

CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp.

ISOENZYMATIC CHARACTERIZATION OF ISOLATED FROM *Trichoderma* spp.

Luis A. Salazar*, Glenda Y. Aponte*, Nelly H. Sanabria**, Efraín Salazar* y Luis Castro***

*Investigadores y ***TAI, respectivamente. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).
Unidad de Protección Vegetal. Laboratorio de Bacteriología, Micología y Biotecnología Agrícola.

**Profesora. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía.
Instituto de Botánica Agrícola. Apdo. 4579. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

Correo electrónico: luisagronomia@gmail.com; gaponteve@gmail.com; salabrian@cantv.net; efra63@gmail.com

RESUMEN

Recientemente se ha demostrado que las técnicas isoenzimáticas son de gran apoyo a los criterios morfológicos tradicionales para la clara delimitación dentro y entre especies, así como la relación que existe en las pruebas patogénicas y electroforéticas de los microorganismos. La investigación tuvo como objetivo implementar el uso de técnica de isoenzimas para caracterizar la variabilidad genética de aislados de *Trichoderma* spp. Se emplearon diez aislados del género *Trichoderma*, entre ellos: *T. harzianum*, *T. koningiopsi*, *T. longibrachiatum* y *T. atroviride* provenientes del sur en el estado Aragua y al norte en el estado Guárico. Se evaluaron doce sistemas isoenzimáticos: alfa y beta esterasa, alcohol deshidrogenada, malato deshidrogenada, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa, glutamato oxalacetato transaminasa, isocitrato deshidrogenasa, enzima málica, glucofosfo isomerasa, glutamato deshidrogenasa. Asimismo, se realizó un cluster utilizando métricamente la distancia de similitud de Jaccard, los datos se analizaron aplicando el programa Past®, Versión 1.55. Según los patrones electroforéticos para isoenzimas existe variabilidad en los aislados debido a la formación de cuatro grupos que corresponden a las localidades de colectas y no a las especies de *Trichoderma* evaluados. El análisis de agrupamiento (cluster) reveló la formación de aislados en cuatro grupos: I y II procedente del estado Aragua; el III proveniente de zonas de producción de los estados Guárico y Aragua; el IV originario del estado Guárico.

Palabras Clave: electroforesis; isoenzimas; variabilidad genética.

SUMMARY

Recently it has been shown that the techniques are highly isozyme support traditional morphological criteria clearly delineated within and between species, as well as the relationship between pathogenic and electrophoretic tests among these microorganisms. The research aimed to implement the use of isozyme technique to characterize the genetic variability of isolates of *Trichoderma* spp. Were used *Trichoderma* isolates including: *T. harzianum*, *T. koningiopsi*, *T. longibrachiatum* and *T. atroviride* from southern Aragua State and northern Guárico State. Isozyme twelve systems were evaluated: alpha and beta esterase, alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, peroxidase, glutamate oxaloacetate transaminase, isocitrate dehydrogenase, malic enzyme, glucofosfo isomerase, glutamate dehydrogenase. Cluster was performed using as a metric distance (the distance of Jaccard similarity), the data is analyzed using Past® Version 1.55. According to the isoenzyme electrophoretic patterns there is variability in the isolates, this due to the formation of four groups corresponding to the locations of collections and not evaluated *Trichoderma* species. Cluster analysis (cluster) revealed the formation of 4 groups. I and II, formed by isolates from of Aragua State. The III, composed of the isolated from production areas Guárico and Aragua States, consisting of Group IV isolates from Guárico State.

Key Words: electrophoresis; genetic variability; isoenzyme.

INTRODUCCIÓN

La clasificación de los hongos está basada principalmente en las características morfológicas relacionadas con hifas vegetativas, estructuras de reproducción asexual y sexual, color, forma y septación de las esporas. El uso de caracteres morfológicos para clasificar hongos a nivel de especie es tradicional y vigorosamente definido (Sanabria, 1998). Sin embargo, la técnica isoenzimática provee un medio bioquímico aceptable para distinguir especies de *Aspergillus* (Nealson y Garben, 1967; *Peronosclerospora* (Micales *et al.*, 1988); *Colletotrichum* (Gantoti y Davis, 1993), entre otros. Estos autores señalan que el análisis de isoenzimas representa una herramienta útil para el estudio de la variabilidad genética intraespecífica de los hongos fitopatógenos.

En Venezuela se realizaron estudios electroforéticos que permitió establecer diferencias y semejanzas entre las especies por *Fusarium oxysporum* y *F. verticillioides* (Sanabria 1998; García 2011). Asimismo, se logró identificar la raza dos por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* presente en siembras de tomate en zonas de producción de los estados Aragua y Guárico (norte), presentando variabilidad interna (Lugo, 1998).

