



Efecto antagónico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinífera*

In vitro agonist effect of *Clonostachys rosea* on the growth of *Botrytis cinerea* from cultures of *Vitis vinifera*

Manuel R. Rodríguez Lacherre y Julio R. Chico Ruíz

Laboratorio de Fitopatología. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.

rola_rob10@hotmail.com

RESUMEN

En el Perú como en el resto del mundo, existen numerosos hongos que causan enfermedades disminuyendo la productividad agrícola. El control fúngico se hace mediante el uso de sustancias químicas que producen deterioro del medio ambiente. La presente investigación tiene como objetivos: (i) determinar el efecto antagónico de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*, hongo patógeno de frutos de *Vitis vinifera* Red globe "vid" de interés económico, entre Enero a Noviembre del 2013 y (ii) establecer una metodología que permita la fácil determinación de *B. cinerea* como hongo causante de enfermedad "podredumbre gris" en los frutos de "vid". Se observó que todas las colonias de *C. rosea* mostraron alta capacidad antagónica (grado 1 en las Escala de Elias y Arcos, 1984) y un grado 4 de micoparasitismo en la misma escala (completo y efectivo). Se concluye que la *C. rosea* presenta un efectivo efecto antagónico sobre *B. cinerea* y que la metodología empleada permite una fácil determinación del parasitismo de *V. vinifera* por *B. cinerea*.

Palabras claves: Hongos, antagonismo, *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

In Peru, as in the rest of the world, there are numerous fungi that cause diseases declining agricultural productivity. Fungal control is done through the use of chemical substances producing environmental degradation. This research aims to: (i) determine the antagonistic effect of *Clonostachys rosea* on *Botrytis cinerea*, pathogenic fungus fruits of *Vitis vinifera* Red globe "vid", from January to November, 2013 and (ii) establish a methodology that allows easy identification of *B. cinerea* fungus as cause disease, "gray rot" in the fruits of "vid". It was observed that all the colonies of *C. rosea* showed antagonistic High Capacity (grade 1 in the Scale of Elias and Arcos, 1984) and a grade 4 mycoparasitism on the same scale (full and effective). We conclude that *C. rosea* presents an effective antagonistic effect on *B. cinerea* and used methodology allows easy determination of parasitism in *V. vinifera* by *B. cinerea*.

Keywords: fungi, antagonism, *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea*, *Vitis vinifera*.

INTRODUCCIÓN

En el Perú la vid, *Vitis vinifera*, es considerada como importante cultivo frutícola que se produce durante todo el año, sobre todo en Piura, y tiene a Estados Unidos, el Reino Unido y los países bajos como los principales mercados importadores^{1,2}. Sin embargo, además, de los deterioros enzimáticos y desintegraciones, los hongos desempeñan un papel fundamental como causantes de podredumbres^{3,4,5}.

Al mismo tiempo, uno de los efectos más importantes de los ataques de hongos sobre la parte comestible de la uva es la inducción a la **micotoxicosis**; es decir, enfermedades ocasionadas por el consumo de alimentos invadidos por hongos que producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas, que pueden causar graves enfermedades a nivel hepático, renal, del aparato circulatorio y de los órganos hematopoyéticos, aun cuando sean ingeridos en dosis pequeñas⁴.

Durante años se han empleado fungicidas sintéticos para controlar patógenos postcosecha; sin embargo, se ha observado que estos compuestos causan resistencia en microorganismos, incluyendo a los hongos y representan un potencial riesgo para la seguridad del medio ambiente y la salud humana. En la búsqueda de alternativas naturales para el control de pudriciones postcosecha se ha valorado el empleo de extractos vegetales, antagonismo microbiano (control biológico) y el quitosano^{5,6}.

