

Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.)

Alejandro Casimiro Michel-Aceves, Marco Antonio Otero-Sánchez, Leticia Yuridia Solano-Pascacio, Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Av. Vicente Guerrero No. 81, Col. Centro, Iguala, Guerrero, México CP 40000; Rafael Ariza-Flores, Aristeo Barrios-Ayala, INIFAP, Campo Experimental Chilpancingo, Av. Ruffo Figueroa s/n, Col. Burócratas, Chilpancingo, Guerrero, México CP 39090; y Andrés Rebolledo-Martínez, INIFAP, Campo Experimental Cotaxtla, km 34 Carr. Veracruz-Córdoba, Apdo. Postal 429, Veracruz, México CP 91700. Correspondencia: amichelaceves@yahoo.com.mx

(Recibido: Octubre 17, 2008 Aceptado: Diciembre 8, 2008)

Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Solano-Pascacio, L.Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Rebolledo-Martínez, A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “escoba de bruja” del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 27:18-26.

Resumen. Se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium subglutinans* (Fs) y *Fusarium oxysporum* (Fo), agentes causales de la “escoba de bruja” del mango. Se aislaron 10 cepas del hongo antagonista, de las cuales se seleccionó e identificó a una a nivel de especie (*T. harzianum*), la cual presentó los mayores porcentajes de antagonismo contra ambos fitopatógenos, al inhibir el crecimiento micelial en 62.9% de Fo y 42.0% de Fs. En cultivos duales entre Fo y/o Fs con las cepas seleccionadas de *Trichoderma*, el tiempo al primer contacto para Fo fue entre 3 y 4 días, mientras que para Fs entre 2 y 3. La mayor zona de intersección (0.87 cm) se presentó en *T. lignorum* contra Fo, mientras que en Fs la cepa nativa Thzn-2 presentó 0.85 cm. La cepas nativas Thzn-2 y Thzcf-12 y la comercial mostraron antagonismo clase 2, logrando detener el crecimiento de ambos fitopatógenos. La cepa Thzn-2 tiene potencial como alternativa biológica para el control de Fo y Fs; sin embargo, se requiere evaluarla bajo condiciones de campo.

Palabras clave adicionales: *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, antagonismo, inhibición.

La producción de mango (*Mangifera indica* L.) en México enfrenta una serie de limitantes en su cadena productiva,

Abstract. The antagonistic effect of native strains of *Trichoderma* spp. was evaluated *in vitro* against *Fusarium oxysporum* (Fo) and *Fusarium subglutinans* (Fs), causal agents of mango “witches’ broom”. Ten strains of the antagonistic fungus were isolated, one of which was selected and identified to the species level (*T. harzianum*); this species showed the highest percentage of antagonism inhibiting mycelial growth of Fo by 62.9% and 42.0% of Fs. In dual cultures between Fo and/or Fs with the selected strains of *Trichoderma*, the time for the first contact for Fo was between 3 and 4 days, and between 2 and 3 for Fs. The greatest intersection area (0.87 cm) was observed in *T. lignorum* against Fo, while the intersection area in Fs with the native strain Thzn-2 was 0.85 cm. Native strains Thzn-2 and Thzcf-12, and the commercial one showed antagonism class 2, being able to stop growth of both plant pathogens. Strain Thzn-2 is promising as an alternative for biocontrol of Fo and Fs; however, it is necessary to evaluate it under field conditions.

Additional keywords: *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, antagonism, inhibition.

