

Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del Mango, con *Trichoderma* spp., en Condiciones de Campo

Biocontrol of "Witches' Broom" Disease in Mango with *Trichoderma* spp., Under Field Conditions

Alejandro Casimiro Michel Aceves, Marco Antonio Otero Sánchez, Antonio Díaz Castro, Rubén Darío Martínez Rojero, Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Av. Vicente Guerrero No. 81, Colonia Centro, Iguala, Guerrero. CP 40000, México; Rafael Ariza Flores, Aristeo Barrios Ayala, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Guerrero), Campo Experimental Iguala. Carretera Iguala-Tuxpan km 2. Iguala, Guerrero, México. Correspondencia: amichelaceves@yahoo.com.mx

(Recibido: Agosto 31, 2012 Aceptado: Octubre 11, 2012)

Michel Aceves AC, Otero Sánchez MA, Díaz Castro A, Martínez Rojero RD, Ariza Flores R y Barrios Ayala A. 2013. Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del mango, con *Trichoderma* spp., en condiciones de campo. Revista Mexicana de Fitopatología 31: 1-12.

Resumen. Se evaluó la efectividad biológica en campo de *Trichoderma* spp., en el control de la “escoba de bruja” del mango ocasionada por *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans* en dos ciclos de producción en una huerta comercial de mango cv. “Haden” de 20 años de edad, en Tuxpan, Gro. Los tratamientos fueron: 1) *Trichoderma harzianum* cepa Thzn-2; 2) *T. harzianum* cepa Thzcf-12; 3) *T. lignorum*; 4) Benomilo; 5) Benzotiazol + Metileno bistiocionato y 6) testigo absoluto; se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar, con 5 repeticiones. Se realizaron ocho aspersiones aéreas, cada 15 d desde mediados de octubre. Las variables evaluadas fueron: 1) número de inflorescencias sanas y enfermas m² y por área de copa; 2), número total de frutos por árbol; 3), eficiencia productiva; y 4) severidad de la enfermedad. Se realizó un análisis de varianza, prueba de Tukey y contrastes ortogonales. *T. lignorum* y Thzn-2 presentaron la mayor cantidad de inflorescencias sanas, superando a los fungicidas químicos. La cantidad de frutos por árbol y la eficiencia productiva tendió a aumentar en el segundo año de evaluación en los tratamientos a base de *Trichoderma*. Con los dos años de evaluación consecutivos se comprobó que *Trichoderma* spp., es un buen agente de biocontrol. En particular, *Trichoderma harzianum* cepa Thzn-2 redujo la severidad en promedio 22.9 % comparado con el testigo.

Palabras clave adicionales: *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, control biológico.

La superficie mundial cultivada con mango (*Mangifera indica* L.) en el 2011 alcanzó un total de 5,092,802 ha, con una producción de 35,124,127 t. El principal productor a

Abstract. The biological effectiveness was evaluated in field of *Trichoderma* spp., in the control of mango "witch's broom" caused by *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans* in two production cycles in a commercial mango orchard of 20 years cv. "Haden", in Tuxpan, Gro. The treatments were: 1) *Trichoderma harzianum* strain Thzn-2; 2) *T. harzianum* strain Thzcf-12; 3) *T. lignorum*; 4) Benomyl; 5) Benzothiazole + Methylene bistiocyanate and 6) absolute witness; they were distributed at random in a design of complete blocks, with 5 repetitions. They were carried out eight air aspersions, every 15 d from about the middle of October. The evaluated variables were: number of inflorescences healthy and disease m² and total area, total number of fruits for tree, productive efficiency and disease severity. It was carried out a variance analysis, test of Tukey and orthogonal contrasts. *T. lignorum* and Thzn-2 presented the biggest quantity in healthy inflorescences, over coming to the chemical fungicides. The quantity of fruits for tree and the productive efficiency spread to increase in the second year evaluation in the treatments with the help of *Trichoderma*. With the two serial years of evaluation was proven that *Trichoderma* spp., is a good biocontrol agent for the disease. In particular, *Trichoderma harzianum* native strain Thzn-2 reduced the severity on the average 22.9 % compared with the witness.

Additional keywords: *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, biological control.

The total world area cultivated with mango (*Mangifera indica* L.) in 2011 reached 5,092,802 ha, with a total production of 35,124,127 tons. The main global producer was India with a share of 46.3 % (2,356,700 ha) and it was followed by China with 9.2 % (466,637 ha), these two countries accounted for over 55 % of worldwide production. Mexico ranks sixth position as a producer of this fruit, right behind India, China, Thailand, Indonesia and Pakistan (FAO, 2012). Mango production in Mexico occupies an important place in the fruit farm industry of the country, in

nivel mundial fue la India con una participación de 46.3 % (2,356,700 ha), seguida por China con un 9.2 % (466,637 ha). Estos dos países representan más de 55% de la producción. México ocupa el sexto lugar como productor de esta fruta, después de India, China, Tailandia, Indonesia y Pakistán (FAO, 2012). La producción de mango en México ocupa un lugar preponderante en la explotación frutícola del país. En 2011 se cosecharon 174,969.85 ha con un rendimiento de 1,632,649.34 t y un valor en miles de pesos de 4,347,697.77. Los principales estados productores fueron: Sinaloa, Chiapas, Guerrero, Nayarit, Veracruz y Michoacán, los cuales aportaron más del 60% de la producción nacional. El estado de Guerrero ocupa el tercer lugar a nivel nacional en la producción de mango. Las regiones productoras son: Costa grande, Costa chica, Tierra Caliente y Norte. En 2011 participó con una superficie cosechada de 24,658 ha y una producción de 13,473 t ha⁻¹ (SIAP, 2012). En la mayoría de las zonas productoras de mango en el mundo se presenta un problema fitosanitario denominado "escoba de bruja" (Kumar *et al.*, 1993), que en México se encuentra distribuida en todos los estados productores y puede reducir el 60 % o más del rendimiento. En casos de ataque severo, el daño puede considerarse del 100 % debido a que los árboles no producen fruta o ésta es abortada prematuramente por acción de la enfermedad. La región de Tierra Caliente y Norte son las más afectadas por la enfermedad y los cultivares Haden y criollo son los más susceptibles con una superficie de 2,804 ha (SIAP, 2012), donde provoca decrementos superiores al 60 % de la producción (Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Ha existido controversia sobre la etiología de la enfermedad; sin embargo, las investigaciones señalan consistentemente a los hongos *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*, como los agentes causales de la enfermedad (Bhatnagar y Beniwal, 1977; Freeman *et al.*, 1999 y 2000). Además, en fechas recientes se han reportado dos nuevas especies, una de las cuales ha sido reportada como *Fusarium mangiferae*, relacionada con cepas que fueron previamente identificadas como *F. subglutinans*, y la otra como *Fusarium sterilihyphosum*, aislada únicamente de tejido malformado en Sudáfrica (Britz *et al.*, 2002). Incluso, algunos trabajos ya señalan a *F. mangiferae* como agente causal de este problema (Iqbal *et al.*, 2006). Para la región norte del estado de Guerrero, Noriega-Cantú *et al.* (1999), reportan las especies *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Estos hongos se han tratado de controlar; sin embargo, no existe un método único que logre disminuirlos significativamente, por lo que se ha propuesto el manejo integrado que incluye: poda fitosanitaria, fertilización al suelo y follaje, aspersiones de fungicidas, acariciadas, reguladores de crecimiento y otros compuestos. El uso descontrolado de fungicidas provoca contaminación ambiental y resistencia (De Waard *et al.*, 1993), por lo que se buscan alternativas compatibles con el ambiente. El método biológico con *Trichoderma* spp., en condiciones *in vitro* puede ser exitoso (Michel-Aceves *et al.*, 2001, 2009). La efectividad para controlar un fitopatógeno *in vitro* e *in situ* por un antagonista puede variar en términos de adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas (Dennis y Webster 1971a y

