

# ASLAMIENTO Y SELECCIÓN *in vitro* DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. PARA EL BIOCONTROL DE *Fusarium* sp. EN *Euphorbia pulcherrima*

## ISOLATION AND *in vitro* SELECTION OF NATIVE STRAINS OF *Trichoderma* spp. FOR THE BIOCONTROL OF *Fusarium* sp. IN *Euphorbia pulcherrima*

Osuna-Canizalez, F.J.<sup>1\*</sup>; Canul-Ku, J.<sup>1</sup>; García-Pérez, F.<sup>1</sup>; Ramírez-Rojas, S.<sup>1</sup>; Rangel-Estrada, S.<sup>1</sup>; Patricio-Paredes, L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Zacatepec. Carretera Zacatepec-Galeana km 0.5, Zacatepec, Morelos, México.

\*Autor de correspondencia: osuna.felipe@inifap.gob.mx

### ABSTRACT

Plant wilting due to root rot caused by *Fusarium* sp. is one of the main diseases of poinsettia in Morelos, so that many sprays of chemical fungicides are done to control the disease. This research has as main objective to look for native strains of *Trichoderma* spp. with potential to be used as biocontrol agents against the pathogen. From regional materials used as organic components of potting mixes to grow poinsettia, a number of *Trichoderma* spp. strains were isolated and purified; at the same time, from symptomatic poinsettia plants, strains of *Fusarium* sp. were isolated and purified. Nine strains of *Trichoderma* spp. and five strains of *Fusarium* sp. were selected to be evaluated *in vitro* by the technique of dual culture. Performance of the *Trichoderma* spp. strains to compete for space and nutrients, micoparasitism and antibiosis was evaluated; regression models with best fit were defined for the radial colony growth variable. All the *Trichoderma* spp. strains had higher colony growth rate than *Fusarium* sp. strains; three of the *Trichoderma* spp. strains had a high micoparasitism activity and one showed a strong capacity to modify the color of the growing media. The biocontrol mechanisms of *Trichoderma* spp. against pathogens were observed and it was possible to select the most promising strains.

**Keywords:** *Euphorbia pulcherrima*, wilting, root rot, dual culture, micoparasitism, antibiosis.

### RESUMEN

La secadera de plantas por pudrición de la raíz, causada por *Fusarium* sp., es una de las principales enfermedades de la nochebuena en Morelos, por lo que, para su control se hacen continuas aplicaciones de fungicidas químicos. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo buscar cepas nativas de *Trichoderma* spp. con potencial para el biocontrol del patógeno. Se obtuvieron materiales regionales que se utilizan como componentes orgánicos de sustratos para nochebuena, de los que se aislaron y purificaron gran número de cepas de *Trichoderma* spp.; al mismo tiempo, de raíces de plantas de nochebuena infectadas, se aislaron y purificaron cepas de *Fusarium* sp. Se pre-seleccionaron nueve cepas de *Trichoderma* spp., las cuales se evaluaron *in vitro*, contra tres cepas seleccionadas de *Fusarium* sp., mediante la técnica de cultivos duales. Se evaluó la habilidad de competencia de las cepas de *Trichoderma* spp. por espacio y nutrientes, micoparasitismo, y antibiosis; también, se definieron modelos de regresión con el mayor ajuste para la variable crecimiento radial de colonias. Todas las cepas de *Trichoderma* spp. tuvieron mayores tasas de crecimiento radial que las cepas del patógeno; tres cepas de *Trichoderma* spp. mostraron alta capacidad de micoparasitismo y otra más mostró gran capacidad para modificar radicalmente el color del medio de cultivo. Se observaron los diferentes mecanismos de biocontrol de patógenos en las cepas de *Trichoderma* spp. confrontadas con *Fusarium* sp., lo que permitió seleccionar a las más promisorias.

**Palabras clave:** *Euphorbia pulcherrima*, secadera, pudrición de raíz, cultivos duales, micoparasitismo, antibiosis.

**Agroproductividad:** Vol. 11, Núm. 7, julio, 2018. pp: 21-27.

**Recibido:** julio, 2017. **Aceptado:** febrero, 2018.

## INTRODUCCIÓN

**En México,** en 2014 se reportó una producción de 14.7 millones de plantas terminadas de nochebuena, de las cuales Morelos contribuyó con 6.1 millones de plantas, para ubicarse como el mayor productor a nivel nacional (SIAP, 2014).

