



## Efecto antagónico *in vitro* de controladores biológicos sobre la pudrición gris de frutos de fresa (*Fragaria* spp) en el distrito de Chachapoyas (Amazonas)

### In vitro antagonistic effect of biological controllers on grey rot of strawberry fruits (*Fragaria* spp) in the district of Chachapoyas (Amazonas)

Malluri Goñas Goñas<sup>1</sup>, Nora Yessenia Vera Obando<sup>2</sup> y Santos Triunfo Leiva Espinoza<sup>3\*</sup>

#### RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto *in vitro* de la capacidad antagónica de cinco controladores biológicos (*Clonostachys rosea*, *Trichoderma viride*, *T. asperellum*, *T. lignorum* y *T. harzianum*) sobre el agente causal de la pudrición gris de frutos de fresa (*Fragaria* spp). Se empleó un diseño completamente al azar, bajo el método de cultivos duales, con seis tratamientos incluidos un testigo absoluto y un testigo químico con cinco repeticiones por tratamiento. Se determinó que el agente causal de la pudrición gris de los frutos de fresa es *Botrytis* spp. Por otro lado, se encontró que el tiempo de contacto entre el patógeno y las cepas de *Trichoderma* spp se produjo al cuarto día después del enfrentamiento. Estas cepas también alcanzaron un mayor PICR del patógeno diferenciándose significativamente ( $p \geq 0,5$ ) de los demás tratamientos evaluados, con un grado II en la competencia por sustrato, donde el crecimiento del antagonista sobrepasó las dos terceras partes de la placa Petri. Por otro lado, al enfrentar *Botrytis* spp con *Clonostachys* spp, el patógeno sobrepasó su crecimiento micelial en dos cuartas partes de la placa Petri. Bajo este escenario se puede optar por usar las cuatro especies de *Trichoderma* como agente de control biológico para inhibir el crecimiento de *Botrytis* spp, y con esta alternativa de control se puede desarrollar una agricultura orgánica y sostenible.

**Palabras clave:** pudrición gris, fresa, control biológico, *Trichoderma* spp.

#### ABSTRACT

The objective of the present investigation was to evaluate the *in vitro* effect of the antagonistic capacity of five biological controllers (*Clonostachys rosea*, *Trichoderma viride*, *T. asperellum*, *T. lignorum* and *T. harzianum*) on the causal agent of gray rot of fruits of strawberry. A completely randomized design was used under the dual culture method with six treatments including an absolute and a chemical control with five replicates per treatment. It was found that the contact time between the pathogen and the *Trichoderma* spp strains occurred on the fourth day after the confrontation. These strains also reached a higher PICR of the pathogen being significantly different ( $p \geq 0.5$ ) from the other treatments evaluated, with a grade II in competition for substrate, where the growth of the antagonist exceeded two thirds of the Petri dish. On the other hand, when facing *Botrytis* spp with *Clonostachys* spp, the pathogen surpassed its mycelial growth in two quarters of Petri dish. Under this scenario we can choose to use the four species of *Trichoderma* as a biological control agent to inhibit the growth of *Botrytis* spp, and with this alternative control can develop an organic and sustainable agriculture.

**Keywords:** gray rot, strawberry, biological control, *Trichoderma* spp.

<sup>1</sup>Bachiller en Ingeniería Agrónoma. Investigadora del INDES-CES, UNTRM. E-mail: malluri.gonas@untrm.edu.pe

<sup>2</sup>Bióloga Microbióloga. Investigadora del INDES-CES, UNTRM. E-mail: nvera@indes-ces.edu.pe

<sup>3</sup>Ingeniero Agrónomo. Investigador del INDES-CES, UNTRM.

