



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios  
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-056

---

---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017  
**ISBN 978-84-941695-2-6**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Especies de *Trichoderma* spp. nativas de plantaciones de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) en Aragón.

KARINA SOLÍS<sup>1,2</sup>, ANA GARCÉS-CLAVER<sup>1</sup>, SERGIO SÁNCHEZ-DURÁN<sup>1</sup>, SERGI GARCÍA-BARREDA<sup>1</sup>, MARÍA MARTÍN<sup>1</sup>, PEDRO MARCO<sup>1</sup>, MIRIAM ESCÓS<sup>1,2</sup>, JUAN J. BARRIUSO<sup>2</sup>

1 Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) IA2.

2 Universidad de Zaragoza, IA2

### Resumen

Las Trufas son fructificaciones comestibles de hongos ectomicorrícicos. Muchos estudios se orientan a la búsqueda de modelos de gestión sostenibles con el entorno en el manejo de plagas, nos interesaba la utilización de agentes de biocontrol del género *Trichoderma*. Los aislamientos se efectuaron o bien a través de diluciones seriadas de muestras de suelo, en medio selectivo TSM (*Trichoderma* Selective Medium) o directamente de segmentos de la parte externa del carpóforo de la Trufa negra. Se identificaron las especies aisladas por caracteres morfológicos y técnicas moleculares. El ADN, se amplificó y secuenció la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico nuclear. La identificación de especies se efectuó mediante comparación con las secuencias contenidas en las bases de datos *TrichOKey* (<http://www.isth.info>) y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las especies nativas de las truferas, correspondieron a dos de las cuatro secciones de *Trichoderma*. Se identificaron en total 11 especies de *Trichoderma*, seis correspondieron a la Sección *Pachybasium* (*T. harzianum*, *T. tomentosum*, *T. pleuroticola*, *T. virens*, *T. rossicum* y *T. polysporum*) la cual contiene a la mayoría de anamorfos descritos para esta especie, y las cinco especies restantes correspondieron a la Sección *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. koningii*).

### Palabras clave

ADN, *TrichOkey*, GeneBank.

### 1. Introducción

La trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.), se encuentra en asociación simbiote formando ectomicorrizas con las raíces de especies leñosas, principalmente robles y avellanos, Este hongo emite hifas que penetran en el suelo, suministrándoles nutrientes adicionales que la planta no es capaz de explotar. A cambio, la planta le sintetiza nutrientes y le proporciona un hábitat adecuado siendo en la proximidad de las raíces durante el invierno, donde fructifica dando un carpóforo hipogeo al que se denomina trufa.

Debido a sus características organolépticas, la trufa negra es reconocida como una auténtica delicia de la gastronomía y la cultura europea, siendo la especialidad de sofisticados platos, debido a su aroma y sabor.

En los últimos años, la demanda mundial de este hongo se ha incrementado, sin embargo, la oferta de la producción mundial de trufa negra en los últimos 100 años, ha decaído de cerca de

2.000 a 50 toneladas/año. El cambio climático, especialmente la modificación del régimen hídrico y otros factores como la presencia del jabalí son algunas de las razones de la disminución drástica de la producción de trufa silvestre en el arco mediterráneo.

*Trichoderma* Persoon es un género de hongos imperfectos, de reproducción asexual (del Deuteromicetes o Adelomicetes) (anamorfo), considerado como un grupo de vida libre. Sus especies son comunes en los ecosistemas de suelo y rizosfera, pudiendo ser oportunistas, no virulentas, simbioses de plantas y micoparásitas (Harman *et al.*, 2004), aunque son ubicuos en la micoflora edáfica (Samuels, 1996) y sobre restos de materia orgánica, algunas especies como *T. harzianum* Rifai, puede ser cosmopolita, mientras que otras están geográficamente limitadas como *T. polysporum* (Link) Rifai, que es de tierras más frías (Samuels, 2006).