En Morelos, uno de los principales problemas fitosanitarios del cultivo de nochebuena, es la muerte por marchitez de la planta, causada por la pudrición de la raíz (Osuna *et al.*, 2012), cuyo patógeno es *Fusarium* sp. (García *et al.*, 2009).

Para el control de esta enfermedad, se utiliza un gran número de fungicidas de síntesis química (García, 2009), lo que incrementa el costo de producción y los riesgos a la salud humana.

El uso de agentes de control biológico para prevenir o controlar enfermedades en plantas cultivadas, es una alternativa sustentable que ha mostrado efectividad en amplio número de casos (Lorito *et al.*, 2010).

Productos a base de *Trichoderma* son los más recomendados a nivel mundial como agentes de biocontrol (Woo *et al.*, 2015; Harman *et al.*, 2010). Adicionalmente, algunos metabolitos secundarios sintetizados por *Trichoderma* spp., tienen propiedades de regulación de crecimiento y estimulación de mecanismos de defensa de la planta (Mutawila *et al.*, 2016; Kotasthane *et al.*, 2015; Vinale *et al.*, 2008).

El presente trabajo tuvo como objetivos, aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp. de materiales orgánicos regionales, evaluarlas *in vitro* mediante la técnica de cultivos duales y seleccionar las más sobresalientes para evaluar posteriormente *in vivo* su potencial de biocontrol de *Fusarium* sp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp.

Se colectaron muestras de materiales orgánicos de origen diverso, utilizados como componentes de sustratos para cultivar nochebuena, tales como: ocochal – tierra de hoja, lombricomposta y lixiviado de su proceso de obtención, así como de un sustrato común en nochebuena compuesto por 70% de ocochal – tierra de hoja + 30% tepojal (v/v).

El ocochal y la tierra de hoja son los componentes orgánicos más comunes en los sustratos de nochebuena en toda la región central de México (Osuna *et al.*, 2012); por otra parte, el tepojal es el principal componente inorgánico y proviene de depósitos formados durante erupciones volcánicas, ubicados en los estados de México y Veracruz.

Los aislamientos se realizaron a partir de 10 g de cada muestra, los que se depositaron en un matraz erlenmeyer que contenía 90 mL de agua destilada estéril, y se agitó en vortex durante 20 minutos (dilución  $10^{-1}$ ). De la suspensión, se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un tubo de ensaye que contenía 9 mL de agua destilada estéril (dilución  $10^{-2}$ ); el procedimiento se repitió hasta obtener diluciones de  $10^{-5}$ . De las tres últimas diluciones se tomó una alícuota de 0.1 mL, la cual se distribuyó de manera homogénea sobre medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), rosa de bengala y ácido láctico al 10%. Se usaron cajas de petri de 9.0 cm de diámetro y el medio de cultivo se preparó de la siguiente manera: 39 g de PDA, 0.5 g de rosa de bengala, más 10 mL de ácido láctico al 10% (v/v), por litro de agua destilada estéril. Las cajas sembradas se incubaron a  $25 \pm 1$  °C durante 7 días.

Una vez desarrolladas las colonias fúngicas características, se realizaron montajes temporales con azul de lactofenol bajo el microscopio compuesto, para identificar la presencia del hongo *Trichoderma* spp., con base en las claves descriptivas de Barnett y Hunter (1978).

### Aislamiento de cepas de *Fusarium* sp.

En viveros comerciales se colectaron plantas de nochebuena con los síntomas de secadera por pudrición de raíz (García *et al.*, 2009). Las muestras de raíces se lavaron y desinfectaron mediante inmersión por 1 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2%. Finalmente, se colocaron en cajas petri con el medio utilizado para *Trichoderma* spp, sin rosa de bengala, y se incubaron a  $25 \pm 1$  °C durante 7 días.

