

ARTÍCULO RESEÑA

Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*

Benedicto Martínez, Danay Infante*, Belkis Peteira

Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue resumir aspectos teóricos vitales para la identificación de especies y aislados de *Trichoderma*, así como algunos elementos a tener en cuenta para el estudio de la variabilidad inter e intraespecífica del género. En la actualidad, aún se utilizan aspectos morfológicos para la ubicación taxonómica de las especies, pero estos resultan insuficientes y se recurre al uso de otras técnicas como son los estudios fisiológicos, de compatibilidad vegetativa y de herramientas moleculares, los cuales contribuyen a la identificación específica y certera. En los estudios de variabilidad se indica tener en cuenta aspectos fisiológicos y ecológicos, incluyendo los modos de acción de este agente de control biológico, así como la variabilidad a nivel de ADN. Ambos temas tributan directamente al conocimiento necesario para realizar una adecuada selección de las cepas que resulten promisorias, su protección como ingrediente activo de productos comerciales, monitoreo, registro y comercialización.

Palabras clave: morfología, compatibilidad vegetativa, identificación molecular.

Polyphasic taxonomy and variability in the genus *Trichoderma*

ABSTRACT: The objective was to summarize essential theoretical aspects for the identification of *Trichoderma* species and isolates, as well as some aspects to be considered for studying the inter and intraspecific variability in the genus. Although the morphological aspects are currently used for the taxonomic status of the species, they are insufficient. Thus, the use of molecular techniques and other vegetative compatibility and physiological studies are important. Such techniques contribute to a specific and accurate identification. Physiological and ecological aspects, including the modes of action of this biological control agent, and the variability at the DNA level as well, must be considered in studies of variability. Both issues point directly at the necessary knowledge for the appropriate selection of promising strains, their protection as active ingredient of commercial products, monitoring, register, and marketing.

Key words: morphology, vegetative compatibility, molecular identification.

INTRODUCCIÓN

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* son saprofitos de crecimiento muy rápido (1). Las especies se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en

descomposición. Son reconocidos a nivel mundial como excelentes agentes de control biológico, debido a diferentes modos de acción, elementos esenciales para la selección eficaz de cepas promisorias para un control más eficiente y duradero (2, 3, 4).

El género *Trichoderma* se describió por Persoon en 1794 (5). Posteriormente, Rifai en 1969 (6) lo revisó y propuso nueve especies agregadas: *Trichoderma*

* Correspondencia: Danay Infante. Correo electrónico: danay@censa.edu.cu.

piluliferum Webster & Rifai, *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai, *Trichoderma hamatum* (Bon) Bain, *Trichoderma koningii* Rifai, *Trichoderma aureoviride* Rifai, *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai y *Trichoderma viride* Pers ex S. F. Gray. Estas especies se identificaron teniendo en cuenta diferencias morfológicas y fisiológicas; sin embargo, con la taxonomía establecida sobre caracteres morfológicos no se diferencian satisfactoriamente las especies en el género.

En la actualidad se utilizan herramientas moleculares para la identificación y clasificación de los organismos. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) específica de las regiones ITS1 e ITS2 y del factor de elongación, así como la secuenciación de estas para su comparación con las secuencias depositadas en GenBank *TrichoBlast* y en otras bases de datos, facilitan la identificación del aislamiento.

A partir de esos nuevos conocimientos se ratificaron especies y se determinaron también otras nuevas, teniendo en cuenta la variación intra e interespecífica notificada para especies del género *Trichoderma* en el GenBank. Esto se evidenció por Lieckfeldt *et al.* (7) en su estudio sobre *T. viride*, una de las primeras especies caracterizada e identificada únicamente por la rugosidad de la pared del conidio que presenta dos tipos morfológicamente distintos (I y II), ya que cada uno de esos tipos posee un diseño de ADN mitocondrial diferencial. Posteriores estudios moleculares, morfológicos y fisiológicos designaron al tipo I como el «verdadero» *T. viride*, anamorfo de *Hypocrea rufa* (Pers.: Fr.) y al II como una nueva especie, *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, la cual, en términos moleculares, se considera cercana al neotipo de *T. hamatum*. Consecuentemente, el taxa en *Trichoderma* incrementó de nueve a más de 100 especies en años recientes (8).

Las bondades que presentan las cepas del antagonista *Trichoderma* hicieron posible la elaboración de productos biológicos con características amigables con el ambiente. Pero el éxito de estas cepas como productos está amparado por una precisa selección de cepas, la cual debe partir de una certera identificación.

La correcta identificación, a través de la conjunción de diferentes técnicas, se conoce como identificación polifásica y se impone teniendo en cuenta las complejidades del género antes mencionadas. Este aspecto es vital para el registro de un producto cuyo ingrediente activo es *Trichoderma*, además de la importancia que reviste para la autenticación y protección del mis-

mo, así como su monitoreo una vez liberado en campo. De igual forma, es preciso el conocimiento de la variabilidad entre los aislamientos de una colección o, incluso, entre especies del género, a fin de hacer una correcta selección de las cepas más promisorias según los aspectos fisiológicos, ecológicos, modos de acción y la misma variabilidad molecular.

Teniendo en cuenta estos aspectos el objetivo de este trabajo fue realizar una revisión actualizada sobre la identificación de aislados del género *Trichoderma* a partir de las diferentes técnicas disponibles para esto.