Las especies de *Trichoderma* pueden estimular los mecanismos de defensa de la planta, aumentando la capacidad de resistencia al ataque de patógenos, ya sea por la alteración de la fisiología vegetal, lo cual se denomina protección sistémica o resistencia inducida, o por el crecimiento de la planta, fortaleciendo sus sistemas naturales de defensa, lo que se asocia con un buen estado sanitario de la planta (Harman, 2000; Druzhinina *et al.*, 2011), induciendo la expresión génica relacionada con la defensa de las plantas, a través de las vías del ácido salicílico y el ácido jasmónico (Malmierca *et al.*, 2012).

*Trichoderma*, se encuentra mejor adaptado a suelos ácidos que a los alcalinos, que son los necesarios para el desarrollo de la trufa negra. Los suelos truferos de España, fundamentalmente son básicos o subbásicos, con pH 7.5 a 8.5, la presencia de Carbonato cálcico proveniente del material originario del suelo (roca madre y pedregosidades) es un requerimiento indispensable para el cultivo de *T. melanosporum* (García-Barreda *et al.*, 2012),

## 2. Objetivos

Aislamiento e Identificación morfológica y molecular (secuenciación de la región ITS (ITS1-gen 5.8S rRNA-ITS2) del ADNribosomal) de especies nativas del género *Trichoderma* de localidades truferas en Aragón.

## 3. Metodología

Aislamiento de *Trichoderma* nativo de truferas.

En laboratorio se aislaron colonias de *Trichoderma* Pers., procedentes de muestras de suelos truferos, de ectomicorizas de *Tuber melanosporum* Vittad. y de peridio de trufa negra. Las colonias en crecimiento se caracterizaron morfológicamente. Las especies aisladas se identificaron molecularmente mediante la secuenciación de la región ITS del ADNribosomal.

Se recolectaron muestras de suelo de truferas, sil vestres y cultivadas con encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Scop) Desf. Samp.), quejigo (*Q. faginea* Lam.) o avellano (*Corylus avellana* L.) de menos de 10 diez años y micorizadas con *T. melanosporum*. Las localizaciones fueron en la Sierra del Moncayo en la provincia de Zaragoza (Aragón), Litago, Añón, Vera del Moncayo, San Bartolomé, San Agustín, Orrios y Pancrudo (Provincia Teruel) y la Comarca de la Ribagorza en Huesca. La

colección de suelos de las plantaciones se realizó siguiendo metodología de “muestreo de suelos por cilindros” de Sánchez (2012).

Se efectuó el cultivo y aislamiento de colonias de *Trichoderma* a partir de diluciones seriadas a partir de un gramo de suelo homogeneizado de cada muestra en TSM (Medio de cultivo selectivo para *Trichoderma*), cuyos componentes inhiben el desarrollo de bacterias y principalmente hongos y oomicetos de crecimiento rápido (Askew y Laing, 1993) (Figura 1).