El control biológico con microorganismos antagonistas comenzó a ser investigado de forma constante a partir de los años 80^{5,6}. Se ha utilizado *Trichoderma harzianum* en el control de hongos como *Botrytis cinerea* en uvas postcosecha, controlando parcialmente la enfermedad *in situ*. También se ha usado contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en “manzanas”, protegiendo durante dos meses al fruto *in situ*^{7,8,9}.

Una alternativa no química para el combate de estas enfermedades es el uso del biocontrolador *Clonostachys rosea* (= *Gliocladium roseum*), hongo habitante del suelo con elevado potencial antagonístico que coloniza las plantas vivas como endófito, digiere el material en el suelo como saprofito y también es conocido como un parásito de otros hongos y de nematodos^{9,10}. Los mecanismos de biocontrol atribuidos a *C. rosea*, son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis, siendo el micoparasitismo el principal mecanismo de acción de este hongo; este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células, causándole un daño extensivo alterando y degradando la pared celular, causa retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma^{11,12,13,14,15}.

No se ha registrado trabajo alguno en el Perú respecto del control biológico de *C. rosea* sobre *B. cinerea*, hongo productor de “podredumbre gris” enfermedad en frutos de *V. vinifera*. Teniendo en cuenta este antecedente y ante el peligro potencial que representa para la salud pública la acción de este hongo como productor de micotoxinas en la parte comestible, se planteó una investigación dirigida a: (i) determinar el efecto antagonístico de *Clonostachys rosea f. rosea* sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* aislado de *V. vinifera* cultivada en el proyecto CHAVIMOCHIC (Perú), y (ii) implementar una metodología que permita la fácil determinación de *B. cinerea* como causante de enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- Cepa de *Clonostachys rosea f. rosea*, proporcionada por la Sub-Dirección de Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA-Perú).
- Cepa de *Botrytis cinerea* (Pers.) Fr., se obtuvo en campo, fue transportada y cultivada en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad.
- Plantas de *Vitis vinifera* var. Red Globe “vid” obtenidas en el viñedo de la Agrícola Santa Marcela E.I.R.L. Guadalupe, Pacasmayo. La Libertad.

Toma de muestra

Se llevó a cabo el muestreo aleatorio, recolectando aquellos frutos maduros que muestren síntomas y signos de enfermedad fúngica, como: necrosis, pudrición, presencia de esporas, micelio, etc. Las muestras fueron transportadas en cajas de cartón, previamente acondicionadas con papel y algodón, al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo, para su análisis correspondiente.

Procesamiento

Utilizando estereoscopio y microscopio compuesto, se procedió a examinar las muestras por extracción directa de las estructuras fúngicas presentes o realizando cortes histológicos de las partes lesionadas, buscando fructificaciones fúngicas. Las estructuras fúngicas encontradas se sembraron en medios de cultivo contenidos en placas Petri y tubos de ensayo, e incubadas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron monocultivos de cada una de las estructuras fúngicas que iban creciendo, y luego, a partir de ellos se llevaron a cabo los microcultivos correspondientes para su determinación final^{10,11,12}.

En las placas Petri preparadas con anterioridad y que contenían Agar Sabouraud-Dextrosa al 4%, se depositaron discos de micelio (2 mm de diámetro) de cada aislamiento de *Cl. rosea* y de *B. cinerea* en posiciones opuestas, y equidistantes; de tal modo que, quedasen enfrentados uno al otro a 5 cm. de distancia aproximadamente.

En las placas de los testigos se inoculó en el centro de la placa, un fragmento de micelio de cada uno de los hongos a evaluar. Los ensayos se repitieron cinco veces.

Análisis de la muestra

Se tomaron nota de las características que mostraban las lesiones causadas por el hongo fitopatógeno y las que presentan éstos, tanto en la macro, mono y microcultivo; es decir, color, aspecto de la colonia, textura, crecimiento vegetativo y elementos de reproducción.

Determinación de la especie

Se llevó a cabo, teniendo en cuenta las características de los macro y microcultivos del hongo hallado, confrontándolas con las claves taxonómicas existentes para este tipo de hongos fitopatógenos^{10,11,19,21}.