Recientemente, varios investigadores demostraron que las técnicas isoenzimáticas son de gran apoyo a los criterios morfológicos tradicionales para la clara delimitación dentro y entre especies, así como la relación que existe en las pruebas patogénicas y electroforéticas de estos microorganismos (Magnano *et al.*, 1995).

Las cepas de *Trichoderma* se diferencian entre sí por los niveles de expresión de las enzimas hidrolíticas, lo cual determina sus características antagónicas. *Trichoderma* puede parasitar la hifa del hongo fitopatógeno mediante enrollamientos, ganchos y cuerpos de tipo apresorios que penetrando la pared celular por la acción hidrolítica de las enzimas quitinasas y glucanasas. Ésto es posible porque la pared celular de los hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp., está compuesta principalmente por β -1.3-glucanos y quitina, con celulosa encontrada en los *Oomycetes*, como *Pythium* spp. (González, 2012).

En esta investigación se implementó el uso de la técnica de isoenzimas para caracterizar la diversidad genética de aislados de *Trichoderma* spp., así como evaluar su efectividad en el control de la fusariosis del tomate y el grado de agresividad que presenten en cada una de estas pruebas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis isoenzimáticos se llevaron a cabo en la Unidad del Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA – CENIAP) en Maracay.

Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.

Los aislados de *Trichoderma* spp. utilizados en todas las pruebas fueron obtenidos en zonas de producción de cultivos de tomate, sorgo y cebolla del sur del estado Aragua y al norte del estado Guárico. Se colectó 1 kg de suelo aproximadamente, cerca de la rizosfera de estas plantas, donde el mismo estuvo en condiciones de humedad a capacidad de campo.

En el Cuadro 1 se muestra el tipo de cultivo presente en el lugar y las localidades donde se colectaron las muestras de suelo que posteriormente son procesadas para aislar *Trichoderma* spp. De los aislados obtenidos, ocho se colectaron durante esta investigación y dos corresponden a los productos ofrecidos por casas comerciales para el control biológico de enfermedades en plantas.

CUADRO 1. Procedencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Aislamiento	Cultivo presente	Procedencia
A1	Tomate	El Sombrero, estado Guárico
B2	Prod. comercial	El Sombrero, estado Guárico
C3	Prod. comercial	Desconocida
D4	Tomate	El Sombrero, estado Guárico
E5	Tomate	El Sombrero, estado Guárico
F6	Sorgo	Palo Negro, estado Aragua
G7	Tomate	El Pao, estado Aragua
H8	Cebolla	Palo Negro, estado Aragua
I9	Sorgo	Palo Negro, estado Aragua
J10	Tomate	Camatagüa, estado Aragua

Procesamiento de las muestras de suelos para aislar *Trichoderma* spp.

Seguidamente de la colecta bajo condiciones de laboratorio se tomaron 10 g de suelo de cada uno de los sitios colectados y se le agregaron 90 ml de agua destilada estéril (ADE) contenidos en una erlenmeyer, siendo ésta la solución madre.

Luego se realizaron diluciones en tubos de ensayo con 9 ml de ADE, a las cuales se le agregaron 1 ml de la solución madre para obtener diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} ; de cada dilución se colocó 1 ml en platos de Petri de 100 x 15 mm de dimensión.

Por último, se les agregó 15 ml de medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA), se extendió cada una de las diluciones en el plato correspondiente, realizando por cada dilución cuatro réplicas, estas se colocaron a incubar a 28 °C, por un lapso de 24 a 48 h, tomándose parte del crecimiento del hongo y se sembró en cultivos unicelulares para la obtención del cultivo puro y a partir de allí replicar.

Los aislados comerciales estaban en presentación sólida (liofilizado), se multiplicaron en medio de cultivo PDA y se incubaron a la misma temperatura que los aislados colectados, con la finalidad de obtener la colonia del hongo para las posteriores pruebas.

Identificación de las especies de *Trichoderma* utilizadas

Una vez alcanzados los aislados puros, se procedió a su identificación taxonómica a nivel de especie, considerando las características fundamentales descritas por Rifai (1969) y Bisett (1991 a, b, y c).

Extracción de proteínas

La preparación del tejido y la extracción de proteínas se hizo mediante una modificación de los protocolos descritos por Bonde *et al.* (1991), Marlatt *et al.* (1996) y Sanabria, 1998.

Se utilizaron colonias puras de cada uno de los aislados cultivados durante 7 d en medio de cultivo PDA. A partir de éstas, se trasladaron tres secciones tomadas con la punta de una micropipeta de cada colonia en ocho frascos que contenían 50 ml de un medio de cultivo líquido de caldo papa – dextrosa y se colocaron por 4 d en agitación continua a temperatura entre 26 y 28 °C. El micelio formado se destiló al vacío en un papel de filtro Watman N° 1, se hizo un lavado con ADE secándolo con papel de filtro y se colocó en congelación.