2011, 174,969.85 ha were harvested with a yield of 1,632,649.34 tons and worth of \$4,347,697.77 Mexican pesos. The main producing states were: Sinaloa, Chiapas, Guerrero, Nayarit, Veracruz and Michoacan, which accounted for over 60 % of the national production. Guerrero state ranks third nationally in mango production, its main growing regions are: Costa Grande, Costa Chica, Tierra Caliente and Norte; during 2011 it contributed with a harvested area of 24,658 ha and a production of 13,473 t ha⁻¹ (SIAP, 2012). In most mango producing areas in Mexico and world wide, there is a phytosanitary problem known as "witches' broom" (Kumar *et al.*, 1993), which in Mexico is currently distributed in all producing states and in high incidence regions it can reduce up to 60 % or more of the yield, in cases of severe attack, the damage can be up to 100 % when the trees do not produce fruit or it is aborted prematurely because of the disease. Tierra Caliente and Norte regions are the most affected by the disease and Haden and Creole cultivars are the most susceptible with an area of 2,804 ha (SIAP, 2012), where it causes more than 60 % decreases in production (Noriega-Cantú *et al.*, 1999). There has been controversy about the etiology of the disease; however, researchers have shown consistently the presence of *Fusarium oxysporum* and *F. subglutinans* fungi as the causative agents of disease (Bhatnagar and Beniwal, 1977, Freeman *et al.*, 1999 and 2000). More over, recently two new species have been reported, *Fusarium mangiferae* (related to strains that were previously identified as *F. subglutinans*) and *Fusarium sterilihyphosum* (only isolated in malformed tissue in South Africa (Britz *et al.*, 2002)). Even some studies already point to *F. mangiferae* as the causal agent of this problem (Iqbal *et al.*, 2006). In the north region of Guerrero state, Noriega-Cantú *et al.* (1999) reported *Fusarium oxysporum* and *F. subglutinans* species. Although there have been several attempts to control these fungi, still there is no one single method that controls the disease by itself, but rather a series of steps that include: plant health pruning, soil and foliage fertilization, fungicides sprays, acaricides, growth regulators and other compounds; however, uncontrolled use of chemicals causes environmental pollution and resistance (De Waard *et al.*, 1993), therefore, there is a continuous search of environmentally friendly alternatives, where the biological *in vitro* method using *Trichoderma* spp. might be successful (Michel-Aceves *et al.*, 2001, 2009). Effectiveness in controlling a pathogen under *in vitro* and *in situ* conditions by an antagonist may vary in terms of adaptation to a specific biotic and abiotic environment (Dennis and Webster 1971a and b), for that reason it is important to know the types of antagonism of biocontrol fungi to implement a good control strategy. *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent is effective against foliar (Nelson, 1991) and soil (Papavizas, 1981, 1985) pathogens, because of its ability to infect, compete for nutrients or produce compounds which are antagonistic to a variety of fungi of the genus *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Mycosphaerella* and *Colletotrichum*, among others. Michel-Aceves *et al.* (2001, 2005a, 2005b, 2009) reported the *in vitro* antagonistic potential of native strains on the two

b) por tal motivo es importante el conocimiento de los tipos de antagonismo de hongos biocontroladores para implementar una buena estrategia de control. *Trichoderma* spp., como agente de biocontrol es eficaz contra fitopatógenos foliares (Nelson, 1991) y del suelo (Papavizas, 1981, 1985), por su capacidad de parasitar, competir por nutrientes o producir compuestos que resultan antagónicos para una gran variedad de hongos de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Mycosphaerella*, *Colletotrichum*, entre otros. Michel-Aceves *et al.* (2001, 2005a, 2005b, 2009) reportan el potencial antagónico *in vitro* de cepas nativas sobre las dos especies de *Fusarium* involucradas en la “escoba de bruja” del mango; sin embargo, se desconoce la efectividad que pueda ejercer en condiciones de campo, por lo que se requiere evaluar su potencial en huertos comerciales y utilizar más extensivamente el control biológico con agentes biocontroladores nativos. Considerando estos aspectos, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad que tiene *Trichoderma* spp., en el control de la enfermedad denominada “escoba de bruja” del mango, en dos años consecutivos de producción bajo condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La presente investigación se realizó durante 2009 y 2010 en una huerta comercial de mango var. Haden de 20 años de edad, ubicada en Tuxpan, Gro., de la región Norte del estado, localizada a 18° 27' LN y entre los 99° 42' LO a una altitud de 731 m. El clima predominante para esta zona, de acuerdo a la clasificación de Köpen modificado por García (1988), corresponde a: Awo (w) (i') g, clima cálido seco, el más seco de los subhúmedos con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 37 °C de abril a septiembre y temperatura promedio de octubre a marzo de 23 °C y una precipitación promedio anual de 960 mm. La dirección de los vientos son de la siguiente manera: En primavera de sur a norte; en invierno de suroeste al sureste; en verano de norte a sur y en otoño de sur a norte (Centro Nacional de Estudios Municipales, 1987; INEGI, 2005).

Microorganismos evaluados. Se utilizó la cepa Thzn-2 (*T. harzianum*), del cepario del Laboratorio de Fitopatología del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, la cual se aisló del suelo de ésta misma huerta de mango y en el trabajo *in vitro* realizado por Michel-Aceves *et al.* (2009), fue la cepa que inhibió significativamente el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*; la cepa Thzcf-12 (*T. harzianum*), del cepario del laboratorio de control biológico de la Universidad de Colima, la cual se aisló en Armería, Colima y en el trabajo *in vitro* realizado por Michel-Aceves *et al.* (2005a y b), presentó efecto inhibitorio sobresaliente del crecimiento micelial sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. La cepa *T. lignorum*, se obtuvo a partir del producto comercial MYCOBAC® (Laboratorios Buckman, S.A. de C.V.) a una concentración de 2×10^7 conidios viables g⁻¹, según su etiqueta y recomendación.

Fusarium species involved in the mango "witches' broom"; however, their effectiveness under field conditions is unknown, the refore, it is necessary to evaluate their potential in commercial orchards and to use more extensively the biological control with native biocontrol agents more antagonistic than those that currently exist. Considering these aspects, the aim of this study was to evaluate *Trichoderma* spp., effectiveness in controlling mango "witches' broom" disease, in two consecutive production years under field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Study area. This research was carried out during 2009 and 2010 in a mango commercial orchard var. Haden of 20 years old, located in Tuxpan, Gro. (northern region of the state) at 18° 27' LN and 99° 42' LW; and 731 m altitude, the predominant climate for this area, according to Köpen classification modified by García (1988), corresponds to: Awo (w) (i') g, dry warm climate, the driest of the subhumids with summer rains, 37 °C average annual temperature from April to September, 23 °C average temperature from October to March and 960 mm average annual rain fall. The wind directions are as follows: In spring from south to north; in winter from south west to south east; in summer from north to south and during autumn from south to north (National Centre for Municipal Studies, 1987, INEGI, 2005).