Después de ese tiempo, se realizaron montajes temporales con azul de lactofenol y con el microscopio óptico se buscó la presencia de macroconidios, microconidios y fialides propias de *Fusarium* sp., de acuerdo con las descripciones de Leslie y Sommerell (2006).

### Cultivos monospóricos de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* sp.

Se sembraron esporas de los cultivos puros de cada hongo aislado; se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , de las tres últimas se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L y se plaquearon en una caja petri con medio PDA acidificado (sin rosa de bengala en el caso de *Fusarium* sp.). Las cajas sembradas se incubaron por 24 h a  $25 \pm 1$  °C.

Pasadas las 24 h, los aislamientos se observaron al microscopio compuesto para ubicar esporas individuales germinadas, las cuales se transfirieron (cada espora seleccionada) a una nueva caja petri con PDA acidificado, y se incubaron a  $25 \pm 1$  °C durante 5-7 días.

### Pre-selección de cepas

En un ensayo previo se descartaron cepas monospóricas que crecían muy lento o tuvieron problemas de manejo (datos no mostrados). Posteriormente, se realizó una pre-selección inicial a partir de 18 cepas de *Trichoderma* spp. y cinco cepas de *Fusarium* spp. (Cuadro 1), las cuales se sembraron por triplicado, se incubaron a  $25 \pm 1$  °C durante 5 días y cada 24 h se cuantificó el crecimiento radial de las colonias con un vernier digital. Los resultados se sometieron al análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### Cultivos duales de *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* sp.

Se realizaron 27 confrontaciones, producto de la combinación de las nueve cepas de *Trichoderma* spp. y tres cepas de *Fusarium* sp., seleccionadas como se indicó atrás.

Los cultivos duales se llevaron a cabo en cajas petri de 9 cm de diámetro, con PDA acidificado. Para el efecto, de colonias de cepas monospóricas, con sacabocado se tomaron discos de micelio de 5 mm de diámetro, del antagonista y del fitopatógeno, se colocaron a 1 cm del borde de la caja petri, con

una distancia aproximada de 7 cm uno de otro, y se incubó a  $25 \pm 1$  °C durante 3 - 5 días.

Con los datos del crecimiento radial al quinto día de incubación, la habilidad de competencia por espacio y nutrientes de las cepas de *Trichoderma* spp. se estimó con la variable de inhibición del crecimiento radial de la colonia del patógeno, usando la siguiente ecuación:

$$PICR = \frac{CR1 - CR2}{CR1}$$

En donde: PICR=Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* sp. CR1=Crecimiento radial (mm) de *Fusarium* sp. testigo (sin confrontación con *Trichoderma* spp.). CR2=Crecimiento radial (mm) de *Fusarium* sp. en confrontación con *Trichoderma* spp.

El diseño de tratamientos fue el factorial completo, que arrojó las 27 confrontaciones evaluadas. La unidad experimental fue una caja de petri, con cinco repeticiones. Los valores originales se transformaron de acuerdo con la ecuación:

$$PICRt = \arccos(\sqrt{PICR})$$

para normalizar la distribución de los datos y hacer uniforme la varianza; los valores transformados se sometieron al análisis de varianza y las medias de tratamiento a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Los datos de crecimiento radial de las colonias, registrados diariamente durante siete días, se utilizaron para el análisis de regresión y cálculo de los modelos matemáticos con mejor ajuste. Se aplicó el procedimiento de regresión del SAS (2009), partiendo de modelos especificados

**Cuadro 1.** Nomenclatura de las cepas de *Trichoderma* spp. y su material de origen.

Cepa	Material de origen	Cepa	Material de origen
T 11	100% ocochal-tierra de hoja	T 20	Lixiviado de lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 12	100% ocochal-tierra de hoja	T 21	Lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 13	100% ocochal-tierra de hoja	T 22	Lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 14	100% ocochal-tierra de hoja	T 23	Lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 15	100% ocochal-tierra de hoja	T 24	Lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 16	100% ocochal-tierra de hoja	T 25	Lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 17	100% ocochal-tierra de hoja	T 26	Lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 18	100% ocochal-tierra de hoja	T 27	Lombricomposta estiércol ganado vacuno+50% residuos vegetales
T 19	Testigo comercial (Fithan®)	T 28	70% ocochal+30% tepojal

con la dispersión de los datos observados; la selección del mejor modelo se hizo considerando el mayor valor de  $r^2$  y el menor cuadrado medio del error.

El micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre las cepas de *Fusarium* sp. se evaluó a los 10 días de incubación. Esta variable se estimó mediante la observación directa de la invasión física a la superficie de la colonia del patógeno por el antagonista, utilizando la escala arbitraria propuesta por Ezziyani *et al.* (2004) (Cuadro 2).

El mecanismo de antibiosis se estimó mediante los cambios visibles en la coloración del medio de cultivo o de la colonia de las diferentes cepas de *Fusarium* sp.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pre-selección de cepas *Trichoderma* spp. y *Fusarium* sp.

Se tuvieron diferencias significativas en el crecimiento radial de las colonias de las diferentes cepas de ambos microorganismos (Cuadro 3). Para la siguiente etapa, se seleccionaron las primeras ocho cepas con mayor crecimiento, además de la cepa del testigo comercial (T 19). En el caso de *Fusarium* sp., se seleccionaron las tres cepas de mayor crecimiento radial (Cuadro 3).

### Competencia por espacio y nutrientes

En todas las confrontaciones, el crecimiento radial de *Trichoderma* spp. fue más rápido que el de *Fusarium* sp.;

**Cuadro 2.** Escala para determinar el grado de micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre las cepas de *Fusarium* sp.

Escala	Grado de micoparasitismo
0	Ninguna invasión a la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno y esporulación sobre ella.

De acuerdo con Ezziyani *et al.* (2004).

en la Figura 1 se ejemplifica con las confrontaciones de la cepa B1A de *Fusarium* sp., contra las nueve cepas de *Trichoderma*.

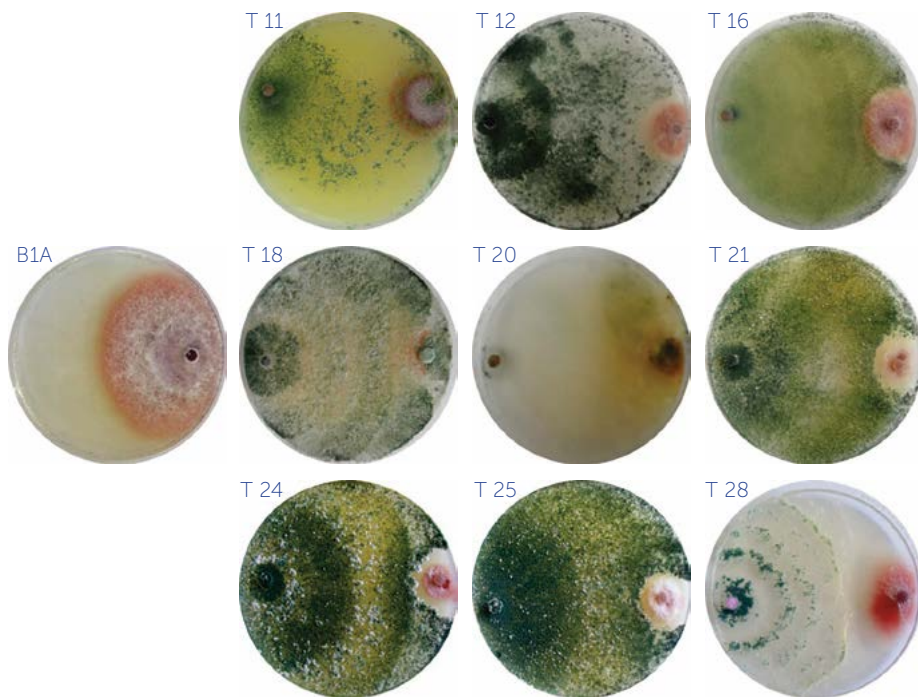
La capacidad de crecimiento rápido es uno de los principales mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra patógenos (Lorito *et al.*, 2010). Las mayores tasas de crecimiento de *Trichoderma* spp., se pueden apreciar con claridad en las curvas de crecimiento de ambos organismos en las confrontaciones (Figura 2), para el caso de la cepa B1A de *Fusarium* sp. en confrontación contra *Trichoderma* spp. La función logística tuvo el mayor ajuste en casi todas las confrontaciones, por su menor cuadrado medio del error y  $r^2$  promedio de 0.98 para *Trichoderma* spp. y 0.88 para la cepa B1A de *Fusarium* sp. (Figura 2); las curvas de la Figura 2 se trazaron con los valores predichos por el modelo matemático correspondiente, cuya expresión es la siguiente:

$$Y = \frac{a}{1 + be^{-cX}}$$

Y=Crecimiento radial (mm); a, b y c=Parámetros del modelo de regresión; X=Días de incubación.

**Cuadro 3.** Crecimiento radial (mm) de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* sp. al quinto día de la siembra en caja de petri con PDA acidificado.

<i>Trichoderma</i> spp.				<i>Fusarium</i> sp.	
Cepa	Crecimiento radial (mm)	Cepa	Crecimiento radial (mm)	Cepa	Crecimiento radial (mm)
T 24	84.8	T 19	76.1	X3B	28.0
T 21	84.4	T 22	74.6	A3A	26.5
T 20	82.8	T 23	73.4	B1A	24.0
T 11	82.1	T 14	72.3	C2C	19.8
T 16	81.9	T 26	68.0	C2B	18.8
T 28	81.1	T 27	67.3		
T 25	78.1	T 17	60.9		
T 12	77.5	T 13	36.1		
T 18	76.1	T 15	36.1		
Tukey (P=0.05)	4.6		4.6		2.3



**Figura 1.** Cultivos duales de la cepa B1A de *Fusarium* sp. y nueve cepas de *Trichoderma* spp., en caja de petri con PDA acidificado. En la caja del extremo izquierdo se observa el crecimiento de la cepa B1A de *Fusarium* sp. sola, y en el resto, en confrontación con cada cepa de *Trichoderma* spp. Imágenes de 10 días después de la siembra de los microorganismos.

La proporción de inhibición del crecimiento radial (PICR) de las cepas de *Fusarium* sp. confrontadas contra las cepas de *Trichoderma* spp. varió significativamente (Cuadro 4). El PICR es un efecto derivado tanto de la competencia por espacio y nutrientes como de los metabolitos secundarios excre-

tados por el antagonista, mismos que pueden tener efectos sobre el patógeno, o sobre otros procesos en la planta, más allá del sitio de síntesis (Mutawila et al., 2016; Kostathane et al., 2015).

Michael-Aceves et al. (2009) reportaron PICR de cepas de *Trichoderma*,

en el orden de 0.05 a 0.42 al confrontar *Fusarium subglutinans* y de 0.43 a 0.62 contra *F. oxysporum*.

### Micoparasitismo y antibiosis

Se presentaron diferencias marcadas en el grado de micoparasitismo entre las diferentes confrontaciones. Las cepas T 16, T 18 y T 20 presentaron de manera consistente los valores más altos de micoparasitismo contra las tres cepas de *Fusarium* sp. (Cuadro 5), mientras que las cepas T 21, T 24 y T 25 no presentaron micoparasitismo contra ninguna de las cepas de *Fusarium* sp. (Cuadro 5 y Figura 1).

Michael-Aceves et al. (2009) evaluaron tres cepas de *Trichoderma* sp. en cultivos duales contra *F. oxysporum* y *F. subglutinans* y reportaron valores de micoparasitismo de 1 a 3, en la misma escala utilizada en esta investigación. El mecanismo de antibiosis, estimado por el cambio pronunciado en la coloración del medio de cultivo, solamente se observó en la cepa T 20 contra todas las cepas de *Fusarium* sp. (Figura 1, para el caso de confrontación contra B1A de *Fusarium* sp.).

**Cuadro 4.** Proporción de inhibición del crecimiento radial (PICR) de tres cepas de *Fusarium* sp. por la confrontación con nueve cepas de *Trichoderma* spp., al quinto día de incubación.

