



Caracterización morfo – cultural y variabilidad genética y molecular de aislamientos de *Trichoderma*

Morpho-cultural characterization and genetic and molecular variability of *Trichoderma* isolates

Danay Ynfante-Martínez¹, Benedicto Martínez-Coca¹, Belkis Peteira-Delgado^{1*}, Yusimy Reyes-Duque², Katia Gil³, June Simpson³, Alfredo Herrera-Estrella³

¹ Grupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Censa. Autopista Nacional km 23½, AP 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

² Dpto. Biología y Sanidad Vegetal, Universidad Agraria de La Habana «Fructuoso Rodríguez Pérez» (UNAH). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³ Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Langebio, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Cinvestav, Instituto Politécnico Nacional, IPN. CP 36821, Irapuato, Guanajuato, México.

RESUMEN

El género *Trichoderma*, descrito por Persoon y Rifai, con base en características morfo - fisiológicas, contaba con nueve especies; aunque no se diferenciaban satisfactoriamente. Las técnicas moleculares permitieron ratificar e identificar otras nuevas; actualmente, se notifican 453 especies de *Trichoderma*. La identificación polifásica se impone, debido a las complejidades del género. El trabajo tuvo como objetivo caracterizar aislados de *Trichoderma* tomando como base aspectos morfo-culturales y genéticos. Las descripciones morfológicas se realizaron por observaciones microscópicas de microcultivos, según Rifai, Gams y Bissett. La compatibilidad vegetativa se evaluó macroscópicamente, y se determinó el tipo de reacción (compatible o incompatible). La variabilidad genética se analizó por RAPD; utilizando el método Jaccard mediante el paquete estadístico FreeTree. Los aislados presentaron características morfológicas similares, aunque hubo diferencias en la coloración de las colonias y la morfometría de las estructuras fúngicas. Fueron compatibles con las especies *T. viride*, *T. asperellum* y *T. atroviride*, y entre ellos. Los RAPD generaron 92 bandas reproducibles, 65 fueron polimórficas (70,7 %). El agrupamiento por UPGMA mostró variabilidad intraespecífica, formándose cuatro grupos. Para *T.13*, *T.17*, *T.75* y *T.78* se detectaron bandas específicas, útiles para el diseño de cebadores específicos para la autenticación, protección y monitoreo en sistemas productivos.

Palabras clave: caracterización morfométrica, compatibilidad vegetativa, variabilidad genética.

ABSTRACT

The genus *Trichoderma*, described by Persoon and Rifai, on the basis of morpho-physiological characteristics, had nine species; however, they were not satisfactorily differentiated. The molecular techniques allowed to ratify and to identify other new ones; at present, 453 *Trichoderma* species are reported. The polyphasic identification is imposed, due to the complexities of the genus. The objective of this work was to characterize *Trichoderma* isolates based on morphological-cultural and genetic aspects. Morphological descriptions

were made from microscopic observations of microcultures, according to Rifai, Gams and Bissett. The vegetative compatibility relationships were macroscopically evaluated, and the type of reaction (compatible or incompatible) was determined. The genetic variability was analyzed by RAPD; using the Jaccard method with the FreeTree statistical package. The isolates presented similar morphological characteristics, although there were differences in the colonies coloration and the fungal structures morphometry. They were compatible with *T. viride*, *T. asperellum* and *T. atroviride* species, and each other. RAPD generated 92 reproducible bands, 65 were polymorphic (70.7 %). Clustering by UPGMA showed intraspecific variability, forming four groups. For *T.13*, *T.17*, *T.75* and *T.78* specific bands were detected, useful for the specific primers design for authentication, protection and monitoring in productive systems.

Keywords: morphometric characterization, vegetative compatibility, genetic variability.

INTRODUCCIÓN

La variabilidad intra e interespecífica en el género *Trichoderma* dificulta la identificación de las especies. Aún en la actualidad, esto provoca discrepancias entre autores, respecto a diferentes taxos de los clados clasificados (Druzhinina y Kubicek, 2005 6B; Martínez *et al.*, 2015).

En las primeras caracterizaciones morfológicas y culturales de aislamientos del género *Trichoderma* se detectó polimorfismo. Este fue uno de los motivos para que se designaran nueve especies agregadas (Rifai, 1969). La variabilidad entre aislamientos de una misma especie se observó, además, en aspectos, fisiológicos y bioquímicos (Gakegne, 2018) y moleculares (Pandya *et al.*, 2017). Esta, en algunos casos, motivó que ciertos aislados se identificaran como especies diferentes. En relación con esto, Lieckfeldt *et al.* (1999) demostraron que la especie *Trichoderma viride* Pers. ex S. F. Gray estaba constituida por dos tipos morfológicamente distintos (tipo I y II) y distinguieron al tipo I como el “verdadero” *T. viride* (el anamorfo de *Hypocrea*) y el tipo II como una nueva especie, identificada molecularmente y nombrada como *Trichoderma*

asperellum Samuels Lieckfeldt & Nirenberg (Samuels *et al.* 1999) y en 2010 la de *Trichoderma asperelloides* Samuels sp. nov. como nuevas especies. Además, con la utilización de estas técnicas se reubicaron cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai en especies como *T. asperellum*, *Trichoderma atroviride* Bissett y *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (Lieckfeldt *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2000), y cepas de *T. atroviride* o *T. viride* como *T. asperellum* (Watanabe *et al.*, 2005). Consecuentemente, el taxa en *Trichoderma* incrementó de nueve, a más de 100 (Druzhinina *et al.*, 2006); 254 (Bissett *et al.*, 2015) y actualmente, se notifican 453 especies (Index Fungorum, 2021).

La incompatibilidad o compatibilidad somática o vegetativa evidencia la existencia o no de variabilidad genética entre aislados de una misma especie de hongo, ya que cepas con cercanía genética entre ellas, muestran patrones similares de compatibilidad y viceversa (Galdames, 2001).

La compatibilidad entre aislados de *Trichoderma* se trató de demostrar sobre la base que las células vegetativas posiblemente basado en la cantidad de núcleos que poseen estas (Samuels *et al.*, 1998), pueden formar heterocarión entre varias especies por medio de la anastomosis hifal, fusión de protoplastos o las transferencias nucleares (Barcellos *et al.*, 2011). Precisamente por esto, la compatibilidad vegetativa permite evaluar las relaciones genéticas entre especies y/o cepas, y es un marcador útil para mostrar diversidad o variabilidad genética en diferentes especies de hongos (Ortuño *et al.*, 2013; Moo koh *et al.*, 2018).

En la actualidad, los marcadores moleculares son ampliamente utilizados para el estudio de relaciones taxonómicas y diversidad genética en disímiles organismos, incluyendo los hongos (El_Komy *et al.*, 2015). Los RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA, Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar) son de gran utilidad en la detección de polimorfismo intra e interespecífico en hongos, debido a que la técnica produce perfiles específicos individuales de ADN molde, mediante la amplificación de fragmentos aleatorios que se distribuyen por todo el genoma (Khattak *et al.*, 2018). Esto ha permitido su utilización en el mapeo, como la generación de huellas genéticas (Hassan *et al.*, 2019).