Para obtener el extracto proteico, el micelio congelado fue macerado en un mortero adicionándole tampón de extracción Tris – Glicina a pH 8,3 en una proporción de 3:1 (g de micelio/ml de buffer). El macerado se realizó en morteros fríos colocados en una cama de hielo.

Una vez obtenido el extracto, se centrifugó la suspensión a 18 000 rpm por 10 min en una centrifuga Sorvall rotor SS-34. Luego se colectó el sobrenadante y se mantuvo en congelación hasta el momento de realizar la corrida electroforética.

Preparación de las muestras

Para la separación electroforética las muestras se prepararon adicionando 120 µl del extracto (sobrenadante), 5 µl de azul de bromofenol al 1% y 50 µl de glicerol al 85%.

Preparación del gel

Los geles se elaboraron de acuerdo a una modificación de los métodos descritos por (Marlatt *et al.*, 1996). La separación electroforética se realizó en una cámara Sigma minidual vertical, se empleó un sistema discontinuo de geles de poliacrilamida con un gel concentrador al 5% y un gel separador al 10%, de 1 mm de espesor cada uno.

Una vez polimerizados los geles, se colocaron en la cubeta de la cámara electroforética y se le adicionó el buffer Tris – Glicina, a pH 8,3 como buffer de corrida añadiendo por carril 10 µl de cada una de las muestras.

Electroforesis y visualización enzimática

La separación electroforética se realizó a un voltaje constante de 100 V y 80 mA de corriente a 4 °C durante 3 h. Las bandas de las isoenzimas se visualizaron sumergiendo los geles en una solución de tinción específica para cada sistema de isoenzimas, evaluando 12 isoenzimas (Cuadro 2). La tinción se realizó en oscuridad y posteriormente el gel se lavó con ADE y se procedió a interpretar los zigmogramas.

Interpretación de los geles

El registro de las bandas fue de naturaleza cualitativa, registradas en un código binario (bandas: 0 ausente y 1 presente). Esta información se adquirió para cada banda del sistema enzimático de los aislados. A partir de esta información se generó una matriz binaria que permitió establecer los patrones electroforéticos para cada aislamiento. Las corridas de los aislados se realizaron por duplicado. El análisis de agrupamiento (cluster) se utilizó como distancia métrica para la similaridad de Jaccard y los datos se analizaron utilizando el programa Past®, Versión 1.55.

CUADRO 2. Isoenzimas evaluadas y la constitución de las soluciones para cada sistema isoenzimático.

Isoenzima	Nomenclatura Universal de las enzimas	Constitución
α -esterasa, (α -EST)	EC 3.1.1.1.1	50 ml buffer fosfato pH 6.3, 25 mg fast blue RR y 25 mg α -naphthyl acetate.
β -esterasa (β -EST)	EC 3.1.1.1.2	50 ml buffer fosfato pH 6.3, 25 mg fast blue RR y 25 mg β -naphthyl acetate.
Alcohol Deshidrogenasa (ADH)	EC 1.1.1.1	50 ml buffer Tris HCl, 0,1 M pH 7,5; 15 mg NAD ⁺ ; 2 mg PMS; 10 mg MTT y 3 ml de etanol.
Malato Deshidrogenasa (MDH)	EC 1.1.1.37	50 ml buffer Tris 0,1 M pH 7,5; 1,5 ml DL-malato 1 M pH 7,5; 15 mg NAD ⁺ ; 2 mg PMS y 10 mg MTT
Fosfatasa ácida (ACP)	EC 3.1.3.2.	50 ml buffer acetato 50 mM pH 5,5; β – ácido naftilfosfato de sodio 1% en acetona 50%; 0,5 ml MgCl ₂ 1 M y 50 mg fast garnet GBC sal.
Fosfatasa alcalina (ALP)	EC 3.1.3.1	50 ml buffer Tris 50 mM pH 8,5; 0,5 ml Mg Cl ₂ 1 M; 0,5 ml MnCl ₂ 1 M; 50 mg fast blue RR sal y 1,5 ml
Peroxidasa (PRX)	1.11.1.7	α – naftilfosfato de sodio 1% en acetona al 50%. 35 ml buffer NaH ₂ PO ₄ 1 M, 25 g O-Dianisidina, 75 μ l (solución al 30 %) de H ₂ O ₂ y 15 ml de metanol.
Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT)		50 ml de solución sustrato para GOT y 50 mg de Fast blue RR sal.
Isocitrato deshidrogenasa (IDH)	1.1.1.42	50 ml buffer Tris 0,1 pH 8, 2 ml MgCl ₂ (10%), 150 mg ácido isocítrico, 1 ml MTT, 100 μ l NADP y 100 μ l de PMS.
Enzima málica (ME)	1.1.1.40	50 ml buffer Tris 0,1 pH 8, 1 ml MTT, 40 μ l NADP, 300 μ l de PMS, 350 mg ácido L-málico y 2 ml de MgCl ₂ (10 %).
Glucofosfo isomerasa (GPI)	5.3.1.9	50 ml buffer Tris 0,1 pH 8, 1 ml MTT, 1 ml NAD, 400 μ l PMS y 30 mg fructose 6-fosfato.
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	1.4.1.3	50 ml buffer Tris 0,1 pH 8, 1 ml MTT, 1 ml NAD, 300 μ l PMS, 200 mg ácido L-glutámico y 1 ml de MgCl ₂ (10 %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las especies de *Trichoderma* utilizadas