Microorganisms evaluated. Thzn-2 (*T. harzianum*) strain was used from the strain collection of the Laboratory of Plant Pathology of the Agricultural College of the State of Guerrero, which was isolated from soil of this same mango orchard and from the *in vitro* work conducted by Michel-Aceves *et al.* (2009), as this was the strain that significantly inhibited mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. subglutinans*; Thzcf-12 (*T. harzianum*) strain, from the strain collection of biological control laboratory of the University of Colima, which was isolated in Armería, Colima, and in the *in vitro* work conducted by Michel-Aceves *et al.* (2005a and b), which showed a remarkable inhibitory effect on mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. subglutinans*. *T. lignorum* strain was obtained from MYCOBAC® commercial product (Buckman Laboratories, Inc.) at a concentration of 2×10^7 viable conidia g⁻¹, according to its label and recommendation.

Treatments and experimental design. *Trichoderma* genus was evaluated with three strains and two different species: native Thzn-2 (*T. harzianum*); Thzcf-12 (*T. harzianum*); commercial strain (*T. lignorum*, Mycobac®), two synthetic fungicides: Benomyl (BENLATE®) and Benzothiazole + Metylene bis-thiocyanate (BUSAN®) and the absolute control without any application of products, generating 6 treatments (Table 1), which were evaluated in two consecutive production cycles. The experimental design used was randomized complete block with five replicates, the experimental unit consisted of a mango tree 20 years old during floral differentiation stage. The eight applications of synthetic and biological products were directly applied to foliage and buds and they began one month before flowering (October 15) until the fruit set

Tratamientos y diseño experimental. Se evaluó el género *Trichoderma* con tres cepas y dos especies diferentes: Thzn-2 nativa (*T. harzianum*); Thzcf-12 (*T. harzianum*); cepa comercial (*T. lignorum*, i.a. del Mycobac®), dos fungicidas sintéticos Benomilo (BENLATE®) y Benzotiazol + Metilen bisticioanato (BUSAN®) y el testigo absoluto sin aplicación de productos, generándose 6 tratamientos (Cuadro 1), los cuales se evaluaron en dos ciclos de producción consecutivos. El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con cinco repeticiones, la unidad experimental estuvo formada por un árbol de mango de 20 años de edad y en etapa de diferenciación floral. Las ocho aplicaciones de los productos sintéticos y biológicos fueron al follaje y brotes, se iniciaron un mes antes de la floración (15 de Octubre) hasta el amarre del fruto (15 febrero), se realizaron cada 15 d, con una bomba aspersora de motor tipo parihuela (Swissmex-Rapid S.A. de C.V. México), con una capacidad de 100 L de agua; en todos los tratamientos se utilizó como coadyuvante y estabilizador del pH al producto AGREX-ABC® a una dosis de 2 mL L⁻¹. Los árboles se bañaban perfectamente con los productos sintéticos y biológicos hasta que empezaban a escurrir al suelo los productos.

Reproducción de *Trichodermas* nativos: Las cepas Thzn-2 y Thzcf-12 se reprodujeron en el laboratorio, para lo

(February 15), the applications were carried out every 15 d with a motor spray pump (litter type, Swissmex-Rapid SA de CV Mexico) of 100 liters capacity; in all treatments, an adjunct and pH stabilizer was used (AGREX-ABC®, 2 mL L⁻¹). The trees were completely covered with synthetic and biological products until the products drained to the ground.

Native *Trichodermas* reproduction. Thzn-2 and Thzcf-12 strains were reproduced in the laboratory, for this purpose small pieces (± 1.0 cm) of corn cobs as a substrate were used, which was previously washed and immersed for 45 min in a container with distilled water and the antibiotic chloramphenicol at a concentration of 500 ppm. After this time, the substrate was placed in a mesh to remove excess water by placing 300 g of substrate in polystyrene bags (23 x 33 cm), then they were tied and lastly autoclave sterilized for 30 min. Once the bags were cooled they were inoculated with 5 mL of a spore suspension at a concentration of 1×10^3 and incubated under laboratory conditions $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 40 % relative humidity and 12 h light / dark. Spore harvesting was done after 21 d of inoculation, adding 500 mL of sterile distilled water to each substrate bag in order to detach from the cob as many spores as possible and obtain a concentrated suspension (Arzate-Vega *et al.*, 2006). In the Neubauer Hematimetic chamber (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Island, NY) the spore concentration was counted and it was adjusted to 1×10^8

Cuadro 1. Tratamientos y dosis utilizadas en el control de la "Escoba de Bruja" del mango, Tuxpan, Gro., ciclo productivo 2009 y 2010.

Table 1. Treatments and doses used in the control of the mango "Witches' Broom" disease, Tuxpan, Gro., 2009 and 2010 production cycles.

No.	Tratamientos	Dosis (100 L ⁻¹)
1	<i>T. harzianum</i> , cepa Thzn-2	1×10^8
2	<i>T. harzianum</i> , cepa Thzcf-12	1×10^8
3	<i>T. lignorum</i> (MYCOBAC®)	2×10^7
4	Benomilo (BENLATE®)	150 g ^z
5	Benzotiazol + Metilen bisticioanato (BUSAN®)	200 mL ^z
6	Testigo absoluto	Sin aplicación

^zProducto comercial.

cual se utilizó trozos pequeños (± 1.0 cm) de olote de maíz como sustrato, el cual fue previamente lavado y sumergido por 45 min en un recipiente con agua destilada y el antibiótico cloranfenicol a una concentración de 500 ppm. Después de este tiempo, el sustrato se depositó en una malla para eliminar el exceso de agua, colocando 300 g de sustrato en bolsas de poliestireno de 23 x 33 cm, fueron amarradas con liga y se procedió a su esterilización en autoclave por 30 min. Una vez frías las bolsas se inocularon con 5 mL de una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^3 e incubaron en condiciones de laboratorio $25^\circ\text{C} \pm 1$, 40 % de humedad relativa y 12 h luz/oscuridad. La cosecha de esporas se realizó a los 21 d después de haber inoculado, agregando a cada bolsa de sustrato 500 mL de agua destilada estéril, con la finalidad de desprender del olote la mayor

spore mL. The 1×10^8 concentration is optimal to have good biocontrol (Arzate-Vega *et al.*, 2006). The commercial strain (*T. lignorum*, Mycobac®) has a 2×10^7 concentration, which is lower; however, it is recommended by the manufacturer.

Agricultural management of the experimental lot. It is important to mention that this commercial orchard has no appropriate agronomic management, no chemical fertilizer application, minimum pests, diseases and weeds control and phytosanitary pruning are not performed. Therefore, in order to standardize the experimental lots, a management of the experimental lot was carried out a month before flowering which consisted of: A light pruning to remove plant inflorescences and vegetative branches affected by the "witches' broom" disease; a mechanized

cantidad de esporas y obtener una suspensión concentrada (Arzate-Vega *et al.*, 2006). En la cámara hematimétrica de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Islan, NY) se contabilizó la concentración de esporas y se ajustó a 1×10^8 esporas mL^{-1} . La concentración de 1×10^8 es óptima para ejercer un buen biocontrol (Arzate-Vega *et al.*, 2006). La cepa comercial (*T. lignorum*, i.a. del Mycobac®) viene a 2×10^7 que es una concentración menor; sin embargo, es la que recomienda la casa comercial.

Manejo Agronómico de lote experimental. La huerta comercial no tuvo un manejo agronómico adecuado; no hubo aplicación de fertilizante químico; tuvo escaso control de plagas, enfermedades y malezas no se realizaron podas fitosanitarias. Con la finalidad de uniformizar las unidades experimentales se realizó un manejo del lote experimental un mes antes de la floración que consistió en: Una ligera poda fitosanitaria para eliminar inflorescencias y ramas vegetativas afectadas por la “escoba de bruja”; control de malezas mecanizado mediante dos pasos de rastra; dos riegos, uno al amarre del fruto (15 de enero) y el otro 15 d después, para promover mejor amarre y desarrollo del fruto que son etapas críticas en la producción de mango; no se aplicó fertilizante químico, solo se incorporó materia orgánica (estiércol de bovino seco) a dosis de 10 kg árbol^{-1} ; no se utilizó ningún producto insecticida-acaricida o fungicida; y finalmente la cosecha se realizó a finales de mayo a principios de julio de cada año.

Variables de estudio: Número de inflorescencias sanas y enfermas por m^2 y totales. Para contabilizar las inflorescencias se utilizó un aro de 0.64 m^2 ; la copa del árbol se dividió en cuadrantes orientados a cada punto cardinal (N, S, E y O) el aro se colocaba sobre el árbol en cada punto cardinal y se contaban las inflorescencias sanas y enfermas (malformación floral) ubicadas dentro del aro. Finalmente se realizó el cálculo del área de la copa/ m^2 , para lo cual se midió el diámetro de copa de cada árbol con ayuda de una cinta métrica, esta se tomó de la sombra proyectada por el sol en el suelo a las 12:00 h, midiendo la parte más larga de la sombra y otra de la parte más angosta de la copa proyectada, obteniendo al final una media del diámetro en cada árbol muestreado; para estimar el número de inflorescencias sanas y enfermas por árbol se utilizó la siguiente fórmula: $(\pi \cdot r^2)$ y realizando los cálculos con reglas de tres para estimar el número por metro cuadrado y por área de copa de las inflorescencias (Westwood, 1982). Número total de frutos por árbol. En el momento de la cosecha se contaron todos los frutos por árbol. Eficiencia Productiva se midió en base al área transversal del tronco. Esta es la mejor forma para evaluar el efecto real de los tratamientos, ya que cada árbol es diferente a otro ya sea en vigor, tamaño de la copa, grosor, entre otros (Westwood, 1982). Para esto se midió la periferia del área del tronco en metros y se estimó el total de frutos en kilogramos producidos por biomasa utilizando la siguiente fórmula:

$$EP = \text{kg}/\text{árbol}/\text{ATT}$$

donde; EP = Eficiencia productiva, ATT = Área transversal del tronco en m^2 ($\pi \cdot r^2$). La periferia del área del tronco se midió con la ayuda de una cinta métrica a 0.50 m de la base

weed control by two dredge steps; two irrigations, first at fruit set (January 15th) and the other one 15 d later to promote a better set and fruit development which are critical stages in mango production; chemical fertilizer was not applied, only organic matter (dry cattle manure) was incorporated at 10 kg tree^{-1} doses; insecticides- acaricides or fungicides were not used, and finally the harvest took place in late May to early July each year.

Study variables: number of healthy and diseased inflorescences per m^2 and totals. In order to account for inflorescences, a ring of 0.64 m^2 was used; the tree crown was divided into quadrants facing each cardinal point (N, S, E and W), the ring was placed on the tree in each cardinal point and healthy and diseased (floral malformation) inflorescences located inside the ring were counted. Lastly, crown area / m^2 calculations were done and for this purpose the diameter of each tree crown was measured using a measuring tape, and this was taken from the shade projected by the sun on the ground at 12:00 h by measuring the longest part of the shade and the narrowest part of the crown projected, obtaining a mean diameter for each sampled tree; in order to estimate the number of healthy and diseased inflorescences per tree, the following formula was used: $(\pi \cdot r^2)$ and doing calculations with rules of three to estimate the number per square meter and per crown area of the inflorescences (Westwood, 1982).

Total number of fruits per tree. At harvest time all fruits per tree were counted.

Productive Efficiency. This is measured based on trunk's transversal area, as it is the best way to evaluate the actual effect of the treatments, as each tree is different to another either in force, crown size, thickness, etc. (Westwood, 1982). For this purpose, the periphery of trunk area in meters was measured, and the total number of fruits was estimated in kilograms produced by biomass using the following formula:

$$EP = \text{kg}/\text{tree}/\text{TCA}$$

Where: PE = Productive efficiency, TCA = Trunk Cross-sectional Area in m^2 ($\pi \cdot r^2$). The periphery of the trunk area was measured with the help of a measuring tape at 0.50 m above ground level (Westwood, 1982).

Disease severity. This was measured based on the total number of healthy and diseased inflorescences by the crown area of each tree, it was expressed in percentage.

Statistical analysis. The data obtained for each of the tests were subjected to variance analysis (ANOVA) and Tukey multiple range test ($P = 0.05$) and orthogonal contrasts with SAS statistical software (1999). In the case of the data in percentages, before being submitted to ANOVA and Tukey test underwent an $\sqrt{0.5}$ angular transformation.

RESULTS AND DISCUSSION

The evaluation under field conditions considering two production cycles allowed a more accurately assessment of *Trichoderma* spp., biological effectiveness and control capacity on *F. oxysporum* and *F. subglutinans*, the causal agents of mango witches' broom disease.

Number of healthy and diseased inflorescences

del suelo (Westwood, 1982).

Severidad de la enfermedad. Se midió en base al número total de inflorescencias sanas y enfermas por el área de copa de cada árbol, se expresó en porcentaje.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de rangos múltiples de Tukey (P 0.05) y contrastes ortogonales, con el paquete estadístico SAS (1999). En el caso de los datos en porcentajes, antes de someterlos al ANVA y prueba de Tukey, se les realizó la transformación angular de $\sqrt{0.5}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación bajo condiciones de campo considerando dos ciclos de producción permitió valorar con mayor precisión la efectividad biológica y la capacidad de control que tiene *Trichoderma* spp., sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, agentes causales de la escoba de bruja del mango.

Número de inflorescencias sanas y enfermas por m² y totales. El ANVA detectó diferencias significativas para el número de inflorescencias sanas m² para el punto cardinal "Este" y total (Cuadro 2), donde los tratamientos biológicos: *T. lignorum*, Thzn-2, y Thzcf-12 con medias de 4.36, 4.19 y 3.46 respectivamente, obtuvieron la mayor cantidad, superando a los fungicidas químicos Benzotiazol + Mutilen bisticioanato, Benomilo y testigo con medias de 1.95, 1.77 y 1.55 inflorescencias sanas m². Comportamiento similar se observó en el total.

En relación al número de inflorescencia enfermas m², el ANVA no detectó diferencias significativas; sin embargo, se observó un comportamiento importante por punto cardinal ya que el número de inflorescencias enfermas está fuertemente influenciado por la dirección y velocidad del viento; según trabajos de Noriega-Cantú *et al.* (1999), la temperatura del aire y humedad relativa también son un factor importante; Mora *et al.* (2003), en un estudio realizado en el Valle de Apatzingán, Michoacán, indican que la mayor incidencia de la enfermedad está correlacionada

per m² and totals. ANOVA detected significant differences for the number of healthy inflorescences m² for the "East" cardinal point and total (Table 2), where the biological treatments: *T. lignorum*, Thzn-2 and Thzcf-12 with averages of 4.36, 4.19 and 3.46 respectively, showed the highest amounts, even higher than the Benzothiazole + Methylene bistiocyanate chemical fungicides, Benomyl and control with averages of 1.95, 1.77 and 1.55 healthy inflorescences m². Similar behavior was observed in the total.

In relation to the number of diseased inflorescences m², ANOVA did not detect significant differences; however, there was an important behavior by cardinal point as the number of diseased inflorescences was strongly influenced by the wind direction and speed; according to Noriega-Cantú *et al.* (1999) reports, the air temperature and relative humidity are also important factors; Mora *et al.* (2003), in a study carried out in Apatzingan Valley, Michoacan, reported that the highest incidence of the disease was correlated with inoculum density, temperature from 20 to 26.9 °C, relative humidity higher than 90 %, wind speed less than 10 km h⁻¹ towards north. In general, in this research, the highest number of diseased inflorescences was found towards North direction 2.74 m² and East 2.45 m², in contrast with the South which had an average of 2.36 m². Data from the National Center for Municipal Studies (1987) indicate that the wind direction in winter is from Southwest to Southeast which coincides with the flowering months (November to March) and with the presence of most inoculum reported for the north of Guerrero area (Mora *et al.*, 1998). The negative statistical significance can be explained in terms of the heterogeneity of the treatments; however, considering the numerical values where Thzn-2 was applied, the number of diseased inflorescences remained below the overall average and together with the other *Trichoderma* strains, a trend towards lower numerical values was observed.

Having the highest number of healthy inflorescences per total crown area involves preventative effect of the products used as the application started before flowering. In the two years average, ANOVA detected significant

Cuadro 2. Número de inflorescencias sanas y enfermas por m² del área de copa orientadas en cada punto cardinal (promedio de dos años).

Table 2. Number of healthy and diseased inflorescences per m² of the tree crown facing each cardinal point (average of two years).

Tratamiento	Norte		Sur		Este		Oeste		Total	
	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo
Thzn-2	4.02	2.03	3.93	1.75	4.19 a ^z	2.45	2.37	2.01	14.51 a ^z	8.24
Thzcf-12	2.52	2.31	1.83	2.76	3.46 a	2.50	2.74	2.00	10.55 a	9.57
MYCOBAC®	3.49	3.38	3.78	2.09	4.36 a	1.29	4.53	2.50	16.16 a	9.26
BENLATE®	2.79	2.21	1.27	2.01	1.77 b	2.48	2.59	2.59	8.42 b	9.29
BUSAN®	1.97	2.29	3.06	2.26	1.95 b	2.73	1.90	3.03	8.88 b	10.31
Testigo	2.72	4.23	2.19	3.27	1.56 b	3.23	3.36	2.37	9.83 b	13.10
Total	17.51	16.45	16.06	14.14	17.29	14.68	17.49	14.50	68.35	59.77
Promedio	2.92	2.74	2.68	2.36	2.88	2.45	2.92	2.42	11.39	9.97

^zMedias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05)

con la densidad de inóculo, temperatura de 20 a 26.9 °C, humedad relativa mayor de 90 %, velocidad del viento menor a 10 km h⁻¹ y dirección norte. De manera general en esta investigación el mayor número de inflorescencias enfermas se encontraron en dirección del Norte 2.74 m⁻² y Este 2.45 m⁻², en contraste con el Sur en el que se presentó un promedio de 2.36 m⁻². Los datos del Centro Nacional de Estudios Municipales (1987) indican que la dirección del viento en invierno es de Suroeste al Sureste lo cual coincide con los meses de floración (Noviembre a Marzo) y presencia de mayor inóculo reportados para la zona Norte de Guerrero (Mora *et al.*, 1998). La no significancia estadística puede explicarse en función de la heterogeneidad de los tratamientos; sin embargo, considerando los valores numéricos donde se aplicó Thzn-2 el número de inflorescencias enfermas se mantuvo por debajo del promedio general y junto con las otras cepas de *Trichoderma* se observó una tendencia a presentar valores numéricos menores.

El tener mayor número de inflorescencias sanas por el área total de copa implica efecto preventivo de los productos utilizados dado que se comenzó la aplicación antes del inicio de floración. En el promedio de dos años, el ANVA detectó diferencias significativas para el contraste de los tratamientos biológicos a base de *Trichoderma* contra los tratamientos químicos (Cuadro 3); teniendo así que los mejores tratamientos fueron Thzn-2, Thzcf-12 y Mycobac®, con promedios de 473.99, 438.62 y 411.37 inflorescencias sanas por el área total de la copa, respectivamente; superó al testigo y a los químicos Benomilo y Benzotiazol + Metilene bistiocianato con medias de 367.34, 347.69 y 276.60, respectivamente. Estos datos son superiores a los obtenidos por Díaz-Balderas (2002), quien evaluó en condiciones de campo en Puente de Ixtla, Morelos, el benomilo para el control de la enfermedad y obtuvo 240 (44.1 %) inflorescencias sanas y 75 enfermas (24.1 %). Cabe mencionar que en el primer año de evaluación se obtuvo en promedio mayor número de inflorescencias sanas por área de copa (495.12) que en el segundo año, esto refleja la alternancia de la producción en

differences for the contrast of biological treatments based on *Trichoderma* against chemical treatments (Table 3); therefore, the best treatments were Thzn-2, Thzcf-12 and Mycobac®, with averages of 473.99, 438.62 and 411.37 of healthy inflorescences per total crown area, respectively; it also exceeded the control and the chemicals Benomyl and Benzothiazole + Metilene bis-thiocyanate with averages of 367.34, 347.69 and 276.60, respectively. These data are higher than those obtained by Díaz-Balderas (2002), who evaluated Benomyl under field conditions (Puente de Ixtla, Morelos) for control disease and they obtained 240 (44.1 %) healthy and 75 diseased inflorescences (24.1 %). It is important to mention that during the first year of evaluation, in average, it was obtained the highest number of healthy inflorescences per crown area (495.12) than in the second year, this reflects the alternation in production of this fruit.

In diseased inflorescences per total crown area, there were no statistically significant differences (Table 3); however, many treatments are reported with a control, Benomyl and Benzothiazole + Metilene bis-thiocyanate with averages of inflorescences of 373.50, 294.42 and 292.51, respectively; while the lowest amount obtained was with Thzn-2, Mycobac® and Thzcf-12, with inflorescences values of 198.78, 217.76 and 250.00, respectively; and observing that biological treatments reduced the number of diseased inflorescences.

In this sense, in order to prevent damage from diseases, including anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) and mildew (*Oidium mangiferae*), which are two of the major diseases together with witches broom, Vázquez-Valdivia (2009b) recommends three preventive applications, first with Captan W 50 % at a dose of 2 g L⁻¹ of water during flowering, and the second and third with Benomyl 50 % at a dose of 1 g L⁻¹.

Total number of fruits. All treatments were statistically equal during the first and second year; however, in the two years average, ANOVA detected significant differences, highlighting the native strain Thzn-2 with the highest number of fruits per tree (393.8), followed by *T. lignorum*, control and Thzcf-12 strain with averages of

Cuadro 3. Número de inflorescencias sanas y enfermas por área de copa promedio y por año.
Table 3. Number of healthy and diseased inflorescences per tree crown area per year.

Tratamiento	Ifs1	Ifs2	IfsX	Ife1	Ife2	IfeX
Thzn-2	584.59	363.39	473.99 a ^z	226.38	171.17	198.78
Thzcf-12	639.58	237.66	438.62 ab	272.44	227.55	250.00
MYCOBAC®	382.51	440.23	411.37 ab	260.18	175.33	217.76
BENLATE®	499.61	195.77	347.69 ab	374.97	213.87	294.42
BUSAN®	354.38	198.82	276.60 b	308.99	276.02	292.51
Testigo	510.07	224.60	367.34 ab	472.54	274.45	373.50
Promedio	495.12	276.74	385.94	319.25	223.07	271.16

^zMedias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey0.05)

Ifs1 = Inflorescencias sanas año 1; Ifs2 = Inflorescencias sanas año 2; IfsX = Inflorescencias sanas promedio

Ife1 = Inflorescencias enfermas año 1; Ife2 = Inflorescencias enfermas año 2; IfeX = Inflorescencias enfermas promedio

este frutal.

En las inflorescencias enfermas por área total de copa, no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Cuadro 3); sin embargo, la mayor cantidad se reporta con los tratamientos Testigo, Benomilo y Benzotiazol + Metileno bisticianato con medias de 373.50, 294.42 y 292.51 inflorescencias, mientras que la menor cantidad con Thzn-2, Mycobac® y Thzcf-12, con valores de 198.78; 217.76 y 250.00 inflorescencias, respectivamente; observándose que los tratamientos biológicos han reducido la cantidad de inflorescencias enfermas.

En este sentido, para evitar daños por enfermedades, entre ellas antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y cenicilla (*Oidium mangiferae*), que son dos de las enfermedades de importancia y escoba de bruja, Vázquez-Valdivia (2009b) recomienda realizar tres aplicaciones preventivas, la primera con Captan W 50 % en dosis de 2 g L⁻¹ de agua durante la floración y la segunda y tercera con Benomil 50 % en dosis de 1 g L⁻¹.

Número total de frutos. Todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales en el primer y segundo año; sin embargo, en promedio de los dos años el ANVA detectó diferencias significativas, sobresaliendo la cepa nativa Thzn-2 con la mayor cantidad de frutos por árbol con un promedio de 393.8 frutos seguido *T. lignorum*, testigo y cepa Thzcf-12 con un promedio de 332.5, 324.7 y 311.8 frutos por árbol (Cuadro 4).

En el primer año de aplicación se obtuvo promedio general de 278.7 frutos, donde el testigo obtuvo el menor número (219.2) y la cepa Thzn-2 el mayor número con 386.6. En el segundo año el promedio fue mayor con 347.8 frutos, donde el testigo obtuvo el 430.1 y el fungicida Benzotiazol + Metileno bisticianato el menor número con 248.8 frutos; todo esto nos indica que la aplicación de *Trichoderma* podría favorecer las condiciones del suelo y logra mantener un equilibrio ya que a partir de la aplicación de *Trichoderma* se ha aumentado la cantidad de frutos por árbol. Aún cuando las aplicaciones fueron a la parte aérea (follaje y brotes), se bañó completamente cada árbol hasta que escurriera al suelo, por lo que indirectamente se aplicó también al suelo. A pesar de ello, la producción tiende a

332.5, 324.7 and 311.8 fruits per tree (Table 4).

In the first year of application an overall average of 278.7 fruits was obtained, where the control had the lowest number (219.2) and Thzn-2 strain had the highest number 386.6). During the second year, the average was higher with 347.8 fruits, where the control obtained the 430.1 and the fungicide Benzothiazole + Methylene bis-thiocyanate the lowest number of fruits (248.8); these results showed that *Trichoderma* application might favor soil conditions and help maintain an equilibrium, as its application increased the number of fruits per tree. Even when the applications were directly done to the aerial part (leaves and shoots), each tree was completely covered until it drained to the soil, thus indirectly it was also applied to the soil. Never theless, the production tends to increase in all treatments and the biological out number the chemical treatments, showing that a constant application restores the native and nonnative antagonists of the disease and there is a tendency to increase the production when biological antagonists are used.

In this regard, Vázquez-Valdivia *et al.* (2009a and b) reported that with a good management, by pruning and preventive applications of fungicides (tribasic copper sulfate, Captan and Benomyl), during flowering and fruit development, it helps to get good productions. In this work, the eight applications done were preventive because they started since the floral differentiation, fruit set and then fruit development, therefore, production increased from one year to another.

In general, in order to reduce witches' broom disease, INIFAP recommends to have a good orchard management, including irrigation, fertilization, weed control, pest and floral induction among others; as well as pruning and burning diseased branches and monthly application of fungicides (during seven months) such as Benomyl, wettable sulfur and tribasic copper sulfate after pruning (Munro-Olmos, 2008). In this study, more applications than recommended were done and in shorter intervals (every two weeks), protecting since the floral differentiation up to the fruit development, with satisfactory results as performance increased.

Productive Efficiency. There were no statistically

Cuadro 4. Número de frutos, eficiencia productiva y severidad de la enfermedad promedio y por año.

Table 4. Number of fruits, production efficiency, average disease severity and year.

Treatment	Fr1	Fr2	FrX	E P1	E P2	E PX	%S E1	%S E2	%S EX
Thzn-2	386.6	411.2	393.8 a ^z	70.6	135.0	102.8	33.4	26.6	30.0 b ^z
Thzcf-12	297.3	326.2	311.8 ab	30.9	89.3	60.1	38.1	47.5	42.8 ab
MYCOBAC®	291.5	373.6	332.5 ab	74.7	112.7	93.7	45.3	33.9	39.6 ab
BENLATE®	256.2	296.9	276.6 b	55.2	95.4	75.3	53.3	61.1	57.2 a
BUSAN®	221.4	248.8	235.1 b	48.6	117.7	83.2	47.2	48.7	48.0 ab
Testigo	219.2	430.1	324.7 ab	30.7	121.0	75.9	47.1	58.6	52.9 a
Promedio	278.7	347.8	312.4	51.80	111.9	81.8	44.1	46.1	45.1

^zMedias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey0.05)

Fr1 = Número de frutos año 1; Fr2 = Número de frutos año2; FrX = Número de frutos promedio

E P1= Eficienciaproductiva año 1; E P2 = Eficiencia productiva año 2; E PX = Eficiencia productiva promedio

%S E1 = Porcentaje enfermedad año1; %S E2 = Porcentaje enfermedad año 2; %S EX = Porcentaje enfermedad promedio

aumentar en todos los tratamientos y los biológicos superan a los químicos, esto indica que una constante aplicación reestablece a los antagonistas nativos y no nativos de la enfermedad y se observa una tendencia a incrementar la producción cuando se protege con los biológicos antagonistas.

Al respecto, Vázquez-Valdivia *et al.* (2009a y b) indican que con un buen manejo, mediante podas y aplicaciones preventivas de fungicidas (sulfato tribásico de cobre, captan y benomilo), durante floración y desarrollo del fruto, se contribuye a obtener buena producción. Las ocho aplicaciones que realizamos fueron preventivas porque iniciaron desde la diferenciación floral, amarre y desarrollo de fruto, por lo que lograron incrementar la producción de un año al otro.

En general, el INIFAP recomienda para disminuir la presencia de escoba de bruja, hacer un buen manejo de la huerta, que incluya riegos, fertilización, control de malezas, plagas e inducción floral entre otros aspectos. Además de podar y quemar las ramas enfermas y la aplicación mensual por siete meses de fungicidas como el benomilo, azufre humectable y sulfato de cobre tribásico después de la poda (Munro-Olmos, 2008). En este sentido, nosotros realizamos más aplicaciones que las recomendadas, solo que en un intervalo más corto (cada quince días), protegiendo desde la diferenciación floral hasta el desarrollo del fruto, con resultados satisfactorios al incrementar rendimiento.

Eficiencia Productiva. No existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos; sin embargo, en el primer año los que mostraron una mayor eficiencia productiva fueron *T. lignorum* con 74.7 kg m² y Thzn-2 con 70.6 kg m² (Cuadro 4), en contraste con los tratamientos que mostraron menor eficiencia productiva que fue el testigo y la cepa Thzcf-12 con 30.9 y 30.7 kg m², respectivamente. En el segundo año, a pesar de que también no existieron diferencias estadísticas significativas, la eficiencia productiva mejoró con respecto al año anterior y los valores cambiaron, donde la cepa Thzn-2 obtuvo la mayor eficiencia productiva con 135 kg m² y la menor fue la cepa Thzcf-12 con 89.3 kg m².

En los dos años de evaluación no hubo diferencias estadísticas significativas, pero dos de los tratamientos biológicos superaron a los químicos y al testigo. Las medias de la eficiencia productiva promedio de los dos años muestran diferencias numéricas; los tratamientos que mostraron mayor aumento por unidad de área transversal del tronco fue *T. harzianum* cepa nativa Thzn-2 con 102.8 kg m² y *T. lignorum* con 93.7 kg m² mientras que los tratamientos que mostraron la menor eficiencia que fue *T. harzianum* cepa Thzcf-12 con 60.1 kg m² y Benomilo con 75.3 kg m² (Cuadro 4).

La cepa nativa Thzn-2 se restableció en su nicho según se incrementó su población, ya que para el primer año, *T. lignorum* tenía la mayor eficiencia productiva con 74.7 kg m² y para el promedio de dos años la cepa nativa Thzn-2 fue la que logró la mayor eficiencia productiva, esto se debe a que está mejor adaptada a las condiciones del ambiente de la huerta y se manifiesta en su efecto benéfico (Nelson, 1991; Arzate-Vega *et al.*, 2006).

significant differences between treatments; however, during the first year those that showed increased productive efficiency: were *T. lignorum* with 74.7 kg m² and Thzn-2 with 70.6 kg m² (Table 4), compared with the treatments that had the production efficiency: control and Thzcf-12 strain with 30.9 and 30.7 kg m², respectively. During the second year, although there were no statistically significant differences, productive efficiency improved from the previous year and values changed (Thzn-2 strain had the highest productive efficiency with 135 kg m² and the lowest was the Thzcf-12 strain with 89.3 kg m²).

In the two years of evaluation there were nonstatistically significant differences, but two of the biological treatments out performed chemicals and to the control. The mean average of production efficiency for the two years showed numerical differences; the treatments that showed higher increase per cross-sectional area unit of the trunk was *T. harzianum* native strain Thzn-2 with 102.8 kg m² and *T. lignorum* with 93.7 kg m², while the treatments that showed the lowest efficiency were *T. harzianum* Thzcf-12 strain with 60.1 kg m² and Benomyl with 75.3 kg m² (Table 4).

The Thzn-2 native strain was restored as its population increased, as during the first year, *T. lignorum* had the highest productive efficiency with 74.7 kg m² and for the two years average, Thzn-2 native strain was the one that achieved the highest efficiency, because it is better adapted to the environmental conditions of the orchard and it is manifested on its beneficial effect (Nelson, 1991; Arzate-Vega *et al.*, 2006).

Disease severity. ANOVA did not show significant differences; however, in the media test, the treatments based on *Trichoderma* showed reduced severity of the disease, ie with each *Trichoderma* application the severity was reduced. The Thzn-2 strain during the first and second year of evaluation had the lowest disease severity (33.4 % and 26.6 %, respectively); the average of the two years was 30.0 % (Table 4). In the same way, *T. lignorum*, that during the first and second year was 45.3 % and 33.9 %, in the two years average registered 39.7 %, in both strains the severity of the disease was reduced. However, the severity of the first year for Thcf-12 was 38.1 % and it increased in the second year to 47.5 %, with a 42.8 % two years average. These results might be due to the low strain adaptability to the orchard environment. In general, consecutive and constant biological product applications, allow this microorganism to adapt to the location and exert a natural biological control. In all trees the disease was manifested, ie there was a 100 % incidence and in general the orchard had high levels of severity, this can be due to several factors including: mango cv Haden, a susceptible genotype (Mora *et al.*, 2003) as well as to the age and poor agronomic management (Vázquez-Valdivia *et al.*, 2009a and b).

Díaz-Balderas (2002) reported 25.7 % severity when Benomyl was applied to cv Haden trees at Puente de Ixtla, Mor. A year later, Mora *et al.* (2003), found in Valle de Apatzingán municipalities some incidences that ranged between 15 and 87 %, with an average of 11 to 30 % severity. Mean while, Pérez-Barraza *et al.*, (2007) conducted a

Severidad de la enfermedad. El ANVA no detectó diferencias significativas; sin embargo, en la prueba de medias, los tratamientos a base de *Trichoderma* mostraron menor severidad de la enfermedad, esto es que a medida de que se aplica *Trichoderma* la severidad se reduce. La cepa Thzn-2 en el primer y segundo año de evaluación obtuvo la menor severidad de la enfermedad (33.4 % y 26.6 %, respectivamente); el promedio de dos años fue de 30.0 % (Cuadro 4). De la misma forma *T. lignorum* que en el primer y segundo año tuvo 45.3 % y 33.9 %, en el promedio de dos años registro 39.7 %, en ambas cepas la severidad de la enfermedad fue reduciéndose. Sin embargo, para Thcf-12 la severidad del primer año fue de 38.1 % e incrementó en el segundo año a 47.5 %, con un promedio de dos años 42.8 % esto puede deberse a la baja adaptabilidad de la cepa al ambiente de la huerta. En general, la aplicación consecutiva y constante de un producto biológico permite a este microorganismo adaptarse al lugar y ejercer un control biológico natural.

En todos los árboles se manifestó la enfermedad, es decir existió un 100 % de incidencia, en general la huerta presenta altos niveles de severidad, esto puede deberse a varios factores entre ellos: que se trata del cv Haden, un genotipo susceptible (Mora *et al.*, 2003) aunado a la edad y al escaso manejo agronómico (Vázquez-Valdivia *et al.*, 2009a y b).

Díaz-Balderas (2002) reportó 25.7% de severidad cuando aplicó Benomilo en árboles de cv Haden en Puente de Ixtla, Mor. Un año después Mora *et al.* (2003), encontraron en los municipios del Valle de Apatzingán incidencias que fluctuaron entre los 15 y 87 %, con una severidad promedio de 11 al 30 %. Por su parte Perez-Barraza *et al.*, (2007) en un diagnóstico que realizaron del cultivo del mango en Nayarit reportan incidencias promedio de 34 %; sin embargo, en la zona centro tienen hasta 58 % por las condiciones climatológicas y huertas de 200 a 600 msnm; estos valores son inferiores a los presentados en la presente investigación, para el caso de los productos biológicos.

En este sentido, Noiaium y Soytong (2000) reportan a los productos biológicos formulados con *Trichoderma* (*T. harzianum* y *T. hamatum*) aplicados al mango en condiciones de campo resultaron más efectivos que los productos químicos para reducir el inoculo y la incidencia de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides*. Además, la incidencia de ésta enfermedad en fruta fue similar entre los biofungicidas y los productos químicos, pero los tratamientos biológicos propiciaron mayor rendimiento que los tratamientos químicos.

Inclusive, Noiaium y Soytong (2000) indican que otro organismo que puede ejercer un control de la antracnosis en postcosecha es *Trichoderma harzianum*, habrá que realizar pruebas *in vitro* e *in vivo*.

CONCLUSIONES

Con los dos años de evaluación consecutivos se comprobó que *Trichoderma* spp., es un promisorio biocontrol para el control de los agentes causales de la "escoba de bruja" del mango. En particular, la aplicación de

mango diagnosis in Nayarit and reported incidences with 34 % average; however, in the central are they observed up to 58 % because of the climate and height orchards (200 to 600 masl); these values are lower than those presented in this work for the case of biological products.

In this regard, Noiaium and Soytong (2000) reported that biological products formulated with *Trichoderma* (*T. harzianum* and *T. hamatum*) applied to mango under field conditions were more efficient than chemicals to reduce the inoculum and the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnosis. Furthermore, the incidence of this disease in fruit was similar between biofungicides and chemicals, but biological treatments led to higher yield than chemical treatments.

Even Noiaium and Soytong (2000) reported that other organism that could exercise postharvest anthracnose control is *Trichoderma harzianum*, but *in vitro* and *in vivo* tests need to be done.

CONCLUSIONS

After two years of consecutive evaluation, it was found that *Trichoderma* spp. is a good biocontrol agent for mango "Witches' Broom" disease. In particular, the application of *Trichoderma harzianum* Thzn-2 native strains very effective; the first year it reduces the severity 13.7 %, the second year 32.0 % and on average 22.9 % compared with the control, surpassing the Benzothiazole + Metylene bis-thiocyanate and Benomyl chemical fungicides.

LITERATURA CITADA

- Arzate-Vega J, Michel-Aceves AC, Domínguez-Márquez VM y Santos-Eméstica OA. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp., sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigacota negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 24:98-104.
- Bhatnagar SS and Beniwal SPS. 1977. Involvement of *Fusarium oxysporum* in causation of mango malformation. Plant Disease Reporter 61:894-898.
- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WFO and Wingfield MJ. 2002. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. Mycologia 94:722-730.
- Centro Nacional de Estudios Municipales. 1987. Iguala. Colección: Enciclopedia de los Municipios de México. Centro Nacional de Estudios Municipales, Secretaría de Gobernación. Pp. 203-208.
- Díaz-Balderas V. 2002. Bioensayos *in vitro*, forma de diseminación y control de la enfermedad "escoba de bruja" del mango causada por *Fusarium moniliforme* Sheld. y *F. oxysporum* Schlecht. Folleto Técnico No. 19. INIFAP. Centro de Investigación Regional Centro. Campo Experimental "Zacatepec". Zacatepec, Morelos, México. 21p.
- Dennis C and Webster J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57:25-39.

Trichoderma harzianum cepa nativa Thzn-2 es efectiva; el primer año redujo la severidad en 13.7 %, el segundo año 32.0 % y en promedio 22.9 % comparado con el testigo, superando a los fungicidas químicos Benzotiazol + Metileno bistiocianato y Benomilo, aunque las pruebas estadísticas no fueron significativas en todas las variables.

- Dennis C and Webster J. 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57:41-48.
- De Waard MA, Georgopoulos SG, Hollomon DW, Ishii I, Leroux P, Ragsdale NN and Schwinn FJ. 1993. Chemical Control of plant disease: Problems and prospects. Annual Review of Phytopathology 31:403-421.
- FAO, 2012. Anuario de Producción. Producción Mundial de Mango. www.fao.org (consulta, junio 2012).
- Freeman S, Maimon M and Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. Phytopathology 89:456-461.
- Freeman S, Maimon M and Pinkas Y. 2000. Etiology of mango malformation disease using GUS transformants of *Fusarium subglutinans*. Acta Horticulture 509:731-758.
- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Cuarta edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F. 217p.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2005. Catálogo de Integración General de Localidades (CIGEL). II Censo de Población y Vivienda 2005. México, D.F. 100 p.
- Iqbal Z, Mehboob-ur-Rahman, Dasti AA, Saleem A, and Zafar Y. 2006. RAPD analysis of *Fusarium* isolates causing "Mango Malformation" disease in Pakistan. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 1161-1167.
- Kumar J, Singh US and Beniwal SPS. 1993. Mango malformation: one hundred years of research. Annual Review of Phytopathology 31:217-232.
- Michel-Aceves AC, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ochoa-Moreno ME, Mesina-Escamilla JC y Samuels G. 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-Aceves AC, Otero-Sanchez MA, Rebolledo-Dominguez O, Lezama-Gutierrez R, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A. 2005a. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. Revista Chapingo, Serie Horticultura 11:273-27.
- Michel-Aceves AC, Reyes-De La Cruz A, Otero-Sanchez MA, Rebolledo-Dominguez O y Lezama-Gutierrez R. 2005b. Potencial Antagónico de *Trichoderma* Pers.:Fr. spp., sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder y Hansen) y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e Invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 23:284-291.
- Michel-Aceves AC, Otero-Sanchez MA, Solano-Pascacio LY, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A, Rebolledo-Martínez A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb y Reinking) Nelson, Toussoun, Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 27:18-26.
- Mora AA, Vega PA, González RM y Javier MJ. 1998. Enfermedades del Mango. Pp. 18-44. In: Téliz-Ortíz D. (ed.). El mango y su manejo integrado en Michoacán. GIIM (Grupo Interdisciplinario de Investigación en Mango). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. México. 55p.
- Mora AA, Téliz OD, Mora AG, Sánchez GP y Javier MJ. 2003. Progreso temporal de "Escoba de bruja" (*Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden en Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:1-12.
- Munro-Olmos D. 2008. Guía para la prevención y control de plagas y enfermedades del cultivo del mango, en el estado de Colima. Comité Estatal de Sanidad Vegetal (Cesavecol), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) Campo Experimental Tecoman, Universidad de Colima (U de C), Consejo estatal del mango en Colima (Coemango) y Secretaria de Desarrollo Rural del Gobierno del Estado. 78p.
- Nelson EB. 1991. Handbook of Applied Mycology. pp-327-355. In: Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K. G., Knudsen, G. R. (Eds.) Current limits to biological control of fungal phytopathogens. Volume 1: Soil and Plants. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 800p.
- Noiaium S and Soyong K. 2000. Integrated biological control of mango var. Choke Anan. Acta Horticulturae 509:769-778.
- Noriega-Cantú DH, Téliz-Ortíz D, Mora-Aguilera G, Rodríguez-Alcazar J, Zavaleta-Mejía E, Otero-Colinas G and Campbell CL. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrate management. Plant Disease 83:223-228.
- Papavizas GC. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. Phytopathology 71:121-125.
- Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54.
- Pérez-Barraza MH, Vázquez-Valdivia V, Osuna-García JA, Ríos-Torres A y López-Arriaga G. 2007. Diagnostico del cultivo de mango en Nayarit. Folleto técnico no. 7. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Pacifico Centro. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Santiago Ixcuintla, Nayarit México. 43p.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028p.

Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. www.siap.sagarpa.gob.mx. Organismo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. (consulta, febrero 2012).

Vázquez-Valdivia V, Pérez-Barraza MH, Osuna-García JA y Urías-López MA. 2009a. Intensidad de poda sobre el vigor, producción y peso del fruto, del mango "Ataulfo". Revista Chapingo Serie Horticultura 15:127-132.

Vázquez-Valdivia V, Pérez-Barraza MH, Osuna-García JA y Urías-López MA. 2009b. Manejo integral de huertos de mango "Ataulfo" con altas densidades de población. Revista Chapingo Serie Horticultura 15:155-160.

Westwood MN. 1982. Fruticultura de zonas templadas. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 461p.