\*Autor de correspondencia. E-mail: santos.leiva@untrm.edu.pe

## I. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria* spp), es un cultivo que ha incrementado su importancia en la región Amazonas (Perú) gracias a las buenas condiciones agroclimáticas que se presentan para el desarrollo del mismo. Sin embargo, debido a sus condiciones fisiológicas resulta muy susceptible a la pérdida de humedad (USDA, 2010). Esto motiva el interés de nuevas empresas en implementar grandes áreas de producción para cubrir la demanda y la investigación previa, ya que la fresa tiene una gran importancia en el mercado local, regional y nacional, por su color, aroma y sabor. Esto ya ocurre en otros países con realidades similares como Colombia, donde con vista en la importancia de este cultivo se han iniciado investigaciones estratégicas agronómicas, apoyadas en estudios eco-fisiológicos, los cuales, serían de gran importancia para el desarrollo agrícola nacional (Posada *et al.*, 2011).

La fresa es una fruta común e importante en la dieta mediterránea debido a su alto contenido de nutrientes esenciales y fotoquímicos beneficiosos, que parecen tener una actividad biológica relevante en la salud humana (Giampieri *et al.*, 2012). Sin embargo, en la etapa de cosecha y post cosecha, el moho gris en los frutos de fresa causado por *Botrytis* spp es una enfermedad limitante, ya que disminuye la calidad y el valor comercial de los frutos. Además, el moho gris es considerado como la enfermedad más importante de la fresa, y puede llegar a generar pérdidas de hasta el 50% de la producción (Merchán-Gaitán *et al.*, 2014).

Cabe destacar que algunos de estos hongos encontrados en frutas y vegetales en la post cosecha (*Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, etc) producen micotoxinas que afectan a la salud pública, produciendo enfermedades por intoxicaciones (Batta, 2004).

Así, y para el control de las enfermedades producidas en la fruta, el productor opta por alternativas de fácil acceso que den resultados a corto plazo, como es el caso del control químico, sin importar que genere residuos tóxicos en los frutos, suelo y medio ambiente, y ocasionando además la resistencia de muchas

enfermedades. El control biológico de enfermedades en las plantas mediante la utilización de microorganismos es considerado como una de las alternativas más deseables y factibles en el manejo de las plagas en la agricultura, pues puede proveer un control adecuado de éstas, dentro de los conceptos más recientes de agricultura sostenible. De esta manera el uso de microorganismos para el tratamiento en post cosecha se ha incrementado en los últimos años (Cotes, 2014).

Los hongos del género *Botrytis* son hongos saprófitos del suelo y de la madera, y de crecimiento muy rápido. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes, y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición (Martínez *et al.*, 2013), quienes además mencionan que la capacidad antagonista de *Trichoderma* es altamente variable. Dicha capacidad depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción, es decir, pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de un patógeno que de otro; por tal motivo, la especificidad debe ser evaluada (Guedez *et al.*, 2009).

Otro hongo reconocido por su potencial de biocontrol es *Clonostachys rosea*; éste hongo es habitante del suelos con elevado potencial antagonico, coloniza las plantas vivas como endófito, y digiere el material en el suelo como saprófito. También es conocido como un parásito de otros hongos y de nematodos. Los mecanismos de biocontrol atribuidos a *C. rosea*, son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis, siendo el micoparasitismo el principal mecanismo de acción del mismo. Este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células, causándole un daño extensivo, alterando y degradando la pared celular, y causando retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma (Lacherre y Ruiz, 2014).

En este sentido, el objetivo de la investigación fue evaluar el efecto *in vitro* de la capacidad antagonica de

cinco controladores biológicos sobre el agente causal de la pudrición gris de frutos de fresa.

**II. MATERIALES Y MÉTODOS**

**Ubicación de la investigación**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Entomología y Fitopatología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (Figura 1).

**Recolección de muestras**

Se colectaron frutos de fresa de la localidad de Cuelcho (distrito de Chilibuín, Chachapoyas - Amazonas), con síntomas característicos del moho gris. Fueron envueltos en papel toalla, se colocaron en bolsas para ser rotulados y trasladados al laboratorio de Entomología y Fitopatología.

**Aislamiento del fitopatógeno**

Para el aislamiento del patógeno en el laboratorio, se procedió a cortar pequeños trozos de frutos con

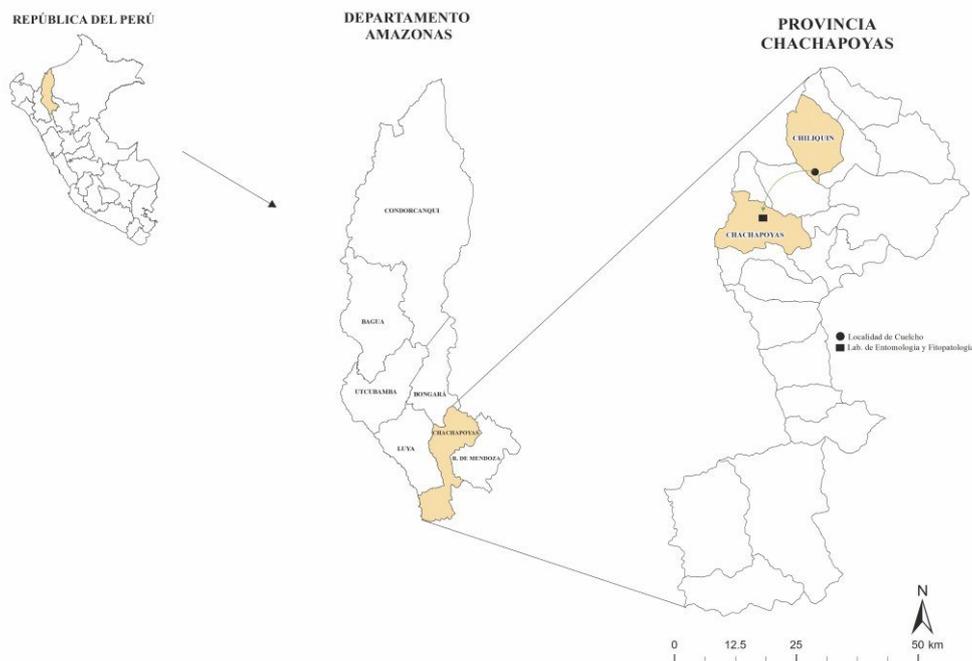
síntomas de la enfermedad, de aproximadamente 0,5 cm de diámetro. Estos trozos fueron colocados en agua corriente por una hora, transcurrido este tiempo se enjuagó con hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos. A continuación se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar en placas Petri con papel toalla estéril por un promedio de cinco a seis horas. Finalmente se sembraron cinco cortes por placa Petri conteniendo medio de Cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), y fueron incubados a 26 °C hasta la observación de crecimiento micelial.

**Identificación del fitopatógeno**

En cada una de las colonias desarrolladas en las placas se realizaron observaciones microscópicas con azul de lactofenol para identificar *Botrytis* spp a partir de las características del patógeno (forma de conidios y conidióforos) descritas por Agrios (1995).

**Prueba de antagonismo**

Para la evaluación del efecto antagónico se siguió la



**Figura 1.** Ubicación del área de estudio en la localidad de Cuelcho, distrito de Chilibuín, y ubicación del laboratorio de Entomología y Fitopatología de la UNTRM, localidad de Chachapoyas (provincia de Chachapoyas)

metodología descrita por Calvo-Araya *et al.* (2012) con algunas modificaciones. De esta manera se aplicó el método de cultivos duales, utilizando placas petri con 20 ml de medio de cultivo PDA. En éstas placas, se sembró un disco de 5 mm de la cepa del controlador biológico en un extremo; en el otro extremo, a una distancia de 7 cm se colocó el hongo *Botrytis* spp. Estas placas se incubaron a una temperatura de 26 °C ± 1 °C. A continuación se realizaron observaciones diarias midiendo el crecimiento micelial hasta que el testigo absoluto cubrió por completo la placa Petri de este micelio.

Se determinó el tiempo de contacto, contando el número de días en los que el patógeno y el controlador estuvieron unidos. Cuando el crecimiento micelial del testigo absoluto llenó por completo la placa Petri, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) utilizando la fórmula:

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_2} \times 100$$

Dónde:

R<sub>1</sub>= radio del patógeno testigo absoluto

R<sub>2</sub>= radio del patógeno con tratamiento

La competencia por sustrato se determinó 10 días después del enfrentamiento, de acuerdo a la escala utilizada por Calvo-Araya *et al.* (2012), la cual consta de cinco clases: en la primera, el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno; en la segunda, el antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo; en la tercera, el antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro; en la cuarta, el patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri; y en la quinta, el agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente la placa Petri.

### Diseño Experimental

Se trabajó en un Diseño Completamente al Azar (DCA), de tal forma que se distribuyó el mismo en siete tratamientos con cinco repeticiones cada uno, resultando un total de 35 unidades experimentales, donde: T1, Testigo absoluto; T2, Testigo químico propineb a 1000 ppm; T3, *Botrytis* spp vs *Clonostachys rosea*; T4, *Botrytis* spp vs *Trichoderma Viride*; T5, *Botrytis* spp vs *Trichoderma asperellum*; T6, *Botrytis* spp vs *Trichoderma lignorum*; y T7, *Botrytis* spp vs *Trichoderma harzianu*. Los datos fueron procesados y analizados con el Programa R versión 3.3.1 (R Core Team, 2013), y los parámetros fueron evaluados mediante la prueba de Duncan (p≤0,5) para comparación de medias.

### III. RESULTADOS

#### Identificación del agente causal de la pudrición gris de los frutos de fresa (*Fragaria* spp)

Se observaron macroscópicamente colonias con el micelio de color grisáceo en la placa Petri, y en la observación microscópica de estas colonias, se identificaron conidios con forma semejante a una uva que se encuentran agrupados en racimos (Figura 1). La velocidad del crecimiento fue de cinco días para cubrir toda la placa Petri.



**Figura 2.** Vista microscópica de los conidióforos en forma de racimos de *Botrytis* spp con un aumento de 63x.

**Crecimiento micelial del patógeno enfrentado a los controladores biológicos**

La figura 3 muestra el crecimiento radial del hongo fitopatógeno cinco días después del enfrentamiento. Se puede observar que el tratamiento T1 (Testigo absoluto) presenta el mayor crecimiento micelial del patógeno (4,5 cm), llenando por completo la placa Petri; sin embargo no presenta diferencia significativa estadística con los tratamientos T2 (4,4 cm) y T3 (4,1 cm). A su vez, el T6 (*Botrytis* spp vs *T. lignorum*) exhibe el menor crecimiento micelial de

patógeno (1,7 cm), sin presentar de nuevo diferencias significativas con los tratamientos T4 (2,1 cm), T5 (2,0 cm) y T7 (1,9 cm).

**Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Botrytis* spp frente a los controladores biológicos**

La figura 4 muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento radial cinco días después del enfrentamiento, observándose que el tratamiento T3 (*Botrytis* spp vs *Clonostachys rosea*) reporta el menor PICR del fitopatógeno (8,5%), seguido del T2 (1,8%), con el cual no se evidencian diferencias estadís-

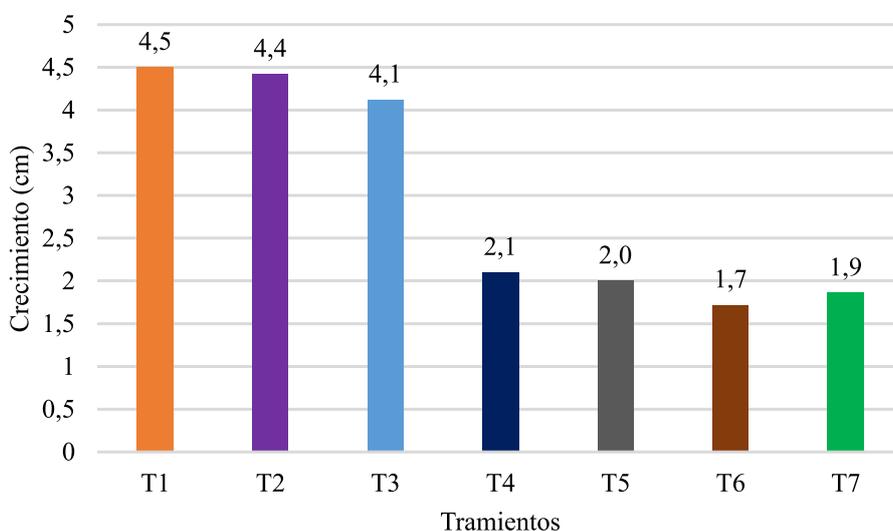


Figura 3. Crecimiento radial de *Botrytis* spp, al día 5 (120 horas) después del enfrentamiento

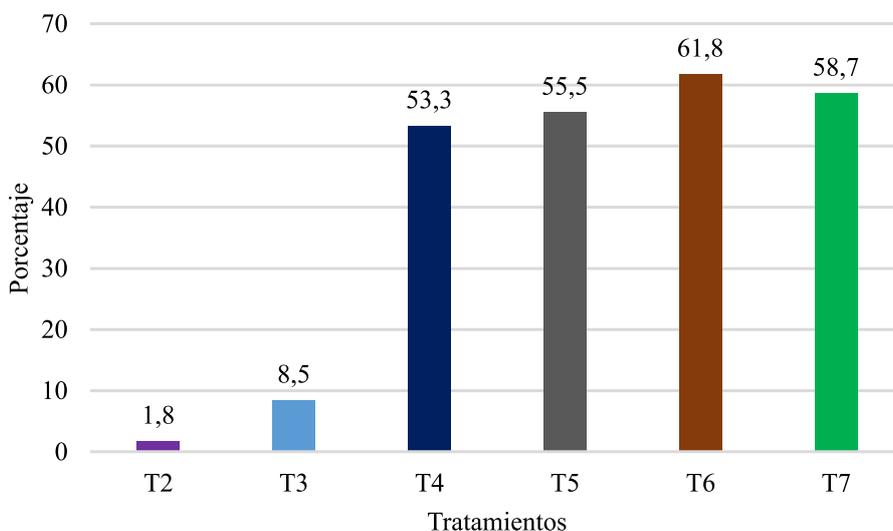


Figura 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) al día 5 (120 horas) después del enfrentamiento

ticamente significativas. En cambio el Tratamiento T6 (*Botrytis* spp vs *T. lignorum*) presenta el mayor PICR del patógeno (61,8%), a pesar de no presentar diferencias significativas con los tratamientos T4 (53,3%), T5 (55,5%) y T7 (58,7%).

**Determinación de competencia por sustrato de los controladores biológicos**

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos de la competencia por sustrato de acuerdo a la escala usada por Calvo-Araya *et al.* (2012) Así, el tratamiento químico (T2) se ubica en la categoría V, el tratamiento con *Clonostachys rosea* (T3), en la categoría IV, y los

tratamientos con *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum* y *T. lignorum* (T7, T4, T5 y T6 respectivamente) se ubicaron en la categoría II, hecho que los sitúa en la categoría de antagonistas de *Botrytis* spp.

**Tiempo de contacto.**

El tiempo de contacto entre el patógeno y las cepas de *Trichoderma* spp se dio cuatro días (96 horas) después del enfrentamiento; por el contrario, la cepa de *Clonostachys rosea* tuvo contacto con el patógeno siete días después del enfrentamiento.