PARTE GENERAL

Trichoderma. Aspectos generales

El género *Trichoderma* se presenta naturalmente en diferentes hábitats, aparece distribuido por todas las latitudes desde zonas polares a ecuatoriales. Se caracteriza por ser saprófito, sobrevive en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica debido a su gran capacidad de descomponerla. En determinadas condiciones, puede ser anaerobio facultativo. Estos atributos le permiten tener una mayor plasticidad ecológica (9). Tal capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos le confiere a este género la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica (10,11).

Su amplia distribución y su plasticidad ecológica se encuentran estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que posee para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (9). Conocer cuáles, en qué momento y bajo qué condiciones se favorece la expresión de estas enzimas, permite, además de la selección de cepas, orientar la forma de producción y aplicación de las mismas (12).

Identificación de aislados del género *Trichoderma*

• Taxonomía

La Taxonomía de este género es complicada. En 1794, Persoon describió el género *Trichoderma* y aún en la actualidad se continúa profundizando en este aspecto. Según Villegas (1), el género *Trichoderma* se ubica en la clase Hyphomycetes, orden Moniliales, familia: *Moniliaceae*.

Su fase sexual (estado Teleomorfo) se encuentra ubicado en la clase Ascomycetes, serie Pyrenomycetes, orden Hypocreales, género *Hypocrea* (1, 13, 14). Las especies del género *Trichoderma* son un grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (15).

Según Samuels (14), *Trichoderma* se clasifica como un hongo anamórfico. El estado teleomorfo se ha detectado en pocas especies. En este sentido se han identificado: *Hypocrea lixii* Chaverri como el estado teleomorfo de *Trichoderma harzianum* Rifai, *Hypocrea atroviridis* Dodd como el teleomorfo de *Trichoderma atroviride* P.karst (Bissett) e *Hypocrea virens* Kullnig-Gradinger como el teleomorfo de *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) Arx (16, 17, 18). Las especies antes mencionadas se utilizan ampliamente como agentes de control biológico (19).

Especies

De las cuatro especies originalmente descritas por Persoon, solo se conserva *Trichoderma viride* Pers.: Fr., lo cual evidencia la dificultad en la identificación en este género. En trabajos posteriores, Rifai (5) determinó nueve especies agregadas sobre la base de los caracteres morfológicos, así como el tipo de ramificación del conidióforo y forma, y tamaño de los conidios, entidades morfológicamente muy difíciles de separar a nivel de especie (5). Este autor, además, señaló que *T. hamatum* podía incluir dos o más especies morfológicamente distintas. Todas estas especies han estado en constante variación, por lo que sus cualidades no se han definido con exactitud. A pesar de que la clasificación propuesta por Rifai sigue en uso, solo se acepta parcialmente.

Posteriormente, Bissett (20, 21, 22, 23) reexaminó los criterios de Rifai y definió cinco secciones: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Pachybasium* e *Hypocreanum*. Estas divisiones se realizaron, fundamentalmente, con el empleo de la taxonomía tradicional, según el tipo de ramificación del conidióforo, la forma del conidio, crecimiento y coloración de la colonia, entre otras.

Samuels *et al.* (24) realizaron otras investigaciones dentro del complejo *Trichoderma*, sección *Longibrachiatum*, las cuales permitieron un avance importante en el conocimiento de la taxonomía del género y en la comprensión de algunas especies no abordadas con anterioridad por Rifai en 1969 y Bissett en 1984.

Para depurar ambigüedades taxonómicas que aún persisten, se propusieron claves adicionales que condujeron a la redefinición de la especie *T. harzianum* y de su neotipo (25) y la neotipificación de *T. koningii* (26).

En la actualidad, la taxonomía basada en caracteres morfológicos no permite una identificación adecuada de las especies del género. Es por ello que la introducción de técnicas moleculares tiene una función decisiva en la identificación y clasificación de las es-

pecies de *Trichoderma*. El uso de estas herramientas por Samuels *et al.* en 1999 (27) trajo como consecuencia la nueva caracterización de *T. viride* y la descripción de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg y, en 2010, de *Trichoderma asperelloides* Samuels como nueva especie (28).

Las técnicas moleculares mostraron su gran potencial en estudios a nivel inter específico y, combinadas con criterios morfológicos, condujeron a la reubicación de algunas especies (7), la definición de otras nuevas (27) y/o conectar fases anamorfos con su teleomorfo (15).

Debido a la importancia del género y la complejidad para su identificación hasta nivel de especie, así como los resultados obtenidos de forma individual por diferentes autores, se evidencia la necesidad de abordar la taxonomía con un enfoque más amplio, teniendo en cuenta los aspectos morfológicos, fisiológicos, compatibilidad vegetativa y moleculares.

· Morfología

Las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* presentan rápido crecimiento. En 1969 Rifai señaló que poseen color blanco y se tornan verde oscuro con abundante esporulación. En general, en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) este hongo no presenta micelio aéreo y su pigmentación puede variar desde verde oscuro hasta verde claro y, en ocasiones, tornarse amarillento. Algunos aislamientos tienen olor típico a coco (29, 30). Durante su desarrollo y crecimiento producen hifas de 5-10µm de ancho (31) que conforman el micelio septado, con paredes compuestas por quitina y glucano.

