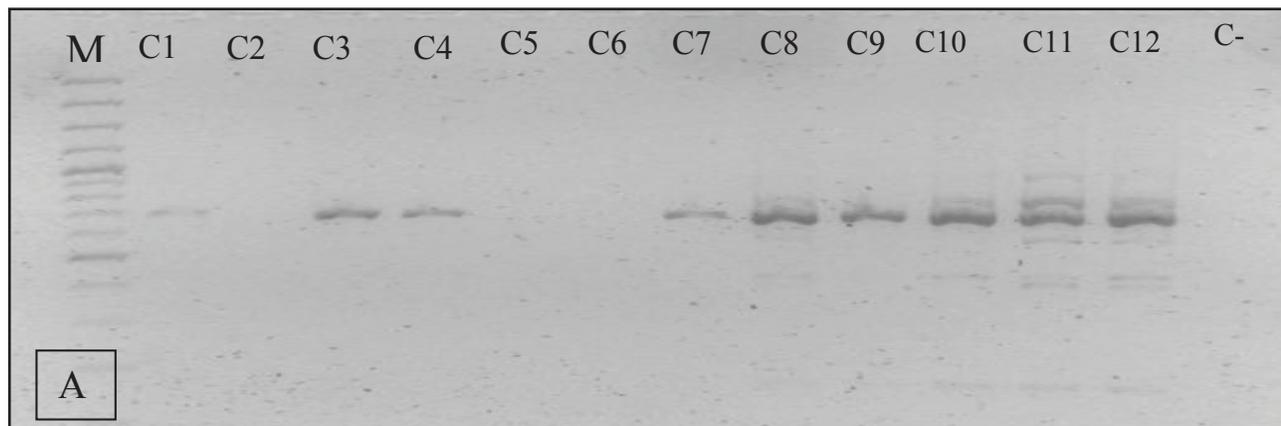
Para el análisis, sólo se consideraron aquellas bandas que fueron capaces de ser distinguibles como presentes o ausentes dadas las condiciones propias de cada gel. La intensidad de las bandas no fue considerada un factor polimórfico de acuerdo a las sugerencias de Luna *et al.* (2003).

El mayor número de fragmentos amplificados se obtuvo con los cebadores OPB 01 y OPD 05 con nueve y tres bandas polimórficas, mientras que el menor número correspondió a OPC 01 y OPD 06 con cinco y tres bandas polimórficas, el tamaño molecular de los fragmentos osciló entre 100 y 3000 pb, rango esperado debido a las condiciones de reacción de PCR que limitan el tamaño de

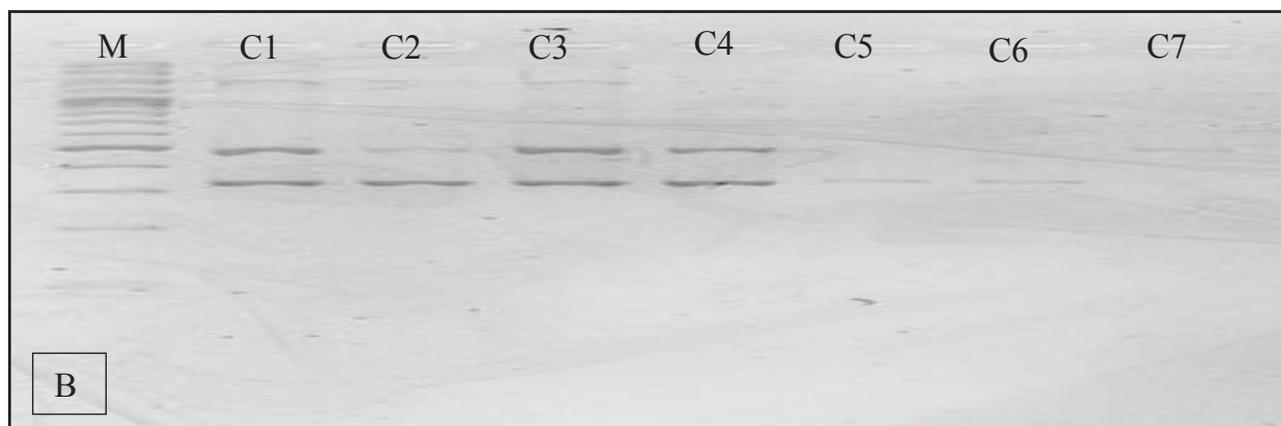
los fragmentos amplificados entre estos valores (Williams *et al.*, 1990, Luna *et al.*, 2003).

Con el primer cebador OPA 03, amplificaron nueve aislamientos de *Trichoderma* obteniendo siete bandas con un peso molecular aproximado de 390 a 900 pb, de las cuales seis fueron polimórficas para un total de 85% de polimorfismo (Figura 4).