Las características de los aislados correspondieron a la descripción taxonómica dada por Rifai (1969) y Bissett (1991^a, 1992^b y 1991^c), en el Cuadro 3 se muestran cada uno de los aislados identificados a nivel de especie, ubicándolas de la siguiente manera: cuatro se relacionó

a *T. harzianum*, cuatro con *T. koningiopsi*, uno para *T. longibrachiatum* y uno correspondió a *T. atroviride*.

Caracterización isoenzimática de los aislados de *Trichoderma* spp.

De los 12 sistemas isoenzimáticos evaluados, solo seis indicaron polimorfismos en el revelado de las bandas, siendo éstos α -esterasa, β -esterasa, malato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, alcohol deshidrogenasa y fosfatasa ácida.

CUADRO 3. Identificación taxonómica de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Nombre del aislado	Sección	Especie <i>Trichoderma</i>
A1	<i>Longibrachiatum</i>	<i>T. longibrachiatum</i>
B2 (Prod. comercial)	<i>Pachybasium</i>	<i>T. harzianum</i>
C3 (Prod. comercial)	<i>Pachybasium</i>	<i>T. harzianum</i>
D4	<i>Trichoderma</i>	<i>T. koningiopsi</i>
E5	<i>Trichoderma</i>	<i>T. koningii</i>
F6	<i>Trichoderma</i>	<i>T. atroviride</i>
G7	<i>Trichoderma</i>	<i>T. koningiopsi</i>
H8	<i>Trichoderma</i>	<i>T. koningiopsi</i>
I9	<i>Pachybasium</i>	<i>T. harzianum</i>
J10	<i>Pachybasium</i>	<i>T. harzianum</i>

El número de bandas en los geles varió según el sistema isoenzimático utilizado, para las α -esterasas se obtuvieron cinco bandas (Figura 1), para las β -esterasas seis bandas (Figura 2), la malato deshidrogenasa reveló cuatro bandas (Figura 3), la fosfatasa alcalina siete bandas (Figura 4), la alcohol deshidrogenasa tres bandas (Figura 5) y para la fosfatasa ácida cuatro bandas (Figura 6).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Grondona *et al.* (1997), quienes realizaron una caracterización isoenzimática a 15 aislados de *T. harzianum*, obteniendo para el caso de la fosfatasa ácida un revelado de seis bandas, cinco para la fosfatasa alcalina, la malato deshidrogenasa reveló 15 bandas.

El sistemas isoenzimático α -esterasa, reveló al menos una banda para cada aislado, en el caso de las β -esterasas, no se detectó presencia de bandas en A1, G7 y H8. La malato deshidrogenasa no obtuvo actividad enzimática en B2, D4 y G7 y para la fosfatasa alcalina no se detectó actividad en C3 y D4. Grondona *et al.* (1997) señalan que algunos aislados no presentaron actividad enzimática. Estos resultados indican que la técnica isoenzimática pudo identificar todos los aislados evaluados, demostrando que con seis sistemas utilizados para cada aislado se logró un perfil de bandas de isoenzimas característico, lo cual se convierte en su identificación isoenzimática y se presenta en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Patrones electroforéticos de los aislamientos de *Trichoderma* spp., basados en análisis isoenzimáticos.

	Aislados									
Isoenzimas	A1	B2	C3	D4	E5	F6	G7	H8	I9	J10
α -esterasas	A	B	C	C	D	E	F	A	A	G
β -esterasas	A	B	B	C	D	D	A	A	D	E
MDH	A	B	C	B	A	D	B	C	E	E
AKP	A	A	B	B	C	D	E	F	B	G
ADH	A	A	A	A	A	B	C	C	D	D
ACP	A	B	B	C	C	D	E	F	G	H

Nota: las letras corresponden a los patrones de bandas obtenidas tal y como se presentan en las Figuras 1 a la 6.