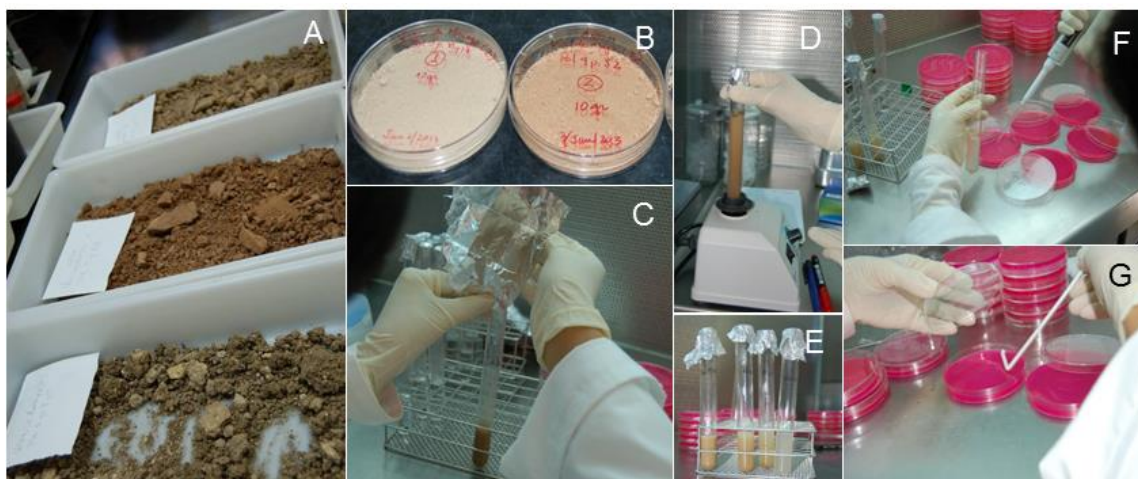


Figura 1. Procesamiento de muestras de suelo. A) Homogenización del suelo. B) Suelo seco y tamizado. C) Dilución madre. D) Homogenización en vortex. E) Diluciones seriadas. F) Siembra de 100ul de dilución en placas Petri con TSM. G) Distribución uniforme con asa de Drigalski.

Los experimentos se efectuaron en placas de Petri plásticas estériles de 90mm de diámetro, conteniendo 15mL del medio de cultivo. Los bioensayos se realizaron con colonias de hongos rejuvenecidas, es decir cultivadas en PDA a 24°C durante siete-diez días en oscuridad y con sacabocados (5mm de diámetro) se cortaron discos del micelio de los hongos. En el grupo de hongos aislados se incluyó la cepa T50 (*T. harzianum*) nativa de plantación trufera (Sánchez, 2012), RMI (*Trichoderma* sp) y TC (*Trichoderma* cepa comercial) de la colección de *Trichoderma* del laboratorio. Conforme a simple vista se observaron colonias características de *Trichoderma* (Barnett y Hunter, 1999) y con diferencias morfológicas entre sí, éstas se purificaron en placas Petri con PDA y codificaron de acuerdo a su origen.

#### Identificación microscópica de *Trichoderma* spp.

La identificación de los géneros y especies de todos los microorganismos obtenidos se realizaron con claves especializadas y las descripciones de *Trichoderma* en la base de datos en-línea (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>) que permite diferenciar a las especies del género *Trichoderma* mediante caracteres morfológicos (Samuels et al., 2014).

#### Aislamiento de ADN genómico y PCR de región ITS

El ADN ribosómico (ADNr) extraído de *Trichoderma* spp., se utilizó como molde para amplificar la región ITS1 e ITS2 (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Underhill y Iliev, 2014) por PCR, con los cebadores universales ITS1-ITS4 (White et al., 1990; Gardes et al., 1991; Gardes y Bruns, 1993

Se incluyó un control negativo (coctel de reactivos sin ADN molde) y un control positivo (ADN de cepa T50). Las PCRs se realizaron en termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler)

#### Electroforesis de los fragmentos ITS

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis horizontal en Agarosa 1% y SYBR® Safe-DNA 10% Invitrogen (Anexo 1). Se depositaron 25µL de la PCR en cada pocillo del gel. La electroforesis se efectuó a 100 Voltios durante una hora. Se visualizó el gel y bandas amplificadas con el sistema de fotodocumentación SynGene, en mesa de luz ultravioleta G:Box, la captura de imágenes se realizó con el programa GeneSys. El tamaño de las bandas se estimó con la escalera de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

#### Purificación y secuenciación del fragmento ITS

El producto de amplificación de cada PCR (banda esperada entre 600 bp), se purificó del gel de Agarosa con el kit QIAquick® Gel Extraction de QIAGEN. Se verificó la calidad del ADN a través de electroforesis horizontal en Agarosa 1.2%. El ADN purificado (región ITS) se envió a secuenciar en ambas direcciones (5´-3´y 3´-5´) con Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, a la empresa STABVida (Caparica, Portugal).

