

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSTGRADO EN AGRONOMÍA**



**USO DE *Trichoderma harzianun* Rifai Y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn
PARA EL CONTROL DE (*Colletotrichum gloeosporioides* Pens.) CAUSANTE
DE LA ANTRACNOSIS EN MANGO (*Mangifera indica* L.)**

Ing. Agr. ADENIS J. SANTANDER P.

Maracay-Mayo 2012

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO FINAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE *MAGISTER SCIENTIARUM* EN AGRONOMÍA,
ORIENTACIÓN PROTECCIÓN VEGETAL QUE OTORGA LA UNIVERSIDAD
CENTRAL DE VENEZUELA.**

Dra. Nelly Sanabria

Tutora

RESUMEN

El mango (*Mangifera indica* L.) es el tercer fruto tropical en términos de producción e importación a nivel mundial. En Venezuela, fue uno de los rubros de exportación más importante. El mango al igual que otros frutales, es afectado por patógenos que disminuyen la capacidad fisiológica y productiva de la planta, incidiendo en la calidad del fruto. Entre las principales enfermedades fungosas se menciona la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Esta investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto antagónico *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* por separado y en mezcla sobre *C. gloeosporioides*; una vez evaluada la patogenicidad del hongo se realizaron los enfrentamientos. El ensayo *in vitro* se realizó en placas Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA), con el fin de evaluar el comportamiento de estos antagonistas, y calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Se establecieron tres tratamientos con 10 repeticiones, los cuales consistieron en: T1) patógeno enfrentado con *B. subtilis*, T2) patógeno enfrentado con *T. harzianum* y T3) patógeno enfrentado con la mezcla de los antagonistas. En el ensayo *in vivo* se definieron seis tratamientos los cuales quedaron conformados por: T1) Testigo: frutos de mango asperjados con el patógeno (1×10^6 conidios/mL), T2) Testigo: frutos asperjados con agua destilada estéril (ADE), T3) frutos asperjados con *B. subtilis* (10^8 ufc/mL), T4) frutos asperjados con *T. harzianum* (1×10^6 conidios/mL), T5) frutos asperjados con la mezcla de los dos antagonistas y T6) frutos asperjados con un fungicida Benomilo 0,5g/L. Se calculó el porcentaje de avance de la enfermedad para cada tratamiento. En ambos ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado para el análisis de los datos, mediante el programa InfoStat 2004. En condiciones *in vitro* se registró un porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno (PIC) de 80,32%, 69,05% y 86,81% respectivamente y un porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) de 98,07%, 84,10% y 99,00% respectivamente. En condiciones *in vivo*, se obtuvieron valores promedio de avance de la enfermedad para los tratamientos T3(7,18%), T4(13,42%) y T5(1,55%), lo cual significa que el mejor tratamiento para ambos ensayos fue la mezcla de los antagonistas, mostrando así la factibilidad del uso combinado de estos agentes de control biológico.

Palabras clave: antagonistas, control biológico de enfermedades, postcosecha

ABSTRACT

The mango (*Mangifera indica* L.) is the third tropical fruit on terms of production and importation worldwide. In Venezuela, it was one of the most important crops of exportation. The mango is affected by pathogens like the others crops, which can affect the physiologic and productive capacity of the plant, affecting the fruit quality and causing its total destruction. Among the main fungal diseases, the anthracnose can be mentioned caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. The objective of this research was to evaluate the antagonis effect of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* *in vitro* and *in vivo* used alone o in combination to control *C. gloeosporioides*; After evaluating the fungal pathogenicity, the confrontation was carried out. The *in vitro* assay was made on Petri dishes and potato dextrose agar (PDA) medium in order to evaluate the antagonistic behavior and to calculate the percentages of inhibition of growing and the percentage of inhibition of sporulation. Three treatments with 10 repetitions were established: T1) pathogen was confronted with *B. subtilis*, T2) pathogen was confronted with *T. harzianum* and T3) pathogen was confronted with combination of antagonists. Six treatments were evaluated in the *in vivo* assay which consisted in: T1) mangos fruits were treated only with the pathogen (1×10^6 conidia/mL), T2) fruits were treated with sterile distilled water (SDW), T3) fruits were treated with *B. subtilis* (10^8 ufc/mL), T4) fruits were treated with *T. harzianum* (1×10^6 conidia/mL), T5) fruits were treated with the combination of antagonists, T6) fruits were treated with a commercial fungicide Benomilo 0,5g/L. A complete random design for both assays was used to analyze the data through the InfoStat 2004 program. *In vitro* conditions, in average, percentages of inhibition of growing (PIC) were 80,32%, 69,05% and 86,81% respectively and a percentage of inhibition of sporulation (PIE) of 98,07%, 84,10% and 99,00% respectively were obtained. The advance percentage of spot was also obtained, T3 (7,18%), T4(13,42%) and T5(1,55%), which means the combined antagonists was the better treatment both *in vivo* and *in vitro* assays.

Key Words: antagonisms, biological control of diseases, postharvest.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
Generalidades del cultivo.....	5
Importancia del cultivo	5
Enfermedades que ataca al cultivo	6
Antracnosis	7
Sintomatologías	7
Descripción del agente causal	8
Epidemiología y ciclo de la enfermedad	8
Control de la antracnosis	10
Control biológico	12
Bacterias antagonistas utilizadas como biocontroladoras	14
<i>Trichoderma</i> spp como biocontrolador	18
Mecanismo de acción de <i>Trichoderma</i>	19
Uso de <i>Trichoderma</i> para el control de patógenos	21
Uso de <i>Trichoderma</i> y <i>B. subtilis</i> para el control de patógenos	22
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Ubicación del ensayo	26

Recolección de las muestras	26
Aislamiento <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.....	26
Procedencia de la especie de <i>T. harzianum</i>	27
Procedencia de <i>Bacillus subtilis</i>	27
Preparación del inóculo del patógeno y los microorganismos antagonistas	28
Evaluación de patogenicidad	29
Evaluación <i>in vitro</i> de <i>T. harzianum</i> y <i>B. subtilis</i> para el control de <i>C.</i> <i>gloeosporioides</i>	30
Evaluación <i>in vivo</i> de <i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i> para el control de <i>C.</i> <i>gloeosporioides</i>	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Descripción de síntomas.....	37
Aislamiento y caracterización del patógeno	37
Evaluación del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>C.gloeosporioides</i> y <i>T. harzianum</i>	38
Caracterización del aislamiento de <i>T. harzianum</i>	39
Caracterización del aislamiento de <i>B. subtilis</i>	40
Pruebas de patogenicidad	46
Evaluación <i>in vitro</i> de <i>T. harzianum</i> y <i>B. subtilis</i> para el control de la Antracnosis	47
Evaluación <i>in vivo</i> de <i>T. harzianum</i> y <i>B. subtilis</i> para el control de la Antracnosis	59
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS CONSULTADAS	69
ANEXO	86

ÍNDICE DE CUADROS

CuadroNº

1	Descripción de los enfrentamientos <i>in vitro</i>	31
2	Descripción de los tratamientos <i>in vivo</i>	34
3	Crecimiento lineal <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i> en placa Petri en (PDA)	39
4	Características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas aplicadas a la bacteria	42
5	Promedio del porcentaje de inhibición de crecimiento día 1 de evaluación.	48
6	Promedio del porcentaje de inhibición de crecimiento día 4 de evaluación.	48
7	Promedio del porcentaje de inhibición de crecimiento día 6 de evaluación.	49
8	Promedio del porcentaje de inhibición de esporulación al día 6 de la evaluación	51
9	Valores de PIC y PIE en la prueba de metabolitos volátiles	57
10	Promedio del diámetro y porcentajes de avance de la mancha para el día 1 de evaluación	60
11	Promedio del diámetro y porcentajes de avance de la mancha para el día 4 de evaluación	61
12	Promedio del diámetro y porcentajes de avance de la mancha para el día 6 de evaluación	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°

1. Evaluación de metabolitos volátiles de *T. harzianum* contra *C. gloeosporioides*.....33
2. Secuencia de pasos para evaluación *in vivo*.....36
3. Síntomas de la enfermedad.....37
4. Características morfológicas de *C. gloeosporioides*. A) Crecimiento de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa; B) Conidios y micelio.....38
5. Crecimiento de *C. gloeosporioides* enfrentado a los antagonistas en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA).....39
6. Principales características macro y microscópicas de la especie *T. harzianum*.....40
7. Colonia de la bacteria *B. subtilis*.....42
8. Células bacterianas observadas con tinción rojo congo y tinción de endosporas.....43
9. Prueba de Tioglicolato para determinar tipo de respiración de *B. subtilis*.....44
10. Prueba a diferentes temperaturas. Crecimiento de *B. subtilis* a 45° y 65°C45
11. Síntomas de la enfermedad en la superficie de fruto de mango.....46
12. Representación gráfica del porcentaje de inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* (PIC) de los tres tratamientos.....50

13. Interacción entre los antagonistas y <i>C. gloeosporioides</i> . A) Parasitismo ocasionado por <i>T. harzianum</i>	56
14. Representación gráfica del promedio porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) al realizar la prueba de Metabolitos volátiles.....	58
15. Avance de la enfermedad en frutos de mango 'Haden' con los diferentes tratamientos.....	63

INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.), es una especie originaria de la India, fue introducida en Venezuela según Humboldt en Ciudad Bolívar en 1801, aclimatándose muy bien en nuestro medio (Rondón y Guevara, 1995). Su exportación y comercialización internacional a gran escala, tanto en Venezuela como en el resto de los países productores del mundo, se inicia en el siglo XX comienzos de la década de los 80, perfilándose un mercado internacional prácticamente ilimitado. Las procedencia para abastecer al mercado mundial son muy variadas si se compara con otras frutas tropicales; sin embargo el mango es una de las frutas con mayor crecimiento en producción y en exportación (Gutiérrez, 2009).

En materia nutricional los frutales proporcionan al organismo sales minerales, vitaminas, carbohidratos, proteínas y grasas. Sin embargo, es por su agradable sabor que son altamente apetecibles por los consumidores (Flores, 2000). De allí, que la mayor parte del volumen de fruta cosechada sea destinada particularmente al consumo fresco nacional, a la agroindustria y en cierta escala a las exportaciones.

El mango, por su grato y delicioso sabor, es una fruta de gran popularidad y consumo, ampliamente difundida en casi toda la totalidad del territorio nacional (Avilán y Rengifo, 1990). De acuerdo a los datos de la FAO para el año 2010, la distribución de la producción mundial estaba localizada en un 40% en la India, seguida de China con un 11% y Tailandia con un 7%, siendo esos los tres principales países productores de mango en el mundo. En Venezuela, durante el año 2010 fueron cosechadas 5.200 ha, para una producción de 74.600 t y un rendimiento de 143.462 kg/ha (FAOSTAT, 2011).

Las enfermedades en el mango, igual que en otros cultivos pueden originar pérdidas, ya que afectan la capacidad fisiológica y productiva de la planta, pudiendo en muchos casos, incidir en la calidad de los frutos y en otros, provocar su destrucción total. Es común observar en las zonas húmedas del país, frutos

que son afectados por enfermedades fúngicas y bacterianas, las cuales inciden sobre su valor comercial. Entre las principales enfermedades fúngicas se menciona la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. Esta enfermedad tiene mucha importancia en la fruticultura tropical, por los daños económicos que ocasiona en frutos y el elevado rango de hospederos que tiene el patógeno, entre los cuales se citan: mango, aguacate (*Persea americana* M.), guanabana (*Annona muricata* L.), cítricos (*Citrus* spp), lechoso (*Carica papaya* L.), manzano (*Malus domestica* B.) (Rondón, 1995).

La importancia económica de la antracnosis en mango depende de varios factores, a saber: la región donde se cultive, las condiciones ambientales, la variedad sembrada y las prácticas culturales empleadas (Rondón y Guevara, 1995). Esta enfermedad es considerada económicamente como la más perjudicial del mango en condiciones de campo, debido a la aparición de manchas oscuras en hojas, flores, pedúnculo y frutos, particularmente en la etapa de cuajado, pudiendo sufrir daños antes de llegar a la madurez.

Teniendo en cuenta el alto costo generado por el manejo químico de la antracnosis, a través de investigaciones se han generado alternativas de manejo o medidas complementarias que contribuyen a minimizar el problema y reducir los costos por concepto de controles químicos (Arias, 2000).

Debido a la creciente necesidad de reducir el uso de agroquímicos para el control fitosanitario de los cultivos, se hace necesario desarrollar tecnologías que permitan el combate de plagas y enfermedades de forma fácil, económica y efectiva. Entre las alternativas al uso de plaguicidas existen técnicas de control enmarcadas en los objetivos de la agricultura sostenible, como es el uso de hongos y bacterias antagonistas (Fernández-Larrea, 2001). Dentro de éstas se encuentra el manejo de patógenos en la agricultura a través del uso de controladores biológicos como son las especie del género *Trichoderma* (*T. harzianum*) y bacterias como *Bacillus subtilis* (Mendgen *et al.*, 1992). Las especies del género *Trichoderma* se han estudiado como agentes de control biológico de

enfermedades de plantas causadas por hongos, tanto de los que invaden la raíz como la parte aérea y en postcosecha (Michel, 2001).

Es recomendable investigar alternativas prácticas y así desarrollar tratamientos basados en mezclas de microorganismos antagonistas complementarios y no competitivo entre ellos (Spadaro y Gullino, 2004). Estas mezclas permiten ampliar el espectro de actividad (diferentes frutos, cultivares y estado de madurez), incrementar la eficacia (reducir la concentración necesaria), ser más seguras, permitir la reducción del número de aplicaciones y por ende el costo de tratamiento (Janisiewicz *et al.*, 1998).

Con el fin de ofrecer a los productores de mango alternativas biológicas enmarcadas en un programa de manejo integrado de enfermedades, se plantea en esta investigación, evaluar la efectividad del uso de la mezcla de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* para el control biológico en postcosecha de *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis en mango.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Evaluar la efectividad de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en mango (*Mangifera indica* L.)

Objetivos específicos:

- Realizar pruebas de patogenicidad para verificar la virulencia del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz).
- Determinar *in vitro* la efectividad de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* por separado, así como de la mezcla de ambos, para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.
- Evaluar *in vivo* la efectividad de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* por separado y la mezcla de ambos, para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz en frutos de mango (*Mangifera indica* L.).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. GENERALIDADES DEL CULTIVO

El mango (*Mangifera indica* L.), es uno de los árboles frutales más conocidos y cultivado no solo en Venezuela sino en todas las regiones cálidas del mundo. Con el nombre vulgar de mango, derivado de la palabra malaya *mangga*, es ampliamente conocido en todos los países tropicales y subtropicales (Hoyos, 1994). El fruto es una drupa grande que pueden contener uno o más embriones, posee un mesocarpo comestible, fibroso o no (según el cultivar), varían en peso desde 200 g hasta unos 2 kg, con formas desde redondos hasta ovoides, arriñonados y a veces aplanados lateralmente; y en color, entre verde y amarillo (Galán, 1999).

Posiblemente, este árbol frutal es originario del noreste de la India, Sri Lanka y Myanmar. A este respecto se señala, que de acuerdo con la distribución fitogeográfica de las especies de *Mangifera* la mayor concentración de ellas se encuentra en la Península Malaya. Le siguen, en cuanto al número de especies, las áreas de Archipiélago Sunda y Península Indochina. (Avilán y Rengifo, 1990)

2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO

El valor nutritivo de este fruto es variable en función de las condiciones climáticas, manejo agronómico y el material vegetal (cultivar y patrón) utilizado; es considerado como una buena fuente de vitamina A y C, razón por la cual su consumo es deseable para el organismo humano (Avilán y Rengifo, 1990). El mango al ser un producto perecedero, necesita de tecnologías idóneas para su manejo y almacenamiento que preserve sus características organolépticas, así como su frescura, color y tersura, tan apreciadas en el mercado internacional. (Vega, 2001).

3. ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL CULTIVO

La susceptibilidad de los frutos de mango a las enfermedades se incrementa después de la cosecha y en el almacenamiento prolongado, como un resultado de los cambios fisiológicos que ocurren en los frutos, que hacen más fácil el desarrollo del patógeno. Entre las principales enfermedades que afectan a los frutos de mango se encuentran, según Rondón (1995):

3.1. Pudrición o mancha negra cuyo agente causal es el hongo *Alternaria alternata*, el cual invade principalmente al fruto en la etapa de postcosecha, aunque también causa problemas en el follaje, flores, frutos y que en casos severos puede reducir el cuajado del fruto.

3.2. Ceniza o mildiú polvoriento (*Oidium mangiferae* Berthet) cuyo teleomorfo es *Erysiphe polygoni* D.C., el hongo afecta hojas, inflorescencias y frutos pequeños.

3.3. Roña. Esta enfermedad es causada por el hongo *Elsinoe mangiferae*. El hongo puede afectar hojas jóvenes, flores y tejidos del fruto. Las lesiones en frutos jóvenes son grises a café grisáceo con márgenes oscuros e irregulares. Las lesiones se agrandan conforme el fruto se desarrolla, dando una apariencia corchosa y agrietada a los frutos afectados.

3.4. Muerte regresiva de las ramas causada por *Botryodiplodia* (*Lasiodiplodia*) *theobromae* Pat., cuyo teleomorfo es *Physalospora rhodina* Cooke., la enfermedad comienza con un necrosado y secamiento de las partes terminales de las ramas y avanza en forma descendente hasta alcanzar el tronco de árbol

4. ANTRACNOSIS. (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz Sacc).

- Importancia

La antracnosis es considerada como la enfermedad más perjudicial del mango en condiciones de campo, debido a que se caracteriza por la aparición de manchas oscuras en hojas, flores, yemas y pedúnculos. En postcosecha, es un factor limitante para las exportaciones y comercialización, debido a la pudrición que ocasiona el patógeno en el fruto, y la consiguiente pérdida de su valor comercial (Vega, 2001). Aun cuando no existen datos estadísticos precisos, se estima que las pérdidas postcosecha por antracnosis en mango fluctúan entre 30% y 60% del total de la producción (Allende *et al.*, 2001).

Está distribuida en todo el territorio nacional y al igual que la mayoría de las enfermedades fúngicas, es favorecida por la elevada humedad relativa. Generalmente el hongo se aloja primero en las hojas y luego invade flores y frutos, por lo que es imperativo su control en el follaje (Sergent, 1999).

- SINTOMATOLOGÍA.

En las hojas ocasionan manchas que aparecen en los bordes y van creciendo hacia el centro de la hoja. Sobre las panículas aparecen manchas o lesiones alargadas de color marrón oscuro que ocasionan las caídas de las flores y frutos muy jóvenes. Los Frutos cuajados (en estado de “alfiler”) al ser infectados, toman una coloración oscura y se “momifican”, lo que eventualmente conduce a su caída. En frutos inmaduros, la enfermedad se expresa a través de manchas de color pardo claro y de aspecto aceitoso, presentándose el mayor número de ellas en las zonas cercanas al punto de unión con el pedúnculo. Los síntomas son más importantes en la fase de maduración de los frutos, en los cuales se desarrollan lesiones irregulares de color café oscuro a negro (Arauz, 2000). Las lesiones se pueden formar en cualquier parte del fruto e inicialmente son superficiales y sólo penetran la pulpa cuando las lesiones se encuentran cubriendo una gran parte de

la superficie del fruto. En la superficie de frutos con daño severo, se pueden formar masas de esporas de color naranja o rosa (Vega, 2001)

5. DESCRIPCION DEL AGENTE CAUSAL

La antracnosis en mango es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (estado anamórfico o conidial), *Glomerella cingulata* su teleomorfo. Pertenece al Reino Mycetozoa; División: Eumycota; Subdivisión: Deuteromycotina, Clase: Coelomycetes, Orden Melanconiales; Género: *Colletotrichum*; Especie: *Colletotrichum gloeosporioides*. Se caracteriza porque produce esporas asexuales (conidios) dentro de pequeños acérvulos negros dispuestos en forma concéntrica o dispersa en las lesiones. El micelio es septado, hialino cuando inmaduro y luego se oscurece ligeramente. Los conidióforos son cortos, simples y hialinos. Puede o no formar setas de color marrón claro y filiforme. Los conidios son rectos, con el ápice obtuso u ovalado, unicelulares, hialinos, amerosporos y miden 9-24 X 3-4,5 µm, los apresorios irregulares y sus dimensiones son de 6-20 X 4-12 µm. Las colonias del hongo *C. gloeosporioides* desarrolladas sobre agar- papa-dextrosa son de color grisáceo a gris oscuro. La colonia es variable en aspecto, algunos aislamientos desarrollan una colonia lisa, otras como fieltro, algodonosa y otras forman anillos concéntricos. Los acérvulos formados son comúnmente de color anaranjado y se presentan agrupados. Estos pueden presentar setas abundantes, algunas veces pocas, o simplemente son glabros (Sutton, 1980; Mordue, 1971).

