

Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Aragua, Venezuela

Importance of *Trichoderma* species for control of *Macrophomina phaseolina* in agricultural areas of Aragua state, Venezuela

Luis A. Salazar¹, Glenda Y. Aponte¹, María de J. Alcano²,
Nelly H. Sanabria² y Jessica J. Guzmán²

¹Investigadores. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Maracay 2101. Estado Aragua. Venezuela.

²Profesores. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía. Maracay 2105. Estado Aragua. Venezuela.
Correos electrónicos: luisagronomia@gmail.com, gaponteve@gmail.com, salabrian@cantv.net

RESUMEN

Los hongos del género *Trichoderma* merecen máxima atención como agentes biocontroladores debido a que se demostró su alto poder antagónico en patógenos vegetales. El objetivo de esta investigación fue identificar las especies de *Trichoderma* aisladas de suelos en zonas productoras de caraota, maíz, tomate y sorgo en los estados Aragua, Carabobo y Guárico, para comprobar su valor antagónico en el control de *Macrophomina phaseolina*. Las muestras fueron procesadas utilizando el método de dilución en placa de agar, los aislamientos obtenidos fueron purificados sobre PDA, se realizó su determinación a nivel de especie. Para ello, fueron crecidos los aislamientos por 3 a 4 días y 6 a 8 días, siendo examinados macro y microscópicamente. Doce aislamientos fueron obtenidos, nueve fueron referidos a la especie *Trichoderma harzianum* (06146, 06143, FTSC05, JCFA05, 06153, I9, J10, 06151 y San Miguel); y los aislamientos restantes pertenecen a las especies *T. crassum* (06141), *T. koningiopsis* (06152) y *T. longibrachiatum* (Samán Mocho), respectivamente. Se encontró variabilidad *in vitro* en cuanto al control ejercido por cada aislado contra *M. phaseolina* en función del porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) y del porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC). El aislado 06141 perteneciente a *T. crassum* fue el más eficiente en el control de *M. phaseolina*, ya que presentó mayor PIE de 91,02 y 91,50% del PIC en comparación a los demás aislados, los cuales tuvieron un efecto inhibitorio con respecto al hongo patógeno en el rango de 65,09 a 84,69% para el PIE y de 67,33 a 77,48% para el PIC.

Palabras clave: control biológico, *in vitro*, taxonomía de hongos, patógeno, inhibición de esporulación, inhibición de crecimiento.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Trichoderma* deserve maximum attention as biocontrol agents because they demonstrated their high antagonistic power plant pathogens. The objective of this research was to identify *Trichoderma* species isolated from soil samples of bean growing areas, corn, tomato and sorghum in Aragua, Carabobo and Guarico and antagonistic value was found in the control of *Macrophomina phaseolina*. The samples were processed using the method of agar plate dilution, the isolates obtained were purified on PDA, its determination was performed at the species level. To do this, the isolates were grown for 3-4 d and 6-8 d being examined macro and microscopically. Twelve isolates were obtained, nine were related to the species *Trichoderma harzianum* (06146, 06143, FTSC05, JCFA05, 06153, I9, J10, and San Miguel 06151); and the remaining isolates belong to the species *T. crassum* (06141), *T. koningiopsis* (06152) and *T. longibrachiatum* (Samán Mocho) respectively. Variability *in vitro* was found in the control exercised by each isolated against *M. phaseolina*, depending on the percent inhibition of sporulation (PIE) and growth inhibition (PIC). The isolated belonging to *T. crassum* 06141 was the most effective in controlling *M. phaseolina*, and showed higher PIE of 91.02% and 91.50% of PIC compared to other isolates, which had an inhibitory effect with respect to the fungal pathogen in the range of 65.09 to 84.69% for the PIE and 67.33 to 77.48 for the PIC.

Key words: biological control, fungus taxonomy, *in vitro*, pathogens, inhibition of sporulation, growth of inhibition.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Trichoderma* se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo y están presentes en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos con altos contenidos de materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de aquellos cultivos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo es favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente.

Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado como agente biocontrolador en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos. En Venezuela, existen varios productos comerciales con base en *Trichoderma* spp., utilizados en el control de enfermedades en plantas (Anzola, 2003).

En este sentido, las especies de hongos que pertenecen a *Trichoderma* son plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, fundamentalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos. Benhamou *et al.* (1993) señalaron que las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de afectar negativamente a los hongos fitopatógenos en diferentes estados de desarrollo, siendo capaces de reducir su crecimiento y esporulación al actuar sobre sus estructuras (hifas, conidios y esclerocios). Por ello, se consideran prometedoras para el control biológico de enfermedades en plantas.

En esta investigación se planteó como objetivo, determinar especies de *Trichoderma* aisladas de muestras de suelo de zonas productoras de caraota, maíz, tomate y sorgo, en los estados Aragua, Carabobo y Guárico, con el fin de evaluar su acción en el control del hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, que afecta al cultivo de caraota.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de suelos

Se tomaron muestras de suelo en ocho zonas productoras de caraota, maíz, tomate y sorgo en los estados Aragua, Carabobo y Guárico.

Se recolectó aproximadamente 1 kg de suelo cercano a la rizósfera de las plantas, que estaba en condiciones de capacidad de campo.

Aislado de hongos a partir de muestras de suelo

En solo 10 g de suelo de cada uno de los sitios muestreados, se agregó 90 ml de agua destilada estéril contenidos en una fiola. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensayo que contenían 9 ml de agua destilada estéril, hasta llegar a concentraciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} [UFC/ml].

De cada una de las diluciones obtenidas se colocó 1 ml por placa de Petri de 100 x 15 mm, luego se agregó 15 ml de medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) derretido a temperatura moderada, el cual se extendió en la placa. Se realizaron cuatro réplicas por cada dilución. Las cajas Petri así preparadas se incubaron a una temperatura de 28 °C por un período de 24 a 48 h. Seguidamente, se tomó parte del hongo en crecimiento para hacer cultivos monospóricos y obtener cultivos puros que fueron conservados en tubos con PDA a 5 °C.

Determinación a nivel específico de los aislados de *Trichoderma* obtenidos

Para ello se utilizaron aislados sobre PDA de 3 a 4 días y de 6 a 8 días de crecimiento. Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas, describiendo los siguientes aspectos de la colonia: color del micelio, tinción de la placa agarificada, producción de pústulas y masas de conidios y formación de anillos concéntricos.

También, con la ayuda de un microscopio compuesto Leica DM 1000 se registraron las características de las estructuras fúngicas con valor taxonómico incluyendo el tipo de conidióforo, número de células conidiógenas (fiálides) por verticilo, presencia de fiálides intercaladas, forma, largo y ancho en micromilímetro (μm) de las fiálides; forma, largo y ancho en μm , color y ornamentación de los conidios; presencia y forma de clamidosporas. Las muestras se observaron con un aumento de 1000 X. Las mediciones de longitud se efectuaron utilizando un ocular con barra micrométrica, y una tabla de conversión a micras.

Para la determinación se realizó el estudio comparativo de las descripciones de los hongos investigados con las características de las especies de *Trichoderma* presentadas por Rifai (1969) y Bisett (1991 a, b, y c).

Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de los aislados de *Trichoderma* spp., con respecto a *Macrophomina phaseolina*

En los bordes de cada una las placas de Petri con PDA y en sitios equidistantes se colocó un disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio de *M. phaseolina* de 5 días de edad (suministrada por la colección de hongos del laboratorio de la Clínica de Enfermedades de Plantas, Universidad Central de Venezuela, previa comprobación de su patogenicidad) y un disco de agar con micelio del aislado de *Trichoderma* a investigar de 3 días de edad. El testigo consistió solamente en un disco con micelio de *M. phaseolina*.

Se hicieron cinco repeticiones por aislado, las placas así preparadas se incubaron a 28 °C durante 6 días. Se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC), se midió el largo y el ancho de cada tratamiento (hongo patógeno) con una cinta métrica en centímetros y el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) en el patógeno. La estimación de PIC y PIE se realizó según Vincent, como lo sugiere Latiegue (1990), indicada en las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$PIC = 100 (C - T) / C \quad (1)$$

$$PIE = 100 (C - T) / C \quad (2)$$

donde:

C: crecimiento micelial del control.

T: crecimiento o esporulación del tratamiento.

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con cinco repeticiones (un control de cada tratamiento), donde la unidad experimental fue cada placa de Petri del antagonista con el respectivo hongo patógeno y el hongo patógeno solo, los análisis se realizaron por la vía paramétrica para analizar la varianza (ANAVAR), previa comprobación de la distribución normal

de los datos, mediante la prueba W de Shapiro-Wilks (1965), la homocedasticidad de las varianzas mediante la prueba χ^2 de Bartlett (1937). Las comparaciones múltiples de medias se realizaron mediante el uso de las pruebas HSD de Tukey con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$; utilizando el programa STATISTICA versiones 7 y 8 (2002-2007) para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para la identificación de las especies de *Trichoderma* presentes en las muestras de suelos analizados, se señalan en el Cuadro 1. Se obtuvieron doce aislados de *Trichoderma* spp., de los cuales nueve fueron referidos a *T. harzianum* Rifai y el resto a las especies *T. longibrachiatum* Rifai, *T. koningiopsis* y *T. crassum* (Bissett, 1991a).

Es importante resaltar, haber encontrado únicamente en el cultivo del maíz a la especie *T. longibrachiarum*. Particularmente, esta especie fue identificada en suelos del estado Carabobo, razón por la cual debe tomarse en consideración su asociación con un cultivo tan importante como el maíz. Del mismo modo, es interesante señalar que se encontró coexistencia de especies solo entre *T. harzianum* y *T. koningiopsis* en los suelos de Tucutunemo. Se reporta la presencia de *T. harzianum* en varios cultivos, mientras que *T. crassum* y *T. koningiopsis* solamente aparecieron asociados al cultivo de la caraota.

Pareciera existir una especificidad de especies asociada a los cultivos de maíz, sorgo y tomate, mientras que en el caso de la caraota, se consigue la asociación con varias especies de *Trichoderma*. Esto pudiera ser de relevancia al momento de diseñar estrategias de control biológico en estos cultivos utilizando *Trichoderma*.

Se logró identificar los aislamientos de *Trichoderma* spp., utilizando los criterios de identificación taxonómica y tomando en consideración las características fundamentales descritas por (Bissett, 1991 a,b,c; Rifai, 1969). En el Cuadro 2, se pueden observar las características macroscópicas y microscópicas de los aislados de las especies de *Trichoderma* spp.

Cuadro 1. Identificación de las especies de *Trichoderma* presentes en las muestras de suelos analizados.

Nombre del aislado	Cultivo presente	Procedencia	Identificación
Samán Mocho	Maíz	Estación experimental Samán Mocho, FAGRO U.C V., estado Carabobo.	<i>T. longibrachiatum</i>
JCFAO5	Caraota	Caicara, estado Aragua	<i>T. harzianum</i>
FTSCO5	Tomate	Finca Los Apamates, El Sombrero, estado Guárico	<i>T. harzianum</i>
J10	Tomate	Vía Camatagua, estado Aragua	<i>T. harzianum</i>
I9	Sorgo	Base Aérea El Libertador, Palo Negro, estado Aragua	<i>T. harzianum</i>
San Miguel	Caraota	Vía Cagua – Villa de Cura, estado Aragua	<i>T. harzianum</i>
06141	Caraota	Arenales, estado Aragua	<i>T. crassum</i>
06143	Caraota	Finca Anapiar, estado Aragua	<i>T. harzianum</i>
06146	Caraota	Finca Los Dolores, estado Aragua	<i>T. harzianum</i>
06153	Caraota	Finca El Mochuelo, Valles de Tucutunemo, estado Aragua.	<i>T. harzianum</i>
06152	Caraota	Valles de Tucutunemo, estado Aragua	<i>T. koningiopsis</i>
06151	Caraota	Finca El Mochuelo; Valles de Tucutunemo, estado Aragua	<i>T. harzianum</i>

En las Figuras 1, 2 3, y 4 se muestran algunas características de crecimiento de *T. harzianum*, *T. crassum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, respectivamente.

Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de los aislados de *Trichoderma spp.*, con respecto a *Macrophomina phaseolina*

Al realizar el análisis de los datos mediante la prueba Shapiro-Wilk (1965), se obtuvo un valor $w=0,93$, indicando la distribución normal de los datos. La homocedasticidad de las varianzas se estimó mediante el parámetro χ^2 de Bartlett, dando un valor de 3,97, señalando que las varianzas son homogéneas y que las fuentes de variación son las mismas.

Una vez establecida la normalidad de la distribución de los datos, se realizó el ANAVAR para los datos de PIC y PIE. En ambos casos se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, indicando que los aislados

estudiados presentaron un poder antagónico diferente en el control de *M. phaseolina*. En virtud de las diferencias observadas, se procedió a clasificar los aislados para establecer los diferentes niveles de antagonismos o poder de control que exhibieron.

Para ello se realizó la prueba DSH de Tukey, que permitió evidenciar la existencia de cuatro grupos (Figura 5). Como se observa, el aislado 06141 perteneciente a la especie *T. crassum*, presentó el mayor PIC (91,50%), conformando el primero de los grupos en cuanto a efectividad de control.

Un segundo grupo se ubicó el aislado 06152 identificado como *T. koningiopsis* con un PIC de 77,48%; seguido de un tercer grupo conformado por los aislados I9, 06151, J10, 06153, 06143 y 06146, todos agrupándose en la especie de *T. harzianum* y un PIC de 74,31 hasta 69,86, notándose una pequeña diferencia en el control de esta especie.

Cuadro 2. Identificación de los aislamientos de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma koningiopsis*.

Nombre del aislamiento	Características macroscópicas	Características microscópicas	Especies de <i>Trichoderma</i>
06143 06146 FTSC05 JCFA05 06513 I9 J10 06151 San Miguel	Crecimiento moderado a rápido, micelio algodonoso, anillos concéntricos, no tiñó el medio, no presentó pústulas.	Hifas hialinas, conidióforo con ramificación intrincada, de una longitud de 123,5 x 3,8 µm y una base de 3,8 µm, fiálides de forma ampuliforme a flageliforme (4,75 x 3,8 µm), con una base de 2,85 µm, conidios globosos a subglobosos, de pared lisa, color verde oliva, longitud de 3,8 a 4,75 x 2,85 a 3,8 µm, abundantes clamidosporas terminales e intercalares, de forma globosa a subglobosa con pared hialina, sus dimensiones fueron 9,5 a 11,4 x 8,55-9,5 µm.	<i>T. harzianum</i>
06141	Crecimiento rápido, micelio algodonoso, formación de exudado color verde claro, presentó pústulas.	Hifas con septos, hialinas, conidióforo con ramificación cerrada, y una longitud de 323 x 3,8 µm de 2 a 5 fialides por verticilo, de forma ampuliforme a flageliforme (8,55 x 2,85 µm) con base de 1,9 µm, presentó extensiones fértiles y estériles, conidios elipsoidales, de pared lisa, color verde pálido, de longitud 4,75 a 5,7 x 3,8 a 4,75 µm, demostró poca producción de clamidosporas terminales e intercalares, de forma subglobosa, con pared lisa, sus dimensiones fueron de 14,25 x 4,75 µm.	<i>T. crassum</i>
06152	Crecimiento rápido, micelio algodonoso.	Hifas hialinas, conidióforos con ramificación abierta, fiálides flageliformes (9,5 a 11,4 x 0,95 a 1,9 µm), conidios subglobosos, color verde oliva, 2,85 x 1,9 µm. Clamidosporas terminales globosas a subglobosas, lisas, hialinas, 6,65 x 6,65 µm.	<i>T. koningiopsis</i>
Samán Mocho	Tiñó el medio de color amarillo, formando agregados de conidios.	Hifas hialinas, conidióforo con ramificación cerrada, de longitud 4,95 x 2,85 µm y una base de 2,85 µm, de 3 a 5 fialides por verticilos de forma ampuliforme a flageliforme 5,7 x 1,9 µm y una base de 1,9 µm, presentó fialides intercalares de forma ampuliforme, de longitud 2,85 x 1,9 µm y una base 0,95 µm, conidios de forma subglobosos a elipsoidales de pared lisa, color verde oliva, de longitud 2,85 x 1,9 µm.	<i>T. longibrachiatum</i>

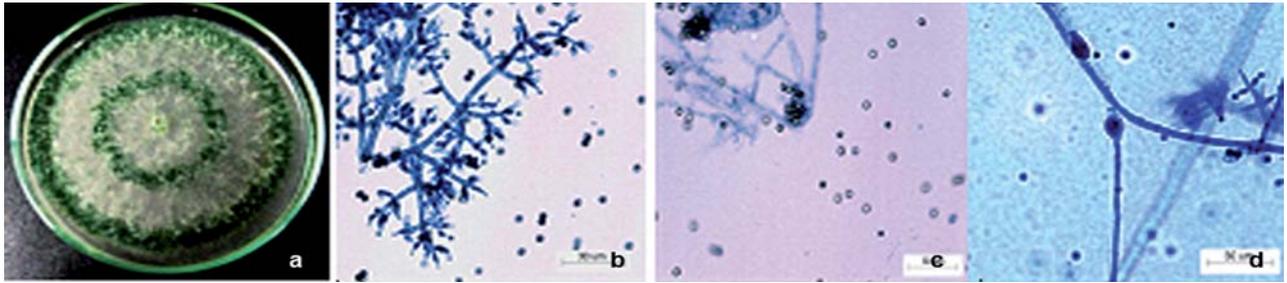


Figura 1. *Trichoderma harzianum*. Aislados 06146, 06143, FTSC05, JCFA05, 06153, I9, J10 y San Miguel. a) formación de anillos concéntricos; b) conidióforos con ramificación intrincada tipo Gliocladium; c) conidios globosos; d) clamidosporas subglobosas.

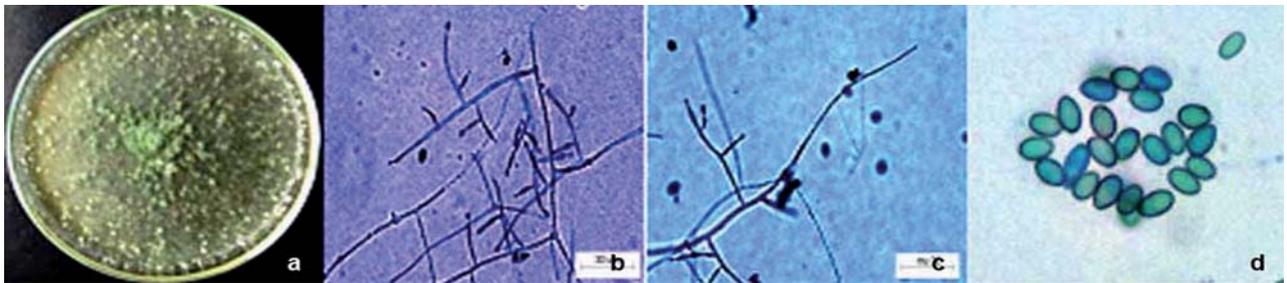


Figura 2. *Trichoderma crassum*. Aislado 06141; a) colonia del hongo; b) conidióforo con extensión hifal fértil; c) conidióforo con extensión hifal estéril; d) conidios elipsoidales.

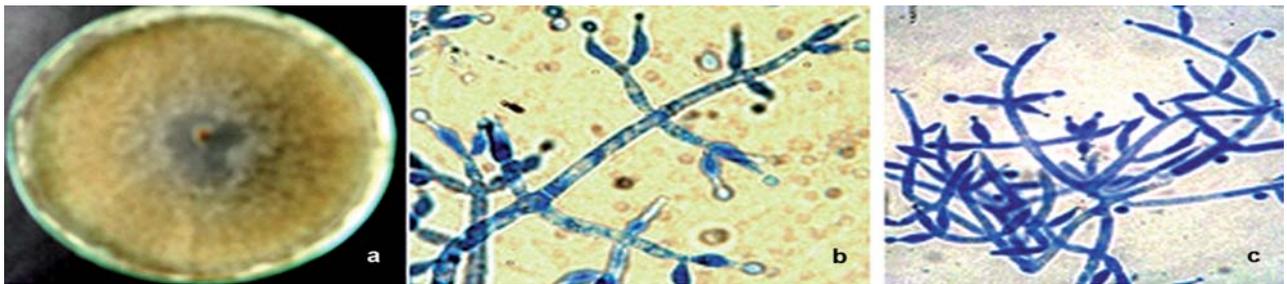


Figura 3. *Trichoderma koningiopsis*. Aislado 06152; a) colonia del hongo; b y c) conidióforo.

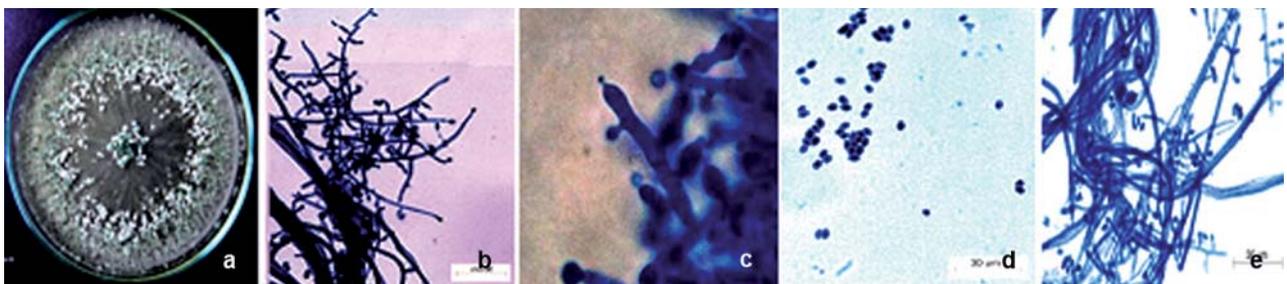


Figura 4. *Trichoderma longibrachiatum*. Aislado Samán Mocho: a) colonia del hongo; b) conidióforo; c) fiálide intercalar; d) conidios elipsoidales; e) clamidosporas intercaladas.

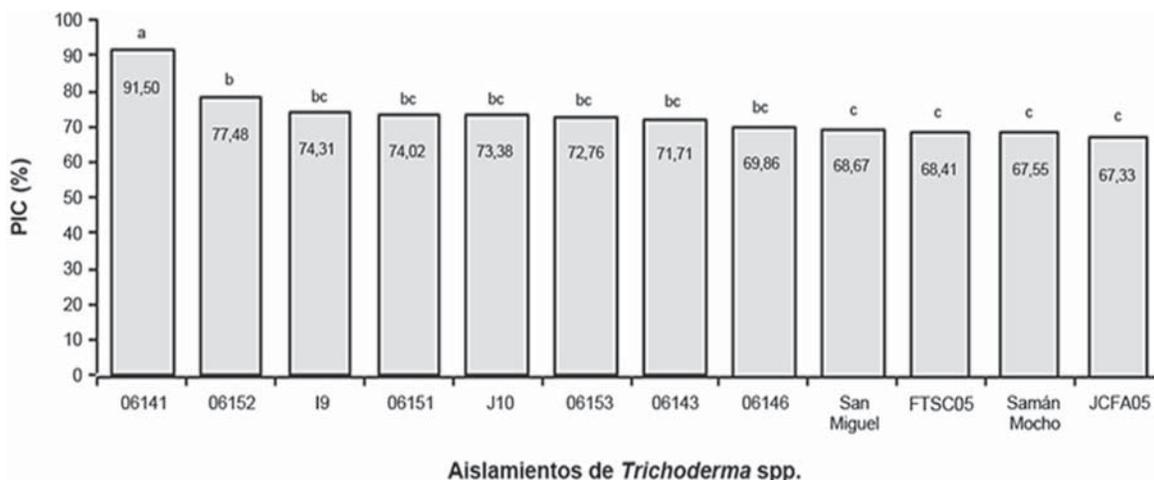


Figura 5. Pruebas MDSH de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$; empleadas para determinar el PIC de cada uno de los aislados de *Trichoderma* sobre el patógeno *Macrophomina phaseolina*.

En el cuarto grupo se encuentran los aislados San Miguel, FTSC05, JCFA05 y Samán Mocho con valores comprendidos entre 67,33 y 68,41%, respectivamente; los tres primeros perteneciente a la especie *T. harzianum* y el último a *T. longibrachiatum*.

Con relación al PIE, las pruebas de medias de Tukey demostraron la existencia de cinco grupos (Figura 6) donde el primer grupo estuvo conformado por los aislados 06141 (*T. crassum*) y 06143 (*T. harzianum*), los cuales presentaron un PIE de 91,02 y 84,69, respectivamente. Un segundo grupo conformado únicamente por el 06146 (*T. harzianum*) mostrando un PIE de 83%; el tercer grupo que incluye a J10, JCFA05, 06153, San Miguel, I9, FTSC05 (todos identificados como *T. harzianum*) y Samán Mocho (*T. longibrachiatum*) con valores del PIE entre 75,18 y 79,44%, el cuarto grupo al aislado 06152 (*T. koningiopsis*); un quinto grupo al 06151 (*T. harzianum*) con un PIE de 65,09%.

El aislado 06141 perteneciente a la especie *T. crassum*, fue el hongo más eficiente en el control de *M. phaseolina*, quien fue el que presentó mayor PIC y PIE, 91,50 y 91,02%, respectivamente. Otros aislados de *Trichoderma* spp., promisorios en el control de *M. phaseolina* fueron los 06141, 06146 y J10, que mostraron menores valores del PIC y mayores valores del PIE.

Estos resultados coinciden con los señalados por Pineda y Gonnella (1988), quienes encontraron dos aislados de *Trichoderma* capaces de inhibir el desarrollo y producción de esclerocios de *M. phaseolina* obtenidos de plantas de ajonjolí. Sobre la base, los aislados más eficientes en el control de *M. phaseolina* fueron 06141, 06143, 06146 y J10 (Figura 6), presentando menores valores del PIC y mayores valores del PIE; esto es lo más importante en un antagonista eficiente ya que los esclerocios representan la principal forma de propagación en el campo del patógeno.

Por su parte, Watanabe *et al.* (1967) demostraron la existencia de una relación directamente proporcional entre la incidencia de la enfermedad y la cantidad de esclerocios en el campo (densidad de inóculo). En cuanto a los principales mecanismos de acción observados en esta investigación se encuentra la antibiosis (Grondona *et al.*, 1995), quienes señalaron a *Trichoderma* capaz de inhibir el crecimiento y esporulación de diversos patógenos sin necesidad de que exista contacto entre las hifas de *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp.

Igualmente, se demostró que *T. koningiopsis* produce metabolitos volátiles que inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici*, y en segundo lugar se pudo observar el crecimiento del aislado de *Trichoderma* sobre el patógeno.

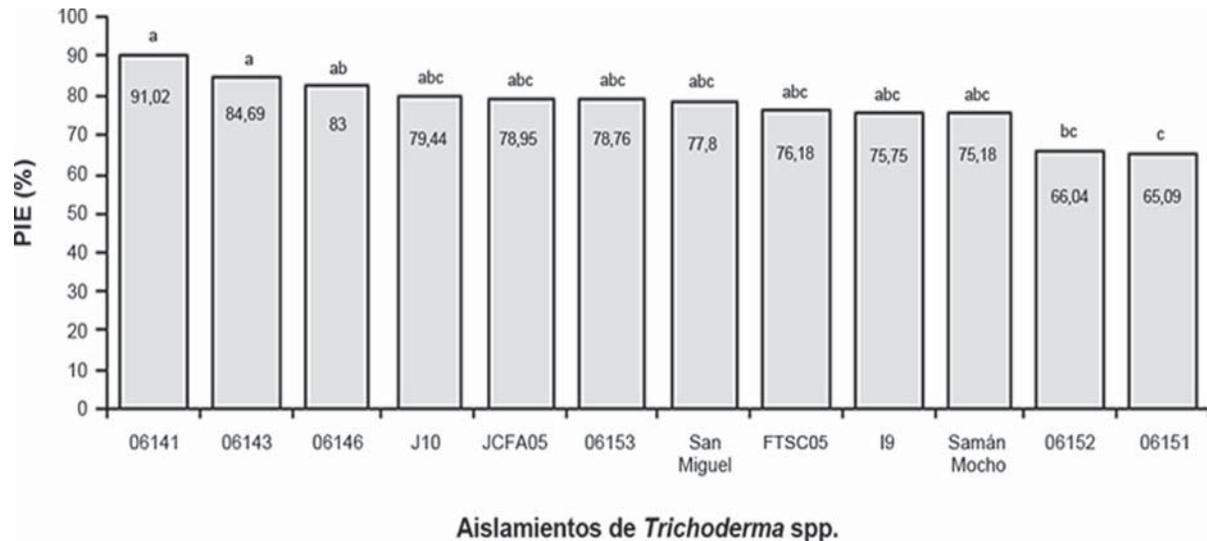


Figura 6. Pruebas MDSH de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, empleadas para determinar diferencias entre el control ejercido (PIE) de cada uno de los aislados de *Trichoderma* sobre el patógeno *Macrophomina phaseolina*.

CONCLUSIONES

De las zonas productoras de caraota, maíz, tomate y sorgo en los estados Aragua, Carabobo y Guárico se identificaron a nivel de especie, si va de doce aislados de *Trichoderma*, nueve fueron referidos a *T. harzianum* y tres aislados; referidos a *T. crassum*, *T. longibrachiarum* y *T. koningiopsis*. En el caso de sorgo y tomate, se encontró una especie asociada a cada cultivo que fue *T. harzianum*; dos especies se encontraron asociadas a caraota y solo hubo coexistencia entre *T. harzianum* y *T. koningiopsis* y para el cultivo de maíz solo se encontró la especie de *T. longibrachiatum*.

En el PIE en el patógeno se demostró la existencia de cinco grupos; el primero conformado por los aislados 06141 y 06143, los cuales presentaron un valor de 91,02 y 84,69, respectivamente; un segundo por el 06146 con un 83%; el tercero que incluye a J10, JCFA05, 06153, San Miguel, I9, FTSC05 y Samán Mocho con valores del PIE entre 75,18 y 79,44%, respectivamente; el cuarto al 06152 (*T. koningiopsis*); un quinto al 06151 (*T. harzianum*) con un PIE de 65,09%. El aislado 06141, perteneciente a la especie *T. crassum*, fue el hongo con mayor eficiencia en el control de *M. phaseolina*.

Los aislados de *Trichoderma* inhibieron el desarrollo y producción de esclerocios de *M. phaseolina* donde el 06141 presentó el mayor PIC (91,50%), un segundo grupo se encontró el 06152 con 77,48%, seguido de un tercer grupo conformado por los aislados San Miguel, FTSC05, JCFA05 y Samán Mocho, con valores comprendidos entre 67,33 y 68,41%.

LITERATURA CITADA

- Anzola, L. 2003. Índice Agropecuario XXVII Edición. Maracay, estado Aragua. Disponible en línea: <http://www.indiceagropecuario.com>
- Bartlett, M. S. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Statistical Society .160(901):268-282.
- Benhamou, N. and I. Chet. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold Cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology. 83(10):1.062-1.071.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69(11):2.357-2.372.

- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasium. Canadian Journal of Botany. 69(11):2.373-2.414.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma* IV. Additional notes on section Longibrachiatum. Canadian Journal of Botany. 69(11):2.418-2.420.
- Grondona, I., M. Hermosa, M. Gomis, P. García, I. García y E. Monte. 1995. Control Biológico de hongos del suelo que afectan semillas y plántulas como alternativas al Bromuro de metilo en la agricultura. Seminario Internacional Almería España. Junta Andalucía. Conserjería de Agricultura y Pesca. Colección de Congresos y Jornadas. Nº 44-97. pp. 13-52.
- Latiegui, A. 1990. *Trichoderma harzianum* Rifai. como antagonista de *Sclerotium rolfsii* Sacc., agente causal de pudrición basal de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, estado Lara. Venezuela. 61 p.
- Pineda, J. y E. Gonnella. 1988. Evaluación del control biológico de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). Agronomía Trop. 38(4-6):43-48.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116. pp. 1-56.
- Shapiro, S. S. y M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika. 52(3-4):591-611.
- Watanabe, T., S. Smith Jr. and W. Snyder. 1967. Populations of microesclerotia of soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* in relation to stem blight of bean. Phytopathology. 57:1.010 (Abstract).