Análisis de secuencias ITS e identificación molecular en bases de datos *TrichoKey*, *TrichoBLAST* y *BLAST*®

Las secuencias nucleotídicas de la región ITS (ITS1 - gen 5.8S rRNA - ITS2), se alinearon usando el algoritmo Clustal W, se editaron con el programa BioEdit (Biological sequence alignment editor) versión 7.0.0 (Hall, 1999), disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Se generó una secuencia consenso con las cadenas hacia adelante "Forward" (Cebador ITS1) y hacia atrás "Reverse" (Cebador ITS4). En la secuencia consenso, se ubicaron los sitios de hibridación de los cebadores y se recortó, ésta secuencia correspondió a la región final del gen 18S (cebador ITS1) e inicial del gen 28S (cebador ITS4 reverso complementario). Se identificó el número de nucleótido correspondiente a la región ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S.

La búsqueda de identidad de cada secuencia consenso obtenida, se realizó a través de comparaciones con la base de datos *TrichoKey* version 2.0, específica para el género *Trichoderma* de la Subcomisión Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea* ISTH disponible en <http://www.isth.info/> (Druzhinina et al., 2005), *TrichoBLAST* (Kopchinskiy et al., 2005) y con la base de datos disponibles en el registro nucleotídico del Genbank del Centro Nacional de Información en Biotecnología NCBI, utilizando la herramienta *BLAST*® (Basic Local Alignment Search Tool) para alinear las secuencias (Altschul et al., 1990), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en el Genbank.

#### Agrupamiento genético de *Trichoderma* spp.

El análisis molecular de las secuencias ITS para su agrupamiento se realizó con el programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.0 (Tamura et al., 2013). Se reconstruyó el árbol de secuencias de ADN con el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), se compararon las

similitudes con el análisis de remuestreo Bootstrap (Felsenstein, 1985) y se contruyó el árbol filogenético con las distancias genéticas entre secuencias, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004).

#### 4. Resultados y Discusión

Con el programa BioEdit (v 7.0.0) se editaron las secuencias consenso de las cadenas hacia adelante “forward” (generada por cebador ITS1) y hacia atrás “reverse” (generada por cebador ITS4) de la región ITS1-gen 5.8S rRNA-ITS2. Las comparaciones de las secuencias con la base de datos *TrichOKey* y *TrichoBLAST*, nos permitió identificar todos los aislamientos, que correspondieron a once especies diferentes de *Trichoderma* y se clasificaron en su clado correspondiente como puede apreciarse en el Tabla 1.

Tabla1. Especies de *Trichoderma* encontradas y su clado correspondiente según las bases de datos (Druzhinina et al., 2005; Jaklitsch et al., 2006)

Clado	Especies de <i>Trichoderma</i> (Bissett et al., 2015)	N° Aislados
I Clado Lixii-Catoptron o Clado Harzianum	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai, Mycol. Pap. 116:38. 1969.	17
	<i>Trichoderma pleuroticola</i> S.H. Yu & M.S. Park, in Park & al., Mycobiology 34:112. 2006.	4
	<i>Trichoderma tomentosum</i> Bissett, Can. J. Bot. 69:2412. 1992	3
II Clado Virens	<i>Trichoderma virens</i> (J. H. Miller, Giddens & A. A. Foster) Arx, Nova Hedwigia Beih. 87:288. 1987.	4
V Clado Stromaticum	<i>Trichoderma rossicum</i> Bissett, C.P. Kubicek & Szakács, in Bissett & al., Can. J. Bot. 81:578. 2003.	1
IX Clado Pachybasioides	<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai, Mycol. Pap.116:18. 1969.	4
XII Clado Rufa o Clado Viride	<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karsten, Finl. Mögelsvamp.: 21. 1892.	2
	<i>Trichoderma koningii</i> Oudemans, in Oudemans & Koning, Arch. Néerl. Sci. Exactes nat. sér. 2:291.1902.	3
XII Clado Rufa o Clado Viride. Clado tipo 3 "Large Viridescens"	<i>Trichoderma gamsii</i> Samuels & Druzhinina, in Samuels & al., Stud. Mycol. 56:168. 2006.	15
	<i>Trichoderma viridescens</i> (A.S. Horn & H.S. Williamson) Jaklitsch & Samuels, in Jaklitsch & al., Stud. Mycol. 56:156. 2006.	1
XIII Sección Pachybasium "A" o Clado Hamatum	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bain., Bull. Soc. Mycol. Fr. 22:131. 1906.	1

#### Agrupamiento genético de secuencias ITS

El análisis filogenético de las 58 secuencias de nucleótidos para la relación evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining.