El análisis de agrupamiento (cluster), utilizando como distancia métrica la distancia euclidiana, reveló la formación de cuatro grupos (Figura 7). Grupo I formado por los aislados H8, G7 y J10, procedente del estado Aragua. Grupo II derivado por el I9, estado Aragua. Grupo III conformado por los F6 y E5 exhibieron igual coeficiente de similaridad, siendo estos pertenecientes a las especies *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma koningiopsi*, lo cual significa que estos aislados guardan información común en su constitución genética. Los aislados A1, B2, C3 y D4 pertenecientes al grupo IV provienen de zonas de producción del estado Guárico, a excepción del aislamiento C3, al cual no se le conoció su procedencia. Estos resultados sugieren que la población es genéticamente heterogénea.

De los resultados mostrados anteriormente, se puede inferir mediante el análisis de los sistemas isoenzimáticos, que los aislados se agrupan según la zona geográfica de donde fueron aislados, y no según la especie taxonómica a la cual pertenecen o al grado de agresividad que puedan tener para controlar un patógeno en particular. Este fenómeno pudiera deberse a lo señalado por Lugo (1998), quien indica que pudieran existir varias causas, por ejemplo, las características morfológicas que están altamente influenciadas por el ambiente, pudiera deberse a que los genes de variabilidad isoenzimática presentan baja correspondencia con la variabilidad de los genes para las características morfológicas.

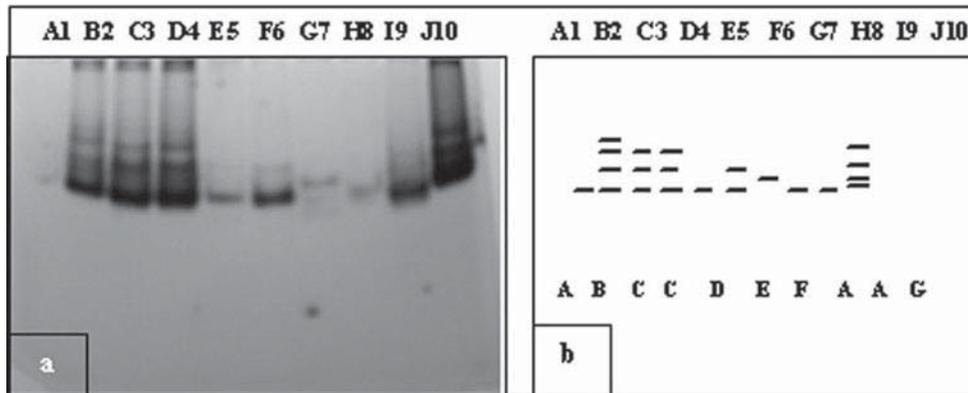


FIGURA 1. Bandas de isoenzimas de α – esterasas (α -EST) en los 10 aislados de *Trichoderma* spp. (a) fotografía original del gel, b) digitalización del Zimograma.

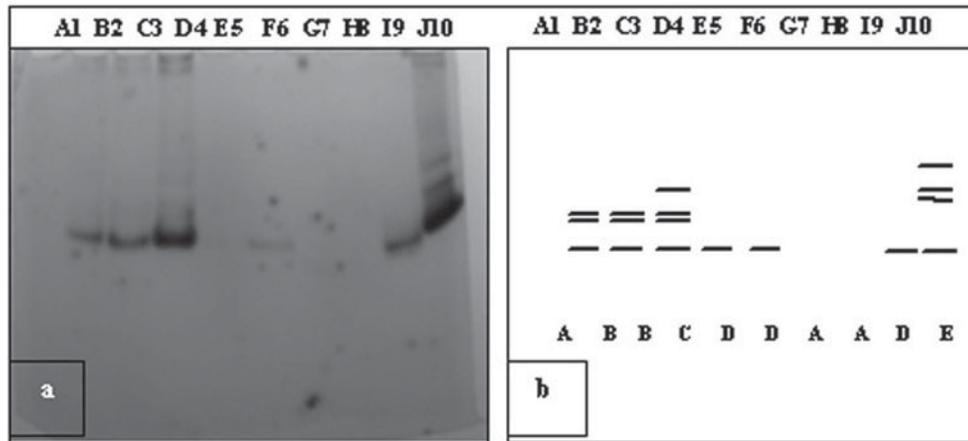


FIGURA 2. Bandas de isoenzimas de β – esterasas (β -EST), en los 10 aislados de *Trichoderma* spp. (a) Fotografía original del gel, b) Digitalización del Zimograma.

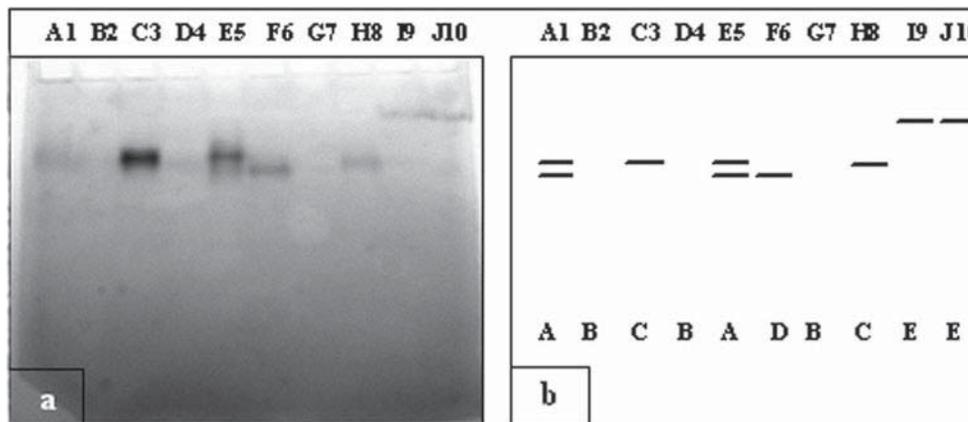


FIGURA 3. Bandas de isoenzimas de Malato deshidrogenasa (MDH), en los 10 aislados de *Trichoderma* spp. (a) Fotografía original del gel, b) Digitalización del Zimograma.

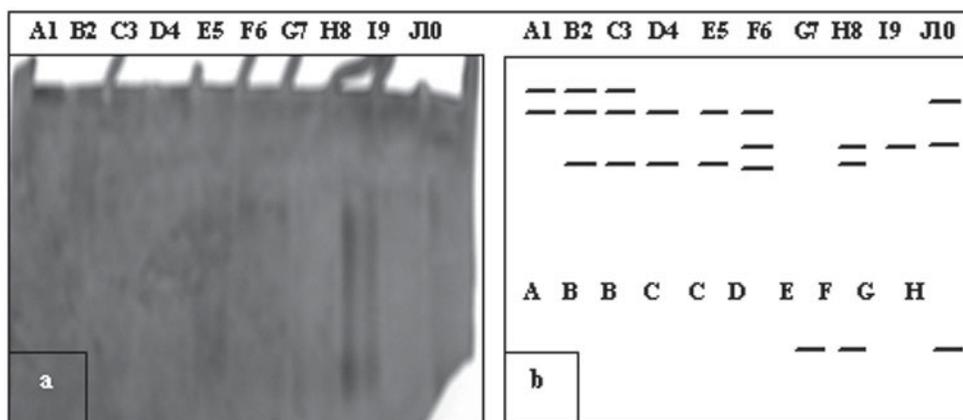


FIGURA 4. Bandas de isoenzimas de Fosfatasa Alcalina (AKP), en los 10 aislados de *Trichoderma* spp. (a) Fotografía original del gel, b) Digitalización del Zimograma.

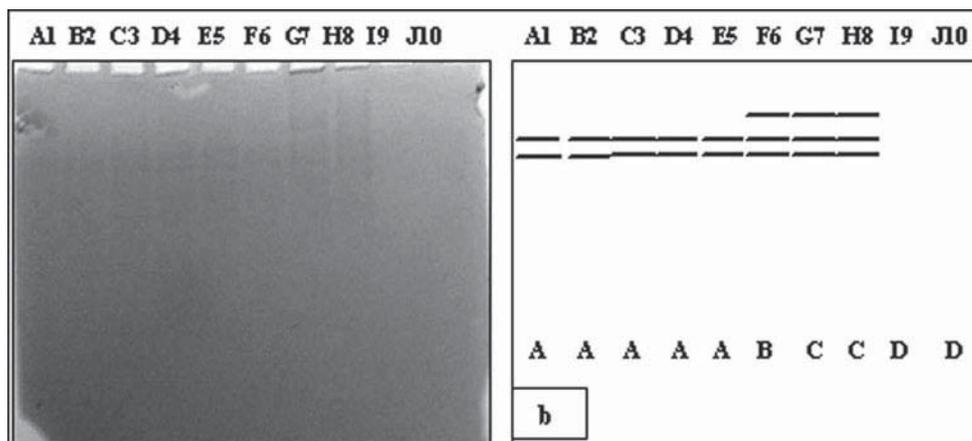


FIGURA 5. Bandas de isoenzimas de Alcohol Deshidrogenasa (ADH), en los 10 aislados de *Trichoderma* spp. (a) Fotografía original del gel, b) Digitalización del Zimograma.