Los conidióforos de *Trichoderma* tienen aspecto cónico cuando se observan al microscopio. Producen gran cantidad de conidios asexuales unicelulares de color verde o hialinos, lisos o con paredes muy poco ásperas, subglobosos, cilíndricos, oblongos, con diámetro promedio de 3 a 5 µm. Estos se forman a partir de células conidiógenas y fiálides (singulares o en grupos), que se ubican en los extremos de los conidióforos, los cuales son hialinos muy ramificados y no verticilados. Además, este hongo puede producir clamidosporas (unicelulares), globosas en sustratos naturales, las que pueden ser intercalares y, en ocasiones, terminales en los extremos de las hifas, de tono verde y menores de 15 µm de diámetro. Estas esporas pueden perdurar a través del tiempo, por ello son consideradas estructuras de sobrevivencia (32, 33).

Para la identificación morfológica de las especies se tuvo en cuenta, principalmente, la clave de Rifai (6). Se emplea la caracterización cultural y el crecimiento

de las colonias sobre diferentes medios de cultivo (Agar Extracto Malta, PDA, *Cornmeal* Agar), la morfometría del conidióforo, fiálides, conidios, clamidosporas, entre otros caracteres obtenidos a partir de colonias del hongo en estos medios. Más recientemente, otros autores (14, 34) diseñaron claves taxonómicas para la identificación de otras especies.

A pesar de las inexactitudes que puedan tener las claves taxonómicas, estas representan la base primaria de identificación y el punto de partida para la identificación molecular.

• Compatibilidad vegetativa

La compatibilidad e incompatibilidad somática o vegetativa, es frecuente en hongos filamentosos. De manera general, los mecanismos que la rigen permiten o evitan la coexistencia de núcleos genéticamente diferentes dentro de un citoplasma común (35).

El control genético de la incompatibilidad se estudió en Ascomycetes, y la definen diferencias en uno o más loci *het* (heterocarión). La existencia de numerosos loci *het* se dedujo a partir del gran número de grupos de compatibilidad presentes en hongos como: *Neurospora crassa* (Shear & B.O. Dodge), *Podospora anserina* (Rabenh.), *Aspergillus nidulans* (G Winter) y otros (35). Por ejemplo, en *N. crassa* la compatibilidad del heterocarión es conferida por al menos 11 loci distribuidos en 5 de los 7 grupos de ligamiento. Esto significa que para que dos aislados de esta especie sean compatibles vegetativamente, los alelos de todos los loci deben ser idénticos. De ahí que la incompatibilidad se manifiesta como una falla de fusión entre las hifas o más frecuentemente como inviabilidad del producto de la fusión, lo cual se identifica por la vacuolación, disolución de núcleos y generación de pigmentos, lo que se describió como barrera de reacción (36).

Los aislamientos agrupados, de acuerdo a los patrones de compatibilidad micelial, muestran patrones genéticos similares. Por ello, la técnica se considera como una herramienta alternativa, simple, económica y rápida para inferir similitudes entre individuos (36).

Estos grupos de compatibilidad vegetativa se consideran como una herramienta muy útil para estudiar diversidad y dinámica poblacional (37); además representan un indicador de la estrategia reproductiva, y posiblemente de la estructura genética de la población (36).

Son varios los trabajos realizados para determinar grupos de compatibilidad en *Trichoderma*, teniendo en cuenta que las células vegetativas pueden llegar a poseer más de 100 núcleos (24). Según Stasz *et al.* (38), se caracterizaron varias progenies (fusión de

protoplastos) de *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*. Varios autores describieron, dentro del género *Trichoderma*, la formación de heterocarión entre varias especies por medio de la anastomosis hifal, fusión de protoplastos o las transferencias nucleares (39).

• Identificación Molecular

La identificación de las especies del género *Trichoderma* resultó ambigua mediante la caracterización morfológica con el uso de claves tradicionales. Por estas razones se introdujeron técnicas moleculares que apoyaron y facilitaron la caracterización e identificación de las especies del género con mayor precisión. No obstante, es posible que la ambigüedad en la identificación morfológica sea una de las causas por lo que existan secuencias en las bases de datos del GenBank que no se correspondan con las especies nominadas, lo que exige una revisión de las mismas.

Dentro de las herramientas moleculares más usadas para la identificación se incluyen: cariotipos electroforéticos y la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal (ADNr) y del Factor de Elongación.

Estas técnicas, además de resolver problemas taxonómicos, proporcionaron marcadores específicos de cepas que permiten evaluar la estabilidad genética a través de diferentes generaciones sucesivas de propagación y el monitoreo de la supervivencia y destino ambiental, después de su liberación en campo (40, 41).

Actualmente, las secuencias de las especies de *Trichoderma* identificadas por métodos moleculares, referidas en el sitio www.isth.info de la *International Commission on the Taxonomy of Fungi subcommission on Trichoderma and Hypocrea* (42, 43, 44), están depositadas en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29859>.

Espaciador interno del transcrito (ITS) de la región del ADN ribosomal

Las regiones del ADN de mayor interés, tanto en estudios de filogenia como en taxonomía de hongos, son las que codifican para el ARN ribosómico (45) que se encuentran en mitocondrias, cloroplastos y el núcleo. Este ADNr contiene la información para la síntesis del ARN que conforma los ribosomas, por lo que se transcribe y no se traduce (46). Este tipo de ADN está presente en más de 90 copias por genoma, puede ser amplificado fácilmente y contiene regiones que no codifican para proteínas (47).