6. EPIDEMIOLOGÍA Y CICLO DE LA ENFERMEDAD

La producción de ascosporas en hojas secas y sobre el suelo ha sido reportada, pero el rol del estado sexual en el ciclo de la enfermedad no está claro (Fitzell y Peak, 1984). En el campo *C. gloeosporioides* produce conidios en lesiones en hojas, ramitas, panículas y frutos momificados (Arauz, 2000). Los conidios pueden ser esparcidos por la lluvia (salpique) a otras hojas o flores y causan infecciones secundarias; la enfermedad es policíclica en estos órganos. Los frutos en desarrollo pueden ser infectados, perdiéndose antes de la cosecha (Gantotti y

Davis, 1993). Los periodos lluviosos, frecuentes rocíos y las neblinas nocturnas durante la floración, incrementan la infección (Behari, 1968). La enfermedad se disemina a través de los conidios, los cuales pueden mantenerse viables en las ramillas o en el suelo hasta después de 2 años, en las ramas superiores después de por lo menos 19 meses y en las hojas sobre el suelo después de 14 meses. Las condiciones ambientales predisponentes de esta enfermedad son: humedad relativa elevada, superiores al 80%, y temperatura comprendidas entre 24-32°C, bajo estas condiciones los conidios germinan y hay formación de apresorios. Sin embargo, los conidios pueden sobrevivir 1 a 2 semanas a humedad de hasta 62% y germinar luego si son colocadas a 100% HR (Estrada *et al.*, 1993). El patógeno es diseminado por el viento, los insectos y el agua de lluvia; frecuentemente es transportado a grandes distancia en material enfermo (Rondón, 1990)

Específicamente en Venezuela, ya ha sido señalado como patógeno principalmente de frutos (Casas, 1994). Datos genéticos y geográficos sugieren que este patógeno se diseminó a través de las poblaciones de mango del mundo a partir de una sola fuente u origen, siendo por la vía endofítica (Alahakoon *et al.*, 1994)

Huerta *et al.* (2009) describen la fluctuación de la antracnosis causada por el hongo en follaje de mango, su relación con el desarrollo de brotes en el hospedante y la cantidad de conidios capturados en tres tipos de trampas, bajo las condiciones climáticas del Soconusco y Chiapas, México. Los resultados indicaron que la enfermedad crece durante todo el año, afectando hojas jóvenes y maduras, con un patrón de distribución al azar en la copa de los árboles. Un análisis de regresión múltiple mostró que los parámetros climáticos de mayor correlación con la severidad de la enfermedad fueron la temperatura mínima de punto de rocío (TminPR) y la humedad relativa mínima (HRmin), con correlación positiva y negativa respectivamente. Estas variables explicaron el 83% de las variaciones en el desarrollo de la antracnosis, mientras que las lluvias torrenciales comunes en esta región, coincidieron con una menor incidencia de la enfermedad y solo explicaron el 25% de las variaciones. Valores de Tmin PR entre 21 a 24°C durante

diciembre y abril, propiciaron la condensación de agua sobre hojas, flores y frutos, favoreciendo la infección y dispersión por arrastre de conidios (síntoma de lagrimeo) y salpique.

7. CONTROL DE LA ANTRACNOSIS

La antracnosis del mango tiene una incidencia muy alta en prácticamente todas las zonas productoras de este fruto. El hongo generalmente infecta el árbol de mango desde etapas tempranas en el ciclo de producción. En consecuencia, la enfermedad debe controlarse principalmente en campo ya que afecta la productividad del árbol y aunque los síntomas no son evidentes al momento de cortar el fruto, esto puede manifestarse en postcosecha. Si bien muchos productores llevan a cabo tratamiento postcosecha, el control de la antracnosis en campo es determinante en la calidad final de los frutos (Páez, 2004). El manejo debe ser eficiente y rentable para los agricultores (Castilla, 2008). El control biológico de enfermedades postcosecha es una de las alternativas posibles al uso de químicos sin perjudicar el medio ambiente (Lindow y Wilson, 1998).

7.1. Control Cultural.

El control se basa en prácticas de manejo del cultivo como distancia adecuada entre plantas, donde exista buena circulación de aire y penetración de rayos solares, construcción de drenajes para impedir estancamiento de las aguas, lo cuales incrementan la humedad relativa dentro de la plantación, la poda es una práctica que permite mejorar el microclima del árbol, disminuyendo la humedad relativa (Cartagena y Vega, 1992).

7.2. Control Químico.

Actualmente el manejo de la enfermedad en mango se fundamenta en la aspersión programada de fungicidas durante la fase productiva, iniciando la floración, pero antes de la apertura floral, hasta que los frutos estén pintones; de esta forma se hacen 8 a 12 aspersiones; en Estados Unidos hay registro de 16 a 22 aspersiones por cosecha (Rondón *et al.*, 2006).

El tratamiento convencional para minimizar (o mantener en niveles aceptables) la antracnosis (tanto en pre como en postcosecha) es el uso de fungicida químicos como el Benomilo cuyo nombre químico es metil 1-butilcarbamoil-2-benzimidazol carbamato y que se comercializa bajo el nombre comercial de “Benlate”. Se ha reportado que en ambientes muy húmedos (donde la incidencia de antracnosis es muy alta) es necesario realizar entre 8 a 12 aplicaciones anualmente de fungicidas químicos (Rondón *et al.*, 2006).

La mayoría de los agricultores se han inclinado más hacia el uso de agroquímicos para el control de esta enfermedad, utilizando productos tales como oxiclورو de cobre, Captan, Benomyl, Orthocide, Carbendazin, Procloraz y Clorotalonil (Arias y Carrizales, 2007).

Rondón *et al.* (2006), evaluaron *in vitro* el efecto de cinco fungicidas sobre la inhibición del crecimiento micelial y esporulación del *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, utilizando el método de dilución en plato de agar y cinco fungicidas: Benomil (Benlate), Procloraz (Funcloraz), Mancozeb (Dithne M-45), Sulfato de cobre (Phyton 27), Extracto de Cítrico Libre de Nitrógeno (Lonlife), en las dosis de 1, 10, 100, 1000 ppm, cada tratamiento del hongo lo incubaron a 26-28°C. Los productos que mostraron mayor efectividad en el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y de la esporulación (PIE) fueron Procloraz en todas sus concentraciones (PIC de 100% a 100 y 1000 ppm), Benomil en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm (PIC de 100% a 1000 ppm), Mancozeb a 100 y 1000 ppm (PIC de 100% a 1000 ppm).

7.3. Control Físico

Rondón *et al.* (2006), determinaron la temperatura óptima y el tiempo de exposición para evitar el desarrollo de la antracnosis por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos almacenados, utilizando como material 140 frutos de mango de los cultivares ‘Haden’ (70 frutos) y ‘Tommy Atkins’ (70 frutos), recolectadas en finca al sur del Estado Aragua, Venezuela. En cada fruto se realizaron cinco heridas puntuales y aplicaron la aspersion del hongo con el fin de desarrollar la enfermedad. Los frutos fueron sometidos a 36 horas en cámara

húmeda y luego le aplicaron los respectivos tratamientos hidrotérmicos ($40 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$; $45 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$; $50 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 60 y 90 minutos). Evaluaron el diámetro de las manchas alrededor de las heridas, obteniéndose que el mejor tratamiento en el control de la enfermedad fue $50 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 90 y 60 minutos, seguido de $45 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 90 y 60 minutos, y con resultados poco efectivos a $40 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ por 60 y 90 minutos. La mayor inhibición del hongo la observaron a temperaturas superiores a 45°C .

8. CONTROL BIOLÓGICO.

El control biológico consiste en la reducción de la densidad de inóculo de un determinado patógeno o parásito en un estado activo o latente, por la acción de uno o más organismos, en forma natural o por la incorporación de una población de uno o más antagonistas (Arcia, 2002).

Uno de los problemas técnicos que influyen en la investigación con productos microbianos es la presencia simultánea del patógeno y del microorganismo en el campo. Por otra parte, existen aspectos o variables que influyen en la efectividad y eficiencia de un programa de control biológico de fitopatógenos como son: ubicación del patógeno, tipo de acción antagonista, medio de dispersión y mantenimiento del antagonista, temperatura y pH del suelo; tipo de inóculo usado, época de introducción del antagonista en el suelo en relación a la época de siembra; tasa de aplicación del antagonista, densidad de inóculo del patógeno, presencia de antagonistas naturales, tipo de acción del antagonista, medio de dispersión del antagonista, entre otros (Arcia, 1997).

El fundamento está basado en el equilibrio de las poblaciones, mediante procesos naturales, para mantener a las plagas y enfermedades a niveles de fácil control y siempre por debajo de umbral económico (Gómez y Ferrer, 2001).

Los antagonistas son aquellos agentes biológicos capaces de interferir en el proceso de la vida de los patógenos vegetales (hongos, bacterias, nematodos y otros). Son equivalentes a enemigos naturales que pueden disminuir o impedir la

germinación de los propágulos de los patógenos y causar la degradación de los micelios, inhibir el crecimiento y desarrollo de la biomasa del patógeno, por la producción de antibióticos o por el entrelazamiento de las hifas, competir por alimento (Hidratos de carbono y Nitrógeno), tanto como por espacio u oxígeno (Baker, 1968).

Entre los microorganismos más importantes como antagonistas se encuentran bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y entre los hongos los más representativos pertenecen a los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*, siendo este último el más utilizado en el control de un grupo importante de patógenos de suelo (Fernández-Larrea, 2006).

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar patógenos de plantas, los cuales se basan ampliamente en las categorías señaladas y pueden operar de manera conjunta o independiente. Estos mecanismos son: antibiosis, competencia, hiperparasitismo e inducción de resistencia (Fernández-Larrea, 2002).

Antibiosis: es la producción de antibióticos o metabolitos tóxicos, o de origen microbiológico por parte de un microorganismo, que comprende a los agentes de la lisis, las enzimas y los compuestos volátiles o no (Sing y Faull, 2000).

Competencia: es el efecto dañino de un organismo sobre otro, por la utilización o requerimiento de un mismo recurso de la naturaleza como nutrientes, agua oxígeno, espacio, entre otros, lo que origina una reducción de la cantidad disponible para los demás, ya que si hay exceso no habrá competencia (Fernández-Larrea, 2002).

Hiperparasitismo: es una simbiosis entre ambos organismos, la cual cubre una multitud de interacciones directa entre ellos. Es una forma de control de los patógenos en sus estados saprófitos y parasíticos, donde estos son utilizados por los antagonistas como alimento (Jarvis, 1998).

La inducción de resistencia: se refiere a la inducción de sistema o defensa de la planta puede ser activada por varios microorganismos, para proteger a la planta de patógenos (Elad, 2000). Este mecanismo de acción influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo, debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas (Fernández-Larrea, 2001).

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de esto es una característica importante, ya que con ellos y/o con el uso de combinaciones de antagonistas con diferentes modos de acción, se reduce el riesgo de desarrollo de resistencia en el patógeno (Fernández- Larrea, 2002).

El uso de microorganismos antagonistas para controlar las enfermedades postcosecha se plantea mediante dos enfoques importantes, que consiste en la estimulación y el manejo de los antagonistas presentes sobre la superficie del fruto, y en la introducción artificial contra los patógenos. Este último, se favorece bajo las condiciones de almacenamiento controlado de los productos (Wisniewski y Wilson, 1992). Entre los productos en la fase postcosecha en los que se ha realizado investigaciones en control biológico con organismo antagonistas están el aguacate, cítricos, fresa, mango, manzana, pera y papa. (Korsten *et al.*, 1995 y Fernández y Arauz, 1992).

9. BACTERIAS UTILIZADAS COMO BIOCONTROLADORAS

Entre los microorganismos del suelo las especies del género *Bacillus* sintetizan como metabolitos especiales un numeroso grupo de antibióticos peptídicos que han sido caracterizados por métodos bioquímicos y de Biología molecular (Fernández- Larrea, 2006). Las bacterias del grupo de *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Estas bacterias se han evaluado para el control de enfermedades fungosas, determinándose que la aplicaciones de *Bacillus subtilis* en campo y postcosecha en aguacate (*Persea americana*) tienen efectos similares al de los fungicidas comerciales (Korsten *et al.*, 1997).

La mayoría de las especies de *Bacillus*, son saprófitos y se desarrollan en materia orgánica en descomposición. *Bacillus subtilis* específicamente habita en la rizósfera, asociados a las raíces de las plantas, además se ha demostrado que entra en conducta caníbal, en casos extremos de sobrevivencia (Raupach y Kloepper, 2000). Del mismo modo, Rytter *et al.*, (1989) llevaron a cabo pruebas de antagonismo para la evaluación de 20 cepas de *Bacillus subtilis* con el fin de lograr el control biológico de *Puccinia pelargonii zonalis*; de las cepas trabajadas, solo tres presentaron efecto inhibitorio.

Ordaz, *et al.* (2007), aislaron una cepa de *Bacillus pumilus* para usarla como control microbiano de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Phytophthora capsici* en cultivo de papa y ají. Encontrando efectos antagónicos para las cuatro especies fitopatógenas en porcentajes que fluctuaron entre el 45 al 87% de inhibición *in vitro*.

Bravo (1993) realizó pruebas de antagonismo bacterial *in vitro*, con el fin de evaluar el comportamiento de *B. subtilis* frente a varios hongos fitopatógenos, incluyendo a *C. gloeosporioides* aislado de naranjo (*Citrus sinensis* L), encontrándose disminución en la germinación de conidias, e inhibición en el crecimiento micelial de *Colletotrichum*.

Bergey (2000) señala que *Bacillus subtilis* presenta células en forma de bastón recto de 0,5-2,5 x 1,2-7, 0 µm, dispuestas en pares o cadenas, con los extremos redondeados, móviles con flagelos peritricos. Son tipo Gram positivos, catalasa positiva, tiene la habilidad para formar endosporas de ovales a cilíndrica, permitiéndole tolerar condiciones ambientales extremas. Son organismos aeróbicos facultativos.

Así mismo, *Bacillus subtilis* se encuentran entre las bacterias que mayores antibióticos se le han aislado. Algunos de estos antibióticos son específicos a determinadas especies, y una especie puede producir varios de ellos. Se ha demostrado que cepas de *Bacillus subtilis* no solo producen antibióticos antibacteriales, sino también antibióticos antifúngicos y producción de sideróforos,

que son compuestos extracelulares de bajo peso molecular con una elevada afinidad por el ion hierro (Fernández- Larrea, 2006 y Angeloni, 2004).

Se determinó el efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Brada *et al.* 1995); también se realizaron pruebas *in vitro* con *Pseudomonas* sp. y *B. subtilis* aislados de plátano (*Musa* sp.) y arroz (*Oryza sativa* L.), respectivamente (Torres *et al.*, 2001) estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporum*, f. sp. *lycopersici*, *Pythium ultimum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo, debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas (Fernández-Larrea, 2001). Se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos Korsten *et al.* (1997) observaron vacuolización y deformación de las hifas de un compuesto volátil con propiedades fungicidas.

Dentro de los antagonistas bacterianos se pueden citar ejemplos de cepas pertenecientes a especies del género *Pseudomonas* y una cepa de *Pantoea agglomerans* (CPA-2) que está siendo actualmente estudiada por varios países de la Comunidad Europea como un efectivo agente biocontrolador de enfermedades postcosecha en cítricos y manzana, cuyo uso como agente de control biológico ha sido patentado en España en 1999 (Costa *et al.*, 2001).

Carrillo *et al* (2005) evaluaron la efectividad de *Bacillus subtilis*, *Rhodotorula minuta* y su combinación, en aplicaciones en campo, para el control en postcosecha de antracnosis en mango (cultivar 'Kent') y su efecto en la calidad en postcosecha de los frutos, comparando así el efecto de los biofungicidas con el desarrollo de la enfermedad en frutos tratados con un producto químico y un testigo. Después de 15 días de almacenamiento, los agentes de control biológico mostraron mayor efectividad en el control de antracnosis en comparación con el control químico. Con la mezcla de *R. minuta* y *B. subtilis* lograron la mayor reducción de la enfermedad. La aplicación de los tratamientos biológicos no afectó negativamente la calidad postcosecha de los frutos, observándose un desarrollo normal en los sólidos solubles totales, acidez titulable y evolución de la firmeza.

Delmoral (2009) evaluó la capacidad biocontroladora de la bacteria *Bacillus subtilis*, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* sobre la antracnosis en mango. De las evaluaciones *in vitro* resultó que las confrontaciones entre *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, obtuvo un porcentaje de inhibición de crecimiento de 69% y un porcentaje de inhibición de esporulación de 99,99%. Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos *in vivo*; sin embargo los resultados mostraron que la severidad de la enfermedad en el tratamiento (Frutos asperjados con *Bacillus subtilis*) el cual fue de 16% con respecto al tratamiento (Testigo con ADE) que fue de 40%. Lo anterior indica la posibilidad de utilizar este biocontrolador para reducir la severidad de *C. gloeosporioides* en mango.

Castilla (2008) evaluó la efectividad antagónica de aislamientos bacterianos contra el agente causal de la antracnosis en condiciones *in vitro*. Para ello aisló de mangos distintas bacterias de las cuales seleccionó 12 y las confrontó en condiciones *in vitro* contra el patógeno, a una concentración alrededor de 10^8 ufc/mL. Resultando que de las bacterias evaluadas solo tres presentaron actividad antagónica al *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, las cuales reportaron un %PIC de 45,23%, 45,23% y 41,34%, respectivamente y un PIE de 88,55%, 83,21% y

63,36%, respectivamente. Las bacterias que presentaron mayor capacidad antagónica fueron identificadas como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Streptomyces* sp.

10. *Trichoderma* spp COMO BIOCONTROLADOR

La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha permitido su uso en el control biológico. Sin embargo, las deficiencias en las tecnologías de formulación son una limitación para el avance en las investigaciones tecnológicas. *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. (Fernández-Larrea, 2001).

Es un tipo de hongo que se encuentra naturalmente en el suelo. Se caracteriza por no tener un estado sexual determinado. Se ubica en sitios que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, especialmente en aquellos que son atacados por hongos fitopatógenos, crece rápidamente en muchos sustratos y produce metabolitos con demostrada actividad antagónica. *Trichoderma* es un hongo que ataca, parásita y desplaza a otros hongos que producen enfermedades en las plantas. Además de ser biofungicida, es un estimulante del crecimiento de raíces, lo que induce en la planta mayor resistencia a los ataques de plagas y enfermedades. (Arias, 2004).

Este género comprende a 35 especies, *Trichoderma* se describió hace más de 200 años por Persson. Desde entonces y hasta la llegada de las técnicas moleculares, la taxonomía del género se basó en criterios morfológicos, que son herramientas subjetivas, imprecisas e ineficaces cuando se trata de diferenciar especies o clasificar nuevos aislamientos dentro de este género (Espósito y Da Silva, 1998; Harman, 2001; Papavizas, 1985).

Trichoderma es el anamórfico de *Hypocrea* que pertenece a la clase Ascomycetes y familia Hypocreaceae (Index Fungorum, 2010). Generalmente forman colonias

floculentas o compactas, de crecimiento rápido, 9 cm en cuatro días, con una superficie lisa que luego toman un color verde brillante debido a la gran cantidad de conidios que se forman en los extremos de las hifas, sin embargo, se ha señalado que también puede ser de color blanco o amarillo. El micelio está compuesto por hifas hialinas, septadas, muy ramificadas y de superficie lisa. Los conidióforos son hialinos, ramificados, septados. Las ramificaciones de los conidióforos por lo general terminan en grupos de tres o más fiálides. Las fiálides son ampuliformes, hialinas. Posee conidios hialinos a sub hialinos, globosos a subglobosos, lisos o rugosos, gutulados, con ápice truncado (Rifai, 1969; Bisett, 1991; Barnett y Hunter 1999; Samsom, *et al.*, 1995).

El hongo antagónico *Trichoderma* spp. es uno de los agentes biológicos más usados para el control de hongos fitopatógenos que causan enfermedades en cultivos de importancia económica. Son numerosas las investigaciones realizadas con el fin de probar la capacidad antagónica de *Trichoderma* sobre hongos patógenos del género *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotium*, *Plasmodiophora*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Botrytis*, entre otros, y sobre nematodos como *Meloidogyne* (Stefanova y Sandoval, 1995; Chacón, 2003 y Sandoval *et al.*, 1998).

Aunque especies de *Trichoderma* se han usado para el controlar enfermedades foliares (Rodríguez *et al.*, 1998), se emplean principalmente en el control de enfermedades fungosas del suelo, por lo que su aplicación al suelo es de forma preventiva en los semilleros y en diferentes etapas del cultivo, logrando reducir la aparición de estas enfermedades fúngicas en cultivos como tomate, tabaco, pimiento, entre otros. (Fernández-Larrea, 2002).