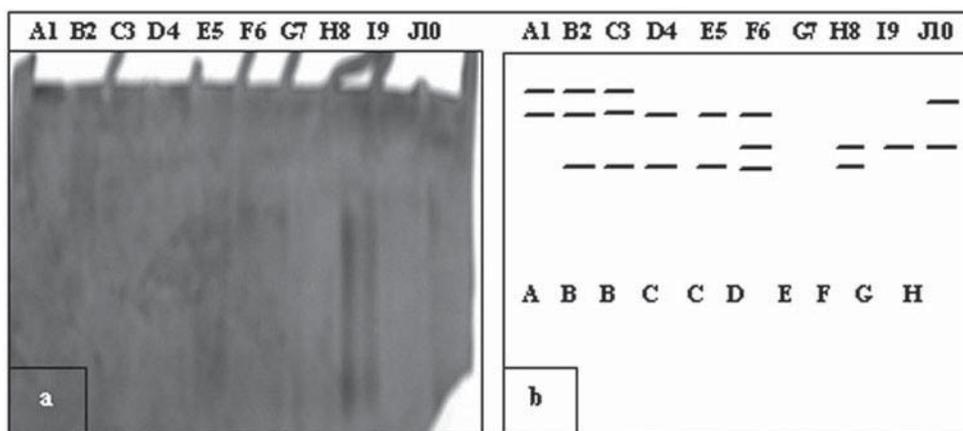


FIGURA 6. Bandas de isoenzimas de Fosfatasa Ácida (ACP), en los 10 aislados de *Trichoderma* spp. (a) Fotografía original del gel, b) Digitalización del Zimograma.

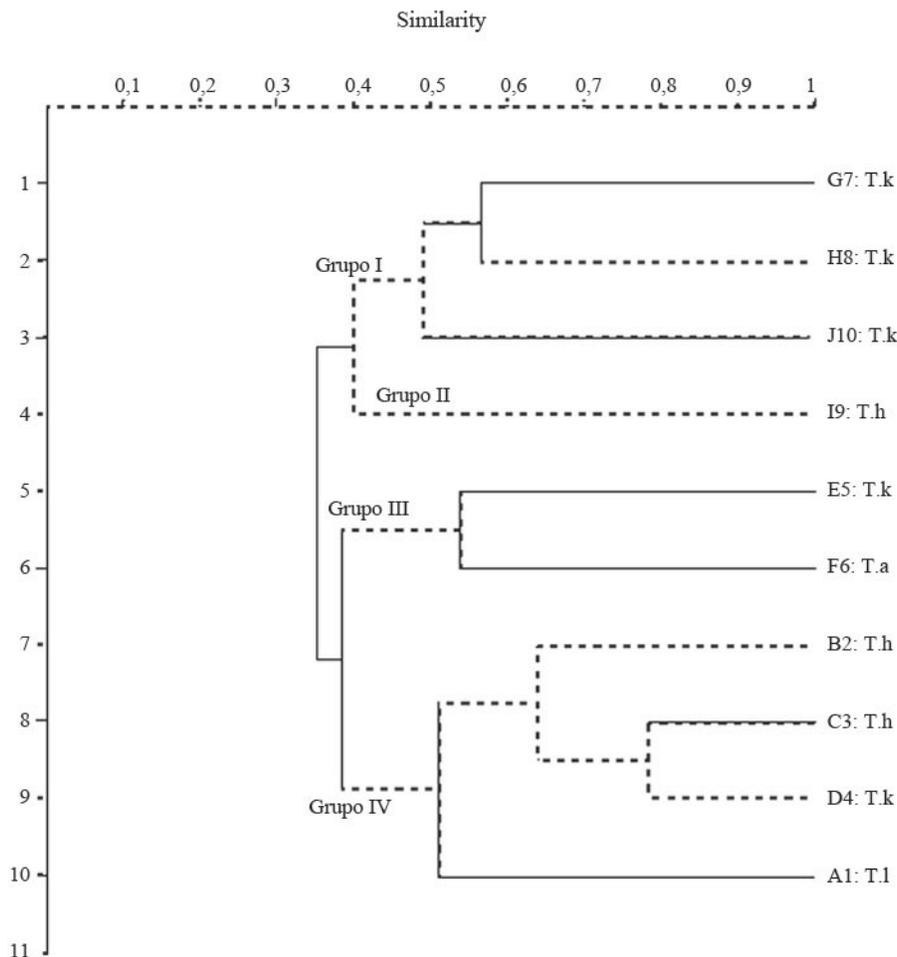


FIGURA 7. Análisis de agrupamiento UPGMA basado en la distancia de similaridad de Jaccard para 10 aislados de *Trichoderma* spp.

Asimismo, Grondona *et al.* (1997) evaluaron 15 aislamientos de *T. harzianum* colectados de diferentes países del continente Europeo, encontraron variabilidad a nivel isoenzimático y molecular y señalan que estas diferencias pudieran deberse al medio ambiente o a las condiciones ecológicas de donde se colectó el aislado.

Hermosa *et al.* (2000) consideran que las condiciones del ambiente son importantes en el momento de seleccionar un biocontrolador, aunado a las evaluaciones taxonómicas, para así, mejorar el aprovechamiento de la especie a utilizar.