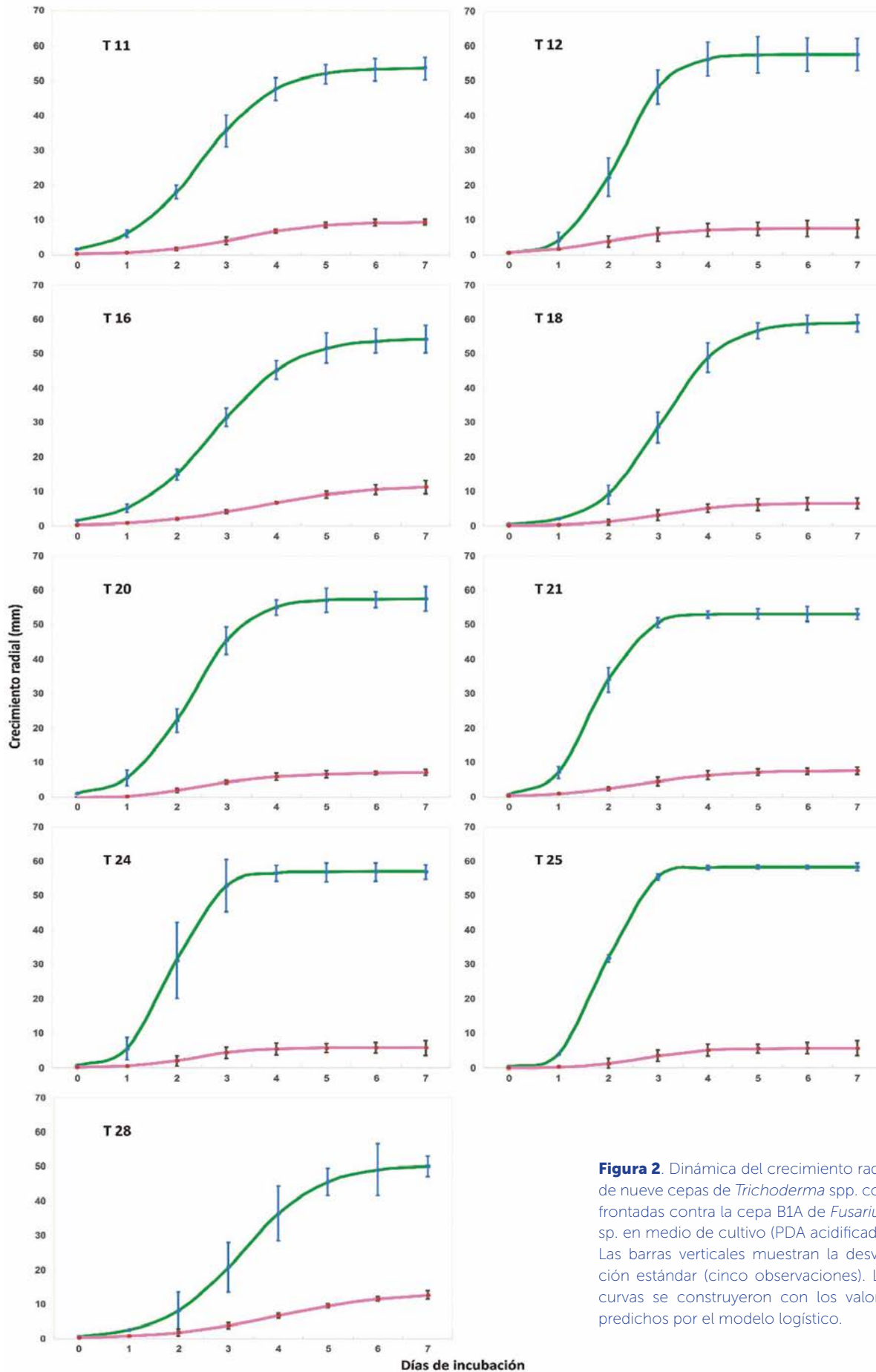
Cepa	X3B		A3A		B1A	
	PICR	PICRt <sup>a)</sup>	PICR	PICRt	PICR	PICRt
T 11	0.29	0.55	0.18	0.42	0.30	0.58
T 12	0.38	0.67	0.29	0.55	0.34	0.62
T 16	0.18	0.42	0.25	0.51	0.33	0.61
T 18	0.14	0.35	0.32	0.60	0.27	0.55
T 20	0.30	0.58	0.41	0.69	0.40	0.68
T 21	0.53	0.82	0.27	0.53	0.42	0.70
T 24	0.38	0.66	0.42	0.70	0.44	0.73
T 25	0.35	0.63	0.47	0.75	0.30	0.58
T 28	0.20	0.11	0.19	0.44	0.15	0.33
Tukey (P=0.05)	--	0.30	--	0.30	--	0.26