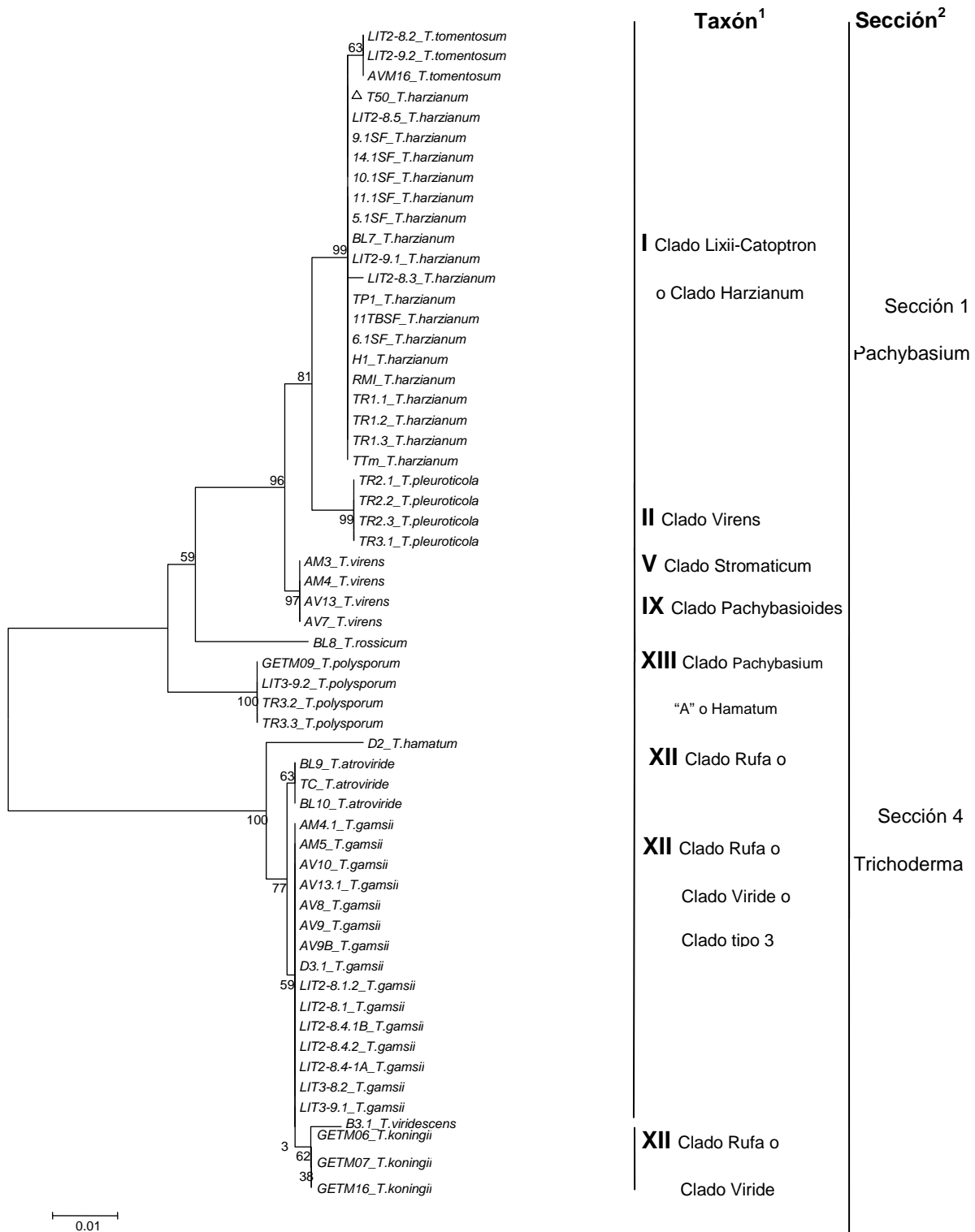


Figura 2. Árbol filogenético de los 58 aislamientos de *Trichoderma* spp., obtenido con Neighbor-Joining, los números corresponden a los valores Bootstrap mostrando las distancias evolutivas en el árbol y agrupados en su taxón y sección.

<sup>1</sup> Druzhinina et al., 2005, 2006; <sup>2</sup> Jaklitsch et al., 2006

El árbol óptimo se obtuvo con la suma de la longitud de rama igual a 0.18413426, el porcentaje de replicas de los taxones asociados agrupados con la prueba de Bootstrap (500 réplicas) se muestran en las ramas del árbol filogenético (Fig. 2).

Las especies aisladas correspondieron a dos de las cuatro secciones de *Trichoderma* establecidas por Druzhinina y Kubicek (2005), 33 aislamientos pertenecieron a la Sección 1 y 22 aislamientos a la Sección 4 *Trichoderma*. Los aislamientos correspondieron a 6 Clados de los 13 descritos por Druzhinina *et al.* (2005, 2006); Druzhinina y Kubicek (2005); Samuels (2006) y Jaklitsch *et al.* (2006), agrupándose en I Clado Harzianum (24), XII Clado Rufa o Viride (21), IX Clado Pachybasioides (4), II Clado Virens (4), V Clado Stromaticum (1) y XIII Clado Pachybasium "A" o Hamatum (1).

En el árbol filogenético, se observó el agrupamiento de 33 aislamientos de las especies *T. tomentosum*, *T. harzianum*, *T. pleuroticola*, *T. virens*, *T. rossicum* y *T. polysporum* correspondieron a la Sección 1 Pachybasium. Los 22 aislamientos restantes de las especies *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. viridescens* y *T. koningii* pertenecieron a la Sección 4 *Trichoderma*.