Control biológico “in vitro” (Prueba de antagonismo o cultivos duales)

La prueba de antagonismo se realizó utilizando placas Petri conteniendo 10 ml de medio de cultivo DSA al 4%, en donde se sembraron el hongo *Cl. rosea* en un extremo y el hongo *B. cinerea* en el otro extremo de la placa (aproximadamente a 7 cm de distancia) Se utilizaron 5 placas de Petri por experiencia, incubándolas a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y, posteriormente, se realizaron observaciones y mediciones cada 24 horas hasta que el desarrollo fúngico cubrió completamente la placa Petri. En las placas testigos se inocularon de manera individual, los hongos a evaluar.

Los ensayos se repicaron cinco veces por cada enfrentamiento; al final de la incubación a temperatura ambiente, se evaluó el grado de antagonismo mediante la escala que aparece en la Tabla 1, creada por Elías y Arcos (1984)¹².

Tabla 1. Escala creada por Elías y Arcos (1984) para evaluación de la capacidad antagónica, de acuerdo a la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación del antagonista sobre cada uno de los hongos fitopatógenos.

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ 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, esporulación sobre ella.

Asimismo, se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Ezziyyani ⁽¹⁸⁾ $\text{PICR} = (R_1 - R_2)/R_1 \times 100$, donde R_1 es el radio del patógeno testigo y R_2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

Mecanismo de acción de *Clonostachys rosea* sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* hongo patógeno en frutos de “vid”

Una vez que *Cl. rosea* alcanzó invadir al hongo postcosecha, se tomó una porción de los hongos con parte de medio de cultivo en la franja de unión, se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de Amann y se observó al microscopio compuesto el mecanismo de acción del biocontrolador.

Diseño experimental ¹³

Se realizó un diseño completamente al azar, con un número de tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento más, incluyendo a ambos microorganismos como testigos: uno del otro-

RESULTADOS

Evaluación del Antagonismo in vitro

Durante el tiempo que duró el experimento a nivel de laboratorio se pudo observar que todas las colonias alcanzaron el grado 2, (según escala de Elías y Arcos (1984), con tendencia a grado 1; es decir, altamente antagonistas pues lograron poco a poco colonizar y esporular la totalidad de la superficie del patógeno.

Evaluación del Micoparasitismo

Todas las colonias presentaron, al final de la experiencia, un grado 4 de micoparasitismo, que según escala de Elías y Arcos corresponde a un mico parasitismo completo y efectivo.

Evaluación de la Antibiosis (Halo de inhibición y PICR)

No se pudo observar la formación de ningún halo entre las colonias en confrontación. No obstante, el efecto antibiótico se pudo cuantificar mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR).

Evaluación de la competencia por sustrato o nutrientes

Una marcada competencia por sustrato fue analizada en todas las placas de enfrentamiento dual, lo que indicaría un claro mecanismo de acción antagónica y elevada virulencia de *C. rosea* sobre *B. cinerea*.

Después de las observaciones realizadas al microscopio, se determinó que el mecanismo de acción de *Cl. rosea* como biocontrolador sobre *B. cinerea* aislados e identificado en frutos de la “vid” fue el de micoparasitismo. Las hifas de *Cl. rosea* cubrieron a las hifas del hongo a controlar, degradando el micelio del hongo controlado.

Tabla 1: Mediciones promedio del diámetro de los monocultivos de *Clonostachys rosea* y *Bothritis cinerea*, a 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado.

Tratamientos Días	T1	T2
	<i>Clonostachis rosea</i> (cm)	<i>Bothritis cinerea</i> (cm)
3	2,0	3,9
7	3,4	4,8
10	4,6	7,2
13	6,7	8,0
15	8,0	8,6

Fuente: Datos obtenidos en trabajo de laboratorio y en gabinete.