**Tabla 1.** Clasificación de la competencia de acuerdo a la escala utilizada por Calvo-Araya *et al.*

Indicador	Categoría	Tratamientos
El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno	I	-
El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo	II	T4, T5, T6 y T7
El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro	III	-
El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri	IV	T3
El agente fitopatógeno llega a cubrir total-mente el plato Petri.	V	T2

Fuente: Elaboración propia

**IV. DISCUSIÓN**

Las observaciones microscópicas realizadas con azul de lactofenol permitieron diferenciar conidios con forma semejante a uvas agrupadas en racimos, características morfológicas que coinciden con la descripción reportada por Agrios (1995) quien expresa que dicha descripción corresponde a estructuras propias de *Botrytis* spp.

Se encontró que, *Botrytis* spp, agente causal de la pudrición gris de los frutos de fresa, tuvo contacto con las cepas de *Trichoderma* a las 72 y 96 horas. Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado por Reyes-Ramírez *et al.* (2012), al enfrentar *Basillus* spp con *Macrophomina phaseolina*; en este último encontraron que el tiempo de contacto entre estos fue de 48 a 72 horas, por lo que cuanto más rápido se dé el tiempo de contacto existe mayor agresividad del antagonista.

Se ha demostrado que las aplicaciones de *T. harzianum* en uvas y manzanas reduce parcialmente la enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinerea* y las protege por más de dos meses (Latorre *et al.*, 1997). Resultó que el crecimiento micelial de *Botrytis* spp, en los tratamientos T1 (testigo absoluto) y T2 (testigo químico propineb a 1000 ppm), fue mayor, diferenciándose significativamente de los tratamientos enfrentados (*T. asperellum*, *T. viride*, *T. lignorum* , *T. harzianum*. y *Clonostachys rosea*); sin embargo el crecimiento radial del fitopatógeno enfrentado a *Trichoderma* spp, no evidenció diferencias significativas, debido a que la capacidad de reproducción de las especies del género *Thichoderma* es alta y puede cubrir mayores espacios que los hongos fitopatógenos. Las especies de *Trichoderma* regularmente presentan resultados satisfactorios en las pruebas de competencia por sustrato para *Clonostachys rosea* (Calvo-

Araya *et al.*, 2012).

Por otro lado, los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento radial de *Botrytis* spp se obtuvieron con las cepas de *Trichoderma* spp: 61,78% (*T. Lignorum*), 58,66% (*T. harzianum*), 55,54% (*T. asperellum*) y 53,32% (*T. viride*), podría ser debido a que estos controladores continuaron creciendo hasta cubrir toda la placa, evitando así el crecimiento del fitopatógeno. Merchán-Gaitán *et al.* (2014), al evaluar el efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad de fruto en fresa, encontraron que la incidencia de la enfermedad en el tratamiento testigo fue del 60%, mientras que para los tratamientos con *T. harzianum* y *T. lignorum* solo alcanzó un 33%. De igual manera estas cepas redujeron significativamente la severidad en un 32%, reduciendo así el desarrollo del patógeno en la planta. Esto nos indica un control mayor de los antagonistas de este género en comparación con el producto químico sobre la enfermedad. Además Calvo-Araya *et al.*, (2012), también mencionan que la capacidad antibiótica desarrollada por el género *Trichoderma* se debe a la producción de los antibióticos peptaibol, y trichozianinas A1 y B1. Mediante la producción de estas sustancias *Trichoderma* spp logra inhibir la germinación de las esporas y la elongación de las hifas de *B. cinerea*.

En general existen reportes que afirman que los mecanismos empleados por distintos microorganismos controladores de patógenos se realizan a través de la producción de diversos metabolitos antifúngicos, los cuales contribuyen a la inhibición del crecimiento. Cabe destacar que no siempre es un solo mecanismo el que utilizan, sino que en algunos casos pueden presentarse varios diferentes (Plascencia-Tenorio *et al.*, 2012)

Calvo-Araya *et al.*, (2012), al determinar la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp sobre *Botrytis cinerea* en el cultivo de mora, encontraron que se ubicaron en la clase I y II. Todo esto corrobora los resultados obtenidos con el género *Trichoderma*, el cual a nivel *in vitro* llegó a sobrepasar las dos terceras partes (clase

II) de la superficie del medio de cultivo con *Botrytis* spp. Por otro lado, en la búsqueda de alternativas naturales para el control de pudriciones post cosecha se ha valorado el empleo de extractos vegetales, antagonismo microbiano (control biológico) y el quitosano (Fraire-Cordero *et al.*, 2003).

