

Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma**

Effect of the extract of rue (*Ruta graveolens*) on the mycelial growth of *Trichoderma*

Claudia Katia Reyes-Quintanar^{1*}, Daniel Martínez-Carrera^{1§}, Porfirio Morales Almora¹, Mercedes Sobal Cruz¹, Alan Helios Escudero-Uribe¹ y José Guillermo Ávila-Acevedo²

¹Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, A. P. 129, Puebla 72001, Puebla, México. ²UNAM, Unidad de Biotecnología y Prototipos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Laboratorio de Fitoquímica, Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala Tlalnepantla, Estado de México, C. P. 54090. *Becaria del CONACYT (no. 100054), doctorado. (ckatiarq@colpos.mx). §Autor para correspondencia: dcarrera@colpos.mx.

Resumen

Uno de los principales problemas en el cultivo de hongos comestibles es la contaminación causada por el moho verde *Trichoderma*, el cual se caracteriza por ser de rápido crecimiento, altamente competitivo y provoca grandes pérdidas en la producción mundial de hongos cultivados. Actualmente, se utilizan fungicidas químicos para contrarrestar la contaminación en plantas productoras. La planta de ruda (*Ruta graveolens*) es una planta aromática que produce diversos metabolitos secundarios con propiedades fungicidas. Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del extracto etanólico de ruda en el desarrollo y producción de esporas del moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. Para el presente estudio, se utilizó material vegetal del Jardín Etnobotánico de San Andrés Cholula, Puebla, cosechado en agosto de 2011. Se realizó un extracto etanólico de ruda y se suspendió en agua destilada estéril, se filtró para su esterilización y se agregó al medio de cultivo PDA en una concentración de 0.4%. Se evaluaron: crecimiento micelial, conteo y germinación de esporas de *T. aggressivum* f. *europaeum*. Se observó una inhibición en la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* expuestas al extracto de ruda.

Abstract

One of the main troubles in edible mushroom cultivation is contamination by the green mold *Trichoderma*, which is aggressive and easily spread on the substrate competing for space and nutrients. Currently, chemical fungicides are used to control it during mushroom cultivation; however, the use of chemicals is increasingly banned by society due to their toxicity and persistence in the environment. Rue (*Ruta graveolens*) is an aromatic plant capable of producing secondary metabolites with antifungal properties. For this reason, the objective of this study was to assess the effect of *R. graveolens* ethanolic extract on *in vitro* mycelial growth and spore production of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. For this research we used plant material obtained from the Ethnobotanical Garden of San Andrés Cholula, Puebla, harvested in August, 2011. We made an ethanolic extract of rue, diluted in sterilized distilled water, filtered for sterilization and it was added into the PDA medium at a 0.4% concentration. Assessing Mycelial growth rate, sporulation and spore germination of *T. aggressivum* f. *europaeum*. Inhibition was observed in the rate of mycelial growth of *Trichoderma* strains exposed to the rue extract. Sporulation of *Trichoderma* from spore

* Recibido: febrero de 2014
Aceptado: junio de 2014

También se observó una menor proporción de germinación de esporas expuestas directamente al extracto. La esporulación de *Trichoderma* a partir de la germinación de esporas en el medio con ruda fue menor que el testigo. El extracto de ruda disminuyó la densidad micelial de las cepas estudiadas. Los resultados demostraron que se puede inhibir el crecimiento (53%-81%), la esporulación y la germinación de *Trichoderma* en niveles superiores al 90% empleando extractos vegetales naturales, los cuales pueden ser potencialmente utilizados en el cultivo de hongos comestibles.

Palabras clave: antifúngico, extracto, *Ruta graveolens*, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*.

Introducción

Un problema frecuente y de gran importancia en el proceso de cultivo de la mayoría de los hongos comestibles son los problemas de contaminación, principalmente por los mohos que proliferan por las condiciones de humedad y temperatura, así como de sanidad ambiental local, necesarias para el desarrollo y fructificación de los hongos comestibles. La mayoría de los mohos que atacan al cultivo de hongos comestibles provocan diferentes tipos de putrefacción del sustrato (blanda o seca), y son principalmente del género *Trichoderma* (Oei, 1991). Es muy común encontrarlo en el compost o sustrato, inhibiendo y reduciendo la fructificación, así como parasitando los carpóforos cultivados. Algunas especies de *Trichoderma* se desarrollan en tejidos leñosos, son abundantes en la turba y se les localiza frecuentemente en los cajones de madera que contienen el compost que sirve de cama para el cultivo de hongos comerciales.

Hoy día; sin embargo, este último hecho es poco frecuente debido a los avances tecnológicos de cultivo, al difundirse cada vez más el uso de anaqueles metálicos (hierro galvanizado o aluminio). Si existen puntos de contaminación en el lugar de cultivo de hongos comestibles el *Trichoderma*, suele diseminarse fácilmente por vía aérea a través de la vestimenta de los cultivadores durante las labores de cosecha y limpieza de las camas de sustrato o bien por vía húmeda mediante las labores de riego (Stamets y Chilton, 1983). Se han realizado diversos estudios para el control del moho verde en el cultivo de los hongos comestibles (Przybylowies y Donoghue, 1990; Stamets, 2000; Guzmán *et al.*, 2002), encontrándose entre otras estrategias utilizadas el control ambiental.

germination in the medium with rue was lower than the control. The rue extract decreased the mycelial density of *Trichoderma* strains. The results showed inhibition of mycelial growth (53%-81%), as well as sporulation and spore germination of *Trichoderma* up to 90%, using a natural plant ethanolic extract, which may be potentially used during mushroom cultivation.

Keywords: antifungal, extract, *Ruta graveolens*, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*.

Introduction

A common and important problem in the growing process of most edible fungi are the problems of pollution, mainly by molds that proliferate the humidity and temperature as well as local environmental health, necessary for the development and fruiting of edible fungi. Most molds that attack the cultivation of edible fungi cause different types of putrefaction of the substrate (soft or dry), and are mainly of the genus *Trichoderma* (Oei, 1991). It is commonly found in compost or substrate, inhibiting and reducing fruiting and parasitizing the cultured carpophores. Some species of *Trichoderma* develop in woody tissues, are abundant in the peat and are frequently located in wooden crates containing the compost as a bed for growing commercial mushrooms.

Today; however, this last fact is rare due to technological advances in farming, growing to spread the use of metal shelves (galvanized iron or aluminum). If there are points of contamination at the site of cultivation of edible fungi *Trichoderma*, often easily spread by air through the clothes of the farmers during the harvest work and cleaning the substrate beds or wet, through the work irrigation (Stamets and Chilton, 1983). There have been several studies for the control of green mold growing edible mushrooms (Przybylowies and Donoghue, 1990; Stamets, 2000; Guzmán *et al.*, 2002), being among other environmental control strategies used.

However, despite the strict management of physical factors, the presence of *Trichoderma* spp. continues to cause damage to various crops of edible mushrooms around the world. Currently, management practices and pest control with traditional fungicides are applied, which are toxic to human health; however, there are natural alternatives that can help control these problems.

Sin embargo, a pesar del estricto manejo de los factores físicos, la presencia del *Trichoderma* spp. continua causando daño a diversos cultivos de hongos comestibles alrededor del mundo. Actualmente, se aplican prácticas de manejo y control de plagas con fungicidas tradicionales, los cuales son tóxicos para la salud humana; sin embargo, existen alternativas naturales que pueden ayudar a controlar estos problemas.

Diversas plantas medicinales con propiedades fungicidas representan un gran potencial que podría ser aprovechado en prácticas de cultivo de los hongos comestibles. No obstante lo anterior, existen pocas investigaciones vinculadas al respecto en la aplicación de productos naturales con propiedades antifúngicas dirigidos al cultivo de hongos comestibles. Con base en lo anterior, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) para controlar o inhibir el desarrollo micelial y esporulación del moho verde (*Trichoderma*).

Materiales y métodos

Material vegetal. Se adquirió 1 kg de ruda (*Ruta graveolens*) en el Jardín Etnobotánico de San Andrés Cholula Puebla, las cuales fueron cultivadas en compost orgánico, elaborado *in situ*. Con la planta se realizó una limpieza superficial en seco, con el fin de eliminar plantas ajenas e insectos. Se deshidrató a temperatura ambiente a la sombra durante 15 días. Una vez deshidratado el material se tomó el peso seco y se fragmentó el material en trozos de aproximadamente 1 cm de largo.

Método de extracción. Se utilizó la técnica de maceración en frascos de vidrio de 3.78 L de capacidad. Se colocó el material deshidratado en un recipiente de vidrio y se agregaron aproximadamente 2 L de solvente etanol al 96 °GL con el objetivo de cubrirlo completamente, se maceró por 24 h a temperatura ambiente, se decantó y filtró con papel filtro Whatman No. 40. Tras cubrirse nuevamente con solvente, el material se maceró por otras 24 h para un segundo y un posterior tercer filtrado. El extracto filtrado previo a su evaporación se mantuvo en obscuridad a 4 °C. Una vez obtenido el total del extracto, se concentró en un rotavapor marca Heidolph Laborota 4000 efficient, WBeco a 100 rpm a menos de 40 °C. Obtenido

Various medicinal plants with fungicidal properties represent a great potential that can be exploited in cultivation practices of edible fungi. Nevertheless, there is little research related to the application in respect of natural products with antifungal properties aimed at the cultivation of edible mushrooms. Based on the above, the main objective of this study was to evaluate the effect of the extract of rue (*Ruta graveolens*) to control or inhibit the mycelial growth and sporulation of green mold (*Trichoderma*).

Materials and methods

Plant material. 1 kg of rue (*Ruta graveolens*) was purchased from the Ethnobotanical Garden of San Andrés Cholula Puebla, which were grown in organic compost, prepared *in situ*. Dehydrated at room temperature in the shade for 15 days. Once dehydrated, dry weight material was removed and the material was broken into pieces OF about 1 cm long.

Extraction method. Maceration technique was used in glass vials 3.78 L capacity. The dried material was placed in a glass container and added about 2 L of solvent ethanol 96 °GL for completely covering it, macerated for 24 h at ambient temperature, decanted and filtered through Whatman No. 40 filter paper. After filled with solvent again, the material was macerated for another 24 h for a second and third subsequent filtering. Filtering the extract prior to evaporation was kept in dark at 4 °C. After obtaining the total extract, it was concentrated on a rotary evaporator Heidolph brand Laborota 4000 efficient, WBeco 100 rpm less than 40 °C. On the performance of the final extract was obtained, after drying at room temperature, it was kept refrigerated at 4 °C until use.

Microbiological tests. For assessing the *Trichoderma* strains we used PDA culture medium, brand Bioxon at a concentration of 0.4% extract of rue. The extract was resuspended in 30 ml of sterile distilled water in a rotary shaker MAXQ 4000-110 rpm at 35 °C for 45 min. This was centrifuged in a centrifuge at 5415C Brinkmann mark 10 000 rpm for 5 min. The extract was decanted and filtered under sterile conditions with hydrophilic acrodisc DISMIC-25 AS, trade mark Advantec of 0.20 microns for sterilization, incorporating the warm culture medium. The strains used in this study came from the collection of the Postgraduate

el rendimiento del extracto final, después de su secado a temperatura ambiente, se le mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Pruebas microbiológicas. Para evaluar las cepas de *Trichoderma* se empleó medio de cultivo PDA, marca BIOXON, con una concentración de 0.4% de extracto de ruda. El extracto se resuspendió en 30 ml de agua destilada estéril en un agitador rotatorio MAXQ 4000 a 110 rpm en 35 °C por 45 min. Se centrifugó en una centrifuga marca Brinkmann 5415C a 10 000 rpm, por 5 min. El extracto se decantó y se filtró en condiciones de esterilidad con acrodisco hidrofílico DISMIC-25 AS, marca Advantec de 0.20 µm para su esterilización, incorporándolo al medio de cultivo tibio. Las cepas empleadas en este estudio provinieron de la colección del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, *Campus* Puebla, sección competidores *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-109), *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-112), *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-113), las cuales fueron previamente aisladas de compost de cultivo de *Agaricus*, de la planta El Riojal, en Xalapa Veracruz. Para evaluar el crecimiento micelial, se inocularon las cajas en medio de cultivo PDA con extracto de ruda al 0.4%. Se colocó un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro con 4 días de desarrollo previo en el centro de la caja y se midió el desarrollo micelial de forma radial cada 24 h por 8 días.

Prueba de germinación de esporas. A partir de cepas de *Trichoderma* que no habían sido expuestas al extracto de ruda previamente, se preparó una suspensión de esporas de cada una de las cepas, se determinó la cantidad de esporas con cámara de New Bauer, se realizaron diluciones y se obtuvo una concentración de 50 esporas en 50 µl. Esta alícuota se distribuyó en condiciones de esterilidad mediante raspado de la placa de agar, usando varilla de vidrio en medio PDA con 0.4% de extracto de ruda. El conteo de esporas germinadas fue individual por caja, mediante observaciones con un microscopio estereoscópico marca ZEISS cada 24 h.

Efecto de inhibición (%). La inhibición en la velocidad de crecimiento micelial y en la germinación de esporas, se calculó en base a Kordali *et al.* (2008) utilizando la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{ inhibición} = (C - T / C) * 100$$

College in Agricultural Sciences, *Campus* Puebla, competitors section *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-109), *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-112), *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-113), which were previously isolated from *Agaricus* compost culture, from plant The Riojal in Xalapa Veracruz. For assessing the mycelial growth, the dishes were inoculated into culture medium PDA with ruda extract at 0.4%. We placed a Mycelial disc of 0.5 cm in diameter with 4 days of development in the center of the dish and we measured the mycelial growth radially every 24 h for 8 days.

Spore germination test. From *Trichoderma* strains that had not been exposed previously to ruda extract, a spore suspension of each strain was prepared, the amount of spores was determined with New Bauer chamber, performing dilutions and a concentration of 50 spores in 50 µl was obtained. This aliquot was distributed in sterile conditions by scraping the agar plate using glass rod on PDA medium with 0.4% of ruda extract. Counting of germinated spores were individually per dish.

Inhibition effect (%). Inhibition rate on mycelial growth and spore germination was calculated based on Kordali *et al.* (2008) using the following formula:

$$(\%) \text{ inhibition} = (C - T / C) * 100$$

Where: C= average of five replicates of mycelial growth (cm) of the controls; T= average of five replicates of mycelial growth (cm) of treatments with extract.

Spore count. Starting from mycelial growth and spore germination test, a daily count of spores in the New Bauer chamber was made when the mycelium of *Trichoderma* mold has reached the fifth day at the perimeter edge of the dishes. The count is conducted every 24 h for 8 days, with three replicates per dish. From a dish, 4 punches were taken, of 0.5 mm in diameter, two from the periphery and two taken from the center; which were placed in a tube with 10 ml of sterile distilled water with Tween at 0.05% (Saxena *et al.*, 2001). The tube samples were vortexed for 10 seconds and, we took an aliquot for reading the New Bauer chamber.

Statisticians. Analysis of variance (ANOVA) completely randomized with $\alpha = 0.05\%$ and 10 repetitions were performed. The Statistical Analysis System (SAS) version 9.0 program was used.

Donde: C= promedio de cinco réplicas del crecimiento micelial (cm) de los controles; T= promedio de cinco réplicas del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos con extracto.

Conteo de esporas. A partir del crecimiento micelial y en la prueba de germinación de esporas, se efectuó un conteo diario de las esporas en la cámara New Bauer, cuando el micelio de los mohos *Trichoderma* ha alcanzado al quinto día el borde perimetral de las cajas. El conteo se llevó a cabo cada 24 h durante 8 días, con tres repeticiones por caja. De una caja se tomaron 4 sacabocados de 0.5 mm de diámetro, dos de la periferia y dos del centro; los cuales se colocaron en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril con tween al 0.05% (Saxena *et al.*, 2001). El tubo con las muestras se agitó en vortex por 10 segundos y se tomó una alícuota para la lectura en la cámara de New Bauer.

Estadísticos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) completamente al azar con $\alpha = 0.05\%$ y 10 repeticiones. Se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

Resultados y discusión

Velocidad de crecimiento micelial: para la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Figura 1A), se observó un efecto inhibitorio de la velocidad de crecimiento micelial por el extracto de ruda, principalmente las primeras 24 h con una inhibición del 66% (Fig. 2B); sin embargo, el efecto no fue tan evidente como en las otras dos cepas evaluadas. En cuanto a la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Figura 1B), la inhibición sobre la velocidad de crecimiento micelial fue significativa con respecto al testigo desde el día 1 hasta el día 5 con una proporción de inhibición de 81.4% al día 1 y hasta 51.9% al día 3 (Fig 2B), llegando a colonizar completamente la caja de Petri hasta los 6 días, dos días después que el testigo. Para la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Figura 2A), se observó un efecto significativo de inhibición sobre la velocidad de crecimiento micelial por efecto del extracto de ruda en los días 1 y 2, siendo de 53.6% y 44%, respectivamente (Fig. 2B). El punto máximo de crecimiento para el testigo se alcanzó a los 3 días y el tratamiento con extracto también cubrió la caja dos días después.

Results and discussion

Mycelial growth rate: For the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Figure 1A), an inhibitory effect was observed on mycelial growth rate for rue extract, especially the first 24 h with an inhibition of 66% (Figure 2B); however, the effect was not as evident as in the other two strains tested. As for the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Figure 1B), the inhibition of mycelial growth rate was significant compared with the control from day 1 to day 5 with a ratio of inhibition of 81.4% at day 1 and up to 51.9% day 3 (Fig 2B), reaching fully colonize the laboratory dish up to 6 days, two days later than the control. For the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Figure 2A), a significant inhibitory effect on mycelial growth rate effect of rue extract on days 1 and 2, with 53.6% and 44%, respectively (Fig observed. 2B). The maximum growth point for the control was reached at 3 days and the extract treatment also covered the case two days later.

This mycelial growth inhibition in agreement with previous studies in which it was found that the antifungal compounds 5-and 8-methoxypsoralen isolates of *R. graveolens*, showed an inhibitory effect on mycelial growth of filamentous fungi *Rhizoctonia solanii*, *Fusarium* spp. and *Trichoderma viride* (Ojala *et al.*, 2000). In general, we observed an inhibitory effect on the rate of mycelial growth of *Trichoderma* strains exposed evaluated the extract of *R. graveolens*, in the concentration of 4 mg/ml (Figure 3), mainly on the strain of *T. aggressivum* f. *europaeun* (MPC-112).

This may be because *R. graveolens* contains various secondary metabolites such as coumarins, furanocoumarins and alkaloids with fungicidal activity (El-Sayed *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2003). There are records of inhibition of mycelial growth rate from extracts of *R. graveolens* and its pure compounds against filamentous fungi such as *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis viticola* and *Trichoderma viridae* (Oliva *et al.*, 1999; Ojala *et al.*, 2000). This delay in the rate of mycelial growth of *Trichoderma* is important in the early days of mycelial establishment of edible mushrooms, as it is a crucial stage where the crop is more vulnerable to contamination by the type of competitor molds such as *Trichoderma*.

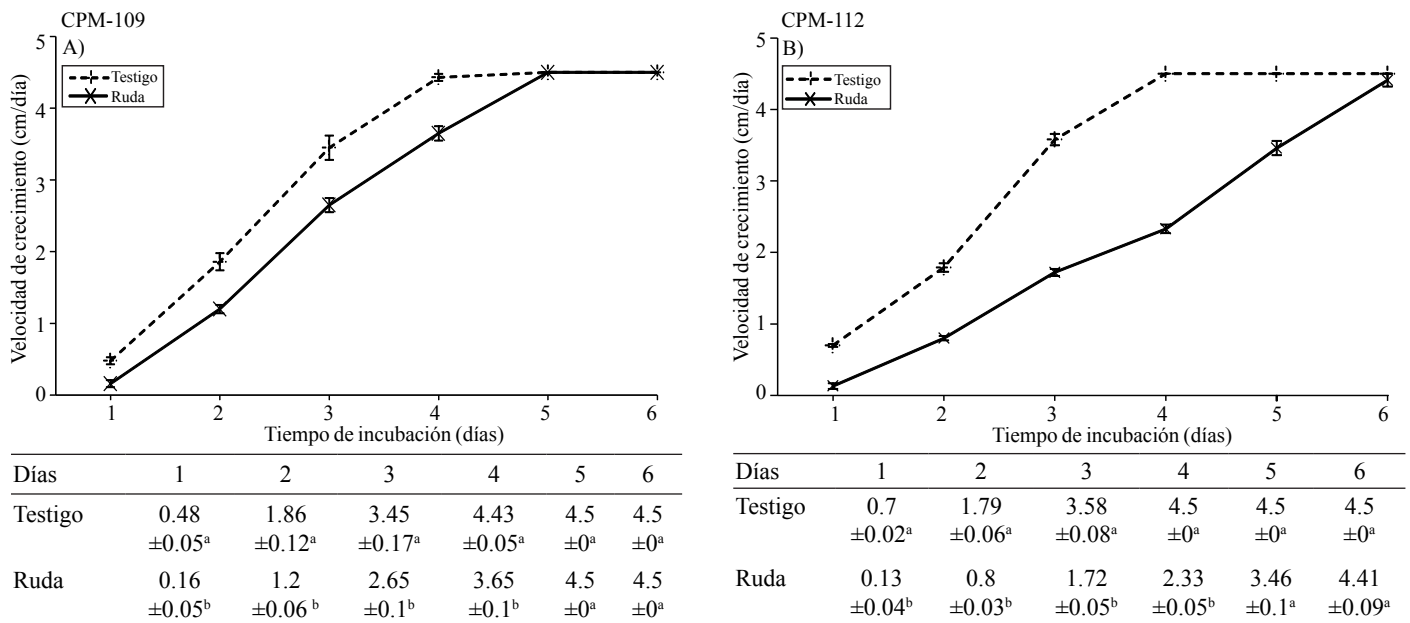


Fig. 1. Velocidad de crecimiento micelial promedio de las cepas de *Trichoderma* en presencia del extracto etanólico de *Ruta graveolens* con dosis de 4 mg/ml. A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; y B) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Los datos fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n= 10.

Figure 1. Average speed mycelial growth of *Trichoderma* strains in the presence of the ethanol extract of *Ruta graveolens* at doses of 4 mg/ml. A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; and B) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Data were analysed by ANOVA, Tukey test $\alpha=0.05$. Réplicas: n= 10.

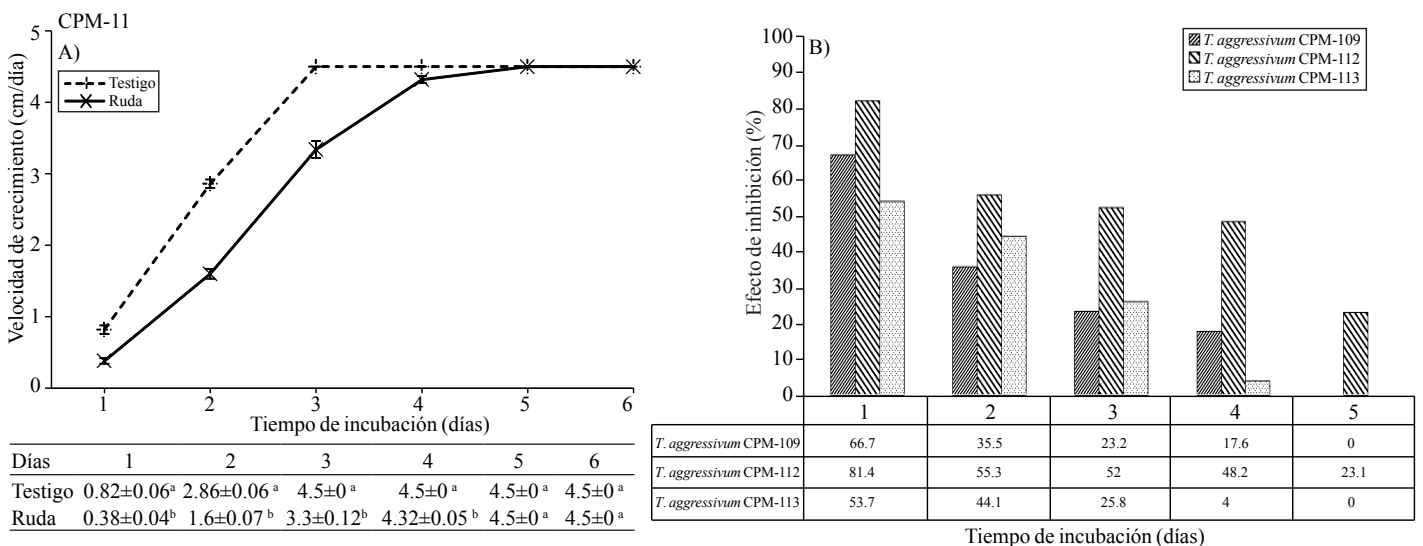


Fig. 2. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa *Trichoderma* A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en presencia del extracto etanólico de *Ruta graveolens* con dosis de 4 mg/ml; y B) proporción promedio de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma* por el extracto etanólico de *Ruta graveolens* 4 mg/ml con respecto al testigo. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n= 10.

Figure 2. Mycelial growth average rate of strain of *Trichoderma* A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, in the presence of the ethanol extract of *Ruta graveolens* at doses of 4 mg/ml.; and B) average proportion inhibition rate of mycelial growth of *Trichoderma* by the ethanol extract of *Ruta graveolens* 4 mg/ml compared to the control. Data were analysed by ANOVA, Tukey test $\alpha=0.05$. Réplicas: n= 10.

Esta inhibición en el desarrollo micelial concuerda con estudios previos donde se comprobó que los compuestos antifúngicos 5- y 8-methoxypsoralen aislados de *R. graveolens*, mostraron un efecto inhibitorio en el desarrollo micelial de los hongos filamentosos *Rhizoctonia solanii*, *Fusarium* spp., y *Trichoderma viride* (Ojala *et al.*, 2000). En general, se pudo observar un efecto inhibitorio de la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas expuestas al extracto de *R. graveolens*, en la concentración de 4 mg/ml (Figura 3), principalmente sobre la cepa de *T. aggressivum* f. *europaeum* (CPM-112).

Esto puede deberse a que *R. graveolens* contiene diversos metabolitos secundarios como cumarinas, furanocumarinas y alcaloides con actividad fungicida (El-Sayed *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2003). Existen registros de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial a partir de extractos de *R. graveolens* y de sus compuestos puros contra hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis viticola* y *Trichoderma viridae* (Oliva *et al.*, 1999; Ojala *et al.*, 2000). Este retraso en la velocidad de crecimiento micelial del *Trichoderma* es importante para los primeros días del establecimiento micelial de los hongos comestibles, ya que es una etapa crucial donde el cultivo es más vulnerable a contaminación por mohos competidores del tipo de *Trichoderma*.

Esporulación de *Trichoderma* a partir del crecimiento micelial: una vez que el micelio colonizó completamente la caja de Petri en medio PDA con extracto, comenzó el conteo de esporas antes de la esporulación de la colonia (a partir del tercer día). En la figura 4A-C, se observa que no hubo una diferencia estadística en la cantidad de esporas con respecto al testigo durante el experimento de ninguna de las tres cepas de *Trichoderma* evaluadas. Esto pudo deberse a que las cepas se mantuvieron expuestas al medio con extracto de *R. graveolens* y tuvieron tiempo suficiente para adaptarse a los compuestos del extracto y recuperaron su desarrollo en cuanto a la producción de esporas.

Se sabe que el género *Trichoderma* tiene una alta capacidad para degradar diversos compuestos del sustrato donde se desarrolla. Su metabolismo enzimático tiene la capacidad de degradar una amplia variedad de sustratos, que van desde celulosa hasta compuestos inorgánicos como diversos plaguicidas, incluidos herbicidas, organoclorados e insecticidas organofosforados (Colina *et al.*, 2009; Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Esta capacidad metabólica pudo interferir en la rápida adaptación de los componentes orgánicos del extracto evaluado. En el caso de la cepa de *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, el

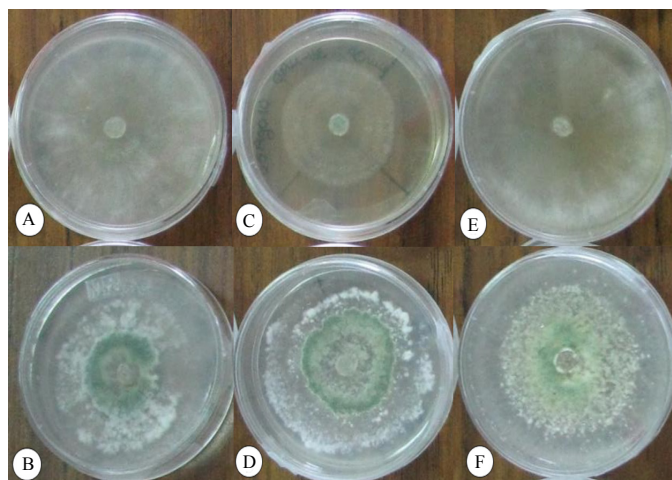


Fig. 3. Crecimiento micelial de las colonias de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación. A y B) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; C y D) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112; E y F) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de ruda (*Ruta graveolens*) al 0.4%, la serie B, D y F son los testigos sin extracto.

Figure 3. Mycelial growth of colonies of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* on PDA culture medium after 7 days of incubation. A and B) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; C and D) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112; E and F) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. A, C and E are the treatments with extract of rue (*Ruta graveolens*) at 0.4%; B, D and F are the control without extract.

Sporulation of *Trichoderma* from mycelial growth: once the mycelium completely colonized the petri dish on PDA medium extract, we began counting spores before sporulation of the colony (after the third day). In the Figure 4A-C, it is observed that there was no statistical difference in the amount of spores than the control in the experiment for any of the three strains of *Trichoderma* evaluated. This might be because the strains were kept exposed to the medium extract of *R. graveolens* and had time to adapt to the compounds from the extract and recovering their growth.

It is known that, the genus *Trichoderma* has a high capacity to degrade various compounds of the substrate where it grows. Its enzymatic metabolism has the ability to degrade a wide variety of substrates, ranging from inorganic compounds such as cellulose to various pesticides, including herbicides, organochlorine and organophosphorus insecticides (Hill *et al.*, 2009; Argumedo-Raves *et al.*, 2009). This metabolic

tratamiento de *R. graveolens* redujo la velocidad de crecimiento en los días 5 y 6, en comparación con la velocidad del crecimiento micelial del testigo. Entre las tres cepas evaluadas de *Trichoderma*, la cepa con mayor esporulación a lo largo del experimento fue la de *T. aggressivum* f. *europaeum*, CPM-113 (Figura 4C). Apesar de la variabilidad de la cantidad de esporas para los últimos días del muestreo, se observó que la cinética de esporulación el tratamiento con extracto de ruda se mantuvo por debajo del testigo al menos hasta el sexto día para las cepas de *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y CPM-112.

capacity could interfere with the rapid adaptation of the organic components of the extract evaluated. In the case of the strain of *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, the treatment of *R. graveolens* reduced growth rate on days 5 and 6, compared to the rate of mycelial growth of the control. Among the three strains tested of *Trichoderma*, the strain with the best sporulation along the experiment was *T. aggressivum* f. *europaeum*, CPM-113 (Figure 4C). Despite the variability of the amount of spores to the last day of the sample, it was observed that the kinetic treatment

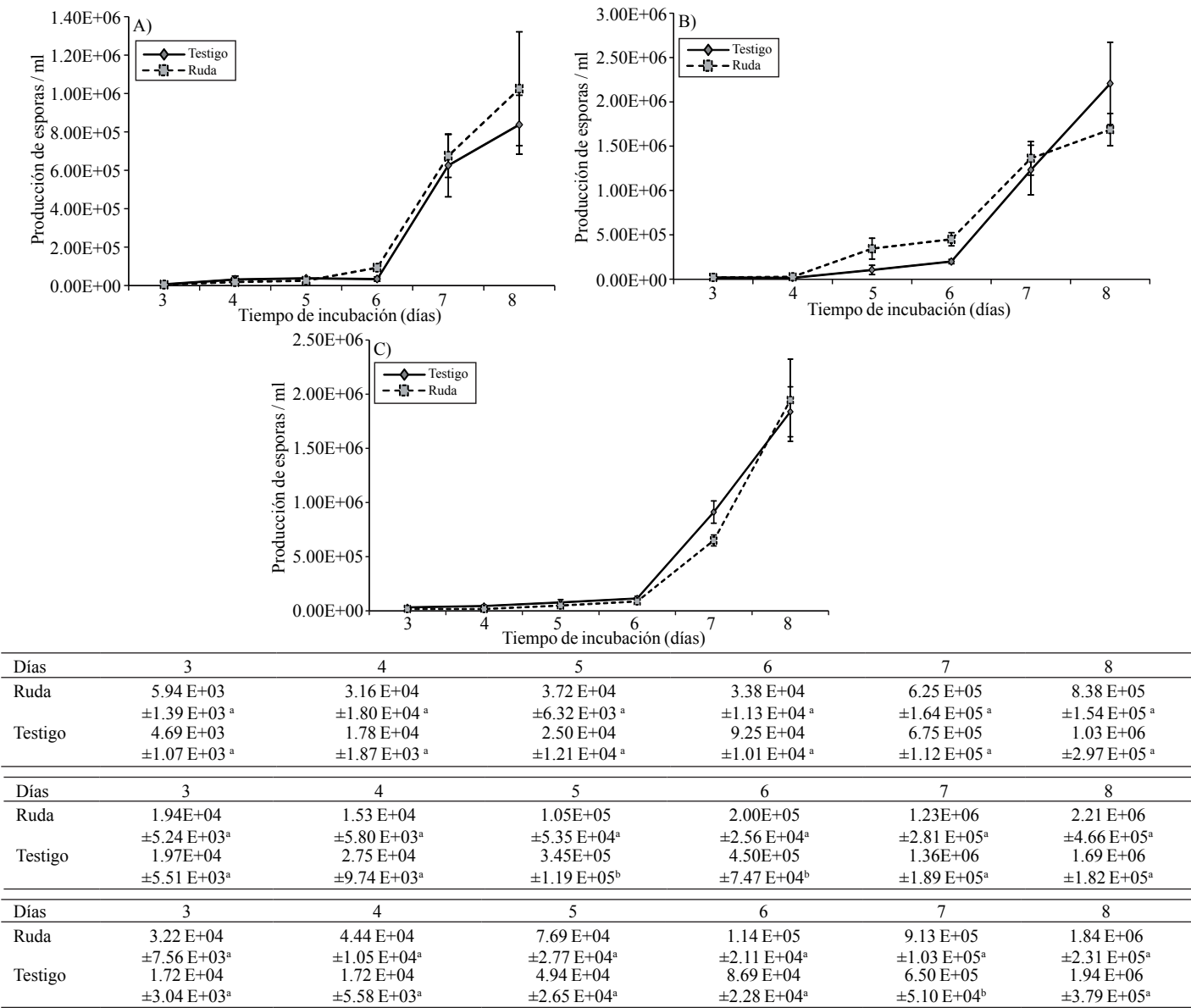


Fig. 4. Efecto del extracto de *Ruta graveolens* con 4 mg/ml sobre la esporulación de A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; B-A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112; y C) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n= 10.

Figure 4. Effect of *Ruta graveolens* extract with 4 mg/ml over the sporulation of A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; B-A) *Trichoderma f. aggressivum europaeum* CPM-112; and C) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Data were analysed by ANOVA Tukey test $\alpha=0.05$. Replicas: n = 10.

Germinación de esporas de *Trichoderma* y su esporulación: para la prueba de germinación de esporas se colocaron esporas que no habían sido expuestas al extracto de *R. graveolens*, con la finalidad de observar el efecto del extracto sobre la de germinación de esporas con respecto al testigo. Posteriormente se realizó un conteo del número de esporas producidas por las colonias que confluyeron y esporularon. El efecto del extracto de *R. graveolens* sobre la germinación de las esporas de *T. aggressivum* f. *europaeum* sobre el medio de cultivo se muestra en la Figura 5A-C, donde se observa que el tratamiento con extracto inhibió la germinación, principalmente para la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. El conteo de las esporas germinadas se detuvo a los 4 días después de inoculadas, cuando las esporas germinadas colonizaron de micelio completamente la caja de Petri.

Para la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Figura 5A) si hubo una diferencia significativa de inhibición en la germinación con respecto al testigo hasta el segundo día del experimento, sin embargo desde el tercer día la variabilidad del conteo no permitió una diferencia significativa. En cuanto a la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Figura 5B), se observó un efecto significativo en la inhibición de la germinación de esporas con una inhibición de 42.1% para el día 2, 64.9% para el día 3 y 70% en el día 4. El efecto inhibitorio en la germinación de esporas puede deberse a que existen registros previos de la presencia de diferentes alcaloides con propiedades antifúngicas aislados de la planta de *R. graveolens*, como son la quinolina y quinolona los cuales han demostrado tener efectos significativos en contra de diversos hongos filamentosos (Oliva *et al.*, 2003).

En cuanto a la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Figura 5C), el mayor efecto inhibitorio se observó a los 2 días con 66.4%, el cual se igualó con el testigo a partir del tercer día. En comparación entre las tres cepas evaluadas de *T. aggressivum* f. *europaeum*, la cepa CPM-113 resultó ser la más tolerante al extracto de *R. graveolens*, ya que a pesar de inhibir su velocidad de crecimiento en 53.7% al día 1 con respecto al testigo evaluado, no disminuyó lo suficiente la capacidad de las esporas para germinar en el medio de cultivo.

sporulation of rue extract remained below the control at least until the sixth day for strains of *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 and CPM-112.

***Trichoderma* spore germination and their sporulation:** for the spore germination test, we placed the spores that have not been exposed to the extract of *R. graveolens*, in order to observe the effect of the extract on spore germination compared with the control. Subsequently, a count of the number of spores produced by the colonies was performed converged and sporulated. The effect of the extract of *R. graveolens* on the germination of spores of *T. aggressivum* f. *europaeum* on the culture medium is shown in Figure 5A-C, which shows that treatment with extract inhibited germination, especially for strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Counting of germinated spores stopped 4 days after inoculation, when the germinated spores colonized of mycelium the Petri dish completely.

For the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Figure 5A) there was a significant difference in germination inhibition relative to the control until, the second day of the experiment however, from the third day, the count variability prevented a significant difference. As for the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Figure 5B), a significant effect in inhibiting spore germination with an inhibition of 42.1% for day 2, 64.9% for day 3 and 70% on day 4 was observed. The inhibitory effect on spore germination may be because there are previous records of the presence of different alkaloids with antifungal properties isolated from the plant *R. graveolens*, such as quinoline and quinolone, which have shown significant effects against various filamentous fungi (Oliva *et al.*, 2003).

As for the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Figure 5C), the highest inhibition was observed at 2 days with 66.4%, which was equal to the control on the third day. By comparing the three strains tested, the *T. aggressivum* f. *europaeum*, CPM-113 strain was the most tolerant to the extract of *R. graveolens*, since despite inhibiting their growth rate was 53.7% at day 1, with respect to the evaluated control, not decreasing enough the capacity to germinate the spores in the culture medium.

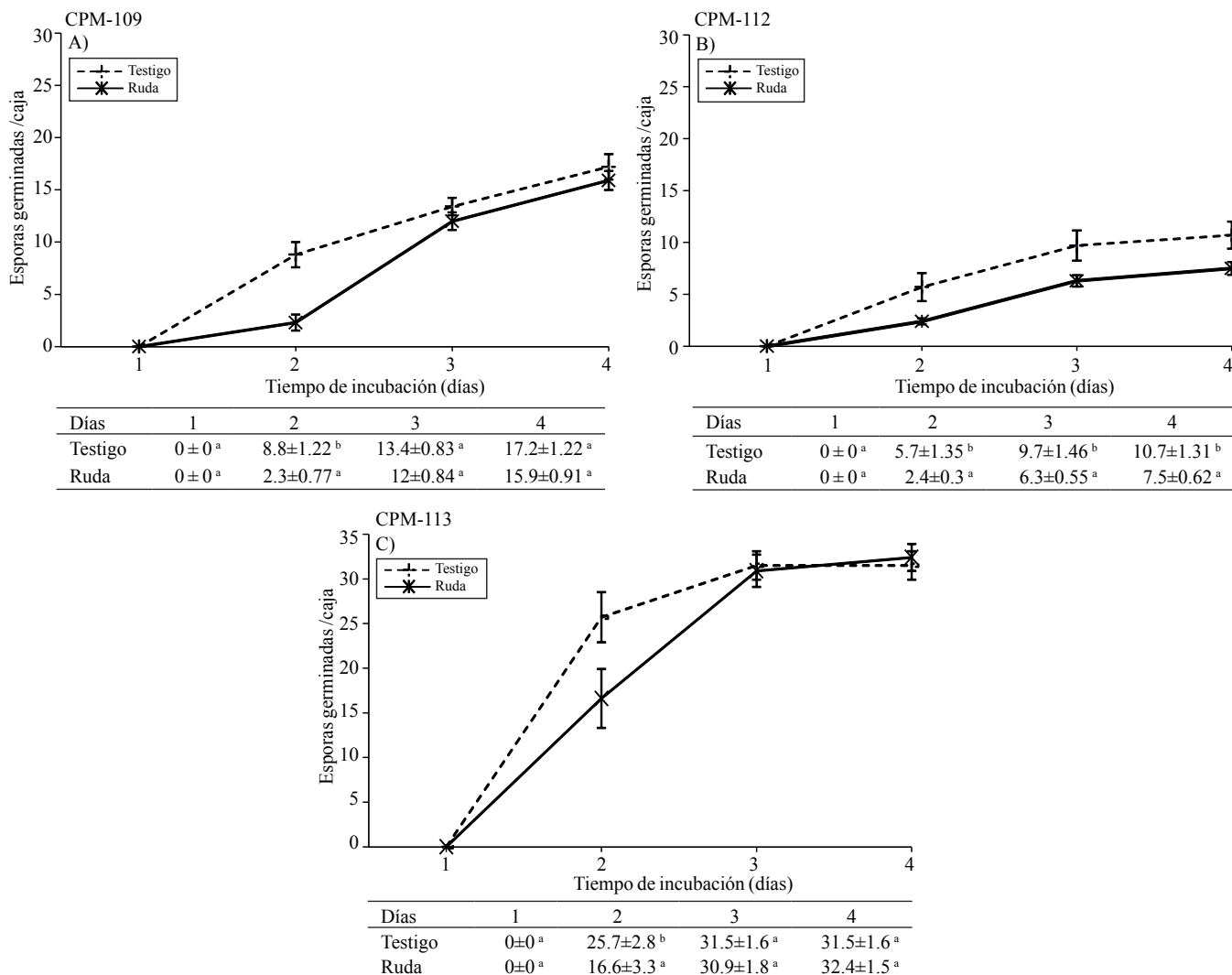


Fig. 5. Efecto del extracto de *Ruta graveolens* con 4 mg/ml sobre la germinación *in vitro* de esporas de *Trichoderma* A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; y B) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112; y C) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n= 10.

Figure 5. Effect of *Ruta graveolens* extract with 4 mg/ml on *in vitro* germination of spores of *Trichoderma* A) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109; and B) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112; and C) *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Data were analysed by ANOVA, Tukey test $\alpha=0.05$. Replicas: n= 10.

En el caso del conteo de esporas que se llevó a cabo a partir de las pruebas de germinación, una vez que las esporas de *T. aggressivum* f. *europaeum* germinaron y colonizaron completamente la caja de Petri (quinto día), se evaluó el efecto del extracto de *R. graveolens* con 4 mg/ml sobre la esporulación (Figura 6A-C). Para la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Figura 6A) con presencia del extracto de *R. graveolens* se observó una menor concentración del esporas a lo largo del experimento, con un aumento a partir del día 7. En cuanto a la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Figura 6B), el efecto del extracto sobre la disminución en el número de esporas fue muy similar a las

Regarding the spore count performed after the germination tests, once the spores of *T. aggressivum* f. *europaeum* fully germinated and colonized the petri dish (fifth day), the effect of the extract was evaluated with 4 mg/ml on the sporulation (Figure 6A-C). For the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Figure 6A) with the presence of the extract of *R. graveolens* less concentration of spores throughout the experiment was observed, with an increase from day 7, regarding the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Figure 6B), the effect of the extract on the decrease in the number of spores was very similar to the strains of *T. aggressivum* f. *europaeum*

cepas *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, siendo un comportamiento de esporulación muy por debajo del testigo (Figura 8) en promedio de las 10 réplicas evaluadas.

CPM-109, being a behaviour of sporulation well below the control (Figure 8) average in the 10 replicates evaluated.

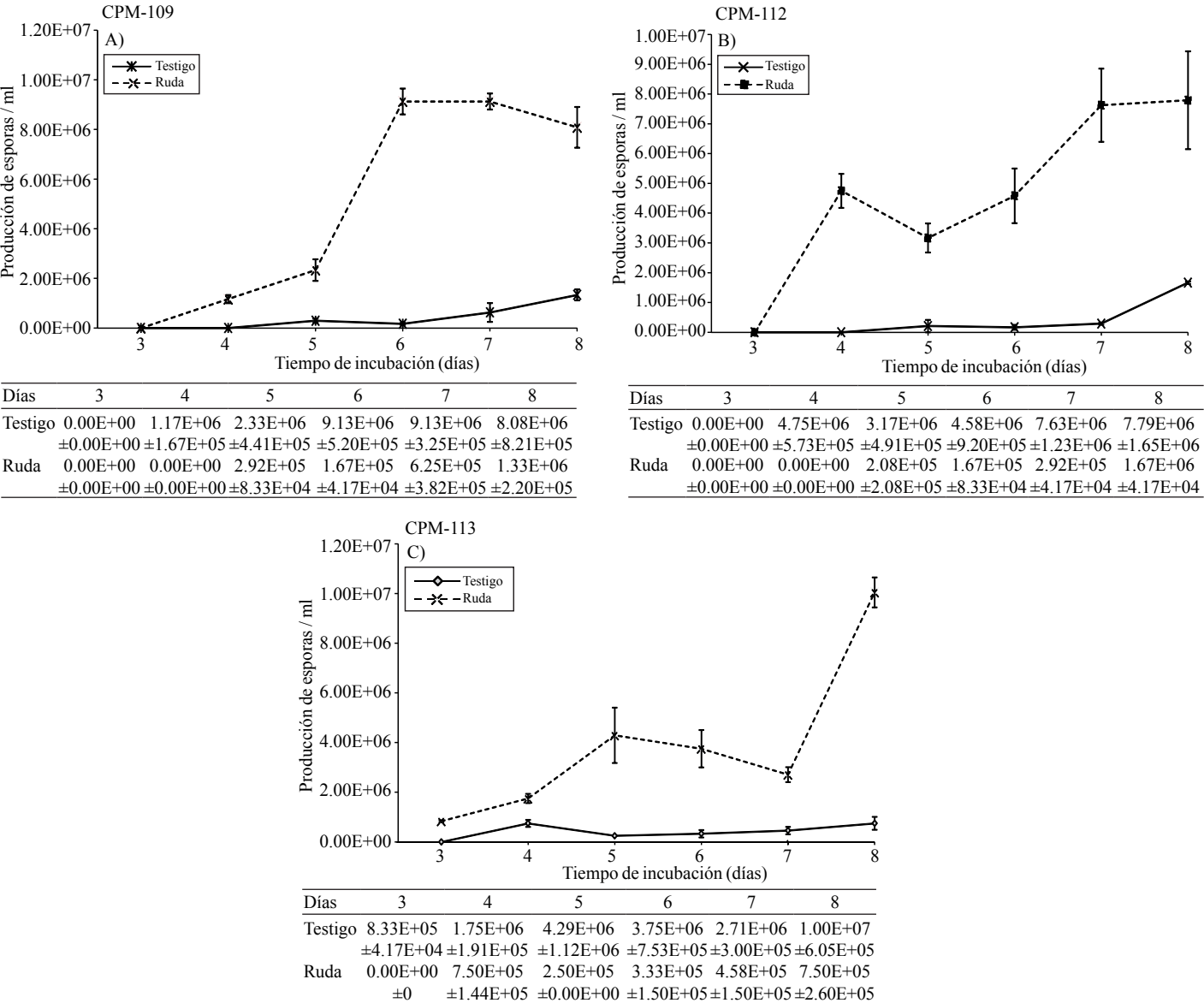


Fig. 6. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de la cepa de A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, a partir de la prueba de germinación. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n=10.

Figure 6. Effect of the extract of rue (*Ruta graveolens*) with 4 mg/ml in culture medium PDA on the spores production of the strain A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 and B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, from the germination test. Data were analysed by ANOVA, Tukey test $\alpha=0.05$. Replicas: n= 10.

En la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Figura 6C), también se observó una inhibición significativa en la germinación, al igual que en las otras dos cepas evaluadas. La cantidad de esporas encontrada para las tres cepas se

In the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Figure 6C), significant inhibition was also observed in the germination, as in the other two strains tested. The amount of spores found for the three strains was observed, which

observa que se mantuvieron muy por debajo del testigo, el efecto de inhibición en la cantidad de esporas encontradas fue de arriba de 90% al día 7 para las 3 cepas de *Trichoderma* (Figura 7). La variabilidad de los datos en los conteos, principalmente en el testigo, se debe a la heterogeneidad del crecimiento en la caja Petri, ya que el crecimiento desde diversos puntos de germinación por la distribución de las esporas no permitió el crecimiento radial característico de la cepa (Figura 8), influyendo en la zona de muestreo de cada caja. Estos resultados inhibitorios pueden deberse a más de 15 compuestos registrados en la literatura con propiedades antifúngicas provenientes de la planta *R. graveolens*, entre ellos se encuentran los alcaloides acridona, cumarinas, furanocumarinas, flavonoides, entre otros, así como también aceites esenciales los cuales también tienen el efecto de inhibir la germinación y la velocidad de crecimiento radical de diversas plantas (Oliva *et al.*, 2003; Hale *et al.*, 2004).

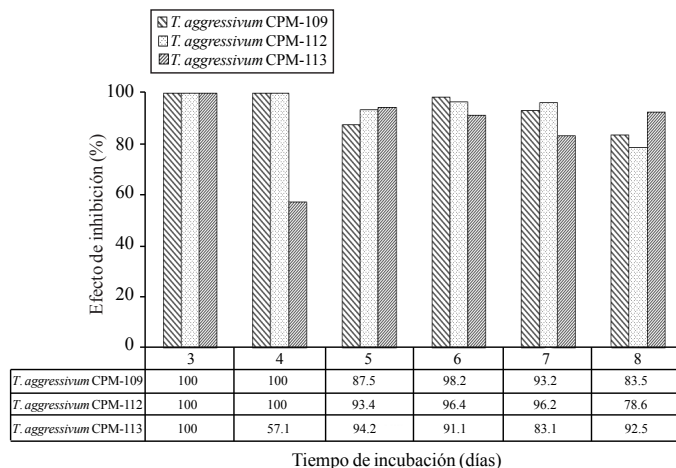


Fig. 7. Efectos de inhibición (%) en la esporulación de las cepas de *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*.

Figure 7. Effects of inhibition (%) on the sporulation of the strains of *Trichoderma aggressiveum* f. *Europaeum*.

En cuanto a la morfología de las cepas de *Trichoderma*, se observó un efecto del extracto sobre el color de las colonias de la cepa de *T. aggressiveum* f. *europaeum* CPM-109, ya que el testigo presentó esporas amarillas, a diferencia de aquellas observadas en el tratamiento con extracto de *R. graveolens* que fueron verde olivo intenso. La cepa expuesta al extracto mostró una coloración más oscura pasando del blanco del micelio a un color verde olivo. En cambio, el testigo mostró una coloración que paso del blanco del micelio a un tono amarillo verdoso intenso para posteriormente tomar un color verde olivo. Esto contradice a la coloración registrada en la literatura ya que menciona que en su desarrollo no existen pigmentos amarillos. A pesar del color, la velocidad de crecimiento micelial coincide con los parámetros descritos

remained well below the control, the effect of inhibition in the number of spores was found above 90% at day 7 for the three strains of *Trichoderma* (Figure 7). The variability of the data in counts, mainly in the control, is due to the heterogeneity of growth in the Petri dish, as growth from various points of the distribution germination of spores prevented the characteristic radial growth of the strain (Figure 8), influencing the sampling area of each dish. These inhibitory results may be due that more than 15 compounds reported in the literature with antifungal properties from the plant *R. graveolens*, among them are the acridone alkaloids, coumarins, furanocoumarins, flavonoids, among others, as well as essential oils which have also the effect of inhibiting the germination rate and root growth of various plants (Oliva *et al.*, 2003; Hale *et al.*, 2004).

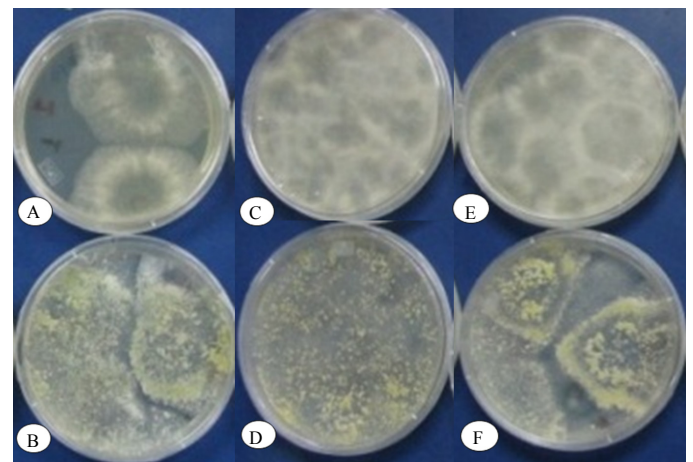


Fig. 8. Efecto del extracto de *Ruta graveolens* sobre la germinación de esporas al 6° día de la inoculación. A y B: *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-112. C y D: CPM-113 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* y E y F: CPM-109 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de *Ruta graveolens*. La serie B, D y F son los testigos sin extracto.

Figure 8. Effect of the extract of *Ruta graveolens* on the germination of spores on the 6th day after inoculation. A and B: *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-112 C and D: CPM-113 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* and E and F: CPM-109 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*. The A, C and E series are treatments with *Ruta graveolens* extract. The B, D and F series are the controls without extract.

Regarding the morphology of the strains of *Trichoderma*, an effect of the extract on the colour of the colonies of strain *T. aggressiveum* f. *europaeum* CPM-109 was observed, as the control had yellow spores, unlike those observed in the

en la literatura, ya que se observó micelio de textura algodonosa con bordes regulares, los conidios estuvieron presentes tanto en medio como alrededor del margen de la caja y no hubo tendencia a formar pústulas (Samuels *et al.*, 2002). A pesar de la maduración de las esporas, se observó que la densidad micelial fue menor en el tratamiento de *R. graveolens* con respecto al testigo y el tipo de crecimiento micelial se observó postrado.

En cuanto a la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, se observaron diferencias en la distribución de las esporas, donde el tratamiento con extracto de *R. graveolens* presentó las esporas principalmente en el centro de la colonia, mientras que en el testigo se observaron esporas dispersas en forma radial hacia el borde de la caja de Petri. Para las tres cepas catalogadas como *T. aggressivum* f. *europaeum*, se observaron las características descritas previamente en la literatura. Se observó que fueron cepas de rápido crecimiento, con formación de conidios al centro (Figura 3B, D y F). Se sabe que la cantidad de conidios puede variar según el medio de cultivo utilizado para su crecimiento, esto pudiera explicar la diferencia en la cantidad de esporas por la presencia del extracto. En las tres cepas no se observó un color amarillento difuso en el medio como cita la literatura; sin embargo, si se observó la formación de pústulas blancas que después cambiaron a color verde, cabe mencionar que el desarrollo de este biotipo Th4 fue el responsable de la epidemia de *Trichoderma* en Pensilvania (Samuels *et al.*, 2002; Chang y Miles, 2004).

Conclusiones

El extracto de *R. graveolens* en la concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo tuvo un efecto inhibitorio en la velocidad de crecimiento micelial al primer día de las cepas de *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 de 66%; de 81% para *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, y 53% para *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Las tres cepas de *T. aggressivum* f. *europaeum* mostraron resistencia al extracto de *R. graveolens* en el efecto inhibitorio de la producción de esporas a partir de la prueba de velocidad de crecimiento micelial. Las esporas de las tres cepas de *T. aggressivum* f. *europaeum* germinadas directamente sobre medio con extracto de *R. graveolens* en la prueba de germinación de esporas, se observó un efecto inhibitorio en la germinación y posterior esporulación, con una inhibición mayor a 90% hasta el día 6 para las tres cepas evaluadas. El extracto de *R. graveolens* disminuyó la densidad del micelio en las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

extract treatment *R. graveolens* that were intense green olive. The strain exposed to the extract showed a darker colour from white to olive green. Instead, the control showed a white coloration over an intense yellow-green tone for subsequently taking an olive green. This contradicts the coloration recorded in the literature and mentioned that there are no yellow pigments in their development. Despite the colour, speed of mycelial growth coincides with the parameters described in the literature, as mycelium of cottony texture was observed with regular borders, the conidia were present both in the medium and around the outside of the dish and there was no tendency to form pustules (Samuels *et al.*, 2002). Despite the maturation of the spores, we observed that the mycelial density was lower in the treatment of *R. graveolens* compared with the control.

As for the strain *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, differences in the distribution of spores, wherein the extract treatment of *R. Graveolens*, spores introduced mainly at the center of the colony, whereas in the control were observed spores dispersed radially toward the edge of the Petri dish. For the three strains classified as *T. aggressivum* f. *europaeum*, the described features were observed previously in the literature. We observed that fast growing strains with the center conidiation (Figure 3B, D and F). It is known that the number of conidia can vary depending on culture medium used for growth, this could explain the difference in the number of spores in the presence of the extract. In all three strains we did not observed a diffuse yellowing in the medium, as cited in literature; however, we did observed the formation of white pustules that later changed to green, it is noteworthy that the development of this biotype Th4 was responsible for the epidemic of *Trichoderma* in Pennsylvania (Samuels *et al.*, 2002; Chang and Miles, 2004).

Conclusions

The extract of *R. graveolens* in the concentration of 4 mg/ml in culture medium had an inhibitory effect on mycelial growth rate at the first day of the strains of *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 of 66%; of 81% for *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, and 53% for *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. The three strains of *T. aggressivum* f. *europaeum* showed resistance to *R. graveolens* inhibitory effect on the production of spores from the test speed of mycelial growth. The spores of three strains of *T. aggressivum* f. *europaeum* germinated directly over the medium extract of

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por el financiamiento de la presente investigación.

Literatura citada

- Argumedo-Delira, R.; Alarcón, R.; Ferrera-Cerato, R. y Peña-Cabriales, J. J. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Rev. Int. Cont. Amb. 25:257-269.
- Chang, S. T. and Miles, P. G. 2004. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2nd (Ed.). Ed. CC Press. 451 p.
- Colina, A.; Ferrer, A. and Urribarri, L. 2009. Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. Revista Tecnológica de la Universidad de Zulia 32:152-159.
- El-Sayed, K.; Mansour, S.; Farouk, S. and Ross, S. A. 2000. New Quinoline Alkaloids from *Ruta chalepensis*. J. Nat. Products. (63):995-997.
- Guzmán, G.; Mata, G.; Salmones, D.; Soto-Velázquez, C. y Guzmán-Dávalos, L. 2002. El cultivo de los hongos comestibles. Ed. Instituto Politécnico Nacional. 245 p.
- Hale, A. L.; Meepagala, M.; Oliva, A.; Aliotta, G. and Duke, S. O. 2004. Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. J. Agric. Food Chem. 52:3345-3349.
- Kordali, S.; Cakir, A.; Ozer, H.; Cakmakci, R.; Kesdek, M. and Mete, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its components, carvacrol, thymol and p-cymene. Biores. Technol. 99:8788-8795.
- R. graveolens* in spore germination test, an inhibitory effect on germination and subsequent sporulation, with an inhibition of 90% was observed until day 6 for the three strains tested. *R. graveolens* extract, decreased the density of the mycelial in *Trichoderma* strains.
- End of the English version*
-
- Oei, P. 1991. Manual of mushroom cultivator. Tool Foundation, Amsterdam. 249 p.
- Ojala, T.; Remes, S.; Haansuu, P.; Vuorela, H.; Hiltunen, R.; Haahtela, K. and Vuorela, P. 2000. Antimicrobial activity of some courmain containing herbal plants growing in Finland. J. Ethnopharmacol. 73:299-305.
- Oliva, A.; Lahoz, E.; Contillo, R. and Aliotta, G. 1999. Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its allelochemicals. J. Chemical Ecol. 3(25):519-526.
- Oliva, A.; Meepagala, K. M.; Wedge, D. E.; Harries, D.; Hale, A. L.; Aliotta, G. and Duke, S. O. 2003. Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. J. Agric. Food Chem. 51:890-896.
- Przybylowicz, P. and Donoghue, J. 1990. Shiitake growers handbook. The art and science of Mushroom Cultivation. Ed. Kendall/Hunt Publishing Company. 217 p.
- Samuels, G. J.; Dodd, S. L.; Gams, W.; Castlebury, L. A. y Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia. 94:146-170.
- Saxena, J.; Munimbazi, C. y Bullerman, L. B. 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. Int. J. Food Microbiol. 71:29-34.
- Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. 3^a ed. 574 p.
- Stamets, P. and Chilton, J. S. 1983. The mushroom cultivator. Agarikon Press. 415 p.