La Sección 1 Pachybasium tiene seis clados y la Sección 4 *Trichoderma* tiene tres clados (Druzhinina y Kubicek, 2005; Druzhinina *et al.*, 2005; 2006; Jaklitsch *et al.*, 2006). En este estudio encontramos especies que representan a cuatro clados de la Sección 1 y dos clados de la Sección 4.

En la Sección 1 Pachybasium, encontramos al I Clado Lixii-Catoptron o Clado Harzianum con las especies *T. harzianum*, *T. tomentosum* y *T. pleuroticola* que formaron un grupo homogéneo. En los aislamientos de *T. harzianum*, la cepa T50 (representada con un triángulo) se agrupó con el resto de aislamientos de esta especie con valores Bootstrap de 99.

En el II Clado Virens, se agruparon los aislamientos de *T. virens* de dos localidades con valores Bootstrap de 97. El V Clado Stromaticum estuvo representado por *T. rossicum* y por último en el IX Clado Pachybasioides se agruparon aislamientos de distintos orígenes de *T. polysporum* con valores Bootstrap de 100.

En la Sección 4 *Trichoderma*, encontramos el XIII Clado Pachybasium "A" o Hamatum con la especie *T. hamatum* y el XII Clado Rufa o Clado Viride con las especies *T. atroviride* y *T. koningii*, este clado ha sido propuesto por Jaklitsch *et al.* (2006) como Tipo 3 "Large Viridescens" para *T. gamsii* y *T. viridescens*.