## V. CONCLUSIONES

El tiempo transcurrido hasta el contacto entre *Botrytis* spp y las cepas de *Trichoderma* se produjo entre las 72 y 96 horas después del enfrentamiento.

El contacto entre *Botrytis* spp y las cepas de *Clonostachys rosea* se produjo a las 168 horas después del enfrentamiento.

El mayor crecimiento micelial del fitopatógeno se obtuvo en los tratamientos T1 (4,5 cm) y T2 (4,42 cm), mientras que los tratamientos enfrentados con controladores biológicos reportaron menor crecimiento radial, indicando que cuando se enfrenta a *Botrytis* spp con un controlador biológico disminuye su crecimiento radial.

Las cuatro cepas del género *Trichoderma* tuvieron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Botrytis* spp.

## RENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- N. 1995. *Fitopatología*. México D. F. (México): Libros Agronómicos.
- Batta, Y. A. 2004. "Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold". *International Journal of Food Microbiology* 96: 281 – 288.
- Calvo-Araya, J. A., G. Rivera-Coto, S. Orozco-Cayasso y R. Orozco-Rodríguez. 2012. "Aislamiento y evaluación *in vitro* de la antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora". *Agron. Mesoam* 23: 225 – 231.
- Cotes, A. M. 2014. "Control biológico de enfermedades de plantas en Colombia". En *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe*.

- Bettiol, W., M. C. Rivera, P. Mondino, J. R. Montealegre, Y. C. Colmenárez (eds). Montevideo (Uruguay): Universidad de Uruguay.
- Fraire-Cordero, M., M. Yáñez, D. Nieto y G. Vázquez. 2003. “Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en post cosecha”. *Revista Mexicana Fitopatología* 2: 285 – 291.
- Giampieri, F., S. Tulipani, J. M. Alvarez-Suarez, J. L. Quiles, B. Mezzetti y M. Battino. 2012. “The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health”. *Nutrition* 28: 9 – 19.
- Guedez, C., L. Cañizález, C. Castilloa y R. Olivarb. 2009. “Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos post cosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29: 34 – 38.
- Lacherre, M. R. R. y J. R. C. Ruiz. 2014. “Efecto antagónico *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinifera*. *Revista Rebiol* 33: 42–49.
- Latorre, B. A., E. Agosin, R. San Martín y G. S. Vasquez. 1997. “Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis bunch* rot table grape in Chile”. *Crop Protection* 16 (1997): 209 – 214.
- Martínez, B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. “*Trichoderma* spp y su función en el control de plagas en los cultivos”. *Revista de Protección Vegetal* 28: 1 – 11.
- Merchán-Gaitán, J. B., R. L. Ferrucho y J. G. Álvarez-Herrera. 2014. “Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* spp)”. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 8: 44 – 56.
- Plascencia-Tenorio, R. I., V. Olalde-Portugal, H. G. Mena-Violante, L. F. Ceja-Torres, J. Venegas-González, G. Oyoque-Salcedo y M. V. Angoa-Pérez. “Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*”. *Ra Ximhai* 8: 103 – 110.
- Posada, F. C., J. E. Peña-Olmos y C. Ulrichs. “Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* spp) afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas”. *Revista UCDA Actualidad y Divulgación Científica* 14: 43 – 53.
- R Core Team. 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Reyes Ramírez, A., E. Ruiz Sánchez, C. Yam Chimal y M. Dzul Chan. 2012. “Selección de *Bacillus* spp con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo”. *Fitosanidad* 15: 117–121.
- USDA (US Department of Agriculture). 2010. *The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks*. Beltsville (EEUU): USDA, ARS. Recuperado de: <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html>