En la Micoteca del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) se conservan aislados con elevadas potencialidades como Agentes de Control Biológico, sin embargo, entre los más promisorios se demostró la existencia de variabilidad patogénica (Cruz-Triana *et al.*, 2018; Gakegne, 2018; Infante y Martínez, 2020; Duarte *et al.*, 2021), que se destacan por su acción biorreguladora sobre una amplia gama de enfermedades en diversos cultivos de interés económico y fisiológica (Infante *et al.*, 2015). Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar aislados de *Trichoderma* tomando como base aspectos morfo-culturales, su compatibilidad vegetativa y variabilidad molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de muestras y aislamiento de *Trichoderma*

Para el análisis, las muestras vegetales, primeramente se lava-

ron cuidadosamente con abundante agua corriente; durante una hora y secaron con papel de filtro Whatman No. 4. Seguidamente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % durante 30 s y posteriormente con alcohol al 70 % durante 1 min; entre cada desinfección y al final las muestras se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril por tres minutos cada uno y secaron en papel adsorbente estéril. A continuación, las muestras se cortaron en fragmentos de 1 cm y se mezclaron para homogenizar. Por último, se seleccionaron segmentos al azar y sembraron en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio Papa Dextrosa Agar (PDA + antibiótico; cloranfenicol 0,1g L⁻¹) e incubaron a 28 ± 2°C a oscuridad. También, se realizó el montaje de los fragmentos en cámara húmeda; la incubación se realizó a temperatura ambiente.

Las evaluaciones se realizaron diarias hasta la aparición de estructuras reproductivas, durante 24 - 48 h.

Para la identificación, se realizaron preparaciones tomando fracciones de las estructuras fúngicas visibles (micelio y/o esporas); las cuales se visualizaron al microscopio óptico Zeiss (modelo Axiostar plus; fabricado en Alemania) con aumento de 400x. Después se realizaron varias siembras de la colonia obtenida como *Trichoderma*; hasta obtener un cultivo puro.

Los aislamientos y cepas de *Trichoderma* objeto de estudio tienen diferentes orígenes (Tabla 1).

Caracterización morfo - cultural de aislamientos de *Trichoderma*

La caracterización micromorfológica de los aislamientos de *Trichoderma* (*T.*) (*T.*13, *T.*17, *T.*75, *T.*78 y *T.*90) se realizó tomando como base los aspectos morfológicos señalados en las claves taxonómicas referidas por Rifai (1969) y Gams y Bissett (1998): dimensiones y forma de los conidióforos, fiáli-

Tabla 1. Procedencia de los aislamientos y cepas de *Trichoderma*.

Table 1. Geographic origin of *Trichoderma* isolates and strains.

Aislamientos de <i>Trichoderma</i>	Origen geográfico
<i>T.</i> 13	Cuba ¹ . Guantánamo
<i>T.</i> 17	Cuba ¹ . Pinar del Río
<i>T.</i> 75	Cuba ¹ . La Habana
<i>T.</i> 78	Cuba ¹ . Mayabeque
<i>T.</i> 90	Cuba ¹ . Cienfuegos
<i>T. atroviride</i> (IMI206040)	Suecia ²
<i>T. asperellum</i> (215D)	Holanda ²
<i>T. harzianum</i> (G108)	Guatemala ²
<i>T. viride</i>	Holanda ²

¹Aislamientos cubanos de *Trichoderma*, conservados en el Laboratorio de Micología Vegetal (LMV) del CENSA.

²Cepas de referencia conservadas en el cepario del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), México.

¹Cuban *Trichoderma* isolates, preserved in the Vegetable Mycology Laboratory (VML) of CENSA.

²Reference strains conserved in the strain collection of the National Laboratory of Genomics for Biodiversity (Langebio), Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav) from the National Polytechnic Institute (IPN), Mexico.

des y conidios, y además la ornamentación de estos últimos; mientras que para la caracterización cultural (macroscópica) se tuvo en cuenta el color, forma y textura de las colonias.

Las colonias de *Trichoderma* se obtuvieron a partir de suspensiones de esporas (10 µL de una suspensión con una concentración de 10⁷ conidios.mL⁻¹), procedentes de cultivos puros y monospóricos de tres días de sembrados en el medio de cultivo Agar Malta (AM) (BioCen). La suspensión se depositó centralmente en placas Petri de 90 mm de diámetro, que contenían medio AM (BioCen, pH 5,5), incubadas a temperatura de 20±2°C y régimen de oscuridad constante. Las evaluaciones [características de las colonias: color, forma y textura] comenzaron a partir de las 24 h de la inoculación, hasta las 72 h; se determinaron por observación visual, documentadas mediante fotografías tomadas con una cámara digital marca Canon PowerShot ELPH 180 8x (20 MP) (Proveedor Costa Rica).

La caracterización micromorfológica de los aislamientos se realizó mediante observaciones microscópicas de las estructuras fúngicas desarrolladas en los microcultivos. Para ello, sobre portaobjetos estériles se vertió asépticamente una película fina de medio de cultivo PDA (BioCen; esterilizado a 121°C, durante 15 min y pH ajustado a 5,5) sobre la cual se sembró un fragmento pequeño de micelio de los aislamientos individualmente, proveniente de la zona de crecimiento activo en la periferia de las colonias, crecidas sobre PDA durante tres días, a 28 ± 2°C y régimen de oscuridad constante. Posteriormente, los portaobjetos sembrados se colocaron en placas Petri de 22 mm de diámetro esterilizadas y se incubaron a temperatura de 28 ± 2°C y régimen de oscuridad constante. A las 24 - 48 h de la siembra se visualizaron y midieron las estructuras fúngicas (30 conidióforos, 30 fiáldes y 30 conidios), en un microscopio óptico marca Zeiss (modelo Axiostar plus; fabricado en Alemania) con aumento de 100x y 400x. Las estructuras, se documentaron como evidencia gráfica con una cámara digital marca Canon PowerShot ELPH 180 8x (20 MP) (Proveedor Costa Rica).

Variabilidad genética de aislamientos de *Trichoderma* Compatibilidad vegetativa (Cv)

Para realizar el ensayo, se utilizaron cultivos de los aislados de *Trichoderma* del LMV del CENSA, y de las cepas de *T. atroviride* (IMI206040), *T. viride* (TV1), *T. asperellum* (215D) y *T. harzianum* (G108), conservadas en el Laboratorio de Genómica para la biodiversidad, Langebio (Guanajuato, México). Todos los aislados y cepas crecieron durante cinco días en medio PDA (Difco) e incubados a 28 ± 2°C y régimen de oscuridad constante.

Para estimar las relaciones genéticas, se realizaron confrontaciones entre los aislamientos cubanos y entre estos y las cepas de referencia de *Trichoderma*; (Tabla 1). Para ello, un disco de micelio de seis mm de diámetro de cada aislado y cepa de *Trichoderma*, se sembró frente a otro, a una distancia de 70 mm centralmente, en placas Petri de 90 mm de diámetro contentivas de medio PDA (Difco). Posteriormente, las placas se incubaron bajo oscuridad constante a 28 ± 2°C y

evaluaron a las 72 h. Las evaluaciones de las interacciones se realizaron macroscópicamente y la compatibilidad de los aislamientos se determinó, según el tipo de reacción entre ellos:

- 1) Incompatible: Formación de una línea sin crecimiento evidente en la zona de contacto entre las colonias, normalmente coloreada o pigmentada; o cuando un aislado sobrecrece al otro.
- 2) Compatible: no se observa formación de línea en la zona de interacción después del contacto entre las colonias, aparentando una sola colonia.

Se tomó evidencia gráfica de las interacciones, con una cámara digital marca Canon PowerShot ELPH 180 8x (20 MP) (Proveedor Costa Rica).

Variabilidad molecular de aislamientos de *Trichoderma* Método de extracción del ADN

Sobre celofán colocado en el centro de placas Petri (Ø = 90 mm), contentivas de medio de cultivo PDA (Difco), se sembró centralmente un disco de cada aislamiento cubano (Tabla 1) por placa. Las placas se incubaron por 72 h a una temperatura de 28 ± 2°C y oscuridad constante. Posteriormente, el micelio se colectó con una espátula al retirar el celofán de la placa y se congeló a -20°C. Para la extracción del ADN total se usó el protocolo DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, MBH, Germany). El *pellet* se resuspendió en 40 - 60 µL solución amortiguadora TE 0,5X, incluido en el juego de reactivos. La calidad del ADN se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %, con solución amortiguadora de corrida TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 57,1 mL y EDTA 2 mM a pH 8), durante 45 min a 100V, teñido con bromuro de etidio (cinco mg.mL⁻¹) y visualizado en un fotodocumentador (Biorad Gel Doc XR). La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro (nanodrop ND 1000), a las longitudes de onda de 260 y 280 nm, tomándose como muestras con buena calidad aquellas cuyos valores estuvieron entre 1,8 a 2 (Sambrook *et al.*, 1989). La suspensión de ADN se conservó a 4°C hasta su uso en la técnica para detectar polimorfismo entre los aislados.

Análisis RAPD

En el ensayo se usaron los aislados cubanos de *Trichoderma* (Tabla 1). Para la amplificación por PCR con cebadores arbitrarios, se utilizó una mezcla de reacción cuyo volumen final de 25 µL contenía: solución amortiguadora de PCR (Tris HCl 20 mM a pH 8,4, KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, Taq ADN polimerasa 1U (Invitrogen), 100 ng de ADN genómico total y 0,2 µM de cada cebador: OPA02, OPA13, OPB07, OPB09, OPB10, OPE14, OPG02, OPG10, OPH03, OPH19 y OPJ20 (Firma Operon Technologies, Alameda).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador API Thermal Cycler; Applied Biosystems, E.U. con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante cinco min, seguido de 45 ciclos de: 94°C durante un min (desnaturalización), 30°C durante 40 s (alineamiento) y 72 °C durante dos min (extensión); con un ciclo de extensión final a 72 °C, durante 10 min.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en TAE 1X, a 100 V durante

1,5 h. La visualización y el registro de los datos se realizaron como se describió anteriormente.

Análisis de los datos

A partir de los datos se confeccionó una matriz binaria donde se le dio el valor 1 a la presencia de la banda y 0 a la ausencia, solo se tuvieron en cuenta las bandas bien definidas. Posteriormente, se calculó el índice de similitud de Jaccard, se realizó un análisis de conglomerados por el método de UPGMA y un remuestreo tipo “bootstrap” de 10000, para estimar la robustez del dendrograma original, utilizando el paquete de software FreeTree (Hampel *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfo - cultural de aislamientos de *Trichoderma*

Los aislamientos de *Trichoderma* mostraron las siguientes características generales: rápido crecimiento, circular uniforme, colonias inicialmente blanquecinas, que se tornan de color verde o azulado a las 72 h; presencia de hifas hialinas septadas, conidióforos hialinos en penachos compactados en forma piramidal, fiálides alargadas y ensanchadas en el centro, y conidios ovalados de paredes ligeramente rugosas observadas con aumento de 1000X.

Estas características ubican los aislamientos fundamentalmente en la especie: *T. viride*, según aspectos descritos en las claves propuestas por Rifai (1969) y Gams y Bissett (1998).

Las características morfológicas observadas en los aislamientos coinciden con notificaciones realizadas por Samuels *et al.* (1999) y El-Sobky *et al.* (2019) en cuanto a: presencia de micelio hifal septado e hialino, conidióforo hialino, conidios generalmente ovalados, unicelulares, pequeños, formando racimos terminales, hialinos, de color verde al llegar a la maduración. Así como con las notificadas por Lieckfeldt *et al.* (1999), en cuanto a la ornamentación de los conidios.

No obstante, los aislamientos entre sí, presentaron diferencias en la coloración de las colonias y la morfometría de las estructuras; evidenciándose variabilidad (Tabla 2, Figura 1A y B).

Si solo se tuviera en cuenta la variabilidad observada en los caracteres morfológicos y culturales (Tabla 2), los aislamientos se ubicarían en distintas especies, según lo descrito en la clave de Gams y Bissett (1998). Precisamente esto es uno de los motivos de identificaciones erróneas de especies (Druzhinina *et al.*, 2006), depositadas en las bases de datos (Druzhinina y Kubicek, 2005 6B; Samuels *et al.*, 2010).

Por esta razón, es necesario usar una taxonomía polifásica que aborde varios criterios de clasificación, que permitan identificar con mayor precisión y confiabilidad las especies del género (Samuels *et al.*, 1999; Lieckfeldt *et al.*, 1999; El-Sobky *et al.*, 2019; Haouhach *et al.*, 2020).

La variabilidad se observó, además, al nivel fisiológico, donde algunos de estos aislados pudieron esporular a 35°C, T.13 y T.90 procedentes de la región oriental y central del país, donde la mayor parte del año las temperaturas medias son elevadas (Infante *et al.*, 2015). También presentaron diferencias en la excreción de enzimas hidrolíticas, T.75 tuvo los mayores niveles de actividad quitinasa, mientras que T.13 y T.17 los mayores de glucanasa (González *et al.*, 2012). Es posible que la variabilidad detectada intraespecífica esté relacionada con su proceso evolutivo, aspecto a seguir investigando.

Variabilidad genética de los aislamientos de *Trichoderma* Compatibilidad vegetativa (Cv)

Entre las cepas de referencia (Tabla 1), tomadas como patrones, se observaron reacciones de compatibilidad entre cepas de la misma especie (Figura 2 A-E) e incompatibilidad entre especies diferentes (Figura 3 A-C), excepto para la interacción F, G y H (Figura 2), las cuales fueron compatibles, aun siendo especies diferentes.

Tabla 2. Características culturales y morfológicas de los aislamientos de *Trichoderma*, observadas a las 72 h.
Table 2. Morphological and cultural characteristics of *Trichoderma* isolates, observed at 72 h.

Aislamientos	Parámetros			
	Culturales (Fig. 1A)	Morfológicas (Fig.1B)		
	Colonia	Conidióforos (µm)	Fiálides (µm)	Conidios (µm)
T. 13	Verde brillante más oscuro después de las 72h. Presenta anillos que se unifican al pasar el tiempo.	(69) 71,4-88,1 (89,5) × (1,9) 2,3-4,6.	(4,7) 7,5-13,5 (15,9) × 2,3-3,7 (l/a 3,4).	Redondeados y/o elipsoidales 4,8-5,6 (6,4) × 3,2-4 (4,48) (l/a 1,4).
T. 17	Color verde azulado, con crecimiento uniforme, que llega a verde claro olivo durante la maduración de las esporas.	(40,1) 41-88,6 × 1,9-4,7 (5,1).	(5,6) 6,1-8,4 (9,8) × 2,3-3,3 (l/a 2,6).	Redondeados y/o elipsoidales 4,8-5,9 (6,4) × 3,2-4,8 (5,6) (l/a 1,3).
T. 75	Verde olivo oscuro, hasta la maduración de sus esporas. Presenta micelio aéreo blanquecino.	(50,4) 101,2-140 (198,7) × (2,8) 3,3-5,6 (6,5).	5,1-10,3 (12,1) × 2,8-3,7 (l/a 2,5).	Redondeados y/o elipsoidales 4-5 (5,1) × 3,2-4,2 (l/a 1,24).
T. 78	Micelio aéreo de coloración verde olivo amarillento.	(38,2) 40,1-79,3 × (1,9) 2,8-5,1.	(6,5) 8,9-9,3 (10,3) × (2,3) 2,8-4,7 (l/a 2,4).	Redondeados y/o elipsoidales 3,2-4,8 × 2,4-3,8 (4) (l/a 1,4).
T. 90	Verde claro, micelio aéreo abundante.	(38,7) 46,6-93,3 × 3,7-4,7 (5,6) µm (l/a 1,5).	(3,7) 4,7-6,1 × (1,9) 2,3-3,3 µm (l/a 2,3).	Redondeados y/o elipsoidales 4-6,4 × (3,2) 3,5-4,5 (5,6) µm (l/a 1,2).

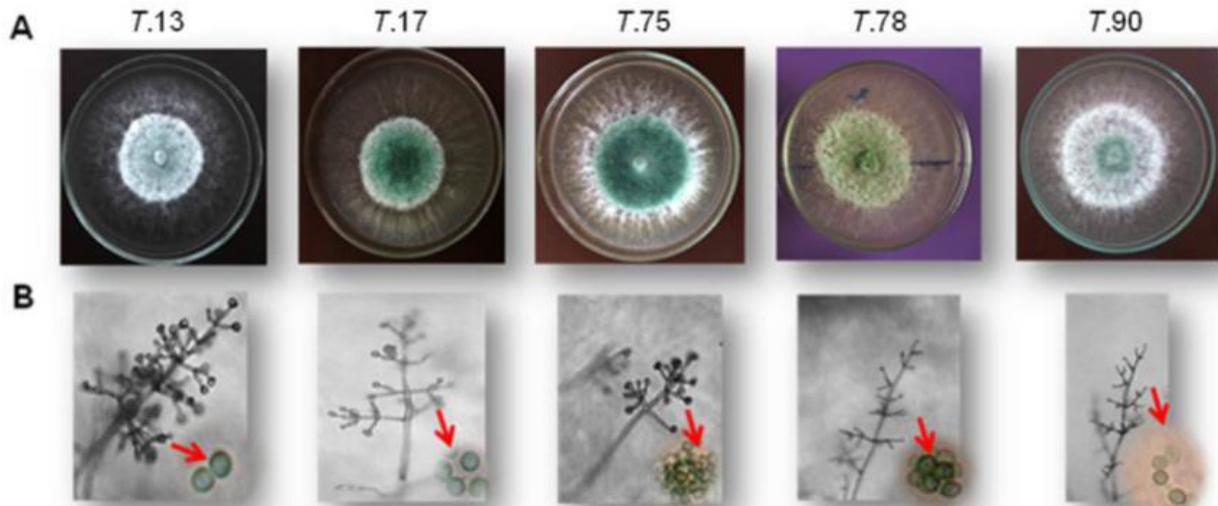


Figura 1. Caracteres morfo-culturales de los aislados de *Trichoderma* sp. A) Características culturales en medio AM (temperatura de 20°C y pH 5,5 a las 72 h). B) Características morfológicas (48 h).

Figure 1. Morpho-cultural characteristics of *Trichoderma* isolates. A) Cultural characteristics in MA culture medium (temperature of 20°C and pH 5.5, at 72 h). B) Morphological characteristics (48 h).

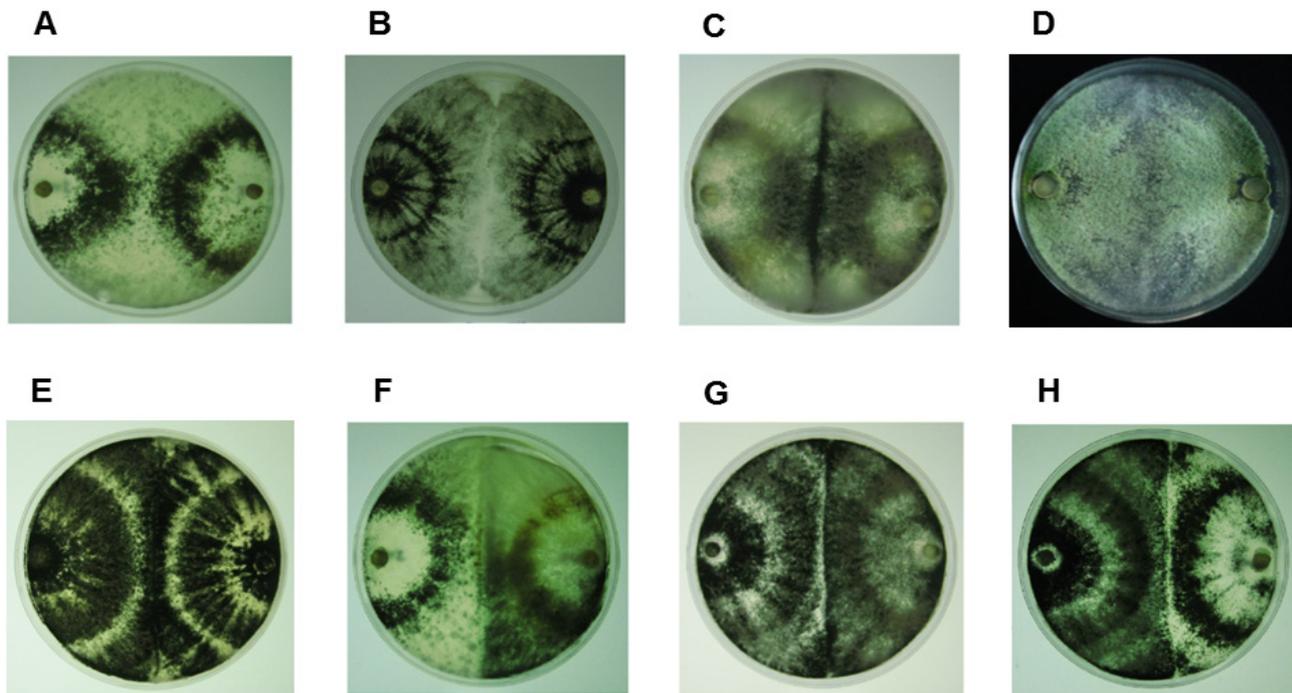


Figura 2. Reacciones de compatibilidad vegetativa entre las cepas de referencia. A) *T. atroviride* IMI206040 - *T. atroviride* IMI206040, B) *T. virens* - *T. virens*, C) *T. asperellum* 215D - *T. asperellum* 215D, D) *T. harzianum* 204 - *T. harzianum* 204, E) *T. viride* - *T. viride*, F) *T. atroviride* IMI206040 - *T. asperellum* 215D, G) *T. asperellum* 215D - *T. viride*, H) *T. atroviride* IMI206040 - *T. viride*. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].

Figure 2. Vegetative compatibility reactions between reference strains. A) *T. atroviride* IMI206040 - *T. atroviride* IMI206040, B) *T. virens* - *T. virens*, C) *T. asperellum* 215D - *T. asperellum* 215D, D) *T. harzianum* 204 - *T. harzianum* 204, E) *T. viride* - *T. viride*, F) *T. atroviride* IMI206040 - *T. asperellum* 215D, G) *T. asperellum* 215D - *T. viride*, H) *T. atroviride* IMI206040 - *T. viride*. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

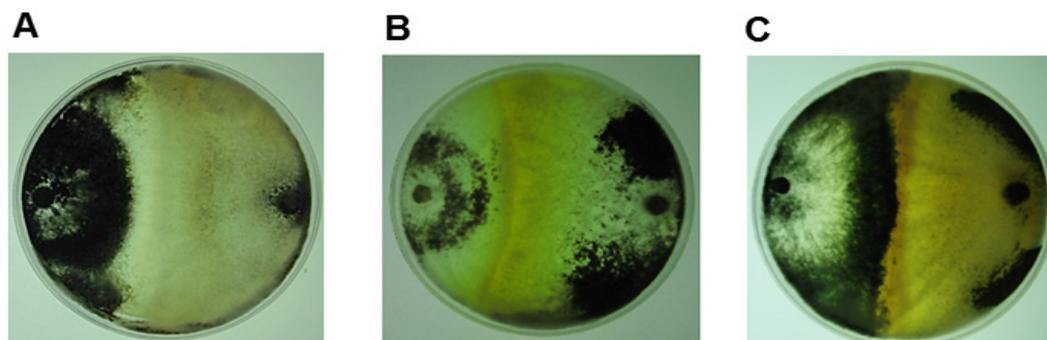


Figura 3. Reacciones de incompatibilidad entre las cepas de referencia. A) *T. asperellum* 215D - *T. harzianum* G108, B) *T. atroviride* IMI206040 - *T. harzianum* G108, C) *T. viride* - *T. harzianum* G108. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].
Figure 3. Incompatibility reactions between the reference strains. A) *T. asperellum* 215D - *T. harzianum* G108, B) *T. atroviride* IMI206040 - *T. harzianum* G108, C) *T. viride* - *T. harzianum* G108. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

Esto indica, que estas especies deben estar genéticamente estrechamente relacionadas, pues la compatibilidad se logra cuando los alelos de todos los loci son idénticos (Galdames, 2001). Este aspecto se tomó como criterio en las observaciones del ensayo para los enfrentamientos de las cepas de referencia con los aislados cubanos.

En las pruebas de confrontación realizadas entre los cinco aislados de *Trichoderma* en estudio y las cepas de referencia antes mencionadas, se observaron también reacciones de compatibilidad e incompatibilidad.

Las confrontaciones entre los aislados en estudio y las cepas de referencia *T. harzianum* (G108), mostraron una clara reacción de incompatibilidad (Figura 4 A-E), determinada por la presencia de una barrera de inhibición [cambio de coloración en las colonias (excreción de metabolitos al medio, Figura 4 A) o inhibición del crecimiento de una de las colonias, Figura 4 E].

Barcellos *et al.* (2011) notificaron que la reacción de incompatibilidad se rige por un loci *het*, que limita la formación de heterocariones entre individuos genéticamente distintos. Es decir, si la diferencia es en uno o más loci *het*, las células que participan en la fusión son compartimentadas y se someten a un proceso lítico que conduce a la muerte celular. En estos casos los aislados son incompatibles; el fenómeno se identifica por la vacuolación, disolución de núcleos y generación de pigmentos, lo que se describió como barrera de reacción (Galdames, 2001).

Por otra parte, en las interacciones de las cepas de *T. asperellum* (215D), *T. atroviride* (IMI206040) y *T. viride* (TV1) con los aislados en estudio se observaron reacciones de compatibilidad (Fig. 5 A-Ñ), al igual que entre los propios aislados (Figura 6 A, B y C).

La compatibilidad observada entre estas especies pudiera estar relacionada con la existencia de un complejo entre *T. viride* - *T. atroviride* (ambas pertenecen a la sección *Trichoderma*, según análisis por ITS) (Lübeck *et al.*, 2000). Consecuentemente, la identificación de *T. asperellum* por técnicas moleculares a partir de *T. viride*, justificó que *T. atroviride* y *T. asperellum* poseen características fenotípicas y talla del fragmento ITS muy similares (Hermosa *et al.*, 2000). Este aspecto explica la compatibilidad existente entre los aislados de estas especies. Es por ello que, algunos aislados de *T. atroviride* o *T. viride* se reclasificaron como *T. asperellum* (Sánchez-García *et al.*, 2017).

En relación con esto, Stocco (2014) demostró que entre las especies de la sección *Trichoderma*, que incluye a *T. viride*, más de una especie puede compartir la misma secuencia de SSU (gen de la pequeña subunidad 18S), lo que indica pocas diferencias entre estas. No se conoce si esta región está correlacionada con la Cv, y que, a ello, se deban los resultados obtenidos. Independientemente, la evaluación de la Cv tiene importancia para la identificación de aislamientos (Galdames, 2001).

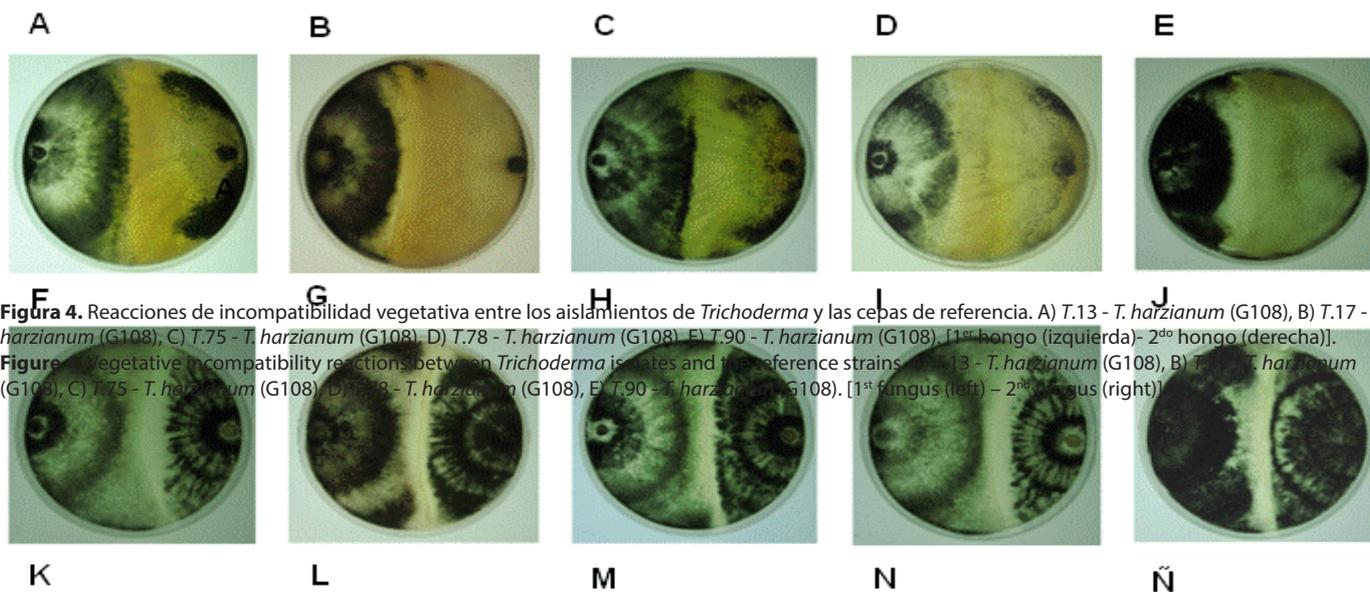


Figura 4. Reacciones de incompatibilidad vegetativa entre los aislamientos de *Trichoderma* y las cepas de referencia. A) *T.13* - *T. harzianum* (G108), B) *T.17* - *T. harzianum* (G108), C) *T.75* - *T. harzianum* (G108), D) *T.78* - *T. harzianum* (G108), E) *T.90* - *T. harzianum* (G108). [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].
Figure 4. Vegetative incompatibility reactions between *Trichoderma* isolates and the reference strains. A) *T.13* - *T. harzianum* (G108), B) *T.17* - *T. harzianum* (G108), C) *T.75* - *T. harzianum* (G108), D) *T.78* - *T. harzianum* (G108), E) *T.90* - *T. harzianum* (G108). [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

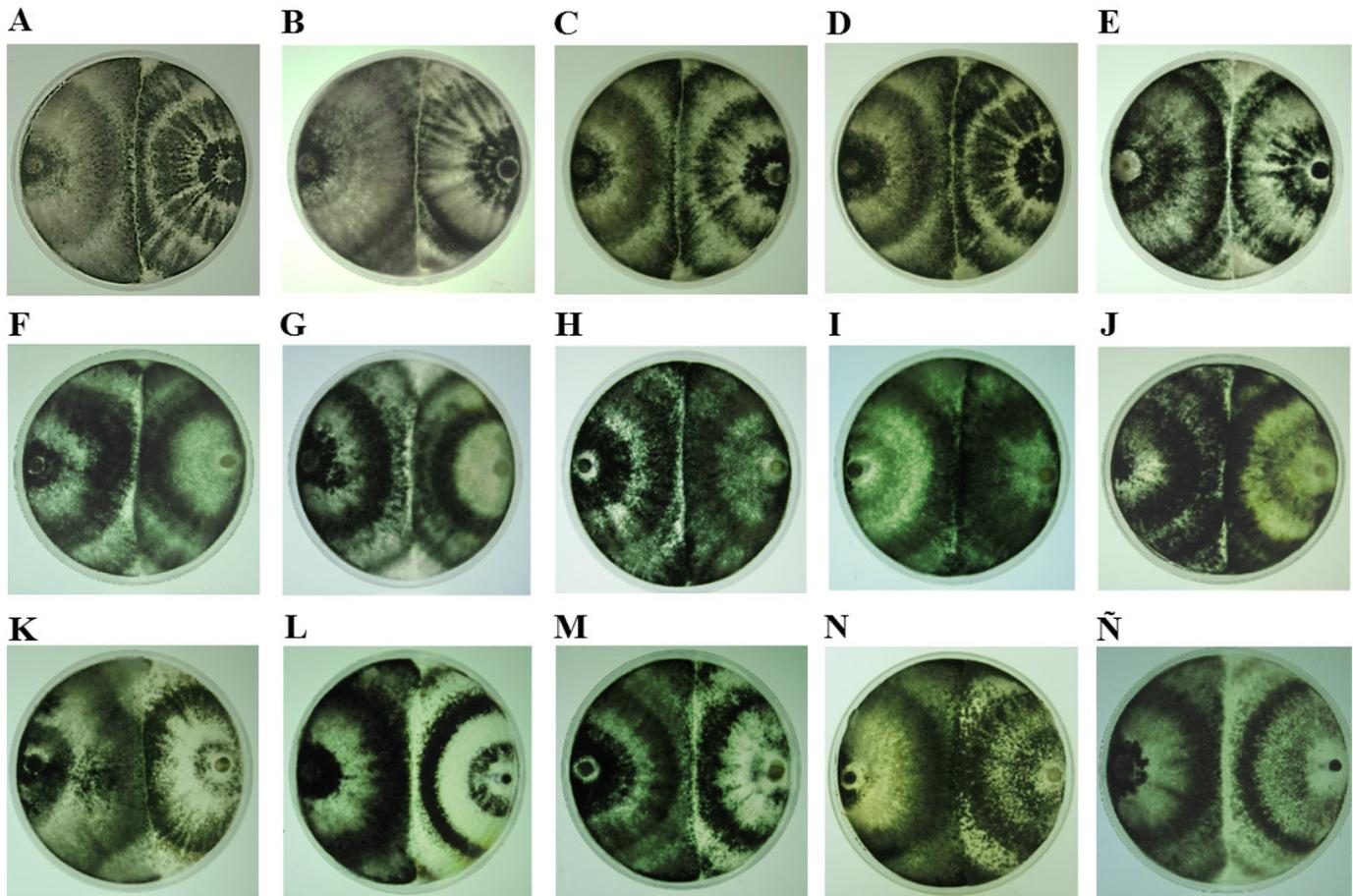


Figura 5. Reacciones de compatibilidad vegetativa entre los aislamientos de *Trichoderma* y las cepas de referencia. A) *T.13 - T. viride*, B) *T.17 - T. viride*, C) *T.75 - T. viride*, D) *T.78 - T. viride*, E) *T.90 - T. viride*, F) *T.13 - T. asperellum* 215D, G) *T.17 - T. asperellum* 215D, H) *T.75 - T. asperellum* 215D, I) *T.78 - T. asperellum* 215D, J) *T.90 - T. asperellum* 215D, K) *T.13 - T. atroviride* IMI206040, L) *T.17 - T. atroviride* IMI206040, M) *T.75 - T. atroviride* IMI206040, N) *T.78 - T. atroviride* IMI206040, Ñ) *T.90 - T. atroviride* IMI206040. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].

Figure 5. Vegetative compatibility reactions between *Trichoderma* isolates and the reference strains. A) *T.13 - T. viride*, B) *T.17 - T. viride*, C) *T.75 - T. viride*, D) *T.78 - T. viride*, E) *T.90 - T. viride*, F) *T.13 - T. asperellum* 215D, G) *T.17 - T. asperellum* 215D, H) *T.75 - T. asperellum* 215D, I) *T.78 - T. asperellum* 215D, J) *T.90 - T. asperellum* 215D, K) *T.13 - T. atroviride* IMI206040, L) *T.17 - T. atroviride* IMI206040, M) *T.75 - T. atroviride* IMI206040, N) *T.78 - T. atroviride* IMI206040, Ñ) *T.90 - T. atroviride* IMI206040. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

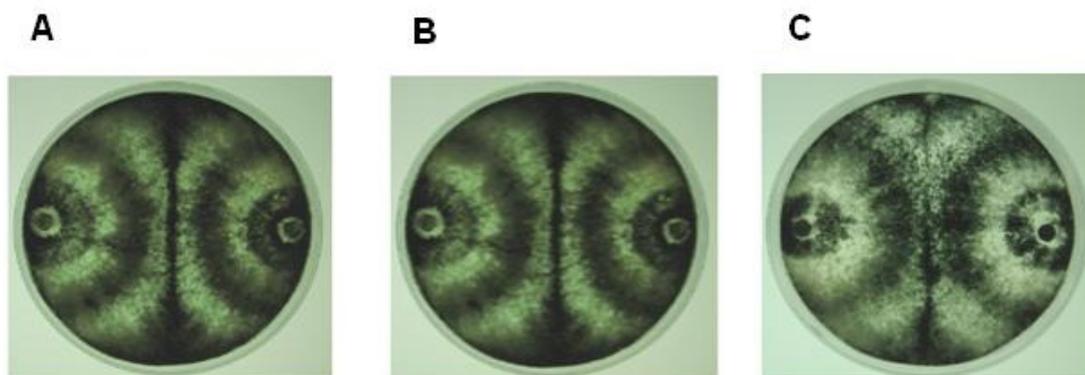


Figura 6. Reacciones de compatibilidad vegetativa entre los aislamientos de *Trichoderma*. A) *T.75 - T.78*, B) *T.17 - T.90*, C) *T.78 - T.13*. [1^{er} hongo (izquierda) - 2^{do} hongo (derecha)].

Figure 6. Vegetative compatibility reactions between *Trichoderma* isolates. A) *T.75 - T.78*, B) *T.17 - T.90*, C) *T.78 - T.13*. [1st fungus (left) - 2nd fungus (right)].

Teniendo en cuenta la compatibilidad vegetativa que mostraron los aislamientos en estudio con las cepas de referencia *T. asperellum* 215D, *T. atroviride* IMI206040 y *T. viride*, se puede inferir, que estos tienen relación taxonómica con cualquiera de las tres especies antes mencionadas.

Cook y Baker (1983) con el uso de esta técnica (Cv) confirmaron la identificación taxonómica de aislados de *Trichoderma* realizada previamente por ellos, a partir de aspectos morfológicos. En relación con esto, Galdames (2001), opinó que este tipo de bioensayo (“prueba de compatibilidad”) puede ser considerado como un criterio de clasificación de las especies del género *Trichoderma*, debido a la consistencia de los resultados, al comparar el agrupamiento obtenido entre 21 cepas de *Trichoderma* spp., por técnicas moleculares (RAPD y AFLPs) y la Cv.

De forma general, esta prueba demuestra que cepas de una misma especie del hongo comparten patrones similares de compatibilidad, lo que se reduce entre especies más alejadas. Por tal motivo, puede ser considerada como una alternativa, simple y rápida para valorar la especie a que pertenece un nuevo aislado, siempre y cuando se cuente con cepas de diferentes especies correctamente identificadas molecularmente.

Desde el punto de vista práctico, es importante, ya que tiene implicación en la formulación de productos biológicos cuyo ingrediente activo es este antagonista y donde se utilicen consorcios de especies, debido a que algunos de ellos pueden inhibir al otro, sobre todo debido a liberación de compuestos no-volátiles (Lelay *et al.*, 2007). Algunas investigaciones aclaran que cuando se aplica un consorcio de microorganismos de la misma especie (relación intraespecífica) o de especies diferentes (relación interespecífica) se podría obtener mayor inhibición de los patógenos, así como proporcionarle beneficios a la planta (Moo koh *et al.*, 2018). En este sentido, Gallegos-Morales *et al.* (2022), evidenciaron compatibilidad *in vitro* entre *T. asperellum*, *T. harzianum* y *Trichoderma lignorum*; y al realizar co-aplicaciones tuvieron hasta el 86 % de rendimientos por planta, y disminución en la incidencia (71 %) y severidad por *Fusarium* sp., (59 %) en el cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.).

Variabilidad molecular de los aislamientos

Análisis RAPD

Los 11 marcadores generaron un patrón de amplificación claro y reproducible para cada aislamiento, con un total de 92 bandas reproducibles. De estas, 65 fueron polimórficas, para un 70,7 % de polimorfismo. Los iniciadores OPA-13, OPB-07, OPB-09, OPH-19 y OPJ-20 tuvieron 70 o más por ciento de polimorfismo (Tabla 3), destacándose el OPH-19 con 100 % de polimorfismo.

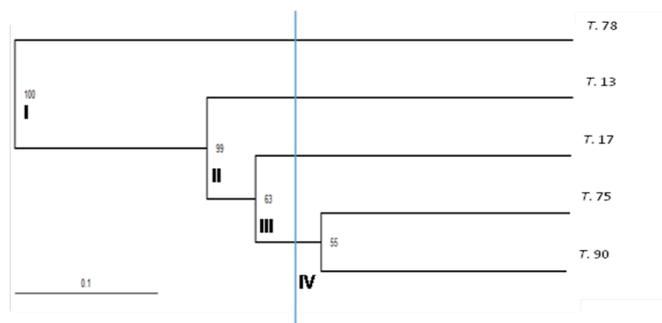
Los datos generados por los RAPD formaron cuatro grupos, una evidencia más de la variabilidad intraespecífica entre los aislados en estudio (Figura 7).

La variabilidad obtenida por RAPD entre los aislados puede ser usada para la detección de estos. El iniciador OPE-14 amplificó una banda en el aislado T.17 que lo diferencia

Tabla 3. Total de bandas generadas a partir de los aislamientos cubanos de *Trichoderma* con el uso de 11 iniciadores RAPD.

Table 3. Total of bands generated from the Cuban *Trichoderma* isolates using eleven RAPD primers.

Iniciador	No. Total de bandas	No. de bandas Polimórficas	% de Polimorfismo
OPA13	4	3	75
OPB07	10	7	70
OPB09	10	7	70
OPB10	6	4	66,7
OPE14	11	6	54,5
OPG02	6	4	66,7
OPH03	8	5	62,5
OPH18	5	3	60
OPH19	10	10	100
OPG10	10	6	60
OPJ20	12	10	83,3
Total	92	65	



Método de Jaccard

Figura 7. Agrupamiento de cinco aislados de *Trichoderma* basado en el polimorfismo por RAPD por el método de Jaccard.

Figure 7. Clustering of five *Trichoderma* isolates based on polymorphism by RAPD by Jaccard's method.

de T.13, para T.75 con el iniciador OPH-03 se produjeron tres bandas que lo diferencian de T.78, y OPH-19, produjo una banda en T.17 que lo distingue del resto de los aislados (Figura 8). Diferencias que puntualizan dicha variabilidad. Desde otro punto de vista, estos resultados tienen importancia para el diseño de cebadores específicos, para su identificación, aspecto primordial para la autenticación, protección, y monitoreo de estos en campo.

Resultados similares obtuvieron Chandulal *et al.* (2016), quienes encontraron con cinco iniciadores RAPD variabilidad intraespecífica entre diez aislados de *Trichoderma* sp., obtenidos de suelo rizosférico de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). También, Ranga *et al.* (2017) detectaron elevada variabilidad intraespecífica en nueve aislados de *Trichoderma*, con el uso de 15 iniciadores. Asimismo, coinciden con los obtenidos por Hernández *et al.* (2013), quienes con el uso de cuatro iniciadores RAPD evidenciaron variabilidad intraespecífica en diez aislados de *Trichoderma* spp. También, Hewedy *et al.* (2020) revelaron un elevado polimorfismo de 80 % de las bandas reproducibles en las cepas con siete iniciadores RAPD.

Por su parte, El_Komy *et al.* (2015), encontraron elevada variabilidad intraespecífica en 30 aislados de *T. asperellum*,

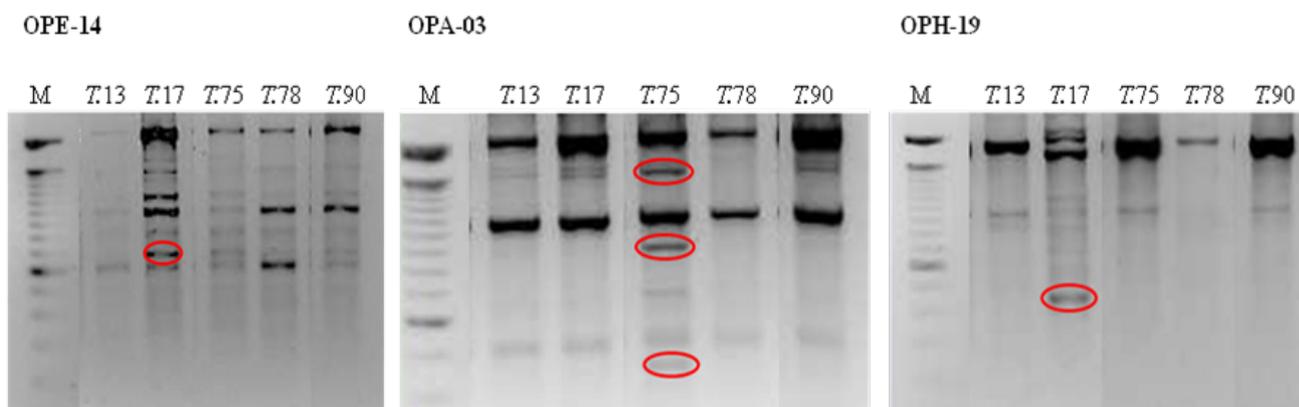


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en TBE de la amplificación con cebadores RAPD. Línea 1: M (1000 pb DNA Ladder, Invitrogen, E.U.); Líneas 2-6: Aislamientos de *Trichoderma* en estudio.
Figure 8. Electrophoresis on 1.5 % agarose gel in TBE of the amplification with RAPD primers. Lane 1: M (1000pb DNA Ladder, Invitrogen, E.U.); Lanes 2-6: *Trichoderma* isolates under study.

con ocho cebadores RAPD, aunque esto no se relacionó con la actividad quitinasa y glucanasa de estas cepas. En sus investigaciones Kumar y Sharma (2011) declaran que, la variabilidad detectada con marcadores RAPD se relaciona con otros marcadores, fisiológicos o patogénicos. Los resultados del ensayo coinciden con los informado por estos autores, aunque parcialmente con los de El_Komy *et al.* (2015), ya que los aislados de *Trichoderma* cubanos, presentan marcada variabilidad enzimática (González *et al.*, 2012).

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran la variabilidad entre los aislados de *Trichoderma* sobre la base de caracteres morfológicos y culturales, así como genéticos, demostrada por la compatibilidad vegetativa y marcadores RAPD.

En general, estos resultados revisten gran importancia para la identificación, autenticación, protección y monitoreo de estos, en sistemas productivos. Para su uso como futuros controladores biológicos donde la variabilidad entre estos, sea la complementación, con vistas a la obtención de productos con mayor alcance, para su implementación dentro de un manejo integrado sustentable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

La investigación se logró gracias al apoyo de una beca SEP, otorgada por México. Con ello, agradecemos al Dr. Alfredo Herrera Estrella, y a la Dra. June Simpson por su apoyo en la realización de estos estudios, a través de una estancia en sus Laboratorios, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Igualmente, agradecer a los técnicos Ing. Pedro Martínez y MSc. Katia Gil.

REFERENCIAS

- Barcellos, F.G., Hungria, M. y Pizzirani-Kleiner, A. 2011. Limited Vegetative Compatibility as a cause of Somatic Recombination in *Trichoderma pseudokoningii*. Brazilian Journal of Microbiology. 42: 1625-1637.
- Bissett, J., Gams, Walter., Jaklitsch, W. y Samuels, J.G. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year. IMA Fungus. 6 (2): 263-95.
- Chandulal, K., John, Priya. y Gopal, C. 2016. Genetic Diversity of *Trichoderma* sp. obtained from tomato rhizosphere using RAPD. International Journal of Science, Environment and Technology. 5 (4): 2101-2108.
- Cook, R.J. y Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota: American Phytopathological Society. 539 p.
- Cruz-Triana, A., Rivero-González, D., Infante-Martínez, D., Echevarría, H.A. y Martínez-Coca, B. 2018. Manejo de hongos fitopatógenos en *Phaseolus vulgaris* L. con la aplicación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Revista de Protección Vegetal. 33 (3):1-7.
- Druzhinina, I. y Kubicek, C.P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J Zhejiang Univ SCI. 6B (2): 100-112.
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A. y Kubicek, C. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience. 47: 55-64.
- Duarte, L.Y., Infante, M.D. y Martínez, C.B. 2021. Biocontrol of *Trichoderma* spp. strains against *Fusarium* spp. isolates from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista de Protección Vegetal. 36 (2):1-5.
- El_Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A. y Molan, Y.Y. 2015. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt. Journal Plant Pathology. 31 (1): 50-60.
- El-Sobky, M.A., Fahmi, A.I., Ragaa, A.E. y El-Zanaty, A.M. 2019. Genetic Characterization of *Trichoderma* spp. Isolated from Different Locations of Menoufia, Egypt and Assessment of their Antagonistic Ability. Journal of Microbial & Biochemical Technology. 11 (409): 9-23.
- Takegane, E.R. 2018. Selección de cepas de *Trichoderma* y *Pseudomonas* para el control de *Alternaria solani* Sor. en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis en opción al grado de doctor en Ciencias Agrícolas. Mayabeque, Cuba.

- Galdames, R. 2001. Análisis genético-molecular de la diversidad del hongo patógeno *Sclerotium cepivorum* Berk., y del biocontrolador *Trichoderma* spp. Tesis en opción al grado de doctor en Ciencias - Biotecnología de Plantas. Irapuato, Gto, México.
- Gallegos-Morales, G., Espinoza-Ahumada, C.A., Figueroa-Reyes, J., Méndez-Aguilar, R., Rodríguez-Guerra, R., Salas- Gómez, A.L. y Peña-Ramos, F.M. 2022. Compatibilidad de especies de *Trichoderma* en la producción y biocontrol de marchitez del chile. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 9: (2): e3066.
- Gams, W. y Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek C, Harman G. (eds.), p. 3-34, *Trichoderma and Gliocladium* Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London, UK.
- González, I., Infante, D., Martínez, B., Arias, Y., González, N., Miranda, I. y Peteira, B. 2012. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. *Biotecnología Aplicada*. 29: 12-16.
- Hapl, V., Pavlíček, A. y Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Freetree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 731-735. <http://www.natur.cuni.cz/~flegr/freetree.htm>.
- Haouach, S., Karkachi, N., Oguiba, B., Sidaoui, A., Chamorro, I., Kihal, M. y Monte, E. 2020. Three New Reports of *Trichoderma* in Algeria: *T. atrobrunneum*, (South) *T. longibrachiatum* (South), and *T. afroharzianum* (Northwest). *Microorganisms*. 8 (1455): 2-14.
- Hassan, M.M., Farid, M.A. y Gaber, A. 2019. Rapid identification of *Trichoderma koningiopsis* and *Trichoderma longibrachiatum* using sequence characterized amplified region markers. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 29:13.
- Hermosa, M., Grondona, I., Iturriaga, E., Diaz-Minguez, J., Castro, C., Monte, E. y Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 1890-1898.
- Hernández, A., Jiménez, M., Arcia, A., Ulacio, D. y Méndez, N. 2013. Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. mediante RAPD y rADN-ITS. *Bioagro*. 25 (3): 167-174.
- Hewedy, O.A., Abdel, L.K.S., Seleiman, M.F., Shami, A., Albarakaty, F.M. y El-Meihy, R.M. 2020. Phylogenetic Diversity of *Trichoderma* Strains and Their Antagonistic Potential against Soil-Borne Pathogens under Stress Conditions. *Biology*. 9: 189.
- Infante, D., Reyes, Y., Peteira, B. y Martínez, B. 2015. Variabilidad fisiológica y patogénica de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. *Métodos en Ecología y Sistemática*. 10 (3): 41-52.
- Infante, M.D. y Martínez, C.B. 2020. Antagonismo de seis cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre *Colletotrichum* spp. *Revista de Protección Vegetal*. 35 (3): 1-8.
- Index Fungorum. [Consultado: Abril de 2021]. 2021. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org/col/search/scientific/genus/Trichoderma/fossil/1/match/1/page/2> 1/sort//direction/asc.
- Kumar, M. y Sharma, P. 2011. Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. *African Journal of Biotechnology*. 10 (22): 4532-4543.
- Khattak, B., Saifullah, S.H., Ahmad, M., Ali, A., Junaid, M., Khan, I.A., Khan, T.A. y Hussain, M. 2018. Genetic Relatedness among the Indigenous Isolates of *Trichoderma harzianum*, using RAPD and their Nematocidal Capabilities against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Agricultura*. 34: 486-493.
- Lelay, Y., Ruano-Rosa, D. y López-Herrera, C. 2007. Estudio de compatibilidad *in vitro* de aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre blanca del aguacate. *Actas VI Congreso Mundial del Aguacate*.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H. y Petrini, O.A. 1999. Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species? *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (6): 2418-2428.
- Lübeck, M., Poulsen, K., Lübeck, P., Jensen, F. y Thrane, U. 2000. Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. (185): 129-134.
- Martínez, B., Infante, D. y Peteira, B. 2015. Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*. 30 (Número Especial): 11-22.
- Moo Koh, F.A., Alejo, J.C., Ramírez, A.R., Suárez, J.T., Angulo, G. y Islas- Flores, I.R. 2018. Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*. *Scientia Fungorum*. 47: 37-45.
- Ortuño, N.C. y Miranda, M.C. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal Selva Andina Biosphere*. 1: 16-4.
- Pandya, J.R., Sabalpara, A.N. y Mahatma, M. 2017. Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis of Native *Trichoderma* Isolates. *Asian Journal of Applied Science and Technology*. 1 (5): 147-150.
- Ranga, R.A., Ahammed, K.S. y Patibanda, A.K. 2017. Genetic Diversity of *Trichoderma* sp. from Rhizosphere Regions of Different Cropping Systems using RAPD Markers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6 (7): 1618-1624.
- Rifai, A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological*. 116: 1-56.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
- Samuels, G., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E. y Kubicek, C. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud. Mycological*. 41: 1-54.
- Samuels, G., Lieckfeldt, E. y Nirenberg, H. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *Trichoderma viride*. *Sydowia*. 51 (1): 71-88.
- Samuels, G., Ismaiel, A., Bon, M., De Respinis, S. y Petrini, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycological*. 102 (4): 944-966.
- Sánchez-García, B.M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R. y Mora-Avilés, M.A. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Cv. Montcalm. *Agrociencia*. 51: 63-79.
- Stocco, M.C. 2014. Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Plata.
- Watanabe, S., Kumakura, K., Kato, H., Iyozumi, H., Togawa, M. y Nagayama, K. 2005. Identification of *Trichoderma* SKT1, a biological control agent against seed borne pathogens of rice. *Journal of General Plant Pathology*. 71: 351-356.