10.1. MECANISMO DE ACCION DE *Trichoderma*

Las conidias de *Trichoderma*, al entrar en contacto con el suelo y detectar la presencia de un hongo fitopatógeno, generan una hifa o hilo que crece paralelamente a la hifa del hongo dañino. Después de reconocerlo, se adhiere y lo penetra, enrollándolo hasta estrangularlo, consumiéndolo (parasitismo) y

compitiendo con él por espacio, energía y luz. La producción de antibióticos por parte del *Trichoderma* hace que el área donde se desarrolla este hongo este libre de otros hongos (antibiosis) (Arias, 2004).

Harman (2001) reporta varios mecanismos demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma* spp. actúa como biocontrolador y como colonizador de las raíces, como son: micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutriente y espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo del sistema radicular, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos, y resistencia inducida. De estos, los primeros cuatro mecanismos mencionados tienen acción en el hongo fitopatógeno, los otros son indirectos, ya que su acción es elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta.

Micoparasitismo. Es el ataque directo de un hongo a otro, es un proceso complejo que involucra eventos secuenciales, incluyendo reconocimiento, ataque, penetración y muerte. *Trichoderma* puede ejercer un biocontrol directo por parasitismo en un rango de hongos. El modelo de mecanismo de acción difiere de una especie a otra. Este proceso consiste en la formación de estructuras llamadas apresorios, que contienen una alta concentración de solutos osmóticos como glicerol y su función es penetrar en el hospedero. *Trichoderma* utiliza los carbohidratos de la pared celular de los patógenos, algunas enzimas que degradan la pared celular de los patógenos son: quitinasa, gluconasa, proteasa (Benítez *et al*, 2004), exoglucan-b-1,3 glucosidasas, endoglucan-b-1,6 glucosidasa, etc. (Lorito, 1998). Estas enzimas son inducidas por los diferentes polímeros componentes de la pared de distintas estructuras de los hongos fitopatógenos. Este proceso puede ser dividido en cuatro sucesos principales: **Crecimiento quimiotrófico:** donde exudados del patógeno atraen a *Trichoderma* spp. **Reconocimiento:** algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. son específicos a algunos fitopatógenos, y es en esta etapa donde el fenómeno de especificidad de ataque se define, siendo medida por leticinas. **Adhesion:** una vez que *Trichoderma* spp. ha reconocido al patógeno, lo envuelve y se adhiere a las hifas

cubriéndolo totalmente. **Degradación:** el paso final es la degradación de la pared celular.

Antibiosis: para *Trichoderma* este mecanismo está fuertemente ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo (Tronsmo y Gordon, 1998). Ocurre durante la interacción de compuestos de bajo peso molecular o producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. La mayoría de las especies de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles, que impiden la colonización de otros hongos. Entre estos metabolitos se encuentran; el ácido harzianico, alameticina, tricolin, antibióticos, peptaibols, 6-pentil- -pirona, entre otros (Benítez *et al.*, 2004).

Competencia: puede resultar en control biológico por aniquilación de la población perjudicial, y puede darse a favor de *Trichoderma* spp. debido a su alta frecuencia de crecimiento y desarrollo (Tronsmo y Gordon, 1998).

Trichoderma es capaz de vencer el efecto de otros hongos del suelo, como resultado de metabolitos producidos por otras especies incluidas las plantas y sobrevive bajo condiciones competitivas extremas. La inanición es la causa más común de muerte de los microorganismos, tanto así que la competencia por nutrientes limitados se traduce en un biocontrol entre hongos. *Trichoderma* tiene una capacidad superior de movilizar y extraer nutrientes del suelo comparado con otros microorganismos (Benítez *et al.*, 2004).

Resistencia Inducida: *Trichoderma* produce un mecanismo de resistencia similar a la respuesta de hipersensibilidad, resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida en plantas (Benítez *et al.*, 2004).

10.2. USO DE *Trichoderma* PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS.

Sarmiento (2009) evaluó el efecto de la aplicación de *Trichoderma* sp. sobre el control de la antracnosis (*Colletotrichum*) en mango tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, realizando estudio de evaluaciones *in vitro* mediante enfrentamiento de diferentes especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. crassum*) con *C. gloeosporioides*. La evaluación la realizó midiendo el número y el

diámetro de las manchas durante ocho días. De las evaluaciones *in vitro* resultó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, pero destacó *T. harzianum*, con un porcentaje de inhibición de crecimiento de (72,29%) y porcentaje de inhibición de esporulación de (99,5%), Concluye que la aplicación de *T. harzianum* controló la antracnosis en frutos de mango en forma similar en todos los tratamientos.

Hernández (1999) evaluó el efecto biocontrolador de *Trichoderma harzianum* sobre la pudrición apical del fruto de guayaba (PAG) causado por *Dothiorella* sp. Bajo condiciones *in vitro*, se enfrentaron los hongos en cultivos dual mediante discos de micelio de 5 mm de diámetro, colocados equidistante en cápsula de petri con PDA, incubados a 25°C y luz continúa. *In vivo* se evaluaron tres tiempos (24 h antes, 0 h y 24h después de la inoculación con el patógeno), y dos formas de aplicación de *Trichoderma* sobre la fruta (inmersión en solución de 3×10^6 conidios/mL; y discos de PDA de 5mm de diámetro con micelio); el patógeno se colocó en discos de PDA de 5mm. *In situ* se realizaron tres aplicaciones de Tricobiol y Carbendazin. Los resultados *in vitro* mostraron que *Trichoderma* controla eficientemente a *Dothiorella*, ya que logra ocupar mayor área al desintegrar la colonia del patógeno. *In vivo* efectivamente *Trichoderma* logra frenar el crecimiento del patógeno cuando se colocó 24 horas antes que el patógeno. *In situ* no se observaron diferencias significativas con respecto al control químico, pero si entre los controles y las plantas testigo las cuales registraron un 70 % de infección vs un 40% con el uso de *Trichoderma*.

11. USO DE *Trichoderma* y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS

Michel (2001) en México evaluó especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de Bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*, señalando la presencia de cepas nativas de especies de *Trichoderma* en suelos de 25 huertos de mango y encontró que las poblaciones de *Trichoderma* variaron significativamente entre suelos y Estados. Registró poblaciones en 22 de las 25 huertos estudiados, recuperándose 105

aislados; de ellos, seleccionó 25 cepas de *Trichoderma*, de las especies *T. harzianum*, *T. vires*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii* y *T. minutisporum* por su capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium*. Las especies de *Trichoderma* aisladas de suelos en huertos de mango, representaron un recurso disponible para su evaluación como agente de biocontrol contra malformaciones del mango.

Paredes *et al.* (2008) determinaron la actividad antagonista *in vitro* de aislamientos de microorganismos obtenidos de la rizósfera de platas de garbanzo contra el complejo de hongos causante de la marchitez: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. Las cepas nativas que mostraron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los patógenos fueron seleccionadas e identificadas como *Trichoderma lignorum* (CIAD 06-540903), *T. harzianum* (CIAD 05-550903), *Bacillus subtilis* (CIAD-940111) y *Pseudomonas fluorescens* (CIAD-990111), las cuales fueron evaluadas en campo. Las cuatro cepas y una cepa comercial de *T. harzianum* (T-22) fueron combinadas con *Glomus intraradices*, y su efectividad para controlar la rabia del garbanzo comparándolo contra un testigo químico (PCNB) y un testigo absoluto.

Chavarria *et al.* (2006), evaluaron la acción supresora de la cepas *Trichoderma viride* 2C-PR, *Bacillus subtilis* 002R y *Streptomyces griseus* 001, en el combate de *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas sp* y *Erwinia carotovora*, en plantas de jengibre, en comparación con fungicidas y bactericidas usadas por el agricultor. Las aplicaciones se realizaron cada 15 días durante un periodo de 9 meses y cada semana cuando se presentaba algún foco de infección. Evaluaron la sobrevivencia de los patógenos y los biocontroladores, para lo cual realizaron análisis microbiológicos a los 4 y 9 meses de edad de cultivo; evaluando además producción. En términos generales, observaron una tendencia a la disminución del inóculo de los patógenos en el tratamiento biológico, en comparación con el tratamiento químico en ambos muestreos, a excepción de *F. solani* en el primer muestreo. Determinaron que la presencia de la cepa de *Trichoderma viride* con poblaciones de $4,5 \times 10^8$ conidios/g, *Bacillus subtilis* con $6,1 \times 10^{10}$ UFC/mL y *Streptomyces griseus* fue la cepa que menos persistió en el campo, con una

población 2×10^1 /mL. El tratamiento con los biocontroladores presentaron una producción significativamente mayor (82000 Kg/ha) que el tratamiento químico (48000 Kg/ha). Los resultados demuestran que los biocontroladores son una alternativa de control contra los patógenos *F. solani*, *R. solani*, *Pseudomonas* sp, *E. carotovora*.

Pineda (2001) estudió la efectividad de tres métodos de aplicación de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol de *Macrophomina phaseolina*, patógeno causante de la pudrición ceniza en ajonjolí (*Sesamun indicum* L.). Se utilizaron gránulos de suelo arcilloso impregnados con conidios de *T. harzianum* y sacarosa al 5%, granos de arroz inoculados con *T. harzianum* y también semilla de ajonjolí cubiertas con conidios del antagonista. La prueba de campo se realizó en la Colonia Agrícola Turén, estado Portuguesa, en un suelo con nivel medio de inóculo de *M. phaseolina*. Se encontró diferencias significativas ($p=0,01$) en el porcentaje de plantas muertas entre los tratamientos con respecto al control. La aplicación de gránulos de suelo al momento de la siembra redujo la mortalidad de planta en un 69,6%, mientras que cuando se utilizó semilla cubierta con *T. harzianum* la reducción fue de 53,3 %. En cuanto al tratamiento con granos de arroz la reducción fue de 26,1% pero el porcentaje de plantas muertas fue similar al testigo. La aplicación al momento de la siembra de gránulos de arcilla o semilla tratados con *T. harzianum* provee una considerable reducción de la enfermedad causada por *M. phaseolina* en ajonjolí.

Guillén *et al.* (2006) realizaron un estudio con fines de conocer el potencial de biocontrol en campo de cuatro aislados de *Bacillus* y la mezcla de estos (B1, B3, B9 y B13) sobre los patógenos causantes de pudriciones de raíz, así como su efecto en el desarrollo y rendimiento de cultivo de ají. La aplicación de las bacterias incrementó la altura de la planta en 20% y el rendimiento al final del cultivo en 270%. Del mismo modo, se redujo la incidencia en 80% y severidad de pudrición de raíz en 39% respecto al testigo. La identificación bacteriana la realizaron por pruebas bioquímicas, placas Biolog, y por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores oligonucleótidos específicos para el gen

ribosomal 16S. El aislado de *Bacillus* B1 lo identificaron como *Bacillus amyloliquefaciens*, B3 como *B. licheniformis* y B9 y B13 como *B. subtilis*. En un árbol filogenético, estos *Bacillus* fueron agrupados por separado con otros aislados de *Bacillus*.

González (2006) evaluó la eficacia biocontroladora de mezcla de aislados nativos de *Trichoderma harzianum* y *T. virens* (a una concentración de 10^9 con/mL), una suspensión de esporas de un aislado nativo de *Bacillus subtilis* a una concentración de 10^6 UFC/mL, y del biofungicida Serenade® WP a una dosis de 200 mL/40 L, en una aplicación (inmersión) en postcosecha antes del ingreso al almacenaje refrigerado de manzana de cultivar 'Pink Lady'. Los resultados mostraron que la incidencia en el testigo alcanzó un 35,6% de frutos infectados, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre este y los tratamientos con biocontroladores. Además a ningún nivel de severidad, los biocontroladores fueron distintos a los del testigo.

Rojas y Sandoval (2009), con el propósito de determinar si es posible la utilización de controladores biológicos como *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. en el control *Phytophthora infestans* y otros patógenos del follaje en tomate realizaron una investigación donde evaluaron la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* cepa Queule, en mezcla con *Trichoderma virens* cepa Trailes y *Bacillus subtilis* cepa Antumavida, tanto en forma separada como conjunta. Los autores concluyeron que dos de los cuatro tratamientos (*B. subtilis* y *B. subtilis* + *Trichoderma* spp.) presentaron diferencias significativas en la reducción de estas enfermedades.

En investigación realizadas en Chile, para evaluar la capacidad biocontroladora de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* (Queule) y del producto comercial Serenade cuyo ingrediente activo es *Bacillus subtilis* sobre *Botrytis cinerea*, Lisboa (2003), llevó a cabo un ensayo donde encontró que la incidencia de la enfermedad con la mezcla de estos microorganismos fue significativamente menor ($P=0,0002$) con respecto a la de los testigos, donde esta alcanzó un 35% con diferentes grados de severidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

La investigación se llevó a cabo en la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Cátedra de Fitopatología, Departamento e Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía UCV, Maracay, estado Aragua.

2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de hojas tiernas y frutos con síntomas de antracnosis fueron recolectadas de una plantación en El Limón Municipio Mario Briceño Iragorry, luego llevadas a la clínica para ser procesadas.

3. AISLAMIENTO *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Se seleccionaron frutos y hojas tiernas de mango con síntomas de la enfermedad y se procedió a lavarlos con agua corriente y luego se seleccionó trozos de tejidos de las márgenes de la lesión, se desinfectó sumergiéndolos durante 1 minuto en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, luego se lavó con agua destilada estéril y se secó con papel absorbente estéril. Del margen de las lesiones, se cortaron trocitos de 1mm. Posteriormente, se colocaron en forma equidistante en placas Petri con medio cultivo Papa Dextrosa Agar Acidificado (PDAA) y se incubó a temperatura de 28° a 30°C, hasta el desarrollo de la colonia. Una vez obtenida la colonia del hongo, se procedió a replicar el hongo para sembrarlo en tubos de ensayo con PDA en forma de cuña y luego se conservó en el refrigerador a baja temperatura (8°C).

4. PROCEDENCIA DE LA ESPECIE DE *Trichoderma harzianum*

Para la identificación de *Trichoderma* se usó el aislamiento 06146 procedente de Finca Dolores, estado Aragua, aislado en la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, e identificada como la especie *Trichoderma harzianum* Rifai. (Alcano, 2008)

5. PROCEDENCIA DE *Bacillus subtilis*

Se usó un aislamiento de *Bacillus subtilis*, proveniente de Calabozo estado Guárico, proporcionada por el tesista Luis Guillen a la clínica de enfermedades de plantas. Del mismo modo se realizaron algunas pruebas de caracterización para así corroborar la especie, según Schaad *et al.* (2001). Estas se describen a continuación:

5.1. Pruebas morfológicas: Se realizó un estriado por agotamiento del aislamiento sobre medio de cultivo Agar nutritivo (AN), para obtener colonias y se observó bajo la lupa estereoscópica, color, forma, superficie, borde y relieve de la colonia. (Rudolph *et al*, 1990)

5.2. Pruebas Fisiológicas y Bioquímicas: Las pruebas bioquímicas y fisiológicas, de acuerdo al manual de Schaad (2001) fueron las siguientes:

- Tinción de rojo congo; para determinar forma de la célula bacteriana.
- KOH al 3%, para determinar si era bacteria Gram (+) o Gram (-).
- Determinación de requerimiento de oxígeno, a través de la prueba de tioglicolato que permite diferenciar si las bacterias son de crecimiento aeróbico o anaeróbico facultativo.
- Prueba de Oxidasa para determinar la presencia de la enzima oxidasa debido a un sistema de citocromo de la cadena respiratoria que poseen ciertas bacterias.
- Prueba de Catalasa, para determinar si la bacteria presenta la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrogeno.
- Crecimiento en AN a 45 °C y 65 °C a ph 5.7.

-Tolerancia al NaCl al 3; 5 y 7% para determinar si hay crecimiento de la bacteria a esa concentración de sales.

-Hidrólisis del almidón, permite determinar la presencia de enzimas extracelulares que degradan el almidón. (Chun y Jones, 2001)

-Tinción de endosporas.

El procedimiento consistió en lo siguiente según el manual de Schaad *et al.*, 2001. Se emplearon cultivos bacterianos de 48 horas de crecimiento, luego se realizaron frotis de la bacteria sobre portabojetos a estos se le agregó una gota del colorante verde malaquita al 5% durante 10min y con la ayuda de una pinza de madera se fue flameando encima de la llama del mechero, transcurrido el tiempo se lavó con abundante agua el exceso de colorante para luego teñir con safranina al 0,5% durante 15 s, seguidamente se lavó con abundante agua para así eliminar el exceso de colorante, luego se dejó secar la preparación y posteriormente se realizaron observaciones de la disposición y la morfología de la endospora con la ayuda del microscopio (100X).

6. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DEL PATÓGENO Y DE LOS MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.

Estos inóculos fueron utilizados en las diferentes pruebas que se llevaron a cabo en los bioensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

6.1. Preparación del Inóculo de *C. gloeosporioides*.

Se tomó un cultivo puro de *C. gloeosporioides* de 8 días de crecimiento, se le agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE); para luego raspar la superficie de la colonia con la finalidad de desprender la mayor cantidad de conidios y obtener una suspensión de inóculo. Luego se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidios/mL utilizando la cámara de Neubauer.

6.2. Preparación del Inóculo de *Trichoderma harzianum*.

Para la obtención de la concentración del inóculo del antagonista, se utilizó cultivos puros de *Trichoderma harzianum* de 6 días de crecimiento, se le agregó 10 mL de (ADE), se hizo un raspado de la colonia para que los conidios quedaran en la suspensión y se ajustó la concentración a 1×10^6 conidios/mL utilizando la cámara de Neubauer.

6.3. Preparación del Inóculo de *Bacillus subtilis*.

Se realizó una suspensión bacteriana con cultivos puros de *Bacillus subtilis* de 48 horas de crecimiento, se tomó con un ansa de siembra una porción de la colonia y se introdujo en un tubo de ensayo previamente identificado con 10 mL de ADE, ésta se ajustó a una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml) utilizando la escala de Mc Farland (Klement *et al.*, 1990).

7. EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD.

Para llevar a cabo esta prueba, se utilizaron 12 frutos sanos del cultivar 'Haden'. Los frutos fueron lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% durante 1 minuto, se lavaron con agua destilada estéril (ADE) para eliminar el exceso de desinfectante, se dejaron secar y posteriormente se inocularon con una suspensión del hongo *C. gloeosporioides* a una concentración de 1×10^6 conidios/mL agregándole dos gotas de Tween 80, ajustada con la ayuda de la cámara de Neubauer. Esta suspensión fue aplicada por aspersion sobre cuatro frutos sanos con heridas mecánicas previamente realizadas con una aguja de disección estéril y sobre cuatro frutos sanos sin herida mecánica, también por aspersion. Como testigo, se utilizaron cuatro frutos de los cuales a dos le fueron causada herida y a dos no; los cuatro fueron asperjados con ADE. Todos los frutos fueron colocados en cámara húmeda a temperatura de 28-30°C, hasta la aparición de los síntomas de la enfermedad.

8. EVALUACIÓN *in vitro* DE *Trichoderma harzianum* Y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

8.1 Prueba de enfrentamiento

***Trichoderma harzianum*.** Para la realización de esta prueba, se colocó un disco de PDA con colonia de *T. harzianum* de aproximadamente 5 mm de diámetro en un extremo de una placa Petri, con medio Agar Papa Dextrosa (PDA), y en el otro extremo opuesto se colocó un disco de micelio de *C. gloeosporioides* del mismo diámetro.

***Bacillus subtilis*.** Se tomaron discos de aproximadamente 5 mm de *C. gloeosporioides* y se colocaron en el centro de cada una de las diez placas con medio (PDA). Alrededor del patógeno se ubicaron, con una pinza esterilizada, equidistantes entre sí, dos discos de papel filtro previamente impregnados con 20 µL de la suspensión bacteriana.

El tratamiento testigo consistió en colocar un disco del patógeno *C. gloeosporioides* en el centro de la placa Petri con PDA, rodeado por dos discos equidistantes impregnados con ADE. Todas las placas se colocaron en incubación durante 7 días a 28°-30°C

Mezcla de *T. harzianum* y *Bacillus subtilis*. Se llevó a cabo un enfrentamiento entre *C. gloeosporioides* y la mezcla de los dos microorganismos antagonistas en medio (PDA) de la siguiente manera: se tomaron discos de aproximadamente 5 mm de la colonia de *C. gloeosporioides* y se colocaron en el centro de cada una de las diez placas. A los lados y equidistantes del patógeno se colocaron dos discos de papel filtro, impregnados con la suspensión en mezcla de los antagonistas.

Se realizaron mediciones diarias del crecimiento radial desde el borde del disco hasta el borde del halo de inhibición, para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC). Al final se determinó el número de conidios/cc, para calcular el

porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Ambos porcentajes vienen dados por las siguientes fórmulas (Mente *et al.*, 1976).