Con el primer cebador OPD 05, amplificaron siete aislamientos de *Trichoderma* con tres bandas polimórficas con un peso molecular aproximado entre 330 a 1500 pb, encontrándose un polimorfismo del 100% . (Figura 5).



**Figura 4.** Patrón de bandas de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos del departamento de Nariño mediante RAPDs utilizando el cebador OPA 03; M: ADN Ladder de 100 pb (100-3000pb) C- control negativo.



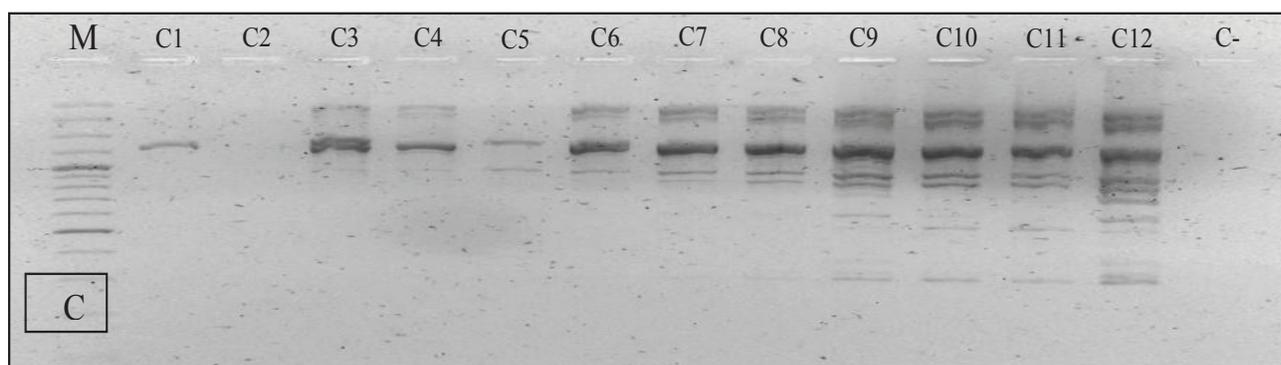
**Figura 5.** Patrón de bandas para 7 de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp. Obtenidos del departamento de Nariño mediante RAPDs utilizando el cebador OPD 05: M:ADN Ladder de 100pb (100-3000pb).

Con el cebador OPB 01 (Figura 6). Se obtuvo un total de 10 bandas, con un tamaño aproximado de 300 a 2500 pb, las cuales presentaron el 90% de polimorfismo (9 bandas), se detectó un alto grado de variabilidad entre los aislamientos.

**Análisis de varianza molecular.** Mediante análisis de varianza molecular se determinó que el 74% de la diversidad se debe a la variación dentro de las tres poblaciones de *Trichoderma* spp. estudiadas en comparación con el 26% correspondiente a la variación entre las tres regiones de estudio (Ipiales, Pupiales y Gualmatán) (Tabla 4). Lo an-

terior indica que no existen diferencias importantes atribuibles a la variación entre las localidades donde se obtuvieron los aislamientos que hayan aportado significativamente a la diversidad genética encontrada, por lo tanto, la diversidad es más atribuible a los efectos particulares dentro de cada localidad.

El análisis de diversidad genética a partir de los datos moleculares generados mediante marcadores RAPDs, mostró que *Trichoderma* spp. es un microorganismo altamente variable desde el punto de vista genético.



**Figura 6.** Patrón de bandas de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp. Obtenidos del departamento de Nariño mediante RAPDs utilizando el cebador OPB 01, M: ADN Ladder de 100 pb (100-3000pb) C- Control negativo.

**Tabla 4.** Análisis de la varianza molecular de tres poblaciones de *Trichoderma* spp. (Ipiales, Pupiales y Gualmatán - Nariño) evaluadas mediante ADN polimórfico amplificado al azar.

FV	SC	Componentes de varianza	Variación porcentual	P-valor
Entre las poblaciones	20,667	1,507	26	0,010
Dentro de las poblaciones	38,750	4,306	74%	0,010
Total	59,417	5,813	100 %	
Fuente de variación				