De forma previa, o paralela, se obtuvieron resultados similares con la identificación morfológica de las colonias y microscópica de los aislados (Figura 3). Las descripciones de las características morfológicas del aislamiento TR2.3, concuerdan con las descritas para *T. pleuroticola* (Park *et al.*, 2006). La colonia forma pústulas de color blanco en toda la colonia y esporula abundantemente hacia los bordes en anillos concéntricos de color verde amarillento y oscuro. Esta especie se asemeja a *T. harzianum* en la morfología piramidal de los conidióforos, las filidies son ampuliformes dispuestas en verticilios de 2 a 4. Los conidios son de color verde palido, de forma subglobosa y pared lisa. El largo de las filidies es mayor en *T. pleuroticola* (Figura. 3)



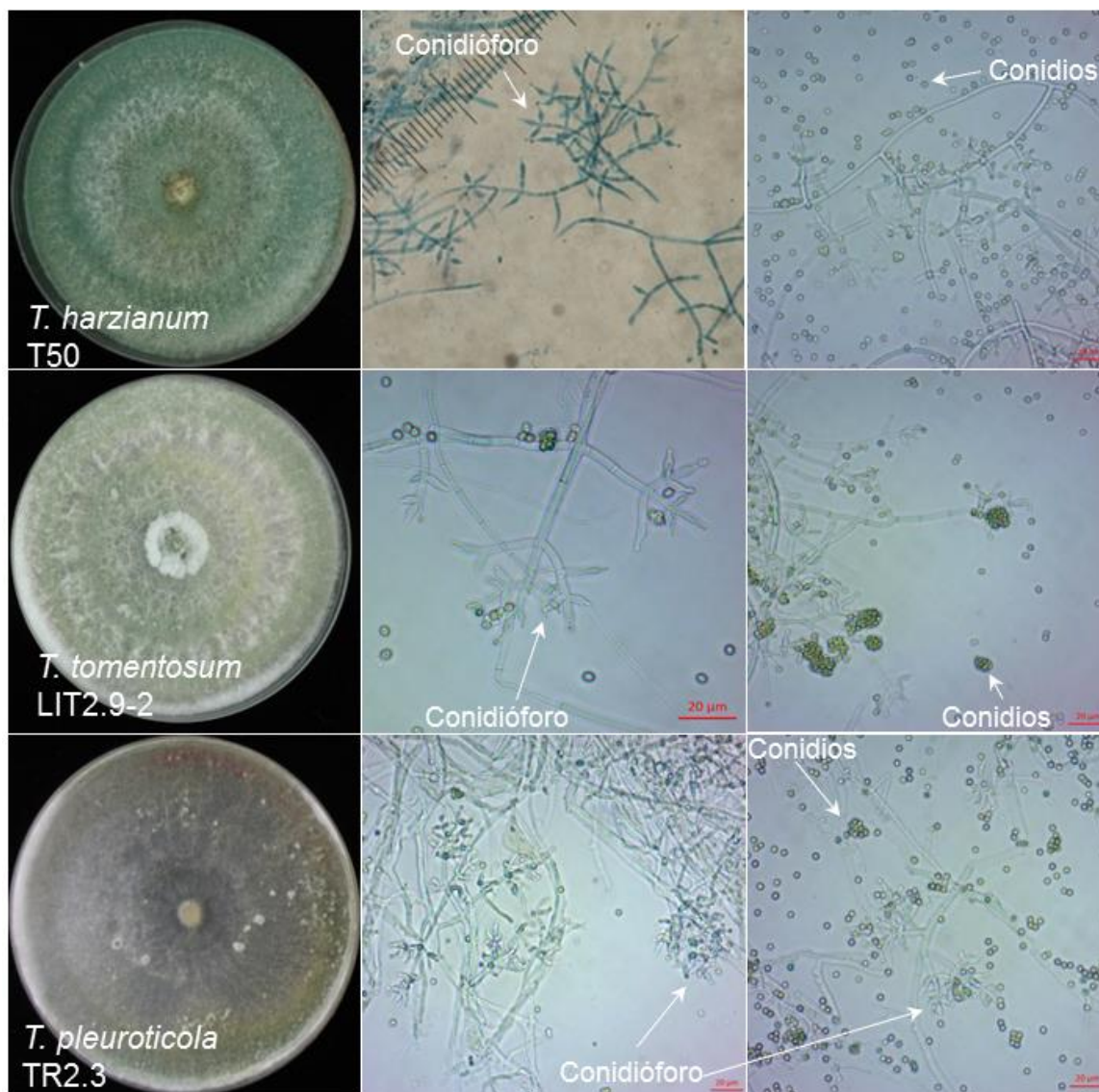


Figura 3. Características morfológicas de especies de *Trichoderma* de Sección 1 *Pachybasium*, Clado I *Lixii-Catoptron* o *Harzianum*.

## 5. Conclusiones

La aparición de once especies diferentes pertenecientes al género *Trichoderma* y pertenecientes a siete Clados diferentes, nos indica la gran complejidad y diversidad de organismos asociados a los ecosistemas truferos, tanto silvestres como los producidos con trufas cultivadas.

## 6. Agradecimientos

Este estudio ha sido posible gracias a la financiación de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación - SENESCYT del Gobierno Nacional de la República de Ecuador. Agradecemos la colaboración de Sandra Soriano y a Mari Navarro por su asistencia técnica.

## 7. Bibliografía

ASKEW, D.J.; LAING, M.D. 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology* 42(5):686-690.  
doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01553.x

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 1 3, 5: 403–410

BARNETT, H.L.; HUNTER, B. B. 1999. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4<sup>a</sup> Ed. APS Press. USA. 218 pp.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science* 6B(2):100-112.

DRUZHININA, I.S.; KOPCHINSKIY, A.G.; KOMON, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*. 42(10):813-828.

DRUZHININA, I.S.; KOPCHINSKIY, A.G.; KUBICEK, C.P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55-64. doi: 10.1007/s10267-006-0279-7.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):783-791.