Porcentaje de inhibición de crecimiento:

$$PIC = \frac{(\text{crec. del testigo} - \text{crec. del tratamiento})}{(\text{Crecimiento del testigo})} \times 100$$

Porcentaje de inhibición de esporulación:

$$PIE = \frac{(\text{esporulación del testigo} - \text{esporulación del tratamiento})}{(\text{Esporulación del testigo})} \times 100$$

Para los tratamientos *in vitro*, el análisis estadístico se realizó usando el programa InfoStat versión 2004, vía paramétrica ya que se cumplieron los supuestos del análisis de la varianza; se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y 10 repeticiones. Los tratamientos se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los enfrentamientos *in vitro*

Tratamientos	Descripción de los Tratamientos
Testigo	<i>C. gloeosporioides</i> solo
T1	<i>C. gloeosporioides</i> X <i>Bacillus subtilis</i>
T2	<i>C. gloeosporioides</i> X <i>T. harzianum</i>
T3	<i>C. gloeosporioides</i> X Mezcla de <i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i>

8.2 Prueba de parasitismo

Para determinar el modo de acción de *T. harzianum* sobre el patógeno, se realizó un microcultivo, el cual consistió en esterilizar previamente todo el material a ser utilizado en una estufa durante dos horas a 250°C. Se colocaron dentro de cada placas Petri, tres discos de papel de filtro que fueron humedecidos con agua destilada estéril (ADE), tubo capilar, porta objeto sobre el cual se vació una capa delgada de Agar agua, en los extremos se colocaron los hongos *C. gloeosporioides* y *T. harzianum*, esto se cubrió con un cubre objeto, se sellaron las placas Petri con cinta de parafilm y se dejó incubar durante tres días. Se hicieron observaciones a partir de las 24 horas, removiendo el cubre objeto muy cuidadosamente del microcultivo se colocó sobre un porta objeto que contenía una gota de azul de algodón, y se llevó al microscopio de luz a fin de observar la interacción de ambos microorganismos.

Para determinar el modo de acción de *B. subtilis* sobre el patógeno, se tomaron 100 µL de la suspensión bacteriana y se colocó sobre los medio de cultivo (PDA), diseminándose por extensión de superficie con la ayuda de una varilla de vidrio estéril luego se colocó un disco de *C. gloeosporioides* de cinco mm de diámetro. Se hicieron observaciones al microscopio a partir de las 24 h para determinar el tipo de interacción. (Borrero y Silva, 2005; Baker, 1968).

8.3. Evaluación de la acción de Metabolitos Volátiles

Para esta evaluación se preparó dos bases de placas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA), luego se sembró en la base superior un disco de micelio de *C. gloeosporioides* y en la otra base inferior se sembró un disco de *T. harzianum*; se ubicaron las bases una frente a la otra y se sellaron con papel Parafilm (Figura 1). El testigo consistió en poner un disco del patógeno el fondo de la placa con el mismo medio. Se incubaron a temperatura de 28-30°C durante 6 días. Se hicieron observaciones y mediciones diarias del crecimiento del patógeno para determinar

el PIC y al final se determinó el número de conidios/cc para calcular el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) (Inojosa, 2009).

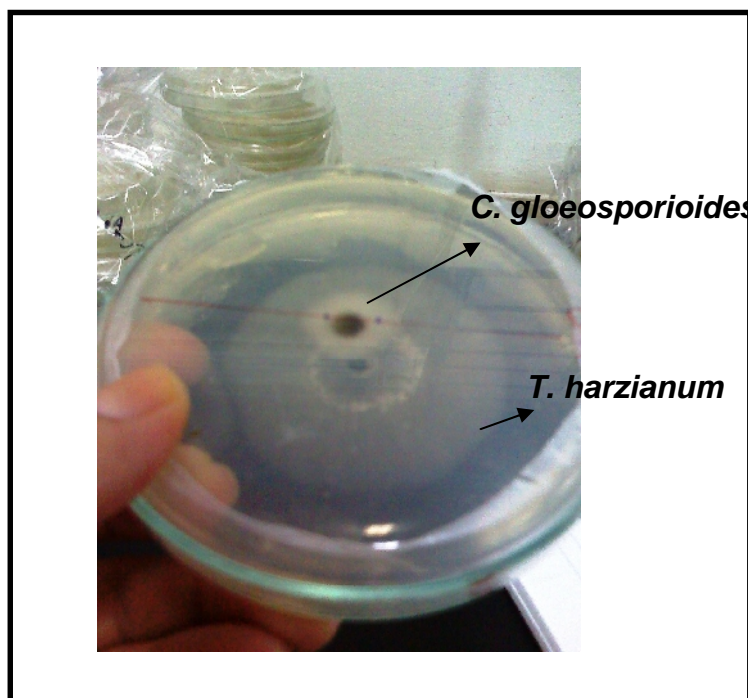


Figura 1. Evaluación de metabolitos volátiles de *T. harzianum* contra *C. gloeosporioides*.

9. EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA BACTERIA *Bacillus subtilis* Y DEL HONGO *Trichoderma harzianum* PARA EL CONTROL DE *C. gloeosporioides*.

9.1. Preparación de los tratamientos *in vivo*.

Para la inoculación se utilizó la secuencia ilustrada en la Figura 2. Se recolectaron frutos de mangos de la variedad 'Haden' provenientes de la Finca Las Parcelas, San Juan de los Morros, Estado Guárico. Estos frutos fueron lavados y desinfectados previamente con hipoclorito de sodio al 3%. Se lavaron con agua destilada esterilizada para eliminar el exceso de hipoclorito, posteriormente fueron pasados por un tratamiento hidrotérmico a temperatura de $46,4 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ durante un lapso de 5 min, se dejaron secar y posteriormente se inocularon por aspersion con los diferentes tratamientos.

En este ensayo se utilizaron diez frutos por tratamiento, para un total de 60 frutos, tomando a cada uno como una unidad experimental. Los tratamientos quedaron conformados como se señala a continuación: En T1 se inoculó solo con el patógeno *C. gloeosporioides* (Testigo), en T2 se asperjó solo con ADE (Testigo sin inocular), en el caso del T3, los frutos fueron asperjados con la suspensión de bacteria antagonista (*B. subtilis*) 24 horas antes de la inoculación con *C. gloeosporioides*. Para T4, se procedió a asperjar la solución contentiva del inóculo de *T. harzianum* 24 horas antes de la inoculación con *C. gloeosporioides*. En T5, los frutos fueron asperjados con la suspensión bacteriana antagonista (*B. subtilis*) y luego la suspensión del hongo antagonista (*T. harzianum*) 24 horas antes de la inoculación con *C. gloeosporioides* y por último T6, los frutos se asperjaron con Benomilo a razón de 0,5 g/L y luego se inocularon con *C. gloeosporioides*. Los tratamientos aplicados en los frutos quedaron estructurados como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos *in vivo*

Tratamientos	Descripción de los Tratamientos
T1	Aspersión con el patógeno (Testigo)
T2	Aspersión con ADE (Testigo)
T3	Aspersión con la bacteria antagonista (<i>B. subtilis</i>) 24h antes de la inoculación con <i>C. gloeosporioides</i>
T4	Aspersión con el hongo antagonista (<i>T. harzianum</i>) 24h antes de la inoculación con <i>C. gloeosporioides</i>
T5	Aspersión con la mezcla de la bacteria y el hongo antagonista 24h antes de la inoculación con <i>C. gloeosporioides</i>
T6	Aspersión con Benomilo a razón de 0.5 g/L 24h antes de la inoculación con <i>C. gloeosporioides</i>

Después que fueron aplicados los tratamientos, los frutos se incubaron en cajas plásticas separados por tratamiento y fueron llevados a condiciones de laboratorio temperatura de 27-28°C, con una HR de 80-90% durante 7 días, tiempo durante el cual se realizaron evaluaciones y mediciones diarias del diámetro de las manchas, para posteriormente realizar los respectivos análisis estadísticos. Se utilizó la fórmula del avance relativo de la mancha (Perdomo *et al.*, 2007).

La fórmula queda expresada de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l} \text{\% Avance} \\ \text{de la mancha} = \frac{LM}{LF} \times 100 \end{array}$$

LM= Largo de la mancha.

LF= Largo del Fruto.

Para los tratamientos *in vivo*, el análisis estadístico se realizó mediante el programa InfoStat versión 2004, vía paramétrica ya que cumplieron los supuestos del análisis de la varianza; se utilizó un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos y 10 repeticiones.



A



B



C



D



E



F



G

Figura 2. Secuencia de pasos para evaluación *in vivo* de la bacteria *B. subtilis* y del hongo *T. harzianum* para el control de la Antracnosis *C. gloeosporioides*: A) Finca Las Parcelas. B) Recolección de frutos sanos de la variedad 'Haden' C) Lavado de frutos. D) Desinfección con Hipoclorito al 3% y lavado con (ADE). E) Preparación de las suspensiones de *B. subtilis* y *T. harzianum* en las concentraciones requeridas. F) Inoculación por aspersión de las suspensiones. G) Conformación de los diferentes tratamientos bajo condición de laboratorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.-Descripción de síntomas

Los frutos seleccionados (Figura 3) presentaban manchas marrones oscuras redondeadas (0,5-3,5 cm), hundidas y presencia de signo tal como acérvulos con setas de color negro, síntomas típicos de la antracnosis en frutos causado por *Colletotrichum gloeosporioides* (Sutton, 1980; Rondón, 1995 y López, 2001).



Figura 3. Síntomas de la enfermedad en la superficie de frutos de mango

2. Aislamiento y caracterización del patógeno

De los aislamientos de frutos de mango en medio de cultivo PDA incubados a 30°C, se desarrollaron consistentemente colonias de aspecto algodonoso, de color blanco grisáceo en la parte superior (Figura 4 A) y gris plomo por el reverso de la placa con crecimiento moderadamente lento, que cubrió la placa Petri al octavo día de aislamiento, en el centro de la colonia se observaron pequeñas masa de acérvulos de color anaranjado. Las observaciones al microscopio mostraron que estas colonias presentaban un micelio hialino, conidios unicelulares, alargados y con ambos extremos redondeados (Figura 4 B), midiendo de 10-13,7 x 3-4,2µm. Los apresorios son clavados con formas irregulares de color marrón, con medidas 5-17,3 x 3,8-12µm. Todas las características antes mencionadas coinciden con lo señalado por Sutton (1980) y nos permiten identificar al patógeno como *Colletotrichum gloeosporioides*.

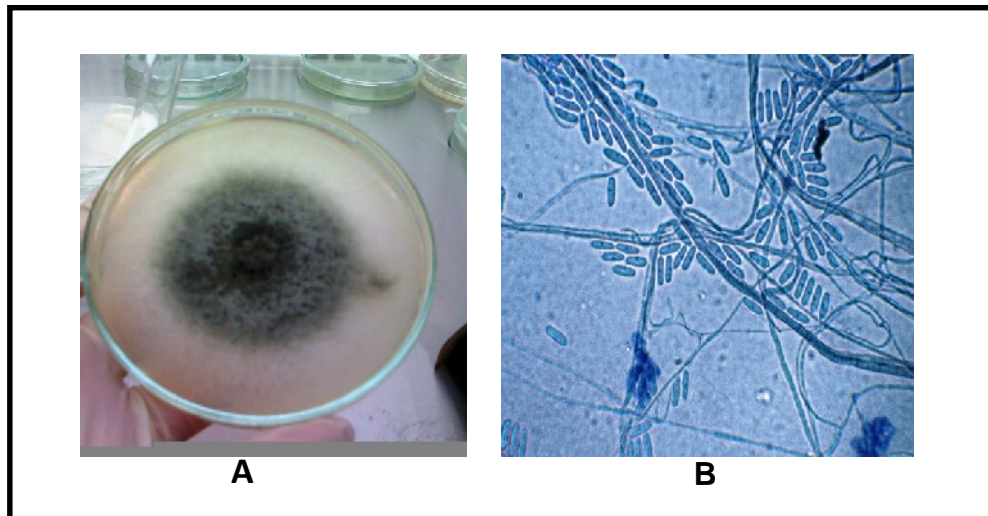


Figura 4. Característica morfológica de *C. gloeosporioides* A) Colonia de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa; B) Conidios y micelio.

3. Evaluación del crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Trichoderma harzianum*.

El crecimiento lineal *in vitro* de *C. gloeosporioides* (testigo) y *T. harzianum* se muestra en el cuadro 3. La velocidad promedio de crecimiento para *C. gloeosporioides* fue de 0,97 cm/día, lo cual coincide con lo descrito por Delmoral (2009), quien obtuvo valores de crecimiento *in vitro* entre 0.5 – 1cm/día, logrando cubrir la totalidad de la placa Petri en el noveno día.

El crecimiento de *T. harzianum* fue mucho mayor que el de *C. gloeosporioides* (2,9 cm/día) para las primeras 72 horas (Figura 5). Además este antagonista invadió por completo la placa Petri al cuarto día, mientras que el patógeno tardó nueve días.

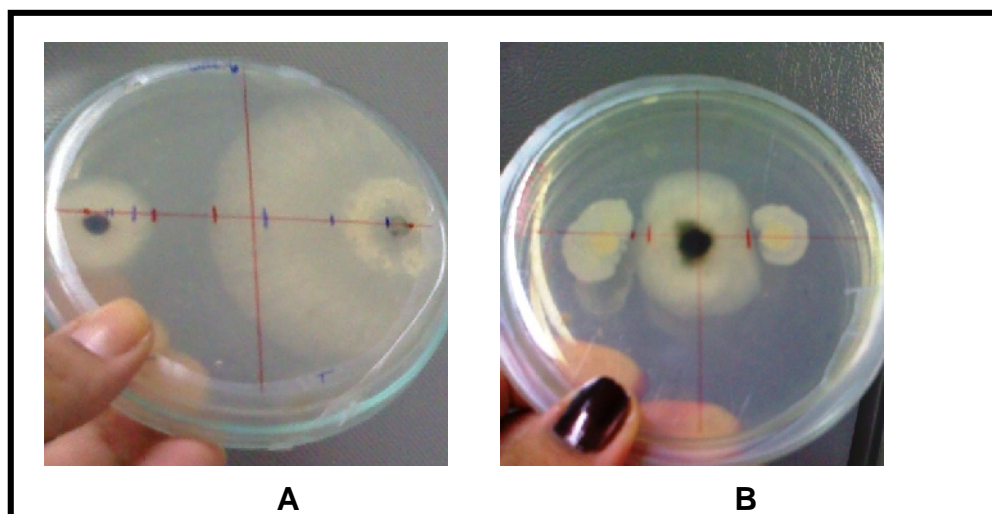


Figura 5. Crecimiento de *C. gloeosporioides* enfrentado a los antagonistas en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA). **A)** *C. gloeosporioides* (derecha) vs *T. harzianum* (izquierda); **B)** *C. gloeosporioides* (centro) vs *B. subtilis* (de los lados de *C. gloeosporioides*).

Cuadro 3. Crecimiento lineal *in vitro* de *C. gloeosporioides* en placa Petri en (PDA)

Tiempo de evaluación (días)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Crecimiento de las colonias (cm)								
Crecimiento (cm) <i>C. gloeosporioides</i>	0,7	2,3	3,5	4,9	6,2	7,5	8,7	8,8	9,2
Crecimiento (cm) <i>T. harzianum</i>	2,6	5,6	8,7	9,2	-	-	-	-	-

4. Caracterización del aislamiento de *Trichoderma harzianum*

Este aislamiento en el medio PDA presentó crecimiento rápido. A las 72 horas se observaron colonias algodonosas de color blanco con el centro verde oscuro con formación de anillos concéntricos (Figura 6A), hifas hialinas septadas, conidióforos intrincados de 30 µm de largo y 2-3 µm de ancho (Figura6B), verticilos formados por cinco fiálides, de forma ampuliforme a langeliforme, de medidas (9,6 x 3,15) µm y 2,5 µm en la base, no se observaron fiálides intercalares, los conidios son de pared lisa, de color verde oliva con forma globosa a subglobosa (3,2 x 3,1) µm (Figura6B), presenta clamidosporas apicales e intercalares, globosas a

subglobosas, midiendo (10,0 x 9,40) μm . Las características corresponden a la descripción dada por Rifai (1969) y Bissett (1991), para la especie *Trichoderma harzianum*.

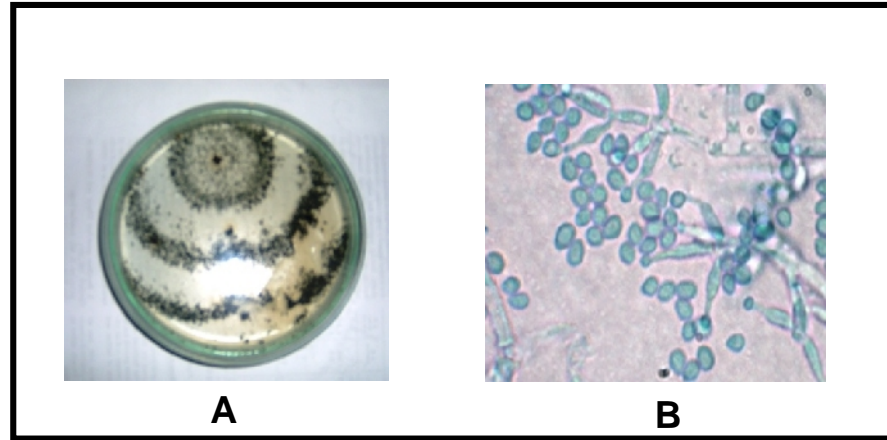


Figura 6. Principales características macro y microscópicas de la especie *T. harzianum*: A) Colonia del hongo con formación de anillos concéntricos. B) Conidióforo con ramificación intrincada y conidios globosos a subglobosos

5. Caracterización del aislamiento de *Bacillus subtilis*

De acuerdo a las pruebas realizadas (Cuadro 4) se encontraron las siguientes características: Colonia de color crema tendiendo a amarillo opaco (Figura 7), de aspecto rugoso y bordes ondulados; se determinó que es una bacteria Gram positiva, presentó forma de bastón observadas con la tinción rojo congo (Figura 8A y B), presenta endosporas en la parte central (Figura 8C), aerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, crecimiento a 45 y 65 ° C positivo (Figura 10), motilidad positiva, hidrólisis del almidón positiva (Figura 9B). Todas estas características señaladas en esta investigación coinciden con la especie *Bacillus subtilis* (Schaad *et al.*, 2001).

En investigaciones llevadas por Fernández y Vega (2001), se señala que la bacteria del género *Bacillus* es considerada una de las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Se encuentran en los suelos y en los

vegetales en putrefacción, interviniendo activamente en la descomposición de la materia orgánica (Buchanan y Gibbons, 1974).

Algunas especies de este género tales como *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniforme* y *B. cereus* actúan como antagonistas frente a muchos microorganismos fitopatógenos (Agrios, 1995).

Por mucho tiempo se consideró a *B. subtilis* como un microorganismo aerobio estricto, a pesar de que se conocía que podía reducir los nitratos (Slepecky y Hemphill, 1992), y que puede crecer en condiciones de limitación de oxígeno formando productos de fermentación (Moes *et al.*, 1985). Estos últimos autores encontraron que a concentraciones limitantes de oxígeno disuelto ligeramente superiores a $3.13\mu\text{m}$ (0.1 ppm; aproximadamente dos ordenes de magnitud por debajo del valor de saturación a 1 atmósfera y 37°C) *B. subtilis* excreta acetoina y por abajo de ese valor butanediol. Sin embargo, no fue sino hasta hace apenas una década que se comenzaron a hacer estudios con *B. subtilis*, principalmente enfocados a aspectos genéticos y moleculares en condiciones anaerobias (Cruz-Ramos *et al.*, 1995; Hoffman *et al.*, 1995).

Además, *B. subtilis* contiene catalasa KatA y MrgA, una enzima responsable de la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, y superóxido dismutasa, una enzima que cataliza la ruptura del superóxido y el peróxido de hidrógeno (Blencke *et al.*, 2003). Las enzimas extracelulares le sirven a *B. subtilis* para degradar y utilizar otros sustratos que puedan existir en su hábitat. Las proteasas forman parte de estas enzimas, siendo las más predominantes proteasa alcalina denominada subtilisina (AprE) y la proteasa neutra (NprE).

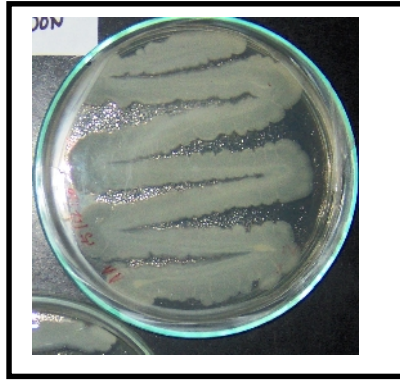


Figura 7. Colonia de la bacteria *B. subtilis*

Cuadro 4. Características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas aplicadas a la bacteria

Prueba	Reacción	
Morfología de la colonia	Aspecto rugoso y bordes ondulados	
Color de la colonia	Crema tendiendo a amarillo opaco	
Forma- Tinción Rojo Congo	Bastones	
Tinción de endosporas	+	
Tamaño	2-4 μm de diámetro	
Catalasa	+	
Oxidasa	Negativo	
Tolerancia a sales	3%	Igual que el testigo
	5%	Afectó el crecimiento
	7%	Poco crecimiento
Requerimiento de oxígeno	Aerobio facultativo	
Temperatura crecimiento óptimo	45° C	+
	65° C	+
Hidrólisis del almidón	+	
Reacción de Gram (KOH al 3%)	Gram (+)	

Todas las pruebas fueron realizadas con colonias de 24-48 horas de crecimiento

(+) Reacción positiva. (-) Reacción negativa.

La observación microscópica evidenció abundantes células vegetativas en forma de bastón a las 24 h (Figura 8AB), presencia de endosporas a las 48 h con esporas elipsoidales, y en posición central a las 72 h (Figura 8C).

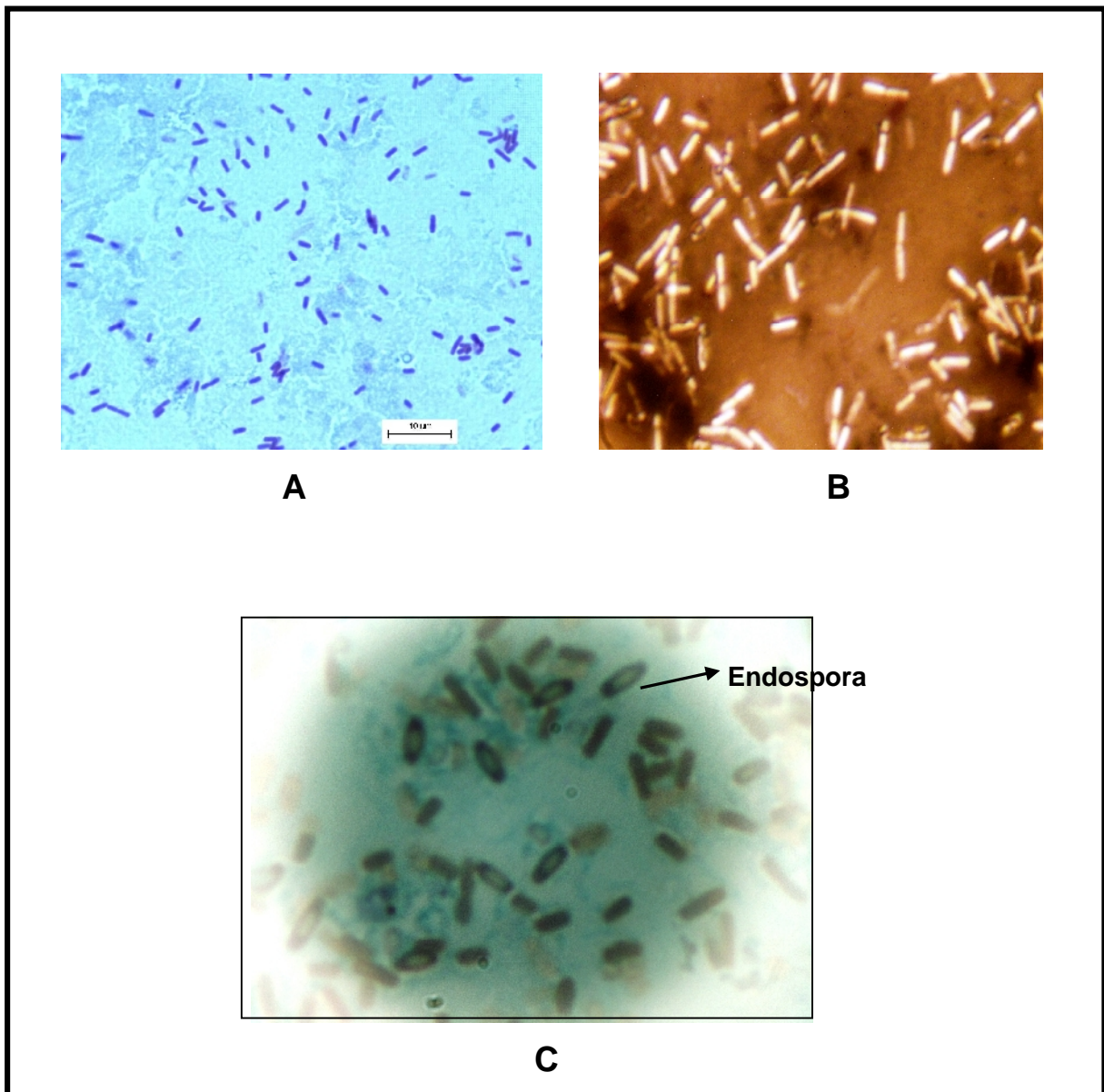


Figura 8. Células bacterianas observadas con tinción rojo congo y tinción de endosporas. A) y B) Bastones de *B. subtilis*. C) Endosporas de *B. subtilis*.

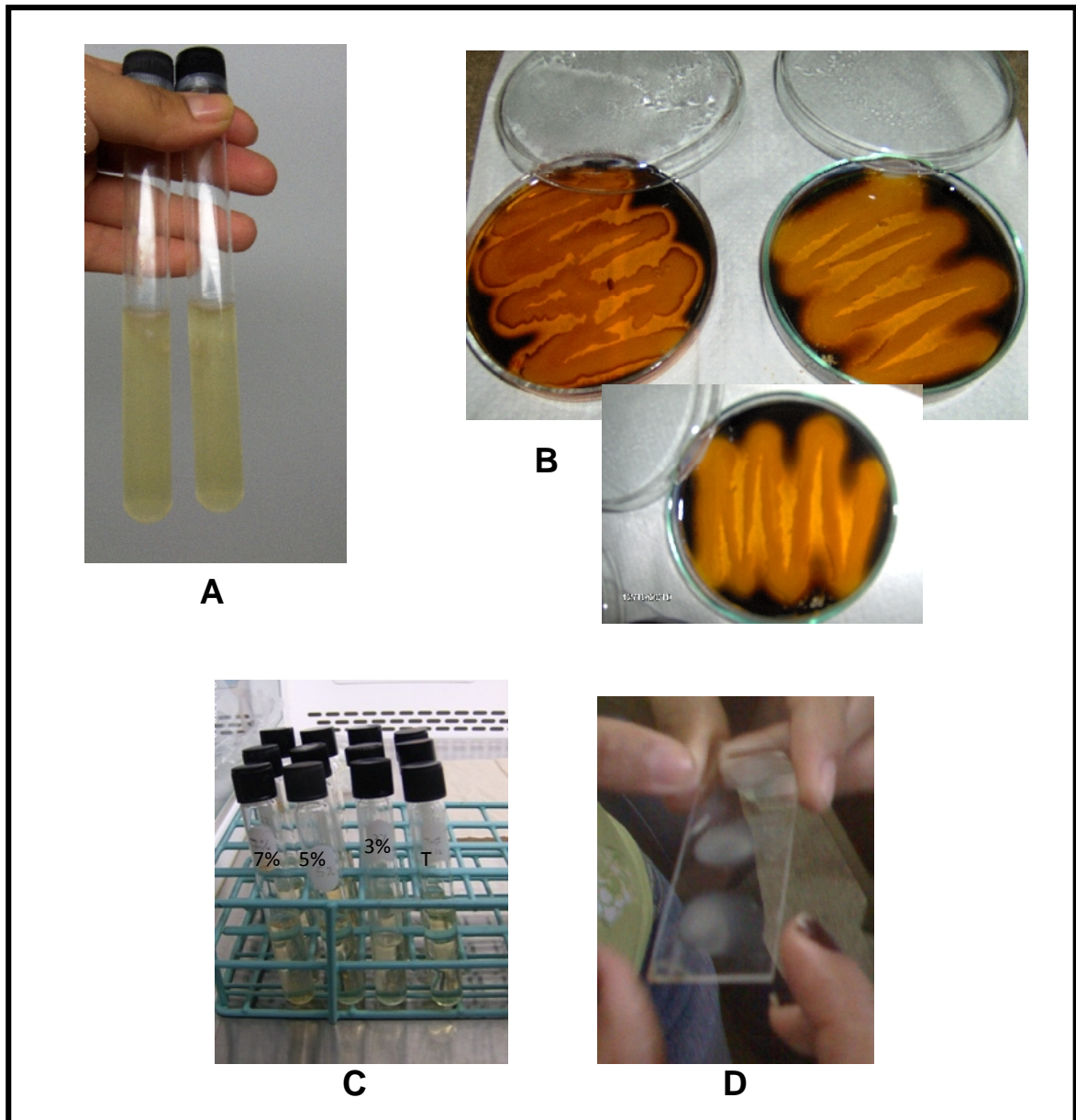


Figura 9. A) Prueba de Tioglicolato para determinar tipo de respiración de *B. subtilis*, crecimiento superficie del caldo, aeróbico. B) Hidrólisis del almidón positivo. C) Prueba tolerancia a sales al 3%, 5% y 7%. D) Prueba de KOH 3%(Gram+) no hubo formación de hilo.

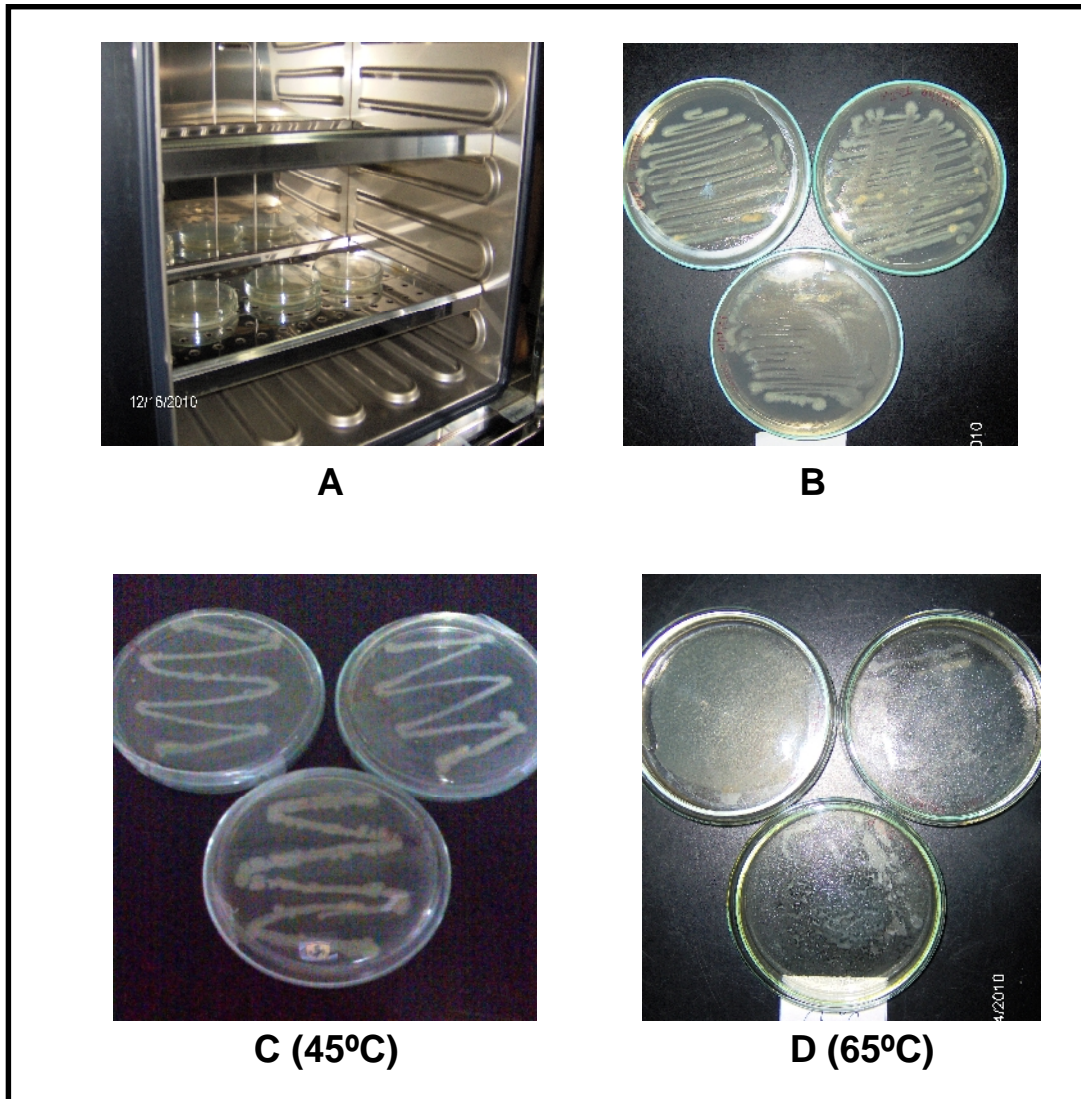


Figura 10. Prueba a diferentes temperaturas. **A)** Estufa por 48 horas ajustada. **B)** Crecimiento de *B. subtilis* (Testigo). **C)** Crecimiento de *B. subtilis* a 45°C. **D)** Crecimiento de *B. subtilis* a 65°C.

6. Pruebas de patogenicidad

Los frutos con heridas inoculados con una concentración de 1×10^6 conidios/mL (Figura 11A) presentaron los primeros síntomas, 48 h después de la inoculación, mostrando manchas pequeñas redondeadas de color castaño. Estas evolucionaron rápidamente tornándose de color castaño oscuro a negro hundido, cuyo tamaño osciló entre 1,6 y 4,5 cm durante los 6 días de evaluación. En los frutos sin heridas (Figura 11B), las lesiones se observaron a las 72 horas, siendo menos notorias y de evolución más lenta. Los testigos (Figura 11C) permanecieron sanos durante la prueba. Del reaislamiento en medio PDA, se desarrolló una colonia del patógeno que presentó las mismas características de crecimiento y morfología del organismo aislado originalmente de los frutos enfermos; por lo antes descrito, se considera que la prueba de patogenicidad resultó positiva, corroborando que el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es el causante de la antracnosis en frutos de mango de la variedad 'Haden', y se confirmó la virulencia del patógeno. (Sutton, 1980).

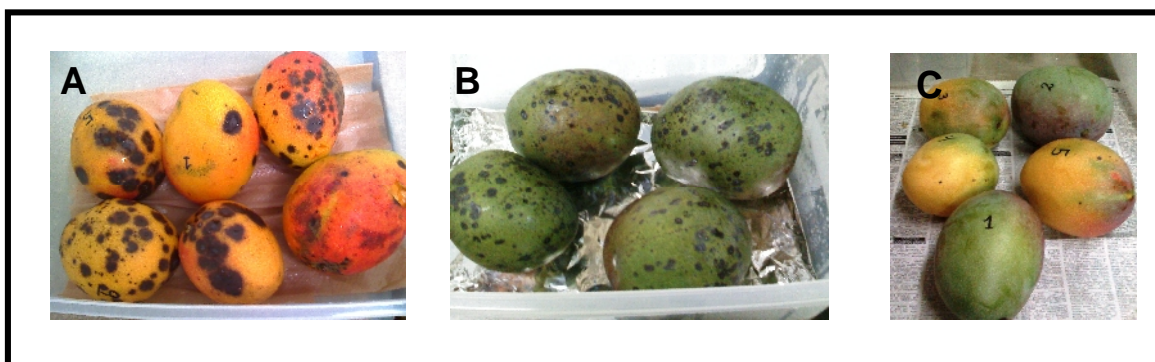


Figura 11. Síntomas de la enfermedad. A) Con herida. B) Sin herida C) Testigo.

7. EVALUACIÓN *in vitro* DE *Trichoderma harzianum* Y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides*.

7.1 Prueba de enfrentamiento *in vitro*

Cabe señalar que todos los tratamientos mostraron un comportamiento diferente durante la evaluación. El resultado de los enfrentamientos permitió observar el comportamiento de la bacteria *B. subtilis* y el hongo *T. harzianum* y el efecto antagónico contra *C. gloeosporioides*.

Durante las primeras 24 horas de la evaluación de los enfrentamientos entre *C. gloeosporioides* y los diferentes antagonistas, se observó directamente en la placa Petri inhibición del crecimiento del patógeno en todos los casos. Cabe destacar que al realizar el análisis estadístico vía paramétrica con los valores obtenidos de los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC), se determinó diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$) (Anexo1); esto también se puede apreciar al observar los promedios del PIC en el Cuadro 5.

Con respecto al coeficiente de variación fue de 25,9%, lo que significa que las condiciones fueron homogéneas y no se presentó alguna variabilidad notoria.

La prueba de medias estableció que el mejor tratamiento fue el de *C. gloeosporioides* Vs la mezcla de *T. harzianum* y *B. subtilis* ubicándose en el grupo B. Seguido del tratamiento con *C. gloeosporioides* Vs *T. harzianum*, ubicado en el grupo AB y por último el tratamiento *C. gloeosporioides* Vs *B. subtilis* ubicado en el grupo A.

Cuadro 5. Promedio del porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) para el día 1 de evaluación.

Tratamiento	PIC promedio
<i>C. gloeosporioides</i> Vs (<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>)	78,85 B
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>T. harzianum</i>	65,25 AB
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	52,64 A

Estadístico-Prueba Tukey

Al cuarto día de evaluación (Cuadro 6) se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (Anexo2) y con la prueba de media se determinó que el mejor tratamiento fue *C. gloeosporioides* Vs la mezcla de *T. harzianum* y *B. subtilis* ubicado en el grupo C, seguido del tratamiento *C. gloeosporioides* Vs *Bacillus subtilis* ubicado en el grupo B y por último el tratamiento *C. gloeosporioides* Vs *Trichoderma harzianum* ubicado en el grupo A. El coeficiente de variación fue de 9,8%.

En el enfrentamiento *C. gloeosporioides* vs *Trichoderma harzianum* este antagonista invadió en todos los casos por completo la placa Petri a partir del cuarto día de evaluación.

Cuadro 6. Promedio del porcentaje de inhibición de crecimiento para el día 4 de evaluación.

Tratamiento	PIC promedio
<i>C. gloeosporioides</i> Vs (<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>)	81,48 C
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	70,81 B
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Trichoderma harzianum</i>	53,06 A

Estadístico-Prueba Tukey

El análisis estadístico para el día seis de evaluación (Cuadro 7) mostró que hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos (Anexo 3), mientras que con la prueba de medias y la de comparación múltiple de Tukey se determinó que el mejor tratamiento fue *C. gloeosporioides* vs (*T. harzianum* + *B. subtilis*) ubicado en el grupo C, seguido del tratamiento *C. gloeosporioides* vs *Bacillus subtilis*, ubicado en el grupo B y por último el tratamiento *C. gloeosporioides* Vs *Trichoderma harzianum* ubicado en el grupo A. Presentando un coeficiente de variación de 4,8%

Cuadro 7. Promedio del porcentaje de inhibición de crecimiento para el día 6 de evaluación.

Tratamiento	PIC promedio
<i>C. gloeosporioides</i> Vs (<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>)	86,81 C
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	80,32 B
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Trichoderma harzianum</i>	69,05 A

Estadístico-Prueba Tukey

En la Figura 12, se muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno (%PIC) frente a los tres tratamientos durante los siete días de observación. Evidenciando con estos resultados que los antagonistas en el ensayo *in vitro* inhibieron el crecimiento del patógeno. Estos resultados coinciden con los de (Ordaz *et al.* 2007), quienes usando cepa de *Bacillus subtilis* para el control microbiano de *C. gloeosporioides*, encontraron efectos antagónicos, cuyos porcentajes fluctuaron entre 45 y 87,6% de inhibición *in vitro*. Sin embargo Botero y Aranzazu, (1999) comparando *T. harzianum* con otros antagonistas, encontraron que la especie *Trichoderma* tenía un buen efecto inhibitorio.

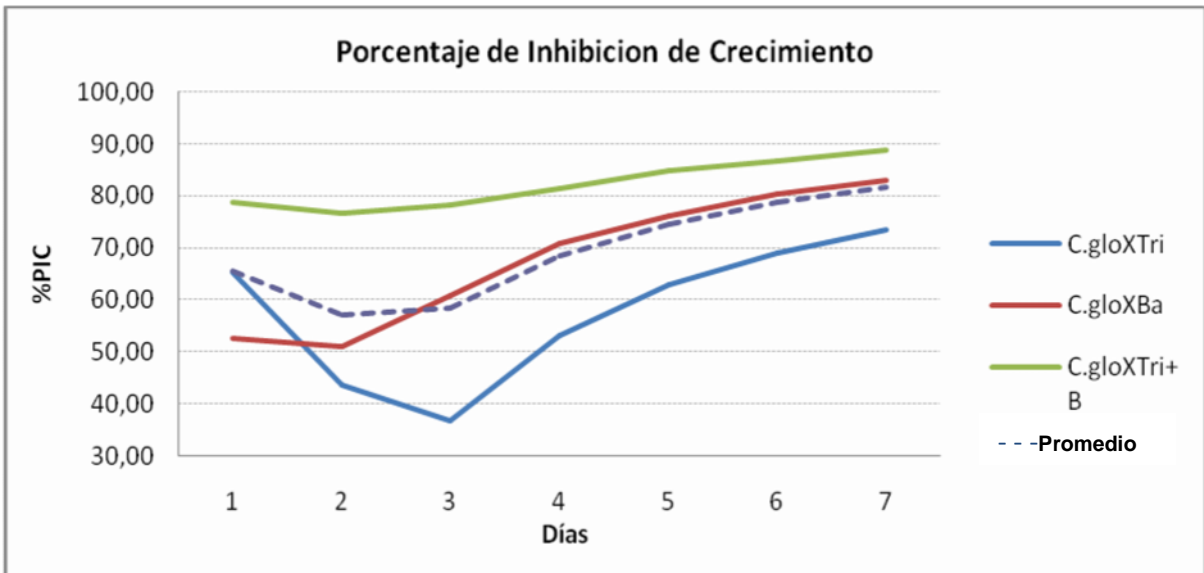


Figura 12. Representación gráfica del porcentaje de inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* (PIC) de los tres tratamientos.

En cuanto a la actividad antagónica de *T. harzianum* y *B. subtilis* sobre *C. gloeosporioides* se obtuvo que el PIE, de acuerdo a lo que se muestra en el (Cuadro 8) para el día seis de evaluación, el mejor tratamiento fue *C. gloeosporioides* vs *T. harzianum* + *B. subtilis*. Sin embargo el análisis de varianza (Anexo 4) mostró que no hay diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$) entre este y el tratamiento *C. gloeosporioides* vs *Bacillus subtilis*, ubicándose con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ambos en el grupo B, mientras que el tratamiento *C. gloeosporioides* vs *T. harzianum* se ubicó en el grupo A. El coeficiente de variación fue de 3,99%.

De acuerdo a estos resultados, se evidenció que el porcentaje de inhibición de esporulación obtenido en todos los tratamientos fue positivo, ocasionando una disminución importante en la esporulación de *C. gloeosporioides*.

Cuadro 8. Promedio del porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) al día 6 de la evaluación

Tratamiento	PIE promedio
<i>C. gloeosporioides</i> Vs (<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>)	99,00 B
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	98,07 B
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Trichoderma harzianum</i>	84,10 A

Estadístico-Prueba Tukey

En cuanto a la actividad antagónica de *T. harzianum* sobre *C. gloeosporioides* se obtuvo un PIC máximo de 69,05%. Sin embargo (Sarmiento, 2009) encontró una reducción superior del crecimiento de *C. gloeosporioides* con un PIC de 72,29%. Igualmente, Suárez *et al.* (2008) determinaron el antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum*, frente a *Fusarium solani*, aislado de plantas enfermas de parchita (*Passiflora edulis*). Obteniendo un porcentaje de inhibición de crecimiento de más de 70%.

Un estudio de Hernández *et al.*, (2006), realizando evaluaciones *in vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Anana comosus* (L.) Merr.) determinaron que el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) de la colonia *Fusarium subglutinans* con *T. harzianum* fue de un 48%. Velázquez (2006), encontró una eficiente inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum* (98,8%) y *C. gloeosporioides* (100%) frente a *T. harzianum*. Estos resultados coinciden con lo descrito por Acuña *et al* (2000) y Montero (2002), quienes utilizaron *T. harzianum* para el control de *C. gloeosporioides* en mango, el primero y *C. acutatum* en fresa el segundo.

Así mismo (Lorenzo, 2004), obtuvo resultados efectivos de enfrentamiento de cepas nativas de *Trichoderma viride* contra *C. gloeosporioides* en cultivo de naranja, los cuales manifestaron un alto antagonismo. Igualmente, Fumero, (2008), realizó pruebas *in vitro* entre *C. gloeosporioides* aislado de hojas de mango (*Mangúifera indica* L.) frente *T. harzianum*, encontrando un buen porcentaje de inhibición de crecimiento y de esporulación del patógeno siendo el mecanismo más común de antagonismo la competencia por sustrato y la elevada actividad hiperparasítica, también se evidenció una clara antibiosis. De igual manera, Sousa y Oliveira (1998) reportan valores de 100% de inhibición sobre *C. gloeosporioides* causante de la antracnosis en parchita (*Pasiflora* spp.).

En el caso de *Trichoderma harzianum*, se obtuvo un porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) de 84,10%, resultado mayor reportó Sarmiento, (2009) quien indica un PIE de 99,5%, con un efecto inhibitorio.

También se ha evaluado el uso de este antagonista frente a otros patógenos del cultivo de mango, incluyendo *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum*, agentes causales de la “escoba de bruja”, obteniéndose un PIC de 42,02 y 62,9%, respectivamente (Michel *et al.*, 2001). En pruebas de enfrentamiento entre *F. oxysporum*, causante de la marchitez en tomate (Jiménez, 2004), con cepas de *Trichoderma* sp. observó que fue capaz de inhibir el crecimiento entre 29 y 49% (PIC) y la esporulación (PIE) entre 60 y 78%, mostrando alta capacidad antagónica.

En esta investigación con el uso de *B. subtilis* sobre *C. gloeosporioides* se obtuvo un PIC máximo de 80,32%, esto resultado coincide con los de Ordaz *et al.* (2007), quienes aislaron una cepa de *B. subtilis* para usarla como control microbiano de *C. gloeosporioides* encontraron efectos antagónicos, reportando porcentajes que fluctuaron entre 45 y 87% de inhibición. Igualmente estos resultados coinciden con la investigación realizada por Castilla (2008) y (Delmoral, 2009), quienes

reportaron un PIC del 45,23% y 69% para la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*.

Investigaciones realizada por Botero y Aranzazu (1999), evaluando el efecto antagonico de 20 cepas de *Bacillus* y 31 cepas de *Pseudomonas* sobre el *C. gloeosporioides*, encontraron que las cepas *B. subtilis*-18 y *P. fluorescense*-31, ejercieron un efecto antagónico sobre la germinación de conidios del patógeno en 49 y 57% respectivamente. Baños *et al.*, (2004), utilizaron aislamientos de *Bacillus firmus* de los cuales dos presentaron la mayor inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* de 75,32 y 69,17% en un lapso de 96 h. El posible mecanismo de acción del antagonista fue el de competencia por nutrientes y espacio (Janisiewicz y Korten, 2000) o bien por la producción de antibióticos y/o sustancias con propiedades antimicrobiales, características propias de este género de bacteria (Reinoso *et al.*, 2006).

En evaluaciones *in vitro* con cepas de *Bacillus subtilis* frente a otros patógenos como *Rhizoctonia solani* se encontró inhibición del crecimiento por encima del 75% (Sosa *et al.*, 2001). Así mismo, Sosa *et al.* (2006) también lograron resultados satisfactorios cuando enfrentaron por cultivo dual las cepas de *B. subtilis* (Bs-21 y Bs-42) con la cepa Rs-10 de *R. solani* de forma simultánea, y demostraron que no habían diferencias significativas entre ambas con un porcentaje de inhibición del 59 y el 57%, respectivamente.

En nuestra investigación se encontró que el uso de la mezcla *T. harzianum* y *B. subtilis*, incrementó su capacidad de control (Figura 12), que se vio reflejado en el porcentaje de inhibición de crecimiento y el porcentaje de inhibición de esporulación, cuyos valores oscilaron entre 78,85 - 86,81% y 99% respectivamente, lo cual indica que hay un efecto sinérgico entre estos antagonistas como lo señaló Carrillo, *et al.* (2005) en el control de *C. gloeosporioides*. Resultado similar fue encontrado por Labrador (2011), quien con el uso combinado de *T. crassum* y *B. subtilis* para el control de *P. palmivora*,

obtuvo un (PIC) y (PIE), cuyos valores oscilaron entre 24-38% y 90% respectivamente.

Algunos investigadores señalan que usando de mezclas de organismos con diferentes modos de acción o combinación de agentes de control biológico posiblemente puedan mejorar el espectro de actividad, lo que podría permitir el control de varios fitopatógenos, ya que la mayoría de los agentes de control biológico se han aplicado para controlar una determinada enfermedad (Yuen *et al.*, 1985).

7.2 Prueba de parasitismo

Las observaciones realizadas en microcultivos se encontró gran cantidad de micelio de *T. harzianum* enrollando las hifas del patógeno (Figura 13C) y/o crecimiento dentro de ella, las cuales además presentaron lisis (Figura 13A). En cuanto a los conidios se observó una desintegración de los mismos (Figura 13D), siendo todas estas estructuras afectadas en formas muy diferentes de las estructuras normales del patógeno. Estos resultados son similares a los señalados por Windham *et al.* (1986), quienes observaron como *Trichoderma* spp. enrolló sus hifas alrededor de las hifas de *Rhizoctonia solani*, penetrándolo y subsecuentemente disolviendo el citoplasma de la célula hospedante. También Elad (2000), menciona que el micoparasitismo utiliza enzimas que degradan la pared celular del hongo hospedante, para luego penetrar la célula. Generalmente en esta acción se ven implicadas enzimas extracelulares que causan lisis a las paredes de las hifas, conidios o esclerocios (Melgarejo, 1989, Harman, 2001).

Así mismo, la producción de sustancias extracelulares por especies del género *Trichoderma*, ha sido señalada por varios investigadores que han determinado la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma*, los cuales fueron capaces de reducir el crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *R. solani* (Stefanova *et al.*, 1999).

Cabe destacar que en micoparasitismo estarían involucrada ciertas enzimas como: 1,3 gluconasas, lipasas y proteolasas que *Trichoderma sp.* liberaría al medio, provocando la destrucción de componentes estructurales de ciertos patógenos (Elad *et al.*, 1982).

En esta investigación todos los antagonistas mostraron efecto micoparasítico, algunos por enrollamiento y otros por penetración de las hifas, obstruyendo de esta forma las funciones biológicas y fisiológicas de *C. gloeosporioides*, además de detener su crecimiento.

Con respecto a *B. subtilis*, se logró observar al microscopio que afecta las estructuras de *C. gloeosporioides* produciendo lisis en sus hifas lo cual se puede observar en la (Figura 13 E-F). En cuanto a los conidios se observó una reducción de la germinación y desintegración de los mismos.

Estos resultados son similares a los encontrados en investigaciones realizadas en Gran Bretaña al hacer pruebas de antagonismo con el fin de evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* frente a *C. gloeosporioides*, observandose lisis celular y reducción en el porcentaje de germinación de conidios de *C. gloeosporioides*, (Fernández y Cenjas, 1997). Igualmente Bravo (1993), encontró disminución en la germinación de conidios, e inhibición en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* aislado de cítricos al realizar pruebas de antagonismo bacterial *in vitro*.

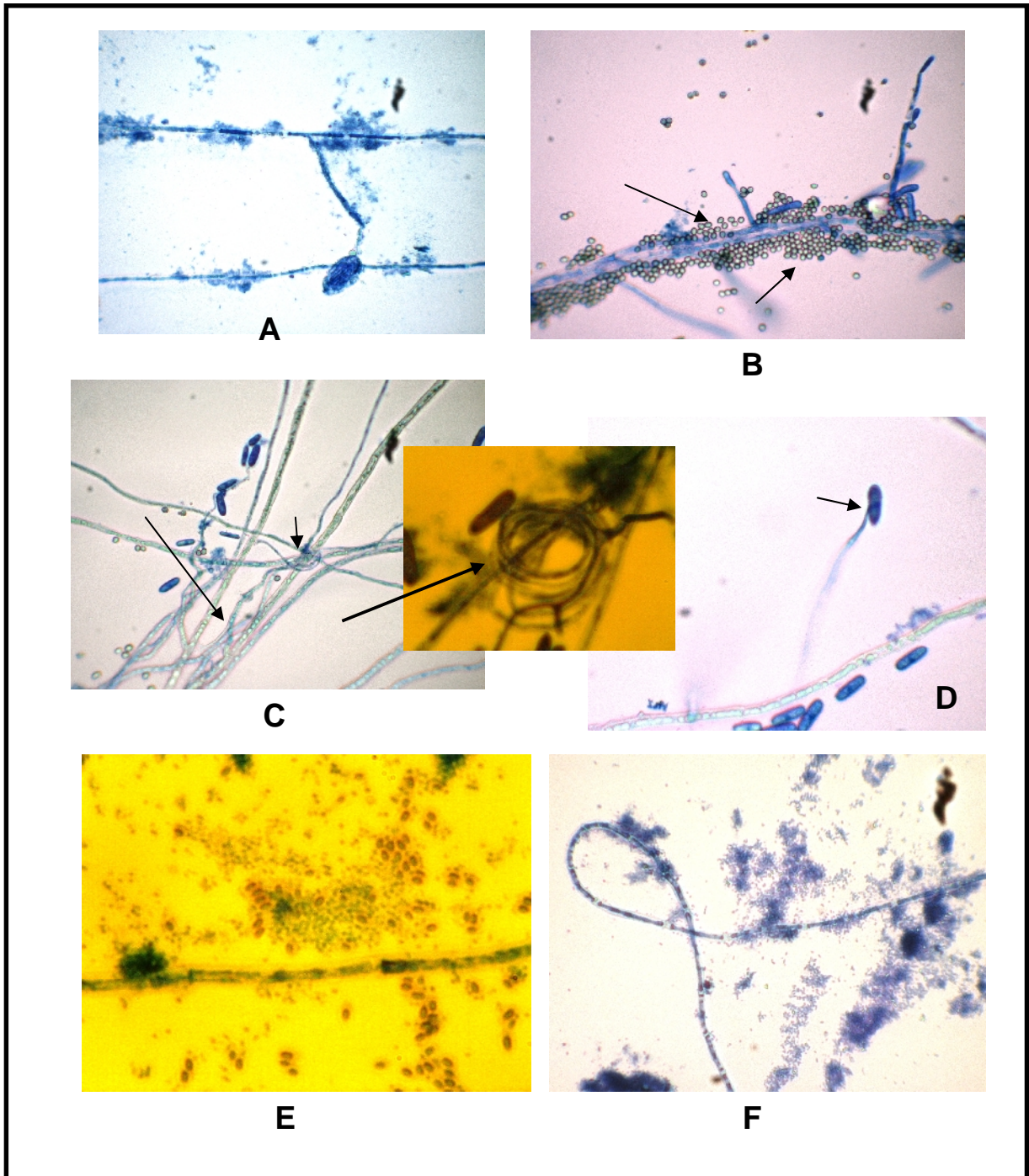


Figura 13. Interacción entre los antagonistas y *C. gloeosporioides*. A) Parasitismo ocasionado por *T. harzianum*; B) Gran cantidad de esporas de *T. harzianum* alrededor de micelio de *C. gloeosporioides*. C) Enrollamiento de hifa de *T. harzianum*. D) Conidio desintegrándose. E-F) Parasitismo ocasionado por *B. subtilis*.

7.3 Metabolitos Volátiles

En la Figura 14 y Cuadro 9, se puede observar los valores promedios del porcentaje de inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* vs *T. harzianum* durante los siete días de observación, demostrándose el efecto inhibitorio de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento del patógeno.

Al comparar el PIC y el PIE del patógeno con los del testigo, se determinó que hubo inhibición del crecimiento a partir de las 48 horas, y que la producción de conidios fue muy baja, lo cual indica que hubo producción de metabolitos secundarios y que estos afectaron el desarrollo del patógeno. El crecimiento de *T. harzianum* fue mucho mayor y más rápido que el de *C. gloeosporioides* como se puede observar en la Figura 14.

Cuadro 9. Valores de PIC y PIE en la prueba de metabolitos volátiles.

Aislamiento	PIC	PIE
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>T. harzianum</i>	59,38%	90,87%

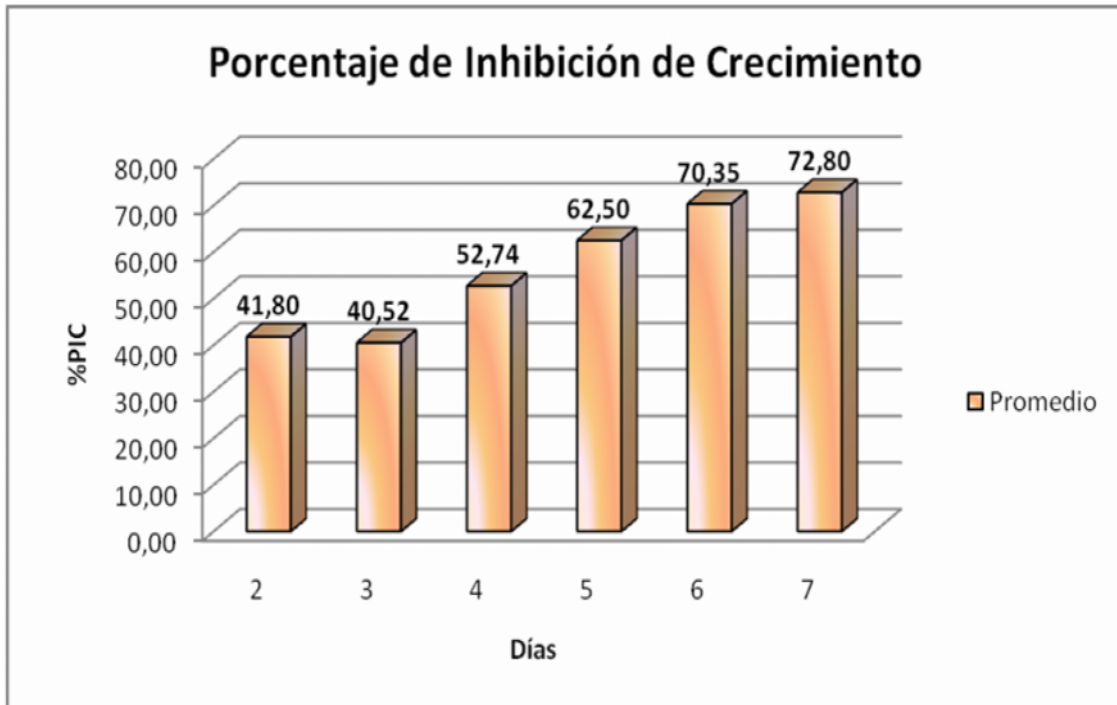


Figura 14. Representación gráfica del promedio porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) al realizar la prueba de Metabolitos volátil.

La actividad de los metabolitos volátiles también ha sido objeto de varias investigaciones. Así se señala que los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático. Estos investigadores detectaron además, que la actividad antibiótica de algunos aislamientos se debía también a la producción de compuestos volátiles (Martínez *et al.*, 1994; Dennis y Webster, 1971). Otros han evaluado la acción de compuestos volátiles de *T. harzianum* sobre *Aspergillus flavus*, quienes encontraron que hubo una inhibición de crecimiento de la colonia de estos patógenos (Inojosa, 2009 y Mejías *et al.*, 2008).

El efecto ejercido por *T. harzianum* sobre *C. gloeosporioides* podría ser debido a la producción de metabolitos volátiles, ya que se observó inhibición del crecimiento y de esporulación sin que las colonias se encontraran, es decir sin enfrentamiento directo, lo que coincide con lo señalado por Stefanova *et al.*, (1999).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Un ejemplo de metabolito volátil es el 6-pentil- -pirona (6PP) quien presenta alta actividad antimicrobiana sobre la membrana impidiendo la absorción de agua por las células del hongo (Bonnarne *et al.*, 1997).

Así mismo, en estudio realizado por (Dal *et al.*, 1997), se evaluó *in vitro* el efecto inhibitor del desarrollo de micelio de *Alternaria citri*, *Bipolaris cynodontis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia brachyspora*, *Curvularia lunata*, *Curvularia oryzae-sativae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotium rolfsii*, causado por metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma hamatum*.

8. EVALUACIÓN *in vivo* DE *Trichoderma harzianum* Y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides*.

En los frutos tratados los síntomas se iniciaron en la superficie el día dos después de la inoculación. Las manchas entre los días cinco y seis se manifestaron de forma redondeada y color castaño oscuro. En el caso de los frutos de los tratamientos testigo, las manchas los cubrieron casi totalmente (Figura 15 F).

El análisis de varianza para el primer día de evaluación, arrojó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los diferentes tratamientos tanto para diámetro de la mancha (Anexo 5) como para el porcentaje de avance de la lesión (Anexo 6). En las prueba de medias cuadro 10, se destacaron tres grupos: el grupo A, donde se

encuentran los tratamiento *C. gloeosporioides* Vs (*T. harzianum*+ *B. subtilis*), *C. gloeosporioides* Vs Benomilo (0,5g/L), *C. gloeosporioides* Vs *Bacillus subtilis* y *C. gloeosporioides* Vs *Trichoderma harzianum*, registrando los menores valores tanto de diametro como porcentaje de avance de la mancha y los grupo B y C donde se registraron los mayores valores.

Cuadro 10. Valores promedio del diámetro y porcentajes de avance de la mancha para el día 1 de evaluación.

Tratamiento	DM (cm)	%Avance
<i>C. gloeosporioides</i> Vs (<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>)	0,0 A	0,0 A
<i>C. gloeosporioides</i> Vs Benomil (0,5g/L)	0,0 A	0,0 A
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	0,0 A	0,0 A
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Trichoderma harzianum</i>	0,0 A	0,0 A
Testigo (ADE)	1,02 B	6,54 B
<i>C. gloeosporioides</i>	2,24 C	15,01 C

Estadístico-Prueba Tukey

El análisis para el día cuatro de la evaluación también reveló diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos (Anexo 7), en las prueba de medias para el diámetro de la mancha cuadro 11, se destacaron tres grupos, el grupo A con los tratamientos que tuvieron mejores resultado, siendo el tratamiento con la mezcla de los antagonistas el valor más bajo en cuanto al diámetro de la mancha, junto con el tratamiento químico (Benomilo 0,5g/L). Así mismo, al analizar el porcentaje de avance promedio se detectó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Anexo 8) destacándose cuatro grupos: el grupo A, donde el tratamiento de la mezcla de los antagonistas fue el que mayor redujo el

porcentaje de avance de la enfermedad, seguido del tratamiento químico, el grupo C y D, donde se encuentra el tratamiento sólo con el patógeno y testigo (ADE) registrando el mayor porcentaje de avance de la mancha.

Cuadro 11. Valores promedio del diámetro y porcentajes de avance de la mancha para el día 4 de evaluación.

Tratamiento	DM (cm)	%Avance
<i>C. gloeosporioides</i> Vs (<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>)	0,05 A	0,31 A
<i>C. gloeosporioides</i> Vs Benomil(0,5g/L)	0,16 A	1,04 A
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	0,47 A	3,02 AB
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>T. harzianum</i>	1,01 A	6,78 AB
Testigo (ADE)	3,63 B	23,42 C
<i>C. gloeosporioides</i>	7,52 C	48,16 D

Estadístico-Prueba Tukey

Transcurrido los siguientes días de la evaluación, los tratamientos mostraron diferencias significativas (Anexo9 -10) y el mismo patrón con respecto al diámetro de la mancha y el porcentaje de avance promedio, destacándose siempre la mezcla de los antagonistas como el mejor tratamiento ubicándose en el grupo A, junto con los tratamientos *C. gloeosporioides* Vs *B. subtilis* y Benomilo (0,5g/L) (Cuadro 12). Esto además, pudo detectarse directamente al observar el desarrollo de la enfermedad sobre los mangos para cada uno de los tratamientos como se observa en la Figura 15.

Cuadro 12. Valores promedio del diámetro y porcentajes de avance de la mancha para el día 6 de evaluación.

Tratamiento	DM (cm)	%Avance
<i>C. gloeosporioides</i> Vs (<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>)	0,24 A	1,55 A
<i>C. gloeosporioides</i> Vs Benomil(0,5g/L)	0,40 AB	2,63 AB
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	1,12 ABC	7,18 ABC
<i>C. gloeosporioides</i> Vs <i>T. harzianum</i>	2,03 C	13,42 BC
Testigo (ADE)	4,85 D	31,14 D
<i>C. gloeosporioides</i>	13,59 E	87,20 E

Estadístico-Prueba Tukey

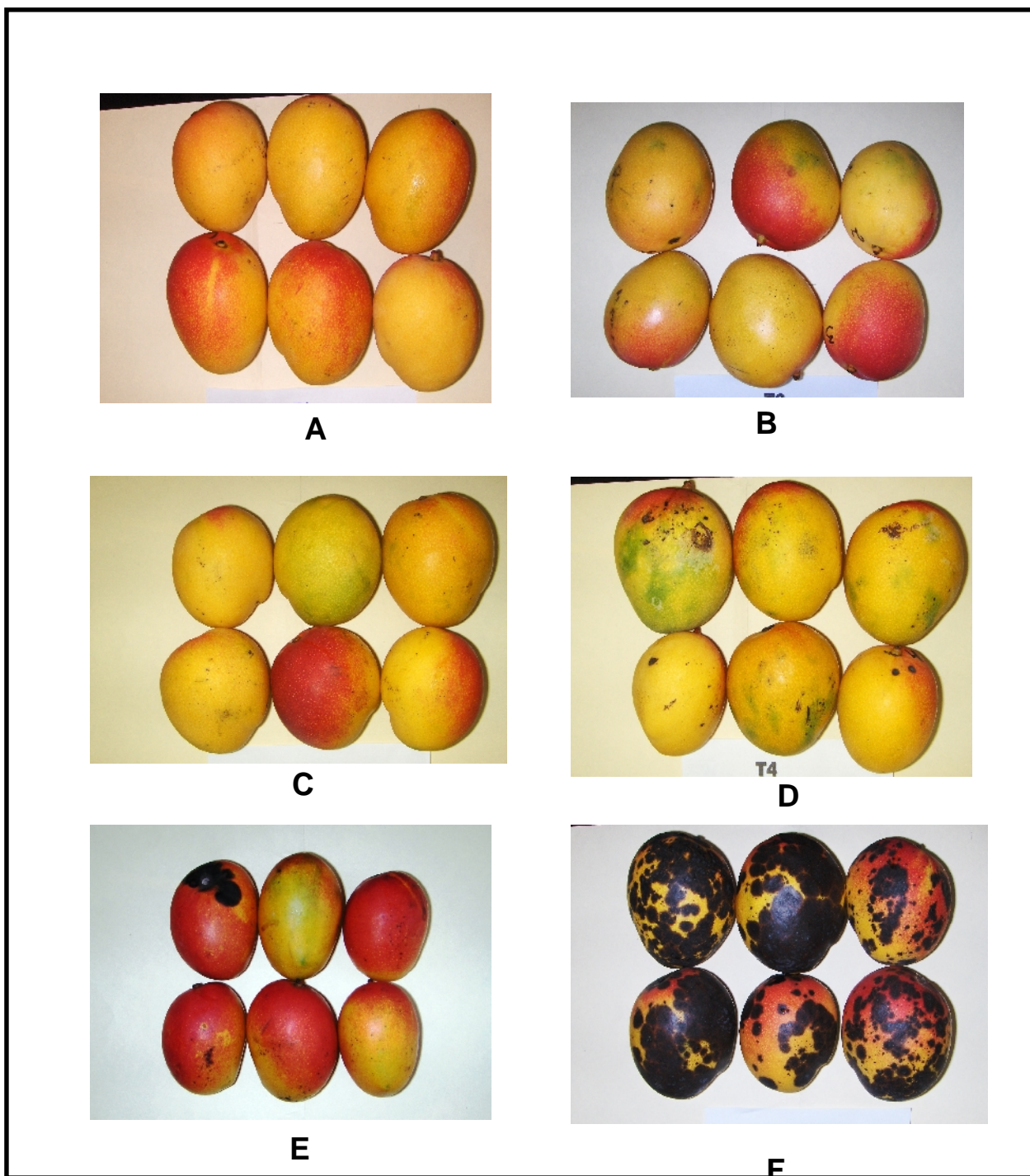


Figura 15. Avance de la enfermedad en frutos de mango 'Haden' con los diferentes tratamientos. A) T5: *T. harzianum* + *B. subtilis*; B) T6: Benomilo a razón de 0,5g/L; C) T3: *B. subtilis*; D) T4: *T. harzianum*; E) T2: Testigo (ADE); F) T1: *C. gloeosporioides* solo.

Los aislamientos de *T. harzianum* y *B. subtilis* en esta evaluación redujeron en forma significativa el porcentaje de la enfermedad cuando se usaron en forma individual, sin embargo *T. harzianum* redujo menos el porcentaje de avance de la mancha (13,42%) al compararlo con *B. subtilis*. Resultados similares ha reportado Delmoral (2009), quien encontró un promedio en el diámetro de la mancha entre 0,23 y 0,5 cm logrando reducir la severidad de la antracnosis al aplicar *B. subtilis* a frutos de mango.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con lo señalado por Fernández y Arauz (1992), quienes al aplicar aislamientos de *Bacillus* sobre mangos disminuyó el desarrollo de la antracnosis, logrando un efecto antagónico.

Bacillus subtilis es efectivo contra hongos fitopatógenos ya que provoca una fuerte inhibición del crecimiento micelial, sea por competencia por nutrientes, por exclusión de sitio o colonización del patógeno, como también por la liberación de metabolitos secundarios (Hansen 1992).

Otras especies de *Bacillus* han sido señaladas como antagonistas efectivos del *Colletotrichum*. Govender *et al.*, (2005) indican que se logró reducir significativamente la severidad de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides* en mango usando *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, y *B. cereus*.

Con respecto al antagonista *T. harzianum*, cuando se aplicó de forma individual los resultados fueron menos efectivos, ya que a pesar de que en todos los casos disminuyó el porcentaje de avance de la enfermedad, esto no fue de manera significativa. Sin embargo, Sarmiento (2009) observó efecto inhibitorio con este antagonista sobre *C. gloeosporioides*, al establecer comparaciones entre el número y diámetro de la mancha por antracnosis en frutos de mangos.

Sousa *et al* (1998), lograron reducir significativamente la severidad de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en el cultivo de parchita (*Pasiflora* spp.) usando especies de *Trichoderma*. Así mismo Velásquez. (2006), obtuvo un control efectivo al usar *T. harzianum* sobre *C. gloeosporioides* en frutos de tomate.

También *Trichoderma* ha ejercido un control efectivo sobre otros fitopatógenos como lo señala Guzmán (2011), quien observó efecto inhibitorio con este antagonista sobre *P. palmivora* al establecer comparaciones entre los valores de PIC, PIE y grado antagonismo con los del testigo

Mohammed *et al.* (2004) determinaron que *T. harzianum* ejerce mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con *Phytophthora capsici* (hiperparasitismo). Por otro lado, Deberdt *et al.* (2008) usaron *T. asperellum* (cepa PR11) y el fungicida Ridomil, obteniendo resultados positivos en la reducción del avance de la enfermedad.

La aplicación del tratamiento que contenía la mezcla de los antagonistas *T. harzianum* vs *B. subtilis*, mostró los mejores resultados con respecto al efecto producido de forma individual por cada uno, logrando así una eficiente reducción de la enfermedad, lo cual puede ser debido a que estos dos antagonistas al unirse provocan una especie de sinergismo. Este posible efecto sinérgico se puede atribuir a la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como se demostró en el ensayo *in vitro*. Este señalamiento ha sido comprobado por otros investigadores en evaluaciones con microorganismos antagonistas en frutos postcosecha (Hernández *et al*, 2009).

Aunque en la literatura, principalmente se ha reportado el uso de antagonistas de forma individual en un mismo tratamiento, sin embargo ya se han realizado algunas investigaciones usando mezclas de antagonistas, como es el caso de Lozoya *et al.* (2006), quienes determinaron la efectividad antagónica de *Pseudomonas* y *Trichoderma* sp contra *Phytophthora infestans*. También *Bacillus*

subtili, *Pseudomonas* y *Trichoderma* spp., han sido usados en el control de *Uncinula necator*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora palmivora* y otros patógenos, tanto de forma separada como conjunta, obteniendo diferencias significativas en la reducción de las enfermedades tanto en fruto, invernadero y campo (Lisboa 2003; Lozoya *et al.*, 2006; Rojas y Sandoval 2009; Chamarro, 2006; Labrado 2011)

CONCLUSIONES

- Al evaluar la efectividad antagónica de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* por separado y en mezcla ante *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones *in vitro*, se observó que el mejor tratamiento fue la mezcla de los antagonistas seguido de *B. subtilis* aplicado solo y luego *T. harzianum*.
- Los antagonistas mostraron efecto micoparasítico (enrollamiento, penetración y lisis de hifas), afectando el crecimiento y esporulación de *C. gloeosporioides*.
- *Trichoderma harzianum* mostró alta efectividad por metabolitos volátiles afectando el crecimiento y esporulación de *C. gloeosporioides*.
- En relación al porcentaje promedio de avance de la mancha promedio se determinó que el mejor tratamiento *in vivo* fue la mezcla de los antagonistas.

RECOMENDACIONES

- Realizar muestreos en fincas de producción de mangos del país para detectar otras posibles cepas endófitas de *Trichoderma* y *Bacillus*. antagonistas de *C. gloeosporioides*.
- Evaluar en campo el uso de mezcla de *T. harzianum* y *B. subtilis* para el control de *C. gloeosporioides*, junto con otras estrategias dentro del manejo integrado del cultivo, para contribuir a la reducción de la antracnosis en mango de manera eficiente.
- Realizar investigaciones sobre los metabolitos producidos por *T. harzianum* en los enfrentamientos con *C. gloeosporioides*.

REFERENCIAS CONSULTADAS

ACUÑA, A. 2000. *Trichoderma harzianum* como controlador de *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. Publicación del XI Congreso de Fitopatología en Chile.

AGRIOS G. 1995. Fitopatología. Editorial Limusa, S.A. UTEHA. Mexico. Segunda edición. 838 p

AGRIOS G. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. London, UK. 922 p.

ALAHAKOON, P., A. BROWN AND S. SREENIVASAPRASAD. 1994. Genetic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates obtained from mango. Int. J. Pest Mang. 40: 225-229.

ALCANO, M. 2008. Selección y caracterización molecular mediante marcadores RAPD de aislamientos de *Trichoderma* spp., usados en el biocontrol de *Macrophomina phaseolina* (Tasso) Goid., en *Phaseolus vulgaris* L. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 59 p.

ALLENDE, R., C. JUAREZ., R. GARCIA., A. CARRILLO., M. PATIÑO., y E. GALINDO. 2001. *Rhodotorula minuta*, agente de control biológico potencial contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. Braziliam Phytopathology 26 (supplement), august, pp.461-462.

ANGELONI, M. 2004. "Bacterias *Bacillus subtilis* nativas del departamento Comandante Fernández como factor de control biológico frente al hongo patógeno *Rhizoctonia solani* en el cultivo del algodón [http://www.inta.ar/saenzpe/fitopatología/tesis de licenciaura.pdf](http://www.inta.ar/saenzpe/fitopatología/tesis%20de%20licenciaura.pdf) (Julio, 2011)

ARAUZ, L. 2000. Mango Anthracnosis: Economic impact and curret options for integrated management. *Plant Disease* 84(6): 600-611.

ARCIA, M. 1997. Avance en el control biológico de enfermedades en plantas, algunas experiencias en cultivos hortícola. En: *Memorias VII Congreso Nacional de Hortalizas*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 43-71 pp.

ARCIA, A. 2002. Control biológico de patógeno en plantas. En: 1^{era} Jornada de Actualización de Manejo Integrado de Artrópodos y Enfermedades Plaga. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 37-81 pp.

ARIAS, A. 2000. Una alternativa al uso de pesticidas químicos: bacterias del suelo. 1 ed. Madrid. España. 128 p.

ARIAS, M. 2004. Guía de insumo biológicos para el manejo integrado de plagas. Edición Harmonia. Corporación para el Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos. Colombia. 54 p.

ARIAS, B., y L., CARRIZALES, 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y post cosecha en el Municipio Cedeño, Estado Monagas. *Bioagro* 19 (1): 19-25.

AVILAN, L. y D., RENGIFO. 1990. El mango. 1 ed. Caracas. Venezuela. 401 p.

AVILÁN. L., C. MARÍN, M. RODRÍGUEZ y J. RUIZ. 2005. Producción forzada del mango (*Mangifera indica* L.) en alta densidad durante el período de crecimiento *Rev. Facultad. Agronomía. (LUZ)*. Vol. 22(3):99-111.

BAKER, K. 1968. Mechanisms of biological control of soil borne pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology* 6: 263-294.

BARNETT H. AND R. HUNTER, 1999. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 2 ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis.USA. 225 p.

BAÑOS, A.; P. ZAVALA.; L. COLINAS y A. GUTIÉRREZ. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)Penz. Y Sacc. En papaya Maradol Roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha en frutos infectados. Revista Mexicana de Fitopatología 22:198-205.

BEHARI, L. 1968. The mango. Botany, cultivation and utilization. S. World. Noel R. Krieg y John G. Holt (Eds). 189 p.

BENITEZ, T.; A. RINCON.; C. LIMON AND A. CONDON. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Universidad de Sevilla. España Internattional Microbiology. 7: 249-260.

BERGEYS, D. 2000. Manual of Determinative Bacteriology. Night Edition. Philadelphia. pp.540-589.

BISSETT, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* II. Intrageneric classification. Can. J. Bot. 69:2357-2372.

BLENCKE, H.; G. HOMUTH.; H. LUDWIG.; U. MADER, M. HECKER.; AND J. STULKE. 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. Met. Eng. 5:133-149.

BONNARNE, P.; A. DIJIAN.; A. LATRASSRE.; G. FERON AND L. LE QUERRE. 1997. Production of 6-pentyl-alfa-pyrone by *Trichoderma* spp., from vegetable oils Journal of Biotechnology 56:143-150.

BORRERO, C. SILVA, M. 2005. Efectos de *Trichoderma* (*in vitro*) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo Oxisol clase IV del piedemonte llanero. Revista Orinoquia. Vol. 9 Universidad de los Llanos.

BOTERO, M. y ARANZAZU, F. 1999. Estudios de la interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* Penz agente causal de la antracnosis en tomate de árbol. CORPOICA. Manizales. 58pp

BUCHANAN, R. AND N. GIBBONS. 1974. Endospore forming rods and cocci. Part 15. Eighth Edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. p. 529-549.

BRADA, L.; E. QUINTANA.; E. PELAYA. y T. ARAUJO. 1995. Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl. Var. *cubensis* Smith. Resúmenes Bioplág 95. (La Habana, Cuba). INIFAT p. 11.

BRAVO, O. 1993. Efecto *in vitro* de *Bacillus* sp. sobre el crecimiento, esporulación y germinación de conidias y esporas de nueve hongos. Fitopatología Colombiana. 17(2): 62-72

CARTAGENA J. y D. VEGA, 1992. Fruticultura Colombiana. El mango. IICA, Manual de Asistencia Técnica NJ. pp. 43-124.

CARRILLO J.; R. GARCIA.; A. SAÑUDO y I. MÁRQUEZ. 2005. Control Biológico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y su calidad postcosecha del mango. Revista Mexicana de Fitopatología 23(2):24-32.

CASAS, G. 1994. Micología General. Ediciones de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas. pp. 24-74.

CASTILLA, M. 2008. Evaluación *in vitro* de bacterias antagonistas para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz causante de la Antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de pregrado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay- Venezuela. 51p.

CHACON, H. 2003. Evaluación de la calidad de diferentes productos biológicos a base de *Trichoderma* spp., comercializados en Venezuela. Trabajo de Grado Ingeniero Agrónomo. Táchira, Venezuela; Universidad Experimental del Táchira. 77 p.

CHAMARRO, 2006. Evaluación de la efectividad biocontroladora de *Bacillus* y dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia y severidad del Oidio de la

vid (*Unicinula necator*) en *vitis vinífera* variedad Cabernet Sauvignon. Tesis de grado. Facultad de Ciencia Agrarias, Universidad de Talca. Chile. 54p.

CHAVARRIA, M.; L. URIBE y A. BOLAÑOS. 2006. Microorganismos Benéficos en el Control de Enfermedades en Jengibre. Revista Agronomía Costarricense. 29(3): 145-155.

CHUN, W. AND J. JONES. 2001. II. Gram negative bacteria. *E. Burkholderia*. In: Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. Edited by Schaad, Jones, Chun. Third Edition. APS Pres, st. Paul, Minnesota. Pp 139-150.

COSTA, E.; N. TEIXIDO.; J. USALL.; AND I. VIÑAS. 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 Using commercial products and by-products applied Microbiology Biotechnology 56:367-371.

CRUZ-RAMOS H, L BOURSIER, I MOSZER, F KUNST, A DANCHIN, AND P. GLASER. 1995. Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. EMBO J. 14: 5984-5994.

DAMICONE, J. 2000. Fungicide resistance management. Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Science and Natural Resources. OSU extension. Oklahoma, E.U. Facts F-7663:8 p.

DAL, G.; C. MONACO y A. CHAVES. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum*, sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. Revista Iberoamericana de Micología (14):131-134.

DEBERDT, P.; C. MFEQUE.; P. TONDJE.; M. BON.; M. DUCAMP.; C. HURARD.; B. BEGOUD.; M. NDOUMBE-NKENG AND P. HEBBAR. 2008. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon Cilas. Biological Control 44: 149–159.

DELMORAL, M. 2009. Evaluación *in vivo* de la efectividad de la Bacteria *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la Antracnosis en fruto de mango (*Mangifera indica* L.). Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 51 p.

DENNIS, C., AND WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. Transaction of the British Mycological Society 57:25-39.

ELAD Y,; I. CHET,; P. BOYLE,; AND Y. HENNIES. 1982. Parasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathol. 18: 73-78.

ELAD, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Protection 19: 709-714.

ESPOSITO, E.; AND M. DA SILVA. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. Critical review in Microbiology 24(2): 89-98.

ESTRADA, A.; J. DODD AND P. JEFFRIES. 1993. Effect of environment on the *in vitro* growth and development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate from the Philippines. Acta Hort. 341:360-370.