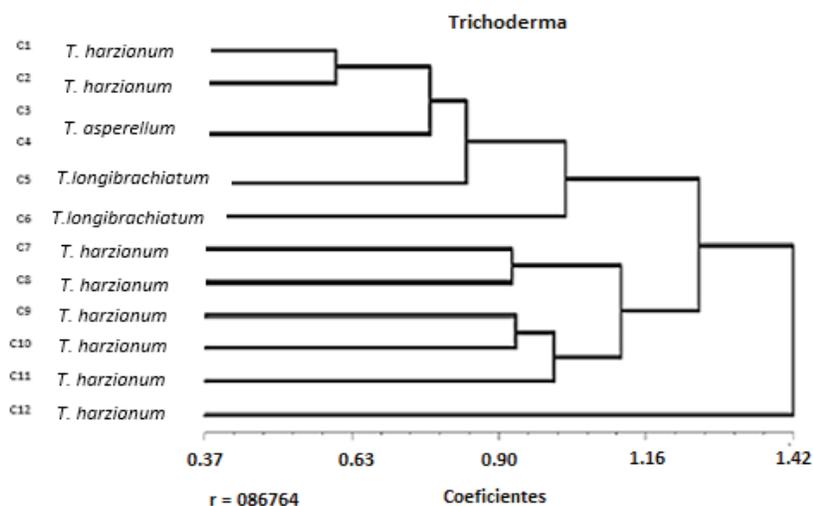
En el dendograma generado mediante el análisis de agrupamiento UPGMA se observan 3 grupos de cepas bien diferenciados (Figura 7). El primer grupo incluye seis aislamientos de *Trichoderma* spp. (C1, C3, C4, C5, C6 y C9). Estas cepas morfológica-

mente corresponden a tres especies (*T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*); en el segundo grupo se encuentran las cepas C7, C8, C10, C11 y C12 que corresponden a *T. harzianum* y el tercer grupo incluye únicamente a la cepa C2 la cual

presentó un coeficiente de distancia de Jaccard de 1.42, indicando un amplio distanciamiento genético respecto al resto de los aislamientos, de igual manera que el grupo anterior esta especie morfológicamente correspondió a *T. harzianum*.

En este estudio se encontró alta variabilidad genotípica intraespecífica en *Trichoderma*, a pesar de estar potencialmente limitado en su capacidad de generar variación debido a su reproducción de tipo asexual. Esta alta variación dentro de las poblaciones puede explicarse debido a la existencia de diferentes mecanismos de generación de variabilidad genética como las mutaciones (de cromosoma, por inserción o eliminación de fragmentos de ADN, o transposones), el flujo de genes en las poblaciones (local o a largas distancias) y la recombinación (sexual o asexual). Este tipo de variación puede ser continua o discontinua. La variación continua se presenta cuando se observa diferencia entre dos extremos de una población de patógenos, pero la diferencia entre los individuos es muy sutil. Por el contrario, la mutación discontinua ocurre cuando la expresión del cambio tiene efectos determinantes (Carlile y Watkinson, 1996).

Al utilizar los marcadores RAPDs no se encontró una relación entre el agrupamiento de los aislamientos con la procedencia de cada uno de ellos, ya que al pertenecer a zonas agroecológicas similares es posible que la variabilidad no haya sido afectada por localidad y en consecuencia no generó cambios importantes en la constitución genética de los aislamientos. El dendrograma permitió establecer que hay variaciones genéticas dentro de la misma especie de *Trichoderma*, lo cual fue observable de manera especial en *T. harzianum* que está presente en todos los aislamientos que hacen parte del segundo agrupamiento, también se encuentra presente en dos de los seis aislamientos del segundo grupo y existe un aislamiento de esta misma especie (*T. harzianum*) que constituyó un grupo diferente. Los marcadores RAPDs empleados fueron útiles para diferenciar y agrupar a cinco de los ocho aislamientos de *T. harzianum*, sin embargo, los tres aislamientos restantes de esta especie que hicieron parte de los otros dos agrupamientos, indican que dentro de *T. harzianum* hay variabilidad que permite a algunos de sus aislamientos acercarse más a otras especies de *Trichoderma* spp. desde el punto de vista de la constitución de su genoma, tal como se observa en el primer agrupamiento.



**Figura 7.** Dendrograma obtenido mediante algoritmo de UPGMA de los coeficientes distancia (1-S de Jaccard) con datos de RAPDs en 12 aislados de *Trichoderma* spp.

El hecho de que aislamientos *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* se encuentren en el mismo agrupamiento, sugiere que es posible que haya introgresiones genéticas entre las diferentes especies de *Trichoderma*, lo cual en algunos casos les permite compartir gran parte de la información genética. En consecuencia, la caracterización morfológica a través de claves taxonómicas que permiten diferenciar las especies no siempre se asocia con grandes diferencias en el genoma de las mismas, pues existen regiones en el genoma que pueden ser compartidas y que no codifican para la expresión o manifestación fenotípica de las estructuras que permiten definir a una especie.

Dentro del género *Trichoderma* spp. se presenta una gran diversidad intraespecífica (Bissett, 1991) y ésta viene establecida por las diferencias entre las distintas circunstancias donde se desarrollaron los aislamientos, contrastes entre las áreas geográficas donde se encuentran y las fuentes de inóculo muestreadas, características propias de cada individuo y la forma cómo se reproducen (Kredics et al., 2003; 2006).