La región del ADNr está conformada por el gen *18S* (SSU), el espaciador intergénico ITS1, el gen *5.8S*, el espaciador ITS2 y el gen *28S* (LSU). Los genes *18S*,

5.8S y 28S están relativamente conservados en los hongos y proporcionan una base molecular para investigar relaciones filogenéticas a diferentes niveles. No obstante, sus pequeños tamaños limitan su utilidad en comparaciones filogenéticas. Los espaciadores ITS, cuya función es desconocida (48), son mucho más variables porque sus transcritos se cortan desde el ARNr y no llegan a formar parte del ribosoma (49, 50, 51). A partir de estas regiones se diseñaron cebadores universales, los cuales permiten realizar estudios evolutivos a nivel de género y familia (52).

Samuels *et al.* (27, 29) y Lieckfeldt *et al.* (7) fueron los primeros que amplificaron las regiones del ITS1-ITS2, incluyendo la región del ADNr 5.8S de la especie de *T. viride*. Kuhls *et al.* (53) lograron definir la sec. *Longibrachiatum* como un grupo monofilético por la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2, mientras que las secciones *Pachybasium* y *Trichoderma* quedaron definidas como grupos polifiléticos. Por lo informativo y la fácil amplificación, la región ITS del ADNr ha sido utilizada en numerosos estudios y, en consecuencia, ha permitido evaluar con mayor detalle la actual taxonomía de *Trichoderma*.

Lieckfeldt y Seifert (54) plantearon que el uso de este marcador fue desacreditado por la presencia de copias parálogas de los ITS de otros géneros de hongos relacionados con las plantas. A pesar que en la mayoría de las especies de *Trichoderma* / *Hypocrea* se encontró prueba de ello y, aunque los ITS proporcionan una pobre resolución filogenética en algunos clados, particularmente de la sección *Pachybasium* B (55), este marcador continúa usándose en la actualidad (14, 17, 18, 28, 33, 36, 56, 57, 58, 59, 60).

Factor de Elongación durante la Traducción (TEF)

El largo intrón de la transcripción (*tef1*) (56) es un fragmento de casi 2 Kb, del cual se pueden usar sus exones o intrones para el análisis filogenético. El fragmento del gen más estudiado y utilizado para la identificación de especies se conoce como *tef1*, el cual incluye al 4to. Intrón, el 5to. Exón, el 5to. Intrón y parte del 6to Exón, y tiene una longitud entre 600 y 650 pb. La secuenciación del factor de elongación de diferentes aislados de *Trichoderma* facilitó la identificación de especies (14, 17, 18, 28, 33, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63), así como la reubicación de especies que por otras técnicas estaban erróneamente ubicadas (64)

Variabilidad en el género *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma* presentan una amplia plasticidad ecológica. Esta característica implica que es posible encontrar variabilidad genética importante, la cual debe ser explorada, caracterizada y fi-

nalmente explotada, con el fin de realizar una selección adecuada de las cepas promisorias. Para el uso de *Trichoderma*, como agente de control biológico, es necesario conocer cómo influyen estos factores bioecológicos en la fisiología de los aislados de este género, su comportamiento en cuanto a los diversos mecanismos de acción que presenta frente a las diurnas que puede controlar y su variabilidad genética.

• Efecto de factores bióticos y abióticos

Dentro de estos factores se encuentran temperatura, pH, humedad relativa, iluminación y los diferentes sustratos que pueden utilizar las diferentes especies y los aislados pertenecientes al género *Trichoderma*. El conocimiento de la influencia de todos estos factores bioecológicos en la fisiología y las potencialidades de *Trichoderma* como agente de control biológico (ACB) son vitales en los procesos de selección de cepas promisorias, su reproducción masiva y su introducción en diferentes agroecosistemas para lograr una máxima efectividad del hongo en el manejo de plagas.

También existe una gran variabilidad en cuanto a los mecanismos de acción que tienen estos aislados como ACB. Entre ellos se citan la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis (65).

Además de su acción biorreguladora, *Trichoderma* actúa de forma indirecta sobre los patógenos a través de la elicitación de mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta, entre los cuales se encuentran: estimulación del crecimiento vegetal y desarrollo del sistema radicular, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos (N y P), inducción de resistencia y tolerancia a estreses bióticos y abióticos (66, 67).

Estos aspectos se analizaron profundamente en un artículo reciente por Martínez *et al.* (4), donde se hace una revisión de diferentes aspectos relacionados con la función de aislados del género *Trichoderma* como ACB y sus potencialidades.

• Variabilidad genética

La variabilidad inter e intraespecífica también puede ser analizada directamente en el ADN. El desarrollo de marcadores moleculares condujo a una intensa investigación y caracterización en plantas, virus, hongos, bacterias, artrópodos, nematodos. El uso de marcadores moleculares dominantes en estudios filogenéticos y de diversidad se justifica porque: 1) a diferencia de los marcadores morfológicos, los marcadores moleculares dominantes exploran múltiples loci a través de todo el genoma, por lo que son más informativos; 2) en el gen analizado pudiera encontrarse

una variación de secuencias insuficiente, la cual se expresa a nivel de fenotipo o esta expresión pudiera estar influenciada por el ambiente; 3) en ocasiones los datos de la secuencia del gen estudiado pueden ser insuficientes para resolver las relaciones filogenéticas entre los grupos de estudio (68).

Es por esto que los marcadores moleculares se convirtieron en una herramienta ampliamente usada en estudios de diversidad y filogenéticos (69, 70, 71), mapeo y mejoramiento (72).