FAO, 2008. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. N°1. Breve información sobre la situación mundial de la oferta y la demanda de frutas. Disponible. en: <http://www.fao.org/>

FAOSTAT. 2011. FAO Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>

FERNANDEZ, A. AND ARAUZ, L. 1992. Reduction of mango anthracnose by *Bacillus* sp. En: IV International Mango Symposium. Miami Beach, Florida, USA. July 5-10. Poster

FERNÁNDEZ, O. AND A. CENJAS. 1997. The epidemiology of anthracnose disease of mango, inoculum sources, spore production and dispersal. Annual of Applied Biological. 104: 53-59.

FERNANDEZ-LARREA, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas. Costa Rica. Nº 62. pp. 86-100.

FERNANDEZ-LARREA, O. 2002. Tecnologías para la producción de biopesticida a base de hongos entomopatógenos y su control de calidad. Disponible en: http://www.codagea.gob.mx/-produce/hong_ent.htm

FERNANDEZ-LARREA, O. 2006. Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas. 2 ed. ampliada y actualizada. Mérida-Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola. 138 p.

FERRARI, E.; A. JARNAGIN AND B. SCHMIDT. 1993. Commercial production of extracellular enzymes. Cap. 62 pag. 917-937 En *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria, ed. AL Sonenshein, Pub. ASM, Washington, EUA

FITZELL, R., AND C. PEAK. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango. Inoculum sources, spore production and dispersal. Annual of Applied Biological 104:53-59.

FLORES, A. 2000. Manejo Postcosecha de Frutas y Hortalizas en Venezuela. 2 ed. Unellez, San Carlos. 224p.

FUMERO, M. 2008. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz), Penz and Sacc en el cultivo del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Fitosanidad.(La Habana). 14(1): 66-67.

GALÁN, V. 1999. El cultivo del mango. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-España. 310 p.

GANTOTTI, B. AND M. DAVIS. 1993. Pectic zymogram analysis for characterizing genetic diversity of the mango anthracnose pathogen. Acta Hort. 341:353-359.

GOMEZ, A. y F. FERRER. 2001. Control biológico y manejo de plagas y enfermedades (MIPE). Índice Agropecuario 2001. Edición XXXVI. P. B-9.

GONZÁLEZ, K. 2006. Evaluación de la eficacia de agentes biocontroladores sobre la expresión de la enfermedad de postcosecha 'Ojo de Buey' causado por *Neofabraea alba* en manzana 'Pink Lady'. Trabajo de Grado. Chile. Universidad de Talca. 33 p.

GOVENDER, V.; L. KORTEN AND D. SIVAKUMAR. 2005. Semicommercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology* 38:57-65

GUILLEN, R.; F. HERNANDEZ y G. GALLEGOS. 2006. *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solana* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonina y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 105-114.

GUTIÉRREZ, C. 2009. Análisis del Mercado para Mango. (19 de Diciembre de 2010). [on line]. [www. Frutal_es. com/uploads/mango.pdf](http://www.Frutal_es.com/uploads/mango.pdf).

GUZMÁN, A. 2011. Uso de *Trichoderma* spp para el control *in vitro* e *in vivo* de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Trabajo de grado. Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay-Venezuela. 40pp.

HANSEN, W. 1992. Control fitosanitario moderno precosecha y poscosecha, para proteger la calidad de frutas y verduras de exportación. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica. 141-151 p.

HARMAN, G. E. 2001. *Trichoderma* spp., Including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system) [http:// www.birdhybrids.com/t-22.htm](http://www.birdhybrids.com/t-22.htm)

HERNANDEZ, J. 1999. Evaluación preliminar del Control Biológico de *Dothiorella* sp. causante de la Pudricion apical de la guayaba por *Trichoderma harzianum*.

Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay-Venezuela. 51p.

HERNANDEZ, A., A. SIERRA y A. PEREZ. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Fitosanidad. 1082):105.109.

HERNANDEZ, A.; S. BAUTISTA.; M. GERARDO y A. HERNANDEZ. 2009. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Revista Mexicana de Fitopatología. 25:66-74.

HJELJORD, L. AND A. TRONSMO. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: Kubice CP. (Eds). 2:131-151.

HOFFMAN T.; B. TROUP.; A. SZABO.; C. HUNGERER AND D. JAHH. 1995. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. FEMS Microbiol. Lett. 131:219-225.

HOYOS, J. 1994. Frutales de Venezuela. 2 ed. Sociedad de Ciencia Naturales La Salle. Caracas-Venezuela. p 27.

HUERTA, G.; G. HOLGUIN.; F. BENITEZ y J. TOLEDO. 2009. Epidemiología de la Antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. and (Sacc.) en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Aaulfo en el Soconusco, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27:93-105.

INDEX FUNGORUM. 2010. CABI Bioscience. [En línea]. Dirección URL:<<http://www.indexfungorum.org/Names/IndexFungorumPartnership.htm>> [consulta: 05 de abril.2010].

INOJOSA, A. 2009. Efecto de compuestos volátiles emitidos por *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium verticillioides* Nirenberg y *Aspergillus flavus* Link aislados de maíz. Trabajo de grado. Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay-Venezuela. 17p.

JAN, J. 2000. “Diseño y construcción de cepas de *Bacillus subtilis* sobre productoras de proteínas heterólogas” tesis de Doctorado en Ciencias

Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

JANISIEWIEZ, W.; W. CONWAY.; D. GLENN AND E. SAMS. 1998. Integrating biological control and calcium treatment for controlling decay of apples. HortScience 33:105-109.

JANISIEWIEZ, W. AND L. KORTEN. 2000. Biological control of postharvest diseases of fruit. Annual Review of Phytopathology 40: 411.441.

JARVIS, W. 1998. Control de enfermedades en cultivos de invernadero. Grupo Mundi-Prensa. España. 334p.

JIMÉNEZ, C. 2004. Formulación y momento de aplicación de *Trichoderma* sp. para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Trabajo de postgrado para optar al título de Magister *Scientiarum* en Protección Vegetal. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Postgrado en Agronomía. Maracay, Venezuela, 92p.

KLEMENT, Z.; K. RUDOLPH AND D.SANDS. 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademiai. Kiado. Budapest. 568 p.

KORSTEN, L.; E. DE JAGER.; E. DE VILLEIER.; J. KOTZE. AND F. WEHNER. 1995. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. Plant Dis. 79:1149-1156.

KORSTEN, L.; E. DE VILLIERS.; R. WEHNER AND J. KOTZET. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvet fruit disease of avocado in South Africa. Plant Disease 81:455-459.

LABRADOR, Y. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma crassum* bissett y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) cohn sobre *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler causante de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) Tesis de grado para optar al título de Magister *Scientiarum* en Agronomía, Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela Maracay-Venezuela. 68p.

LINDOW, E. AND M. WILSON. 1998. Strategies for implementation for implementation of biological control of foliar pathogens and pests with bacterial biocontrol agents. 2ed. California University Press. USA. pp 1-18.

- LISBOA, M. 2003.** Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum*, sobre la incidencia y severidad de la pudrición gris (*Botrytis cinerea*), en *Vid vinífera*. Trabajo de Grado. Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile. Universidad de Talca. 49 p.
- LOPEZ, A. 2001.** Taxonomía, patogênese e controle de espécies de gênero *Colletotrichum*. In Ed. Luz, WC. Revisão Anual de Patología de Plantas RAPP Passo Fundo, Brasil. 9:291-318.
- LOPEZ, E.; A. CASTILLO y F. PAEZ. 2004.** Tratamiento postcosecha contra *Fusarium roseum* en melón reticulado (*Cucumis melo* L.). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. México. 8(1):1-6.
- LORENZO, M. 2004.** Prospección de hongos antagonistas en la provincia de cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Revista Fitosanidad. (La Habana) 8 (1): 64-65
- LORITO, M. 1998.** Chytinolytic enzymes and their genes. En Kubicek. C.P. & Harman, G.E. (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. 2:72-99
- LOZOYA, H.; M. COYOT.; R. FERRERA. y E. LARA. 2006.** Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (MONT) DE BARY. Agrocienca 40: 491-499.
- MARTÍNEZ, S.; E. TERRAZAS. y T. ÁLVAREZ. 1994.** Actividad antifúngica *in vitro* de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. Rev. Bol. Quim, 27:13-18.
- MEJIAS, L.; R. ALVARADO y A. MARTNEZ. 2008.** Inhibición del crecimiento de *Aspergillus flavus* y producción de aflatoxinas b1 en grano de maíz almacenados bajo la acción de compuestos volátiles de *Trichoderma harzianum* Rifai. Revista de Agronomía 33(3):219-222.
- MELGAREJO, P. AND E. SAGASTA. 1989.** Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. Can. J. Bot. 67:83-87.
- MENDGEN, K.; A. SCHIEWE AND C. FALCONI. 1992.** Biological crop protection. Biological control of plant diseases. Bayer AG. Leverkusen. 45:5-20.
- MENTE, L.;**

C. MACHADO.; E. MINUSSI.; C. CASTRO y H. KIMATI. 1976. Efecto de algunos fungicidas en el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina* (TASS) Goid *in vitro*. Revista de Fitopatología Brasileira. 1 (2): 57-66

MICHEL, A.; O. DOMINGUEZ.; R. LEZAMA.; G. SAMUELS y J. ESCAMILLA 2001. Especies de *Trichoderma* en Suelos Cultivados con Mango Afectados por "Escoba de Bruja" y su potencial Inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19:154-160.

MICHEL, A. 2005. Potencial antagónico de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 23:284-291.

MORDUE, J. 1971. *Glomerella cingulata*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. N° 315. pp. 47-89.

MOES, J.; M. GRIOT.; J. KELLER.; E. HEINZLE.; I. DUNN AND J. BOURNE. 1985. A microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. Biotechnol. Bioeng. 27: 482-489

MOHAMMED, E.; PÉREZ, C.; AHMED, S.; REQUENA, M. y CANDELA, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Anales de Biología 26: 35-45.

MONTERO, J. 2002. Uso de *Trichoderma* spp. y *Beauveria bassiana*, para el control de antracnosis: *Colletotrichum acutatum* en fresa. <http://www.Infoagro.go.cr/37. Uso trichoderma.htm>. Consultada el 23 de noviembre de 2011.

ORDAZ, S.; G. GALLEGOS.; M. CEPEDA.; F. HERNANDEZ y V. ZAMORA. 2007. Control microbiano de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Phytophthora capsici* mediante *Bacillus pumilus*. Congreso

Latinoamericano y del Caribe de Fitopatología. Cancún, Quintana Roo, México. pp. 20-24.

PAEZ, R. 2004. Tecnología sostenible para el manejo de la antracnosis en papaya y mango. Boletín N° 96. Corpoica. pp. 45-79.

PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54.

PAREDES, J.; J. CARRILLO; R. GARCIA; R. ALLENDE; J. SAÑUDO y J. BENIGNO. 2008. Microorganismos Antagonistas para el control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa. Revista Mexicana de Fitopatología 27: 27-35.

PERDOMO, R.; A. HERNANDEZ; A. GONZALEZ; J. PINEDA y J. ALEJONE. 2007. Caracterización y evaluación de virulencia de aislamiento de *Rhizoctonia solani* kuhn causante de la mancha bandeada del maíz. Interciencia 32(1): 48-55.

PERES, N; T. SOUZA.; L. PEEVER AND W. TIMMER. 2004. Benomyl sensitivity of isolate of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Plant Disease. 88: 125-130.

PINEDA, J. 2001. Evaluación de Métodos de Aplicación de *Trichoderma harzianum* al suelo para el Control de *Macrophomina phaseolina* en Ajonjolí. Revista Fitopatología Venezolana 14: 31-34.

RAUPACH, G. y J. KLOEPPER. 2000. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. Plant Disease. 84:1073-1075.

REINOSO, R.; R. CASADESUS.; S. GARCIA.; P. GUTIERREZ y R. ALVAREZ. 2006. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. frente a bacterias fitopatógenas del cultivo de la papa. Rev. Protección Vegetal. 21:119-121.

RIFAI, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute. England. N° 116. 55 p.

RODRIGUEZ, F.; M. STEFANOV y U. GOMEZ. 1998. Efecto del biopreparados de *Trichoderma harzianum* (Rifai) contra *Pseudoperonospora cubensis* (Berk Curt) Rostow y *Erysiphe cichoracearum* D.C en pepino (*Cucumis sativus* L.) Fitosanidad 2 (1-2):41-43.

ROJAS, C. y C. SANDOVAL. 2009. Evaluación *in vivo* de la efectividad biocontroladora de *Bacillus subtilis* y dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia de tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y otros patógenos en plantas de tomate. Tesis de Maestría. Universidad de Talca. Escuela de Agronomía. Talca-Chile. 43 p.

RONDON, G. 1990. Enfermedades de los frutos en Venezuela. Instituto de Investigaciones Agronómicas. CENIAP-FONAIAP, Serie B, N19, Maracay, Venezuela. 96 p.

RONDON, G. 1995. Principales enfermedades del mango en Venezuela y su control. En: Seminario Internacional y II Encuentro de Productores y Exportadores de Mango de Guatemala. Memoria. p. D1-D5.

RONDÓN, A. y Y. GUEVARA. 1995. El cultivo del Mango en Venezuela. Principales enfermedades y su control. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Fonaiap Divulga. N° 50. Maracay. pp. 20-21.

RONDÓN, O.; N. SANABRIA y A. RONDÓN. 2006. Control hidrotérmico de *Colletotricum gloeosporioides* Penz en mango (*Mangifera indica* L.). Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. (Costa Rica). 78: 76-79.

RONDÓN, O.; N. SANABRIA y A. RONDÓN. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. Revista Agronomía Tropical. 56 (2): 219-235.

RUDOLPH, K; M. ROY.; M. SASSER.; D. STEAD AND F. GOSSELE. 1990. Chapter 1.4 Isolation of Bacteria. In: Methods in Phytobacteriology. Edition by: Klement; Rudolph y Sands. Akadémia Kiadó. Budapest. Pp 45-86.

RYTTER, J.; F. LUKESIC.; R. CRAING. y G. MOORMAN. 1989. Control biológico de la Roya por *Bacillus subtilis*. Fitopatología 79(3): 367-369.

SAMSON, R., E. HOEKSTRA AND J. FRISSUAD. 1995. Introduction to food borne fungi. Central buream voor shimmeicultures. Netherlands. 322 p.

SANDOVAL, I.; M. LOPEZ.; T. BONILLA y Y. TOMAS. 1998. Hongos de suelo que atacan al clavel y antagonismo "*in vitro*" con *Trichoderma* spp. Fitosanidad. (La Habana) 2(3-4): 42-44.

SARMIENTO, A. 2009. Control biológico *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.) con el uso de *Trichoderma* sp. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay-Venezuela. 25p.

SCHAAD N.W. 2001. Initial Identification of common genera. In: Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. Edited by Schaad N.; Jones J.; Chun W. Third Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota. Pp 1-5.

SCHAAD, N.W.; J.B. JONES AND W. CHUN. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. 373 p.

SERGENT, E. 1999. El cultivo del mango. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas - Venezuela. 42 p.

SING, J. AND J. FAULL. 2000. Antagonism and biological control. In Biological of plant diseases. K.G. Mukerji and N: Gary (ed.). Florida, EEUU.CRC Press. Vol. II. pp 168-177.

SLEPECKY, A. AND H. HEMPHILL 1992. The Genus *Bacillus*—Nonmedical Cap. Pag. En The Prokaryotes 2a. Edición. Ed. Dworkin M, Schleifer KH y Stackebrandt, Springer Verlag, New York, EUA.

SOSA, A., V. PAZOS y M. GONZÁLEZ. 2006. Nuevos aislados de *Bacillus* spp. antagonistas a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*, Fitosanidad. (La Habana) 10(1):73-74

SOSA, A.; V. LÓPEZ,; G. RIVERA,; G. BORGES y E. 2001. Evaluación del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* cohn, mediante la actividad antagónica frente a *Rhizoctonia solani* kühn. Revista Fitosanidad. (La Habana). 15(11):45:49.

SOUSA, R. AND N. OLIVEIRA. 1998. *In vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp. Against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of antranoce in the passion fruit (*Passiflora* spp.). Boletín Mycologist 13:103-110.

SUÁREZ, C.; FERNÁNDEZ, R.; VALERO, N.; GÁMEZ, R.; y PÁEZ, A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá .Revista Colombiana de Biotecnología 10: 35-43.

SPADARO, O. AND M. GULLINO. 2004. State of the art and future prospect of the biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology 91:185-194.

STEFANOVA, M. y SANDOVAL I. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. En el control de hongos fitopatógenos de suelo. Boletín Técnico Nº 2. INISAV. La Habana Cuba. 22 p.

SUTTON, B. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfect with pycnidia, acervulo and stromata. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. 407p.

TORRES, L.; W. WONG,; A. MIGUEL,; A. FERNANDEZ y Z. AMAT. 2001. Actividad antagónica de especies de *Bacillus* spp contra *Rizhoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Revista Fitosanidad. (La Habana) 10 (1):12-17.

TRONSMO, A. AND L. GORDON. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. Boland, G.; kuykendall, L. D. Plant-microbe interactions and biological control. 2 ed. Marcel Dekker. 442p.

VEGA, P. 2001. Enfermedades del mango (*Mangifera indica*). En: enfermedades y normatividad de frutales del Pacífico. Centro-sur de México. Fuente e Ireta (Eds). Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C., Cd. Obregón, Sonora, México. pp. 49-61

VELÁSQUEZ, L. 2006. Diagnostico y alternativas de control de la antracnosis del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) en el sector monte oscuro del Municipio Tovar. Tesis de grado para optar al título de Magister *Scientiarum* en Agronomía, Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela Maracay-Venezuela. 85p.

WINDHAM, M.; T. ELAD AND R. BAKER. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76:518-521.

WISNIEWSKI, M. AND C. WILSON. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Recent advances. *HortScience* 27:94-98

YUEN, G.; M. SCHROTH AND A. MCCAIN. 1985. Reduction of Fusarium wilt of Carnation with suppressive and antagonistic bacteria. *Plant Disease* 69:1071-1075.

ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de varianza del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC) de *C. gloeosporioides* para el día 1 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	2	3438,57	1719,29	5,92	0,0074
Tratamiento	2	3438,57	1719,29	5,92	0,0074
Error	27	7836,96	290,26		
Total	29	11275,53			

CV 25,98. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 2. Análisis de varianza del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC) de *C. gloeosporioides* para el día 4 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	2	4120,58	2060,29	45,18	<0,0001
Tratamiento	2	4120,58	2060,29	45,18	<0,0001
Error	27	1231,13	45,60		
Total	29	5351,72			

CV 9,87. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 3. Análisis de varianza del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC) de *C. gloeosporioides* para el día 6 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	2	1614,36	807,18	55,71	<0,0001
Tratamiento	2	1614,36	807,18	55,71	<0,0001
Error	27	391,20	14,49		
Total	29	2005,56			

CV 4,83. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 4. Análisis de varianza del Porcentaje de Inhibición de Esporulación (PIE) de *C. gloeosporioides* para el día 6 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	2	1392,91	696,46	49,79	<0,0001
Tratamiento	2	1392,91	696,46	49,79	<0,0001
Error	27	377,68	13,99		
Total	29	1770,59			

CV 3,99. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 5. Análisis de varianza del Diámetro de la Mancha (DM) para el día 1 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	11	84,92	7,72	34,57	<0,0001
Tratamiento	5	84,08	16,82	75,30	<0,0001
Error	108	24,12	0,22		
Total	119	109,04			

CV 90,59. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 6. Análisis de varianza del Porcentaje de Avance de la Mancha para el día 1 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	11	4643,95	422,18	37,68	<0,0001
Tratamiento	5	4591,09	918,22	81,95	<0,0001
Error	108	1210,04	11,20		
Total	119	5853,99			

CV 86,93. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 7. Análisis de varianza del Diámetro de la Mancha (DM) para el día 4 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	11	752,61	68,42	128,54	<0,0001
Tratamiento	5	745,86	149,17	280,24	<0,0001
Error	108	57,49	0,53		
Total	119	810,09			

CV 36,06. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 8. Análisis de varianza del Porcentaje de Avance de la Mancha para el día 4 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	11	41402,36	3763,85	126,77	<0,0001
Tratamiento	5	40978,19	8195,64	276,04	<0,0001
Error	108	3206,47	29,69		
Total	119	44608,83			

CV 35,97. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 9. Análisis de varianza del Diámetro de la Mancha (DM) para el día 6 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	11	1985,18	180,47	170,23	<0,0001
Tratamiento	5	1899,21	379,84	358,29	<0,0001
Error	108	114,50	1,06		
Total	119	2099,68			

CV 31,67. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)

ANEXO 10. Análisis de varianza del Porcentaje del Avance de la Mancha para el día 6 de evaluación.

Fuente de variación	GdL	SC	CM	Fcal	Valor p
Modelo	11	101997,18	9272,47	162,30	<0,0001
Tratamiento	5	101778,71	20355,74	356,29	<0,0001
Error	108	6170,33	57,13		
Total	119	108167,52			

CV 31,40. Diferencias significativa ($p \leq 0,05$)