Cabe mencionar que tradicionalmente, la caracterización y clasificación de microorganismos se ha logrado mediante el uso de descriptores que implican la comparación del material genético basada en fenotipos visibles (forma, tamaño, coloración) y aunque estas características clásicas son todavía muy útiles, la eficiencia de identificación puede reducirse debido a la naturaleza subjetiva que implica hacer observaciones que dependen netamente de la sensibilidad del observador y por tanto puede abarcar un porcentaje de error.

De acuerdo con lo anterior, es necesario observar que a pesar de la presencia de aislamientos de *T. harzianum* en los tres agrupamientos identificados, el hecho de que el segundo agrupamiento solo este integrado por *T. harzianum* en donde se encuentran ubicados el 62,5% de los aislamientos

de esta especie, sugiere que en los marcadores RAPDs utilizados existen bandas que en una alta proporción pueden caracterizar a los aislamientos de *T. harzianum*.

## CONCLUSIONES

La diversidad genética observada para el género *Trichoderma* spp. fue mayor dentro de las poblaciones de aislamientos identificadas por su origen geográfico como Ipiales, Pupiales y Gualmatán y menor entre ellas. *T. harzianum* mostró la mayor variabilidad genética al estar presente en los tres agrupamientos del dendrograma.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiesta su agradecimiento a Colciencias por la financiación del proyecto, a la Universidad de Nariño por su apoyo logístico, al Grupo de Investigación en Cultivos Andinos (GRICAND) por su apoyo en las actividades de laboratorio, a los docentes Daniel Marino Rodríguez y Luis Alfredo Molina, al Ingeniero David Álvarez, a la bióloga Diana Burbano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABOUVETTE, C. y STEINBERG, C. 2006. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. pp. 123-144. In: Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T., An Ecological and Societal Approach to Biological Control, Springer, Netherlands.
- BISSETT, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69(11):2357 - 2372.
- CARLILE, M. y WATKINSON, S. 1996. The fungi. First edition. N.Y. Academic Press. London. 608 p.
- CHAVERRI, P., CASTLEBURY, L., OVERTON, B. y SAMUELS, G. 2003. Hypocrea/*Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. Mycologia. 95(6):1100 - 1140.

- GONZÁLEZ, S. J., MARURI, G. y GONZÁLEZ, A. 2005. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. Revista UDO Agrícola. 5(1):45 - 47.
- GRIFFITH, G. y SHAW, D. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of ADN from Pure Cultures or from Host Lesions. Applied and Environmental Microbiology. 64(10):4007 - 4014.
- HARMAN, G. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96:190 - 194.
- KREDICS, L., ANTAL, Z., DÓCZI, I., MANCZINGER, L., KEVEI F. y NAGY. 2003. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 50(2):105 - 117.
- KREDICS, L., HATVANI, L., ANTAL, Z., MANCZINGE, L., DRUZHININA, I., KUBICEK, C., SZEKERES, A., NAGY, A., VÁGVÖLGYI, C. y NAGY, E. 2006. Green mould disease of oyster mushroom in Hungary and Transylvania. Acta Microbiologica Immunologica et Hungarica. 5(3):306 - 307
- KULLNIG, C., KRUPICA, T., WOO, S., MACH, R., REY, M., BENITEZ, T., LORITO, M. y KUBICEK, C. P. 2001. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. Mycological Research. 10(5):769 - 772.
- LARDNER, P., JHNSTON, K., PLUMER y PERSON. 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensulato. Mycological Research. 103(3):275 - 285.
- LUNA, M., FLORES, M. y PONCE, N. 2003. Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar. Elementos. 49:53 - 59.
- REY, M., DELGADO, J., RINCÓN, A., LIMÓN, M. y BENÍTEZ, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología. 17:531 - 536.
- SAMUELS, G. 2006. *Trichoderma*: systematic, the sexual state, and ecology. Phytopathology. 96:195 - 206.
- SÁNCHEZ, V., REBOLLEDO, O., PICASO, R., CÁRDENAS, E., CÓRDOVA, J., GONZÁLEZ, O. y SAMUELS, G. 2008. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxaby Trichoderma longibrachiatum*. Mycopathologia. 163:49 - 58.
- VERMA, M., BRAR, S., TYAG, R., SURAMPALLI, R. y VALERO, J. 2007. Review: Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal. 3(7):1 - 20.
- WILLIAMS, G., KUBELIK, R., LIVAK, J., RAFALSKI, J., ANTONI, y TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18(22):6531.
- WOO, S., SCALA, F., RUOCCO, M. y LORITO, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp, pathogenic fungi, and plants. Phytopathology. 96:181 - 185.