GARCÍA-BARREDA, S.; REYNA, S. D.; PÉREZ, B.R.; RODRÍGUEZ, B.; DOMINGUEZ, J.A. 2012. Ecología de la trufa y las áreas truferas. *In*. Truficultura. Fundamentos y Técnicas. S. Reyna D. (Editor-Coordenador). Ediciones Mundi-prensa. pp. 151-206.

GARDES, M.; WHITE, T.J.; FORTIN, J.A.; BRUNS, T.D.; TAYLOR, J.W. 1991 Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, 1991, Vol. 69, No. 1 : pp. 180-190.  
doi: 10.1139/b91-026

GARDES M.; BRUNS TD 1993 ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113–118.

HARMAN, G. 2000. Myths and dogmas of Biocontrol, changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4): 377-393.

JAKLITSCH, W.M.; SAMUELS, G.J.; DODD, S.L. LU, B-S.; DRUZHININA, I.S. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 55:135-177.

KULLNIG-GRADINGER, C. M.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P. 2002. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106(07):757-767. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756202006172>

MALMIERCA, M.G.; CARDOZA, R.E.; ALEXANDER, N.J.; MCCORMICK, S.P.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. 2012. Involvement of *Trichoderma* Trichothecenes in the Biocontrol Activity and Induction of Plant Defense-Related Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 14: 4856 – 4868.

SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The Neighbor-Joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425.

SAMUELS, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* 100:923-935.

SAMUELS, G.J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96:195-206.

SAMUELS, G.J.; CHAVERRI, P.; FARR, D.F., MCCRAY, E.B. 2014. *Trichoderma* Home, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. [en línea] consultado en mayo 13 del 2014. <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>

SÁNCHEZ, D.S. 2012. Ectomicorrizas en el cultivo de Trufa negra: ecología, diversidad y gestión. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza. 276 p

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11030-11035.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.

UNDERHILL, D.M.; ILIEV, I.D. 2014. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology* 14(6):405-416. doi:10.1038/nri3684

WHITE – T.J.; BRUNS T.D.; LEE, S.; TAYLOR J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White TJ (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego.