ISSN 1870-4069

Caracterización microbiológica de un hongo aislado de la Sierra de Santa Rosa, Guanajuato

Cielo C. Molina-Calderón, Estefanía O. Juárez-Hernández

Instituto PolitécnicoNacional,
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería,
Campus Guanajuato,
México

cielocmc@hotmail.com

Resumen. Debido a la inespecificidad de los complejos enzimáticos especializados presentados por los hongos descomponedores de madera, estos presentan una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas. Se realizó la identificación de un hongo noreportado, considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, México; se realizó la caracterización de su morfología, así como la evaluación de su capacidad para degradar madera y celulosa. Se creció el hongo por triplicado en medio PDA durante seis semanas a 26°C, obteniendo un crecimiento lento [13]. Se evaluó su capacidad para degradar madera cultivándolo en medio PDA con 3, 10 y 15% v/v de aserrín depino por el mismo periodo de tiempo, disminuyendo el diámetro de crecimiento en los mismos a medida que aumentaba dicho porcentaje respecto al control sin aserrín. Asimismo, se evalúo la actividad celulolítica del hongo a través de su crecimiento en medio sólido de celulosa por triplicado durante 21 días bajo las mismas condiciones; se obtuvo un crecimiento similar de la muestra respecto al crecimiento obtenido en el cultivo en medio PDA y una velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa de 5.33 y 33.02 $mm/día$ para un periodo de cero a tres y de tres a veintiún días, respectivamente, describiéndolo como degradador de celulosa alto o rápido [6] tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días. Se observó una morfologíaal crecer el hongo en medio PDA y al usar las técnicas de papel de celofán y microcultivo que permitió proponer su identificación como *Verticillium dahliae*,

Palabras clave: Caracterización, celulosa, aserrín, plaga, *Verticillium.*

Microbiological Characterization of a Fungus Isolated from the Sierra de Santa Rosa, Guanajuato

Abstract. Due to the nonspecificity of the specialized enzyme complexes presented by wood-decomposing fungi, they present a wide variety of biotechnological applications. The identification of an unreported fungus, considered a pest in the Sierra de Santa Rosa, Mexico, was carried out; The characterization of its morphology was carried out, as well as the evaluation of its capacity to degrade wood and cellulose. The fungus was grown in triplicate in PDA medium for six weeks at 26°C, obtaining slow growth [13]. Its ability to degrade wood was evaluated by growing it in PDA medium with 3, 10 and 15%

v/v of pine sawdust for the same period of time, decreasing the growth diameter in them as said percentage increase compared to the control without sawdust. Likewise, the cellulolytic activity of the fungus was evaluated through its growth in solid cellulose medium in triplicate for 21 days under the same conditions; A similar growth of the sample was obtained with respect to the growth obtained in the culture in PDA medium and a speed of appearance of the cellulose degradation halo of 5.33 and 33.02 $mm/día$ for a period of zero to three and three to twenty-one days. respectively, describing it as a high or rapid cellulose degrader [6] after a latency period of approximately three days. A morphology was observed when the fungus grew in PDA medium and when using cellophane paper and microculture techniques that allowed us to propose its identification as Verticillium dahliae.

Keywords: Characterization, cellulose, sawdust, pest, Verticillium.

1. Introducción

Los hongos de tipo silvestre en México se presentan en variedad de especies y formas [3], por lo que el reportado conocimiento de dicha diversidad es insuficiente, y las cifras que han mencionado diversos autores no reflejan con certeza la cantidad concreta de especies conocidas [1]. Estos son aquellos organismos de tipo unicelular o pluricelular, eucariotas ycon una rígida pared celular compuesta por quitina y glucano [5].

Específicamente, los hongos de tipo xilófagos son aquellos organismos que se alimentan de los componentes quecontiene la madera, provocando así severos daños a la misma [14]. La degradación que estetipo de organismos causa en la madera de los árboles es una de las enfermedades más comunes que pueden sufrir, debilitando hasta cierto punto la madera llegando a fracturarlos;este fenómeno puede afectar diferentes partes de los árboles, desde las ramas, hasta las raíces [12].

Específicamente, el proceso de hidrólisis de la celulosa por hongos se realiza a través de la participación de un complejo enzimático llamado celulasas, debido a la estructura compleja, cristalina y amorfa que tiene la celulosa, hidrolizándola en las moléculas de celobiosa, glucosa y oligosacáridos.

Dicho complejo está constituido por tresenzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasas, enzimas de naturalezaglicoproteína que no necesitan de cofactores para poder realizar la actividad enzimática a diferencia de las involucradas en la degradación de lignina [10].

2. Metodología

2.1. Caracterización macroscópica

Se elaboró por triplicado medio PDA para el crecimiento del hongo en cajas Petri y se evaluó la capacidad de degradar madera por el hongo analizado creciéndolo en medios PDAcon aserrín proveniente de pino, específicamente con 0, 3, 10 y 15% v/v de aserrín cada uno. Todas las placas sembradas fueron incubadas a 26°C por un periodo de seis semanas. Para el caso del cultivo de medios sin porcentaje de aserrín, se midió diariamente el diámetro de crecimiento en milímetros, con el fin de construir una curva

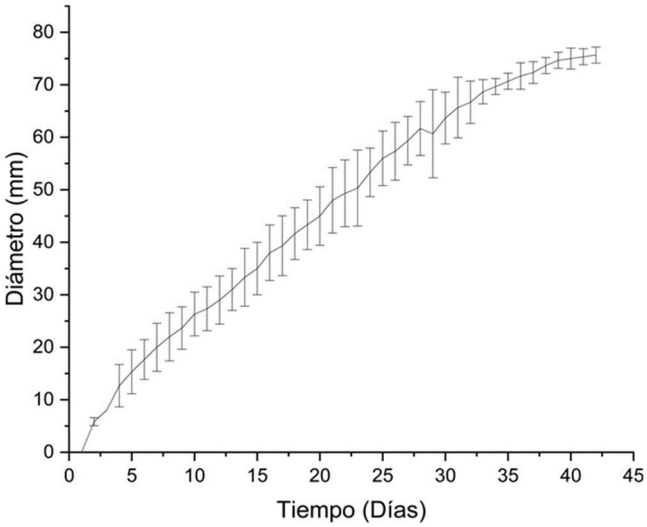


Fig. 1. Cinética de medias con desviación estándar del crecimiento del hongo por triplicado en medio PDA a 26°C durante seis semanas.

de crecimiento a lo largo de periodo de incubación. Asimismo, se midió en las mismas unidades el diámetrode crecimiento de manera semanal de los medios de cultivo con porcentaje de aserrín para realizar un análisis ANOVA de factor único, también evaluando las diferencias significativas entre los aislados en cada porcentaje de aserrín de manera semanal mediantecomparaciones múltiples de medias usando la prueba de Tukey ($P<0.05$). Además, a lo largo de este periodo y para todos los tipos de medio, se observó y registró la morfología presentada.

2.2. Caracterización microscópica

Técnica del papel celofán. Se realizó la técnica del papel de celofán [11] partiendo de un cultivo del hongo en medio PDA tras tres semanas de incubación a 26°C y observando la muestra al microscopio óptico bajo objetivo 40X para describir la forma celular de la muestra.

Técnica de microcultivo. Se realizó la técnica de microcultivo [7] montando el sistema yhumedeciendo la cámara con agua destilada estéril con 30% de glicerol al papel filtro en el fondo para producir una cámara de humedad. Se incubaron las placas de Petri a 26°C durante tres semanas, añadiendo periódicamente glicerol 30% nuevamente al papel filtro en la base de manera semanal. Finalmente, se observó al microscopio óptico bajo objetivo40X y se registraron las estructuras del hongo para su identificación.

2.3. Evaluación de la actividad celulolítica

Se realizó esta prueba inoculando en medio de celulosa [6] (g/L: 5 celulosa, 0.1 sulfato demanganeso, 0.2 sulfato de magnesio, 2 fosfato monobásico de potasio y 15 agar agar) una muestra de micelio, además de un control sin muestra, todos por

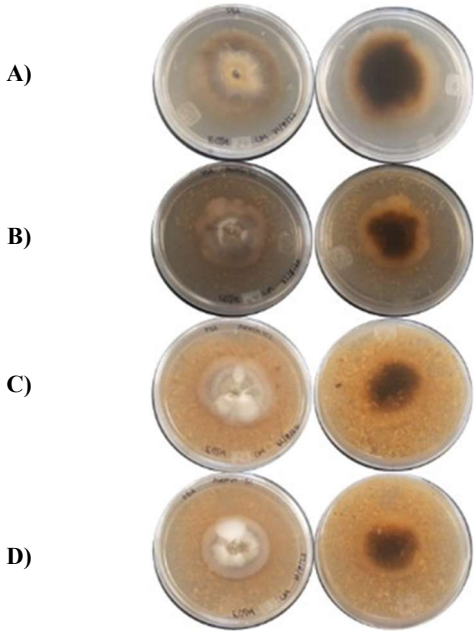


Fig. 2. Crecimiento del hongo en medios PDA con diferente porcentaje v/v de aserrín tras cuatro semanas de la inoculación (anverso, izquierda; reverso, derecha). A) Control medio PDA sin aserrín; B) Medio PDA+Aserrín 3%; C) Medio PDA+Aserrín 10%; D) Medio PDA+Aserrín 15%.

triplicado. Se incubaron durante tres semanas a 26°C, tiempo durante el cual se evaluaron diariamente los respectivos diámetros de crecimiento y de halo de degradación a contraluz basándose en ladesaparición de las pequeñas acumulaciones de celulosa del medio heterogéneo gracias a la actividad el hongo, obteniendo así aproximaciones; todas las mediciones se realizaron enmilímetros, con el fin de elaborar sus respectivas cinéticas a lo largo del periodo de tiempode incubación.

Se reveló el medio con solución rojo Congo al 0.1% (p/v) y se dejó actuar el colorante durante 15 minutos. Después, se lavó con una solución de cloruro de sodio 1 M. Se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestadaspor la hidrólisis de la celulosa.

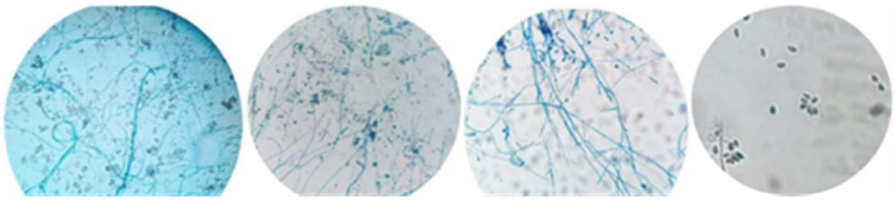
En el caso de la realización de la cinética de aparición del halo de degradación de celulosa, esta se dividió en dos periodos de tiempo de acuerdo con el comportamiento de dicha degradación, obteniendo así las respectivas velocidades en $mm/día$ para cada periodo.

3. Resultados

Se obtuvieron colonias en medio PDA las cuales abarcaron finalmente el área central de lacaja de manera uniforme. Su morfología fue filamentosa, con elevación plana, borde filamentoso y superficie lisa. Se observó una textura de micelio algodonosa con

Tabla 1. Resultados obtenidos tras el análisis ANOVA usando la prueba de Tukey (P<0.05) para los diámetros obtenidos de crecimiento en milímetros en la prueba de degradación de aserrín.

Semana	Control medio	Medio	Medio	Medio	Valor P
	PDA	PDA+Aserrín 3%	PDA+Aserrín 10%	PDA+Aserrín 15%	semanal
1	18 abcd	15.33 abcd	13.33 abcd	12.67 abcd	0.0795
2	36.33 abc	30.33 abcd	30 abcd	28.33 bcd	0.0181
3	47.67 ac	35.33 cdb	39.33 acdb	37.33 cdb	0.0082
4	58.33 a	43.33 cdb	44.33 cdb	44 cdb	0.0002
5	74 a	57.33 bdc	54.33 bdc	55.33 bdc	0.0021
6	77.33 a	65.67 bcd	63.33 bcd	62.67 bcd	0.0004



A) B) C) D)

Fig. 3. Observación del hongo tras ser incubado por tres semanas a 26°C en medio PDA al microscopio óptico bajo objetivo 40X. A) Técnica del papel celofán; B) Técnica de microcultivo; C) Técnica de microcultivo (visualización de hifas); D) Técnica de microcultivo (visualización de conidios).

esporas decolor negro, con micelio vegetativo y reproductivo, siendo el primero de un color blancuzco crema oscureciéndose a café gradualmente en el centro debido a pigmentación, así como un crecimiento invasivo (fig. 2, A).

Asimismo, se evaluó la cinética de crecimiento del hongo midiendo el diámetro de crecimiento de las muestras a lo largo de las tres semanas de incubación en milímetros, obteniendo una curva representativa como se muestra en la fig. 2, observando un crecimiento total al cabo de dichas tres semanas, teniendo su aparentefase exponencial de desarrollo microbiano del quinto al vigésimo octavo día de incubación. Por otro lado, en la prueba de degradación de aserrín se observó la aparición de micelio aéreo parcialmente de un color blanco más pronunciado en las muestras evaluadas en medios con aserrín que en el control sin aserrín (fig. 2).

Al final de la prueba, se observó que el crecimiento en los medios tendía a disminuir en cuanto a longitud del diámetro del mismo a medida que aumentaba el porcentaje de aserrín en el medio (fig. 2). De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis ANOVA, en cuanto al valor P semanalse tienen diferencias significativas en los datos de todas las semanas a excepción de la primera, al haber obtenido valores inferiores a

0.05. Sin embargo, según los resultados obtenidos en la prueba de Tukey, se observan diferencias estadísticamente significativas únicamente en el caso del control (tabla 1, columna 2) al ser comparadas las respectivas medias de este tipo con las medias obtenidas en los casos de medios PDA con aserrín (tabla1, columnas 3-5).

Cabe mencionar que dichas diferencias se fueron identificando de maneragradual a medida que se avanzaba en el número de semanas, ya que en la primera no se determinaron diferencias significativas. Los datos corresponden a la media de las tres réplicas respectivas realizadas en cada caso. Las letras representan la diferencia significativa existente entre dicho número de repeticiones, en donde las medias en la misma fila (ya que se realizó el análisis de manera semanal) y con la misma letra no se determinaron como estadísticamente diferentes.

La última columna corresponde al valor P obtenido tras la realización del análisis ANOVA, esto realizado de igual forma semanalmente. De acuerdo con las pruebas concernientes a la caracterización microscópica, se identificaron hifas de modalidad rizoide y septadas (fig. 3, C), con microconidias de conidióforos verticilados, además de largas fiálides. Asimismo, se apreciaron abundantes microesclerocios (fig. 3, A y B) y conidios de tipo fialospora, esféricos u ovoides, hialinosy unicelulares (fig. 3, D); reproducción asexual por fragmentación y sin pigmentación.

Finalmente, se realizó la evaluación de la velocidad de aparición del halo de hidrólisis de celulosa generado y del crecimiento del hongo cada 24 horas, midiendo los respectivos diámetros en milímetros. Los resultados confirmaron este tipo de degradación de acuerdo con la comparación del anverso y reverso de las muestras evaluadas contra el control realizado. Se observa un fondo rojo en la caja Petri debido a la adición de solución de rojo Congo al 0.1% (p/v), con zonas claras alrededor del crecimiento de la muestra, siendo estolos ya mencionados halos de degradación de celulosa (fig. 5).

Se elaboró la cinética de crecimiento del hongo en este medio, observando un crecimiento ligeramente mayor al obtenido en el cultivo en medio PDA, para el periodo final alcanzado de 21 días, sin embargo, se aprecia de manera general un mismo ritmo de crecimiento a lo largo de este periodo de tiempo. Además, se evaluó la velocidad de degradación de celulosa a lo largo de dichas tres semanas (fig. 4); se dividió en dos partes la cinética elaborada de acuerdo a la marcada diferencia en el comportamiento mostrado enla misma, la primera abarcando desde la inoculación hasta el tercer día de incubación, y lasegunda del tercer día al vigésimo primero.

De esta manera, se obtuvieron dos velocidades promedio de degradación de este compuesto, una correspondiente a cada parte: de 5.33 y 33.02 $mm/día$ respectivamente, observando así una mayor velocidad para el segundo periodo de degradación.

4. Discusión

En cuanto a la identificación del hongo, el género *Verticillium* posee fiálides largas en conidióforos ramificados en verticilos [15], característica que se ajusta a las mostradas porel hongo en análisis (fig. 3). Se reporta que las especies de *Verticillium* son fitopatógenos no específicos [8], aspecto que concuerda con la problemática presentada en la Sierra de Santa Rosa; de igual manera, posee conidióforos hialinos,

simples o ramificados rectos biendiferenciados, portando verticilos de esbeltas fiálidas divergentes en forma de punzón, cuyas hifas son hialinas y septadas, además de que sus conidios son hialinos o de colores brillantes y en su mayoría unicelulares [9].

Dicha descripción encaja con los resultados obtenidos (fig. 3). Para la parte microscópica, la especie en específico de *V. longisporum* cultivada en medio PDA presenta una morfología macroscópica plana, borde filamentoso, pigmentación al centro color café y micelio algodonoso [16], descripción sumamente parecida a la del hongo estudiado.

De dicho cultivo en medio PDA, al incubarse durante 14 días en oscuridad a aproximadamente 20°C, se obtiene un diámetro de crecimiento de 42 mm, mientras que la muestra analizada en este trabajo adquirió uno en promedio de 34 mmen este mismo tiempo (fig. 1). Como se observa, ambos crecimientos son parecidos.

Sin embargo, para diferenciar entre las dos especies mencionadas de este género al momento (*V. dahliae y V. longisporum*) es importante la morfología de los conidios, ya que *V. dahliae* produce unos relativamente esféricos, mientras que V. *longisporum* produce unos de formaelongada [17].

Además, *V. dahliae* es un organismo de colonia blanca y micelio algodonoso abundante al crecer en medio PDA inicialmente, para gradualmente volverse de un tono oscuro, produciendo abundantes conidias hialinas y de forma generalmente ovalada. Debido a lo anterior, se propone la identificación del hongo analizado como *V. dahliae*, al presentar las características atribuidas a este hongo, diferenciándose de *V. longisporum* al observarse conidias esféricas y ovaladas.

Conforme a los resultados obtenidos en la prueba de degradación de aserrín, se observó la capacidad de degradación de madera del hongo al identificarse una disminución estadísticamente significativa en los diámetros de crecimiento con porcentajes v/v de aserrín respecto a los obtenidos sin este compuesto con el pasar de las semanas (tabla 1), demostrando un retardo en el crecimiento del hongo analizado posiblemente debido a dicho proceso de degradación.

A lo anterior, se suma que la podredumbre de tipo blanca presenta una gran diversidad, habiendo dos tipos de esta degradación: deslignificación selectiva y pudrición simultánea, donde en el primer caso, los hongos degradan principalmente la lignina, dejando sin afectar los tubos de celulosa y la madera con manchas de color blancoy con arrugas. Por otro lado, en el caso de la pudrición simultánea, los hongos descomponen al mismo tiempo celulosa, hemicelulosa y lignina [14]. Teniendo lo anterior en cuenta, en la última clasificación de hongos de podredumbre blanca, el hongo analizado podía categorizarse de esta manera al ser posible la degradación simultánea de celulosa y lignina.

En cuanto a ello, aspectos como la aparición de micelio blanco al entorno de las hifas en elcrecimiento del hongo en medios PDA+Aserrín con diferentes porcentajes (fig. 2) concuerda con las manchas blancas anteriormente mencionadas en el caso de los hongos de podredumbre blanca, así como el vasto crecimiento habido en la evaluación del crecimiento de hongo en medio de celulosa (fig. 4) a comparación del crecimiento mostrado en mediosPDA con aserrín (tabla 1), ya que fue bastante similar al hallado en medio PDA (fig. 1), e incluso ligeramente mayor, esto al haber alcanzado en promedio los 60 cm de diámetro decrecimiento en 42 días para el medio con menor cantidad de aserrín (PDA+Aserrín 3%), en22 días en medio PDA y en 19 días en medio de celulosa, estando todos los cultivos bajo las mismas condiciones.

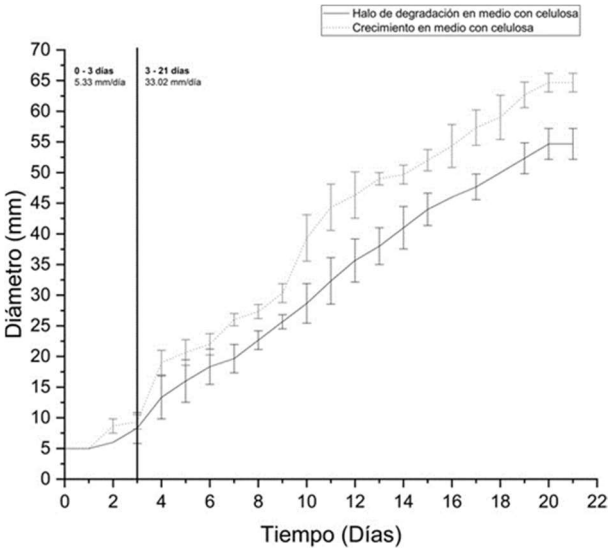


Fig. 4. Cinética de las medias con desviación estándar de la actividad celulolítica y de crecimiento del hongo en medio de celulosa por tres semanas a 24°C junto con las respectivas velocidades de degradación de celulosa por periodo definido.

Aunado a ello, se menciona la rápida degradación de celulosa graficada en la fig. 4, de donde se calcula una velocidad de degradación de celulosa promedio en el primer periodo definido de 5.33 $mm/día$ y de 33.02 $mm/día$ para el segundo. En un estudio, al evaluar de manera similar la degradación de celulosa en diferentes hongos xilófagos, se obtuvo las máximas velocidades de 18.816 $mm/día$ (correspondiente a *Aspergillus fumigatus*) y 9.432 $mm/día$ (para *Aspergillus flavus*) en los primeros cuatro días y en los siguientes dos, respectivamente [6].

Al comparar estas velocidades con las obtenidas, se observa una notable diferencia, ya que, para el primer periodo de tiempo, se obtuvo una velocidad más baja, y, en contraste, para el segundo, se obtuvo una mayor, sin embargo, para este último caso se tiene un periodo de tiempo más largo. De esta manera, en comparación, la capacidad de degradación del hongo estudiado podría entenderse como alta o rápida tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días.

5. Conclusiones y perspectivas

Se realizó la caracterización de un hongo no reportado, considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, Guanajuato, esto a través de la realización de pruebas microbiológicas con el fin de observar su morfología, observando características del género *Verticillium*, específicamente de la especie *V. dahliae*, proponiendo dicha especie para su identificación.Asimismo, se realizó la evaluación de su capacidad para degradar madera y actividad celulolítica. Para el primer caso, al evaluar su crecimiento en medios PDA con porcentajesascendentes de aserrín de pino (3, 10 y 15% v/v), se obtuvo una disminución del diámetro en los mismos a medida que aumentaba este porcentaje

A)

B)

Fig. 5. Cultivos en medio sólido de celulosa revelados con rojo congo 0.1% (m/v) tras incubación de tres semanas a 26°C (anverso, izquierda; reverso, derecha); A) Control medio celulosa sin muestra, B) Medio celulosa con muestra.

respecto al control sin aserrín, estoademás de la aparición parcial de micelio blanco en los medios que contenían aserrín, lo último acentuándose a medida que aumentaba el porcentaje de dicho compuesto, mostrandoasí atributos de un hongo de tipo xilófago de podredumbre blanca.

Para el segundo caso, ensu cultivo en medio de celulosa, se obtuvo un crecimiento similar de la muestra respecto asu crecimiento en medio PDA, donde se obtuvo un crecimiento catalogado como lento [13],y una velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa de 5.33 y 33.02 $mm/día$para un periodo de cero a tres días y de tres a veintiún días, respectivamente, característicasque describen a este hongo con una capacidad de degradación de celulosa alta o rápida [6]tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días.

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización microbiológica, al no poder ser considerados estos como inequívocos, se propone realizar una caracterización de tipo molecular para su identificación, realizando una secuenciación por gen ITS con una previa extracción y purificación de ADN fúngico. Asimismo, se podrían realizar pruebas en cuanto a una caracterización más profunda sobre la actividad celulolítica presentada por el hongo y así obtener una perspectiva más amplia en cuanto a sus potenciales aplicaciones.

Inclusive, pruebas en cuanto a degradación de lignina y hemicelulosa podrían ser realizadas. Por otro lado, dado que el interés en el hongo se debea que se considera plaga, podría realizarse un muestreo del área para así estimar el porcentaje de árboles sanos, enfermos y muertos para de esta forma tener una idea más clarade la enfermedad y buscar la manera de controlarla.

Finalmente, al haber comprobado su capacidad de degradación de celulosa, se tienen aplicaciones en distintas áreas de la industria, entre ellas, la industria extractiva, actividad limitada debido a su alto coste de producción en el uso común de vegetales al respecto [2],por lo que, al ser el hongo analizado de naturaleza filamentosa, sobresale al caracterizarse por formar hifas capaces de colonizar matrices sólidas, y así se tiene una tecnología más sencilla y con menor costo para su producción [4].

Referencias

1. Aguirre, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., Valenzuela, R.: Biodiversidad de hongos en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, vol. 85, pp. 76–81 (2014) doi: 10.75 50/rmb.33649
2. Chacón, O., Waliszewski, K.: Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia, vol. 21, no. 42, pp. 111–120 (2005)
3. Díaz, K., Morales, G., Radilla, A., vonBertrab, P.: Identificación, caracterización y conservación de hongos silvestres mexicanos. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, vol. 3, no. 1, pp. 501–507 (2018)
4. Escudero-Agudelo, J., Daza-Merchant, Z. T., Gil-Zapata, N. J., Mora-Muñoz O. Y.: Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. 15, no. 1, pp. 108–117 (2013)
5. Universidad Católica de Manzinales, https://www.ucm.edu.co/wp- content/uploads/2021/ 03/Micologia_general.pdf
6. Galván-Quintero, B.: Aislamiento, purificación y caracterización de actividad celulolítica de hongos de corteza de Pinus hartwegii. Universidad Autónoma del Estado de México (2018)
7. García-Hernández, M.: Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamientos de agua residual. Universidad Autónoma de Nuevo León (2004)
8. Koppert: https://www.koppert.mx/retos/control-de-enfermedades/verticilosis/.
9. Larone, D. H.: Medically important Fungi: A guide to identification. 3rd edn, ASM Press, Washington, D.C. (1995)
10. Mora, V.: Evaluación de dos hongos filamentosos para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (Rubus adenotrichos) mediante fermentación en medio sólido. Universidad de Costa Rica (2015)
11. Universidad Autónoma de San Luis Potosí: http://www.fc.uaslp.mx/informacion-para/material-didactico/MANUALDELABORATORIOBIOLOGIADEHONGOS.pdf
12. Passer: https://www.controldeplagaspasser.com/wiki/hongos-xilofagos/
13. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, http://www.fcn.unp.edu.ar/ sitio/microambiental/wp-content/uploads/2016/08/TP-8- Micolog%C3%ADa.pdf
14. Sanite: https://diagnosisdelamadera.com/diagnosis-de-la-madera-guia-de-hongosxilofagos/
15. Sociedad Microbiológica Española: https://www.semicrobiologia.org/wp- content/uploads/ 2021/04/30_Clave.pdf
16. Xiaorong, Z.: Verticillium longisporum on oilseed rape (brassica napus L.): Differential roles of salicylic acid, seed transmission and plant colonization in greenhouse and field conditions. Universidad Göttingen (2018)
17. Yu, J., Cafarov, I. H., Badadoost, M.: Morphology, molecular identity, and pathogenicity of verticillium dahliae and V. longisporum Associated with Internally Discolored Horseradish Roots. Plant Disease, vol. 100, no. 4, pp. 749–757 (2016)