También señalan que mediante la secuenciación y amplificación de ADN ribosomal lograron analizar filogenéticamente 33 especies del género *Trichoderma* provenientes de diferentes partes del mundo.

Por su parte, Stasz *et al.* (1989) usaron isoenzimas para evaluar las relaciones morfológicas y filogenéticas entre especies del género *Trichoderma* y *Gliocladium*, encontrando que existe correlación entre ellas, evidenciando un alto número de alelos que pueden ser el resultado de cambios genéticos entre los aislados.

El análisis de isoenzimas fue utilizado para estudiar el efecto que puede generar el ambiente sobre la diversidad genética de una población de hongos, tal es el caso de Micales *et al.* (1988) quienes señalan que mediante análisis de componentes principales y análisis de cluster con isoenzimas en el hongo *Suillus tomentosus* (Kauffman) Singer, Snell and Dick, obtuvieron que el hábitat y la selección del hospedador puede ser el responsable de la variación genética de este hongo en la mayoría de las regiones forestales.

CONCLUSIÓN

- A través de la técnica isoenzimática se pudo identificar a todos los aislados evaluados, por tanto, con los seis sistemas evaluados que presentaron polimorfismos se obtuvo un perfil de bandas de isoenzimas característico para cada uno, de esta manera este patrón se convierte en la identificación isoenzimática para estos aislados.
- Mediante el análisis de los sistemas isoenzimáticos se reveló un agrupamiento más cercano a la zona geográfica de donde fueron aislados que a la especie taxonómica a la cual pertenecen o al grado de agresividad que puedan tener para controlar un patógeno en particular
- El ambiente juega un papel importante en el comportamiento de los aislados de *Trichoderma*, lo cual nos permite inferir qué especie debemos utilizar en el momento de aplicar en una zona de producción agrícola determinada y de esta forma garantizar el éxito en cuanto al desarrollo y colonización, posteriormente su efecto inhibitorio en los patógenos que deseamos controlar.

BIBLIOGRAFÍA

- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* II. Intrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69:2.357-2.372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69:2.373-2.414.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma* IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69:2.418-2.420.
- Bonde, M., G. L. Peterson and J. L. Y. Maas. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology* 81:1.523-1.528.
- Gantoti, B. and M. Davis. 1993. Pectic zymogram analysis for characterizing genetic diversity of the mango anthracnose pathogen. *Acta Horticulturae* 341:353-359.
- García, J., A. Trigos, L. Andreu, N. Estevez y M. Luna. 2011. Variaciones Isoenzimática y Patogénica de *Fusarium* spp., asociadas con la pudrición de tallo y raíz de vainilla. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13:299-306.
- González, I., D. Infante, B. Martínez, Y. Arias, N. González, Ll. Miranda y B. Peteira. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp., promisorias como agentes para el control biológico. *Biotecnología Aplicada* 29:7-11.
- Grondona, I., M. R. Hermosa, M. Tejada, M. D. Gomis, P. F. Mateos, P. D. Bridge, E. Monte and I. Garcia-Acha. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3.189-3.198.
- Hermosa, M. R., I. Grondona, I. A. Iturriaga, J. M. Díaz-Minguez, C. Castro, E. Monte and I. Garcia-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology 66(5):1 890-1 898.
- Lugo F., Zunilde C. 1998. Identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder & Hansen procedentes de algunas zonas productoras del estado Aragua y norte de Guárico. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay 101 p.
- Magnano, G., F. Scala and Q. Michelli. 1995. Moderne technique diagnostiche in mycologie phytopathology. *Petria* 5:53-90.
- Marlatt, M., J. Correll and P. Kaufman. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the united States. *Plant Disease* 80:1 336-1 342.
- Micales, J. A., R. M. Bonde and G. L. Peterson. 1986. The use of isoenzymes analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* 27:405-449.
- Micales, J. A., R. M. Bonde and G. L. Peterson. 1988. Isoenzyme analysis and aminopeptidase activities within the genus *Peronosclerospora*. *Phytopathology* 78:1 396-1 402.
- Nealson, K. and E. Garber. 1967. A electrophoreses survey of esterases, phosphatases and lemineaminopectidasas in micelial extracts of species of *Aspergillus*. *Mycología* 59:330-336.

- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*.
Mycological paper N° 116.
- Sanabria de, A. N. 1998. Serología y electroforesis para
identificación de tres especies de *Fusarium*. Tesis de
doctorado. Maracay, Ven. Universidad Central de
Venezuela 102 p.
- Stasz, Nixon, G. Harman and F. Weeden. 1989. Evaluation
of phonetic species and phylogenetic relationships
in the genus *Trichoderma* by cladist analysis of
isozyme polymorphism. *Mycologia* 81:391-403.