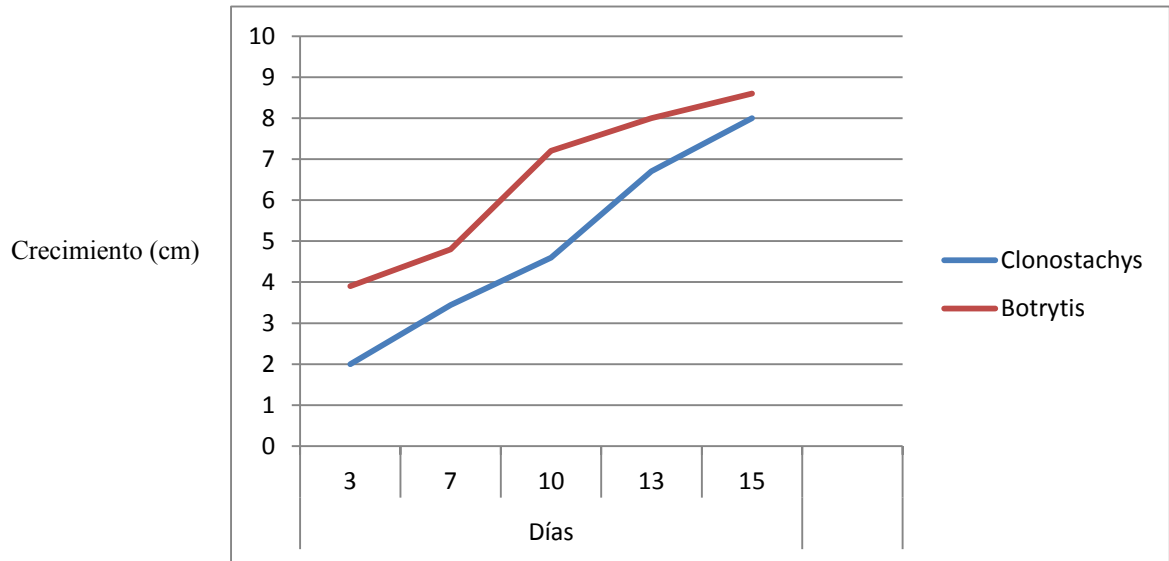


Fig. 1: Mediciones promedio del diámetro de los monocultivos de *Clonostachys rosea* y *Botrytis cinerea*, a 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado.

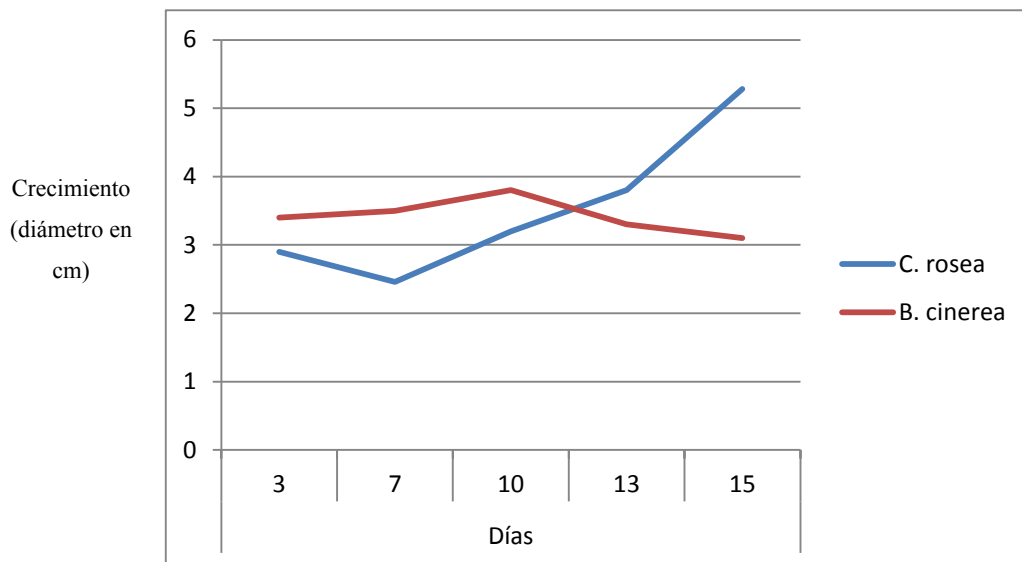


Fig. 2: Medición promedio del diámetro del cultivo dual de *Clonostachys rosea* vs *Botrytis cinerea*, a 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado

Tabla 2: Medición promedio del diámetro del cultivo dual de *Clonostachys rosea* vs *Botrytis cinerea*, a 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado.

Cultivo dual		T3	
Días		<i>C. rosea</i> vs. <i>B. cinerea</i>	
3		2,90	3,40
7		2,46	3,50
10	3,20	3,80	
13		3,80	3,30
15		5,28	3,10

Fuente: Datos obtenidos en trabajo de laboratorio y en gabinete.

Tabla 3: Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Clonostachys rosea* sobre *B. cinerea*, a 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado.

CULTIVO DÍAS	<i>Botrytis cinerea</i> PICR (%)
3	12,80
7	27,08
10	47,2
13	58,75
15	63,95

Fuente: Datos obtenidos en trabajo de laboratorio y en gabinete.



Fig. 3: Inhibición del crecimiento radial de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*, a los 15 días de sembrado.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que *Cl. rosea* inhibe el crecimiento miceliar del hongo fitopatógeno *B. cinerea*. En las mediciones a los 15 días de sembrado de *Cl. rosea* sobre *B. cinérea*, se determinó que hay diferencia significativa en el crecimiento de ambos. Asimismo, al comparar los tratamientos *Cl. rosea* sobre *B. cinerea* enfrentados, se observa la diferencia significativa en su crecimiento, esto nos muestra claramente la inhibición del hongo fitopatógeno.

Esto coincide con lo encontrado por otros autores en sus investigaciones, quienes determinaron que el control de *B. cinerea* por *G. roseum* en “fresa” (tanto en hojas como en frutos) siempre fue igual o superior al logrado con fungicidas^{9,13,14}. Asimismo, según los datos obtenidos se puede observar que el porcentaje de inhibición (PICR) de *B. cinerea* es moderado con un grado de antagonismo de tipo 2.

Según Rivera Fonseca¹⁵, *B. cinerea* presenta enzimas antioxidantes, además de producir cutinasa y poligalacturonasa que lo hace ser más resistente al ataque por *Cl. rosea*; es por ello, que al día 10 se observó que la colonia de *B. cinerea* se resiste y trata de desplazar a *Cl. rosea*; en este momento se da un incremento en la incidencia de la enfermedad y hace que se note más el efecto del biocontrolador en el combate de la misma.

Entre las enzimas líticas que produce *Cl. rosea* se reportan las quitinasas, glucanasas, proteasas y celulasas, algunas están relacionadas con el fenómeno de la antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y parasitar al hospedero²².

Guédez et al¹⁷, señalan que la cantidad de metabolitos producida por el controlador depende de los nutrimentos y no siempre está relacionada con la habilidad para controlar la enfermedad. Sin embargo,

García et al¹⁸; indicó una correlación positiva entre la cantidad de enzimas y el porcentaje de micoparasitismo, y reducción de la enfermedad.

Las condiciones que pueden afectar el desempeño de *G. roseum* como biocontrolador están: la concentración del inóculo del antagonista y del patógeno; y las condiciones ambientales; al respecto, mencionan que *Cl. rosea* incrementa su actividad supresiva según se incrementa la temperatura de 10 a 25°C, y que a partir de los 15°C la germinación de los conidios del biocontrolador es mayor al 80%, incrementándose también con el aumento de temperatura. Debido a ello, la cepa de *Cl. rosea* creció menos que la cepa del hongo patógeno; pero, esto no influyó en la inhibición; porque, *C. rosea* sólo actúa efectivamente cuando es aplicado al mismo tiempo o antes de que ocurra la infección por parte de *B. cinerea* o cualquier otro patógeno¹⁵.

Al respecto, Mont¹⁹, refiere que *Cl. rosea* tiene una alta capacidad de competencia por el sustrato; como consecuencia de ello, el organismo afectado tiende a entrar en un estado de latencia, que podría ser por deficiencia de nutrientes o la presencia de cierto nivel de sustancias inhibitorias, lo cual impide que siga creciendo; coincidiendo, con los resultados obtenidos en el presente trabajo, como lo demuestra la notable acción inhibitoria que ejerce *Cl. rosea* sobre *B. cinerea*.

Cl. rosea mostró una alta capacidad para parasitar a *B. cinerea*; además, presenta una alta actividad competitiva frente al fitopatógeno, al impedirle su crecimiento en el mismo sustrato. Al respecto, se ha mencionado que el éxito de los antagonistas en la planta también puede ser gobernada por su capacidad de colonizar y utilizar los sustratos en la superficie de la planta, permitiendo que compita efectivamente con los fitopatógenos¹⁹.

Al respecto, se debe tener en cuenta que el micoparasitismo es un proceso complejo de quimiotropismo cuya acción antifúngica específica es desconocida; sin embargo, se ha propuesto una serie de etapas por la que *Cl. rosea* lleva el antagonismo, las cuales son: (a) reconocimiento, (b) penetración de la hifa, (c) invasión y secreción de enzimas hidrolíticas²⁰, siendo éste último el de mayor interés, ya que no se ha determinado con exactitud el mecanismo mediante el cual se controla la expresión de cada una de las enzimas involucradas; así como, su orden. Durante la etapa de reconocimiento, se lleva a cabo un proceso de quimiotropismo, el cual es mediado por el reconocimiento de lectinas, que se encuentran incorporadas en el hongo fitopatógeno, y cuando el micoparásito reconoce al hongo, las hifas de *Cl. rosea* lo atrapan y lo rodean formando estructuras apresoras²¹.

Asimismo, en cuanto a la penetración de la hifa, ésta se realiza mediante la degradación de la pared celular del hongo fitopatógeno, por medio de la secreción de enzimas que actúan sinérgicamente, y a las que se les denomina en conjunto como las enzimas degradadoras de pared celular, conformado por β -1,3-glucanasas, quitinasas y proteasas, las cuales se inducen por la presencia de las paredes celulares de hongos fitopatógenos²².

Hernández-Lauzardo et al²¹ señalan, al respecto, que en el micoparasitismo, la formación y secreción de estas enzimas es el paso fundamental para la destrucción del hongo fitopatógeno, y que el mecanismo de acción del hongo antagonista, que en éste caso es *Cl. rosea*, puede ser variable y depende del hongo a controlar y del aislamiento. Asimismo, indican que *Cl. rosea* protege las plantas contra *B. cinerea* mediante la supresión de la producción de esporas; además, que se han encontrado a sus hifas alrededor del micelio, que penetran y crecen dentro de las hifas y conidias de *B. cinerea*.

Cabe señalar, que el estudio del controlador *Cl. rosea* es muy limitado y poco conocido sobre todo en el Perú. Hasta el momento los resultados indican la capacidad inhibitoria de *Cl. rosea* sobre *B. cinerea*; por lo tanto, el presente trabajo es un modelo para seguir investigando en busca de un biocontrolador para diferentes hongos fitopatógenos que causan daño económico en cultivos de “vid” en el Perú.

CONCLUSIONES

- El grado de antagonismo de *Cl. rosea* sobre *B. cinerea* corresponde al grado 2.
- El porcentaje de inhibición (PICR) de *B. cinerea* por *Cl. rosea*, a los 15 días de sembrado, fue de 63,95%.
- *Cl. rosea* demostró, en cultivos duales, ser un efectivo controlador biológico de *B. cinerea* en cultivo de “vid”, inhibiendo el crecimiento del fitopatógeno mediante su capacidad antagonica.
- Los mecanismos de acción antagonica efectiva de *C. rosea* sobre *B. cinerea* son el micoparasitismo, antibiosis y competencia por sustrato o nutrientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrobanco. Cultivo de la vid. Lima-Perú. 2008. www.agrobanco.com.pe/cultivo/delavid.pdf.
2. Reyes M, Gómez-Sanchez I, Espinoza C, Bravo F, Ganoza L. Tablas Peruanas de composición de alimentos. 8ª ed. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú. 2009.
3. Agrios C. Fitopatología. 3ª ed. México DF: Edit. Limusa S.A. 2004.
4. Fraire-Cordero M, Yáñez M, Nieto D, Vázquez G. Hongos patógenos en fruto de “fresa” (*Fragaria ananassa* Duch.) en postcosecha. Rev Mex Fitopatol 2003; 2: 285-91
5. Umaña G. Control biológico de enfermedades postcosecha de frutas. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. En: III Congreso de Fitopatología. 1996.
6. Hernández-Lauzardo A, Bautista-Baños S, Velásquez-Del Valle S. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Rev Mex Fitopatol 2007; 25: 66-74
7. Llácer G, López M, Trapero A, Bello A. Patología Vegetal. 2ª ed. México DF: Edit. Grupo Mundi-Prensa, S.A. 2000.
8. Molina G, Zaldúa S, Gonzáles G, Stowasser S. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Laboratorio de Patología Forestal. Universidad de Concepción. Chile. 2006.
9. Chávez N, Wang A. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la “fresa” mediante *Gliocladium roseum*. Rev Agron Costarricense 2004; 28(2): 73-85
10. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Manual de procedimientos para verificación de calidad de agentes biológicos para el control de plagas agrícolas, producidos por laboratorios en convenio con el SENASA. Directiva General N° 24/2001-SENASA-DGSV-PNCB. Lima. Perú. 2001.
11. Barnett H, Hunter B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4ª ed. The American Phytopathological Society, S.A. EE.UU. 1998.
12. Ezziyyani M. Biocontrol mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia-España. 2004.
13. Peng G, Sutton J, Evan P. Effectiveness of honeybees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Canadian J Plant Pathol 1992; 14(2):117-129.
14. Sutton J, Yu H. *Gliocladium roseum*: a cosmopolitan antagonist of *Botrytis cinerea* and other pathogens in crops. In: Cong Annual APS, División Caribe. San José, Costa Rica. 1997.
15. Rivera-Fonseca A. Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja Saponaria* Mol. cultivada *in vitro* en *Botrytis Cinerea* Pers. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Temuco, Chile. 2007.
16. Yu H, Sutton J. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. Canadian J Plant Pathol 1997; 19(3):237-246
17. Guédez CL, Cañizalez L, Castillo C, Olivar R. Efecto antagonico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Rev RSVM 2009; 29:34-38
18. García S, Landeras E, Alzugaray R, Braña M. Podredumbre gris de la “vid”. Consejería del medio ambiente y desarrollo rural. Principado de Asturias. España. 2007.
19. Mont R. Manejo integrado de las enfermedades de las plantas. SENASA. Lima-Perú. pp. 50-56. 2002.
20. Vazques-Garcidueñas S, Leal-Morales C, Herrera-Estrella A. Analysis of the β -1, 3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. App Environ Microbiol 1998; 64(4): 1442-1446
21. Hernández-Lauzardo A, Bautista-Baños S, Velásquez-Del Valle M. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Rev Mex Fitopatol 2007; 25: 66-74
22. Ordoñez V. Producción de enzimas microbianas y sus aplicaciones en la industria. En: II Cong Intern Microbiol Indust. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2000.