a) Proporción de inhibición del crecimiento radial transformado con:  $PICRt = \arcseno\sqrt{PICR}$

**Cuadro 5.** Grado de micoparasitismo (°M) de nueve cepas de *Trichoderma* spp. confrontadas con tres cepas de *Fusarium* sp., al décimo día de incubación.

Cepa	X3B	A3A	C2B
T 11	3	2	3
T 12	1	0	0
T 16	3	2	3
T 18	4	4	4
T 20	4	3	4
T 21	0	0	0
T 24	0	0	0
T 25	0	0	0
T 28	1	0	1

Según la escala de Ezziyani et al. (2004).



**Figura 2.** Dinámica del crecimiento radial de nueve cepas de *Trichoderma* spp. confrontadas contra la cepa B1A de *Fusarium* sp. en medio de cultivo (PDA acidificado). Las barras verticales muestran la desviación estándar (cinco observaciones). Las curvas se construyeron con los valores predichos por el modelo logístico.

## CONCLUSIONES

**Se logró** el aislamiento y selección de cepas monospóricas de *Trichoderma* spp. sobresalientes, las cuales, en confrontaciones contra cepas de *Fusarium* sp., presentaron uno o más de los mecanismos de antagonismo de competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis.

## LITERATURA CITADA

- Barnet H., Hunter B. 1978. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Ed. MacMillan Pub. Company. New York, USA.
- Ezziyani M., Pérez S., Requena M., Rubio L., Candela M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei-Ziyani*, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales Biología* 26:69-78.
- García P.F., Ramírez R.S., Osuna C.F.J., Ocampo T. 2009. Enfermedades de las principales ornamentales en Morelos. SAGARPA. INIFAP. Campo Experimental Zacatepec. Folleto técnico No. 39.
- García A. 2009. Producción de nochebuena planta terminada. pp. 63-77. En: Osuna, C.F.J., F. García P., S. Ramírez R., L. Granada C. y D.V. Galindo G. (Comp.) Memoria del 7º. Simposium Internacional de Viverismo. Oaxtepec, Morelos, México. ISBN 978-607-425-148-7.
- Harman G.E., Obregón M.A., Samuels G., Lorito M. 2010. Changing models of biocontrol in the developing and developed world. *Plant Disease* 94: 928-939.
- Kotasthane A., Agrawal T., Kushwah R., Rahatkar O.V. 2015. *In-vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter melon. *European Journal of Plant Pathology* 141: 523-543.
- Leslie J., Summerell B. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa. USA.
- Lorito M., Woo L.S., Harman E.G., Monte E. 2010. Translational Research on *Trichoderma*: From Omics to the Field. *Annual Review of Phytopathology* 48: 19.1-19.23.
- Michael-Aceves A., Otero-Sánchez M., Solano-Pascacio L. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "escoba de bruja" del mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 18-26.
- Mutawila C., Vinale F., Halleen F., Lorito M., Mostert L. 2016. Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathology* 65: 104-113.
- Osuna-Canizalez F.J., Moreno-López M.F., García-Pérez F., Ramírez-Rojas S., Canul-Ku J. 2012. Biocontrol de la pudrición de raíz de nochebuena de interior con *Trichoderma* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 553-564.
- SAS. 2009. The SAS system. Version eight for windows. Cary, N.C. USA.
- SIAP. 2014. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (Consulta: 28-04-2016).
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- Woo S.L., Ruocco M., Vinale F., Nigro M., Marra N., Lombardi N., Pascale A., Lansuise S., Manganiello, Lorito M. 2015. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Micology Journal* 8: 71-126.