Algunas especies del género *Trichoderma* se caracterizaron con el uso de estas herramientas. Los cuatro tipos de marcadores moleculares más usados para determinar la diversidad genética son: RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism, Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción) (73) (marcador codominante), RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA, Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar) (74), SSR (del inglés Single Sequences Repeat, Secuencias Simples Repetidas) (75) y AFLP (del inglés Amplified Fragments Length Polymorphism, Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados) (76). Cada uno de estos marcadores tiene un poder de discriminación diferente (77).

RFLP

Botstein *et al.* (78) describieron esta técnica, que constituyó el primer marcador de ADN utilizado para construir mapas genéticos de organismos superiores. Dicha técnica se basa en la digestión del ADN con enzimas de restricción (endonucleasas). Cada una de estas endonucleasas (de origen bacteriano), reconoce y corta una secuencia nucleotídica específica de 4-8 pb nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando estas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente, cualquier ADN que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida. Cualquier mutación puntual dentro de esos sitios ocasionará pérdida o creación de un nuevo sitio de restricción en una región del genoma (79).

Es una técnica de alta repetibilidad, que permite detectar variaciones en la secuencia de ADN de 4 a 8 pb reconocidas por las enzimas utilizadas. Se aplicó a un gran número de estudios de construcción de mapas genéticos y mapeo de caracteres de interés. También se usó para resolver problemas taxonómicos o filogenéticos en *Trichoderma* (75, 80).

Posee como ventaja la rápida identificación de rutina, especialmente en los casos de genomas menores; es económica y confiable (si el patrón de bandas coincide con los previamente notificados). Entre las

principales desventajas de la técnica se halla el requerimiento de grandes cantidades de ADN de buena calidad para la detección de loci de copias únicas. Si no se encuentra un patrón de bandas igual al descrito no se logra identificar el organismo y, además, exige de personas especializadas (81, 82).

RAPD

Esta técnica fue descrita por primera vez por Williams *et al.* (83) y Welsh y McClelland (84). Se basa en una PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa), caracterizada esencialmente por condiciones de baja asringencia, con el uso de solo un iniciador arbitrario, con longitud de 9 a 10 nucleótidos y con un contenido de 60-70% de G + C. Las regiones del ADN, homólogas con el iniciador, son amplificadas y generan productos múltiples de loci que se distribuyen en todo el genoma. Dicha característica permitió su utilización en el mapeo, así como en la generación de huellas genéticas (36).

Esta técnica posee diversas ventajas como son la obtención de un alto número de bandas, los cebadores arbitrarios pueden ser adquiridos fácilmente sin necesidad de información nucleotídica inicial, solo se requieren pequeñas cantidades de ADN diana para la amplificación y los costos por ensayo son bajos. El poder de esta técnica se pone de manifiesto cuando se utiliza para identificar variaciones en la secuencia del ADN entre individuos. Por tal motivo, los RAPDs son una técnica muy poderosa para el estudio de la diversidad en la secuencia de una población y la localización de genes (82).

Entre las desventajas se encuentran que son esencialmente dominantes, no hay un conocimiento *a priori* sobre la identidad de los productos de amplificación, existen problemas de comigración y también de baja reproducibilidad de los resultados obtenidos. No obstante, esta última, aparente y discutida desventaja, se supera de manera satisfactoria al establecer adecuadamente los protocolos (85).

Esta herramienta se ha usado para estudios genéticos y taxonómicos en varios hongos, entre los que se incluyen especies del género *Trichoderma* (36). En este sentido, Kumar y Sharma (74) obtuvieron 100% de polimorfismo con cuatro cebadores RAPD para 12 aislados de *Trichoderma* spp. Latha y Mukherjee (86) encontraron, con cinco iniciadores RAPD, gran variabilidad intraespecífica entre las cepas examinadas de *Trichoderma* spp., excepto para dos de *T. hamatum*, que resultaron ser exactamente idénticas. También Hernández *et al.* (87) obtuvieron gran variabilidad intraespecífica en diez aislados de *Trichoderma* spp. con cuatro iniciadores RAPD.

SSR

Los microsatélites son secuencias de uno a diez pares de bases repetidas y adyacentes distribuidas en el genoma. Generalmente consisten en dinucleótidos $(AC)_n$, $(AG)_n$, $(AT)_n$, trinucleótidos $(TCT)_n$, $(TTG)_n$; tetranucleótidos $(TATG)_n$, donde n es el número de unidades repetidas dentro de un *locus* de microsatélite. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (88). Debido a esto, la técnica muestra altos niveles de variación genética basados en la diferencia del número de unidades repetidas en el *locus*. En ella, el número de productos amplificados depende de la frecuencia en que se encuentran los microsatélites utilizados como cebadores. El nivel polimórfico detectado en los productos amplificados puede estar relacionado con la diversidad genómica dentro de la especie.

Al igual que con los RAPDs, los microsatélites tienen la desventaja de que los productos obtenidos varían con las combinaciones usadas, la temperatura de acoplamiento, la concentración del cebador y del magnesio. Se demostró que ocurren problemas con el sitio de reconocimiento del cebador, aún a altas temperaturas de acoplamiento. En este caso, para incrementar la especificidad se recomienda ajustar la temperatura de acoplamiento o aplicar un PCR con decremento de la misma (89). Las reacciones donde se involucran los microsatélites son más específicas que los RAPDs debido a la mayor longitud de los cebadores (15-20mers), por lo que resulta de mayor repetibilidad.

En general, los marcadores desarrollados por microsatélites son altamente polimórficos, generan gran cantidad de información debido al número y frecuencia de los alelos detectados. De aquí que los SSR se han usado satisfactoriamente para estudiar variabilidad genética en especies del género *Trichoderma* (74, 90).

AFLP

La técnica se describió por primera vez por Vos *et al.* (91) y demostró ser extremadamente versátil debido a su confiabilidad, reproducibilidad y potencia; además, porque detecta polimorfismo en todo el genoma. El principio de la técnica es utilizar Amplificación Selectiva de Fragmentos de Restricción de ADN genómico.

Valadez y Kahl (79) mencionaron que los AFLPs surgen a partir de: A) polimorfismos en los sitios de

restricción, donde una secuencia específica por el reconocimiento de una endonucleasa de restricción está presente o ausente; B) polimorfismos en la longitud de la secuencia, donde el número de las secuencias repetidas arregladas en serie («tandem») tienen sitios variables; C) cambios en los pares de bases de ADN no asociados con sitios de restricción. Como desventaja, con respecto al RAPD, esta técnica requiere de más experiencia para su manipulación y, principalmente, de los geles de poliacrilamida (92).

Según Galdames (36), ambas técnicas (RAPD y AFLP) fueron lo suficientemente poderosas para detectar variabilidad genética entre aislados de *Trichoderma*. Sin embargo, a partir de los dendrogramas generados en cada caso, llegaron a conclusiones diferentes acerca de las relaciones genéticas entre individuos. Como resultado obtuvo que las cuatro combinaciones de los cebadores AFLP amplificaron casi el doble del producto en comparación con el número de amplicones obtenidos con los 12 iniciadores RAPDs utilizados. Aunque el polimorfismo que se detectó por los RAPDs fue mayor que el evidenciado por los AFLPs, los dendrogramas generados por este último marcador fueron más robustos, precisos y confiables.

Los resultados obtenidos hasta el momento de los estudios de variabilidad, indican que se debe usar más de un tipo de marcador, teniendo en cuenta los materiales a analizar y las ventajas y desventajas de estas técnicas. En este caso fue posible, mediante los AFLPs, detectar diferencias entre los aislados cubanos con relación a las cepas usadas como referencia, pero no entre ellos, lo que se logró con la técnica de RAPD (datos no publicados).

Debido a la alta variabilidad morfológica existente en las especies del género *Trichoderma*, se han introducido secuencias erróneamente identificadas por caracteres morfológicos en el Genbank; esto debe ser tomado en cuenta cuando se utilicen técnicas moleculares para su identificación.

En general, para realizar una certera identificación, tanto a nivel de especie como para llegar a la clasificación de aislamientos en el género *Trichoderma*, se precisa en la actualidad de la taxonomía polifásica a partir de datos morfofisiológicos y de la introducción de las técnicas moleculares y, sobre todo, de la secuenciación de ácidos nucleicos, teniendo en cuenta los nuevos avances en el tema y los cambios que se están produciendo en los últimos años.

REFERENCIAS

1. Villegas M. *Trichoderma* pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. 2005. Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/tecnica/128-Trichoderma-pers-caracteristicas-y-su-potencialbiologico-en-la-agricultura-sostenible> [Consultado: 11 de marzo 2010].
2. Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Trichoderma* sp. en arroz. *Rev Protección Veg.* 2008; 23(2): 118-125.
3. Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev Protección Veg.* 2009; 24(1):14-21.
4. Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev Protección Veg.* 2013;28(1):1-11.
5. Persoon CH. *Disposita methodica fungorum.* Römer's Neues Mag Bot. 1794;1:81-128.
6. Rifai M. A revision of the genus *Trichoderma.* *Mycol Pap.* 1969;116:1-56.
7. Lieckfeldt E, Samuels G, Nirenberg H. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Applied and Environmental Microbiology.* 1999; 65:2418-2428.
8. Druzhinina I, Kopchinskiy A, Kubicek C. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience.* 2006;47:55-64.
9. Howell C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease.* 2003;87(1):4-10.
10. Harman G. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology.* 2006; 96(2):190-194.
11. Páez O. 2006. Uso Agrícola del *Trichoderma.* Disponible en: <http://www.soilfertility.com/trichoderma/espanol/index.shtml>. [Consultado: 19 de marzo de 2009].
12. González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, et al. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. *Biotecnología Aplicada.* 2012; 29:12-16.
13. Druzhinina I, Kubicek C. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *J. Zhejiang Univ SCI.* 2005;6B(2):100-112.
14. Samuels G, Dodd S, Lu B, Petrini O, Schroers H, Druzhinina I. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology.* 2006;56:67-133.
15. Kuhls K. *et al.* Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93: 7755-7760.
16. Kullnig-Gradinger C, Szakacs G, Kubicek C. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: A multigene approach. *Mycol Res.* 2002;106: 757-767.
17. Chaverri P, Castlebury L, Samuels G, Geiser D. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* / *Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2003;27(2):302-313.
18. Dodd S, Lieckfeldt E, Samuels G. *Hypocrea atroviridis* sp. nov. the teleomorph of *Trichoderma atroviride.* *Mycologia.* 2003; 95: 27-40.
19. Monte E. Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol.* 2001;4:1-4.
20. Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma.* I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can J Bot.* 1984;62:924-931.
21. Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma.* II. Infrageneric classification. *Can J Bot.* 1991a; 69(11):2357-72.
22. Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium.* *Can J Bot.* 1991b; 69(11): 2373-417.
23. Bissett J, A revision of the genus *Trichoderma* IV. Additional notes on section *Longibrachiatum.* *Can J Bot.* 1991c;69:2418-2420.

24. Samuels G, Petrini O, Kuhls K, Lieckfeldt E, Kubicek, C. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud Mycol.* 1998;41:2-54.
25. Gams W, Meyer W. What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia* 1998;90:904-915.
26. Lieckfeldt E, Samuels G, Börner T, Gams W. *Trichoderma koningii*: Neotypification and *Hypocrea* teleomorph. *Can J Bot.* 1998;76:1507-1522.
27. Samuels G, Lieckfeldt E, Nirenberg H. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *Trichoderma viride*. *Sydowia.* 1999;51(1):71-88.
28. Samuels G, Ismaniel A, Bon M, De Respinis S, Petrini O. *Trichoderma asperellum sensu lato* consists of two cryptic species. *Mycologia.* 2010;102:944-966.
29. Samuels G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol Res.* 1996;100(8):923-935.
30. Harman G. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales), 2003. Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html> [Consultado: 2 de Febrero 2007].
31. Rodríguez VJ. Efecto antagonico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofiticos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatogeno causante del (damping off) en plantas de tomate». Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 2002. Disponible en: <http://72.30.186.56/search/cache?p=investigaciones+con+trichoderma> [Consultado: 30 de mayo de 2007].
32. Harman, G. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). 2001. Disponible en: <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.htm>. [Consultado: 2 de febrero de 2010].
33. Pérez CM. Aislamientos de *Trichoderma* spp., nativos de Venezuela, promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en maíz (*Zea Mays* L.). 2012. Trabajo de Grado presentado como requisito final para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía. Venezuela.
34. Jaklitsch W, Samuels G, Dodd S, Lu B-S, Druzhinina I. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud Mycol.* 2006;56:135-177.
35. Begueret J, Turcq B, Clavé C. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. *Trends in Genetics.* 1994;10:441-446.
36. Galdames R. Análisis genético-molecular de la diversidad del hongo patógeno *Sclerotium cepivorum* Berk., y del biocontrolador *Trichoderma* spp. Tesis en Opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas-Biotecnología de Plantas. 2001. Guanajuato. México.
37. Leslie JF. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Review. Phytopathol.* 1993;31:127-150.
38. Stasz TE, Nixon K, Harman GE, Weeden NF, Kuter GA. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism. *Mycologia.* 1989;81:391-403.
39. Barcellos FG, Hungria M, Pizzirani-Kleiner AA. Limited vegetative compatibility as a cause of somatic recombination in *Trichoderma pseudokoningii*. *Brazilian J of Microbiology.* 2011;42:1625-1637.
40. Brimmer TA, Boland GJ. «A review of the non-target effects of fungi used biologically control plants diseases». *Agriculture Ecosystems & Environment.* 2003;100:3-16.
41. Punja ZK, Utkhede RS. Using fungi and yeast to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology.* 2003;21(9):400-407.
42. Gomes EM, Kasuya E, De Barros A, Borges AM. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology.* 2002;25(4):477-483.
43. Zervakis GI, Moncalvo J, Vilgalys R. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology.* 2004;150(3):715-726.

44. Villalobos A, Escobar M, Guzmán G, Guzmán-Dávalos L. Extracción de ADN y amplificación de secuencias de ITS en *Psilocybe* (Agaricales, Fungi). 2005. Avances en la Investigación Científica en la CUCBA. XVI Semana de la investigación Científica. Universidad de Guadalajara, Zapopan. 2005; 548-553.
45. Iturralde J. Identificación genética de hongos. Sociedad Micológica de Madrid. España. 2005. Disponible en: <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias30.html>. [Consultado: 23 de julio 2014].
46. Rentarías M. Herramientas Moleculares. Breve revisión de los marcadores moleculares. 2007; Cap. 18: 541-566.
47. Calle J. Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Tesis en Opción al Grado de Maestro en Ciencias en Agronomía. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico. 2005.
48. Peintner UJ, Moncalvo JM, Vilgalys R. Toward a better understanding of the intrageneric relationships in *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycota). *Mycologia*. 2004;96(5):1042-1058.
49. Guevara GF, Garza OF, Cázares E. Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. *CIENCIA UANL*. 2004;VII(3):371-378.
50. Tedersoo L, Suvi T, Larsson E, Kõljalg U. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycol Res*. 2006;110:734-748.
51. Herrera P. Aislamiento de *Tulasnella* spp. (Basidiomycota) a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epifitas. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico Universidad Técnica Particular de Loja. 2007.
52. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. *et al.* (Eds.), *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. 1990; 315-322.
53. Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Meyer W, Kubicek CP, Börner T. Revision of *Trichoderma* section *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*. 1997;89(3):442-60.
54. Lieckfeldt E, Seifert KA. An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the Hypocreales. *Stud Mycol*. 2000;45:35-44.
55. Druzhinina I, Kopchinskiya A, Komoña M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek C. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*. 2005;42(10):813-828.
56. Taylor J, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics Biol*. 2000;31:21-32.
57. Mukherjee P, Verma A, Latha J. PCR fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collection-a need for re-identification of these economically important fungi. *Science Correspondence*. 2002;83(4):372-374.
58. Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J. Genetic and metabolic biodiversity of Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*. 2009; pag. 303-320.
59. Hoyos-Carvajal L, Bissett J. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. *The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*. *Fungal Genetics and Biology*. 2010;46(9):615-631.
60. Devi P, Prabhakaran N, Kamil D, Pandey P, Lekha BJ. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. *African J of Biotechnology*. 2012;11(85):5150-5160.
61. Seibel C, Tisch D, Kubicek CP, Schmoll M. The role of pheromone receptors for communication and mating in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Fungal Genetics and Biology*. 2012;49:814-824.
62. Druzhinina I, et al. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genet Biol*. 2012; 49(5): 358-368.
63. Barrera VA. El género *Hypocrea* Fr. (*Hypocreales*, *Ascomycota*) en la Argentina.

- Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias. Fuente: Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. 2012.
64. Martínez B, Infante D, Reyes Y. About to identification of some *Trichoderma* isolates reported in Revista de Protección Vegetal. Rev Protección Veg. 2010;25(2):135.
65. Harman G. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 2000;84:377-393.
66. Harman, G. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 2006;96(2):190-194.
67. Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalberti EL, Marraa R, Woo L, Lorito M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry. 2008;40:1-10.
68. Simmons SL, Bazyliński DA, Edwards KJ. Population dynamics of marine magnetotactic bacteria in a meromictic salt pond described with qPCR. Environ Microbiol. 2007;9(9):2162-2174.
69. Marhold K, Lihova J, Perny M, Bleeker W. Comparative ITS and AFLP analysis of diploid *Cardamine* (Brassicaceae) taxa from closely related polyploid complexes. Annals of Botany. 2004;93:507-20.
70. Sasanuma T, Chabane K, Endo TR, Valkoun J. Characterization of genetic variation in and phylogenetic relationships among diploid *Aegilops* species by AFLP: incongruity of chloroplast and nuclear data. Theoretical and Applied Genetics. 2004;108:612-618.
71. Furini A, Wunder J. Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. Theoretical and Applied Genetics. 2004;108:197-208
72. Thabuis A, et al. Marker-assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. Molecular Breeding. 2004;14:9-20.
73. Ali A, Bajwa R, Mehmood N, Jabeen R. Molecular Screening of *Trichoderma* isolates. J. Bio-Sci. 2009;17:117-122.
74. Kumar MA, Sharma P. Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. African J. of Biotechnology. 2011;10(22):4532-4543.
75. Kretzner AM, Molina R, Spatafora JW. Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*. Mol Ecol. 2000;9:1190-1191.
76. Buhariwalla HK, Srilakshmi P, Kannan S, Kanchi RS, Chndra S, Satyaprasad K, et al. AFLP analysis of *Trichoderma* spp. from India compared with sequence and morphological-based diagnostics. J of Phytopathology. 2005;153(7-8):389-400.
77. Couteaudier Y, Viaud M, Neuveglise C, Bridge P, Clarkson J. Combination of different independent molecular markers to understand the genetic structure of *Beauveria* populations. In: Molecular variability of Fungal Pathogens. Bridge P. and Couteaudier Y. (eds) CAB International, Wallingford. 1998; pp 95-104.
78. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RV. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Amer J Hum Genetic. 1980;32:314-331.
79. Valadez E, Kahl G. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). 1era edición. Mundi-Prensa. 147p. 2000.
80. Ahmad Israr, Bhagat Someshwar, Kumar Krishna, Birah Ajanta, Tripathi AK, Madhuri K, et al. PCR-RFLP marker based DNA amplified fragments and diversity assessment of *Trichoderma* spp. from Andaman and Nicobar Islands. J of Mycopathological Research. 2012;50(1):55-59.
81. Segura G, Luis E, Kirchmayr Manuel R, Flores B, Ericka P, Gschaedler M, et al. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. e-Gnosis. 2010;8:1-12.
82. Cornide MT, Arencibia RA, Berovides VA, Calvo DP, Canales EL, Coto OA, et al. Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de plantas. Ed. Félix Varela. 367 Págs., 2002.

83. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(22):6531-6535.
84. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(24):7213-7218.
85. Rifalski JA. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. En: *DNA markers: protocols, application and overviews*. Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff (eds.) Wiley-VCH. 1997;5:75-83.
86. Latha J, Verma A, Mukherjee P. PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collections - a need for re-identification of these economically important fungi. *Current Science.* 2002;83(4):372-374.
87. Hernández A, Jiménez M, Arcia A, Ulacio D, Méndez N. Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. mediante RAPD y rADN-ITS. *Bioagro.* 2013;25(3):167-174.
88. Coltman DW, Bowen DW, Weith JM. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Molecular Ecology.* 1996;5:161-163.
89. Vogel JM, Scolnik PA. Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat-based polymorphisms without cloning. En *DNA markers: protocols, application and overviews*. Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff (eds.). Wiley-VCH. 1997;9:133-150.
90. Stenglein SA. Caracterización de *Trichoderma* con marcadores moleculares ISSR y RAPD. Conferencia en Taller Latinoamericano: Biocontrol de fitopatógeno con *Trichoderma* y otros antagonistas. Ciudad de La Habana Cuba 28-31 marzo 2006. Abstract. *Fitosanidad.* 2006;10(2):138-139.
91. Vos AP, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4407-4414.
92. Macías FO, Delgado CY, Peña ME, León BR, Elías BR. Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. 30p. 2006. Disponible en: <http://www.bibliociencias.cu/gsd1/collect/libros/index/assoc/HASH01d2/441186ed.dir/doc.pdf>. [Consultado 12 de junio 2014].

Recibido: 20-11-2014.
Aceptado: 10-9-2015.