Abbreviated article

Mango (*Mangifera indica* L.) production in Mexico has limiting factors like high production costs, deficiencies in commercialization and postharvest management, pests, diseases, and a short period for harvest. These factors have a negative effect on yield and profitability. One of the most important diseases is witches’ broom, which affects production and quality and occurs in all mango-producing states of Mexico; yield loss may reach up to 60% or more (Chávez-Contreras *et al.*, 2001). The greatest damage by the

entre los que destacan: altos costos de producción, deficiencias en la comercialización y el manejo de postcosecha, incidencia de plagas, enfermedades y períodos cortos de cosecha, entre otros; lo que trae como consecuencia bajos rendimientos por unidad de superficie y en general una baja rentabilidad. De las diferentes enfermedades que disminuyen la producción y la calidad del fruto, entre las más importantes destaca la “escoba de bruja” que se encuentra distribuida en todos los estados productores de la República Mexicana y puede reducir el 60% o más del rendimiento (Chávez-Contreras *et al.*, 2001). La mayor severidad de la enfermedad se ha detectado a alturas comprendidas entre los 200 y 750 msnm (Mora, 2000); en casos de infecciones severas, el daño puede considerarse del 100%, debido a que los árboles no producen fruta o es abortada prematuramente. El Estado de Guerrero ocupa el tercer lugar a nivel nacional en la producción de mango, siendo las regiones productoras: Costa grande, Costa chica, Tierra caliente y Norte; ésta última es una de las regiones más afectadas por la enfermedad, donde es de mayor importancia económica, principalmente en los municipios de Iguala, Tuxpan, Huitzucó, Tonalapa del Río y Tepecoacuilco. Los cultivares Haden y Criollo son los más susceptibles y se alcanzan pérdidas mayores al 60% de la producción (Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Entre las causas de la enfermedad se han considerado virus, ácaros, desbalances fisiológicos y hongos; sin embargo, las investigaciones señalan consistentemente a los hongos *Fusarium subglutinans* (Wollenweber y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas comb. Nov. (Freeman *et al.*, 1999; 2000; Ploetz, 1994; Ploetz y Gregory, 1993) y *Fusarium oxysporum* Schlecht. (Bhatnagar y Beniwal, 1977) como agentes causales de la enfermedad. Asimismo, se ha encontrado que el ácaro de las yemas de mango *Aceria mangiferae* Sayed transporta a las esporas sobre su cuerpo y favorece la penetración del hongo (Gamlies *et al.*, 2007). No existe ningún método eficiente que por sí solo disminuya significativamente la enfermedad; se han realizado grandes esfuerzos por controlarla y actualmente se realiza un manejo integrado en el que se incluyen la poda fitosanitaria, fertilización al suelo, aspersiones de fungicidas, acaricidas, reguladores de crecimiento y otros compuestos químicos (Kumar *et al.*, 1993). Éstos últimos son utilizados con mayor frecuencia; sin embargo, su uso indiscriminado provoca problemas de contaminación ambiental y en general desequilibrio ecológico, situación que puede ocasionar muchas desventajas para los seres vivos. Aún falta integrar un método biológico para el control de la enfermedad, de esta manera el abuso de los productos químicos disminuiría y el control sería más eficiente (Michel-Aceves *et al.*, 2001). El control biológico (CB) se presenta como una alternativa eficaz, económica y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso indiscriminado de agroquímicos. En el CB de enfermedades se utilizan microorganismos antagonistas en el sitio de infección (Agrios, 2002), antes o después de que se presenten los fitopatógenos que interfieren en su supervivencia. Se busca

disease occurs at altitudes from 200 to 750 msnm (Mora, 2000). The state of Guerrero ranks third in mango production in Mexico; the most important regions are: Costa grande, Costa chica, Tierra caliente, and Norte; Norte is the most important economically and the most affected by the disease in the following counties: Iguala, Tuxpan, Huitzucó, Tonalapa del Río, and Tepecoacuilco. Cultivars Haden and Criollo are the most susceptible to the disease (Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Several factors have been attributed to cause the disease, like virus, mites, physiologic unbalance, and fungi; however, recent investigations consistently indicate that *Fusarium subglutinans* (Wollenweber and Reinking) Nelson, Toussoun and Marasas comb. Nov. (Freeman *et al.*, 1999; 2000; Ploetz, 1994; Ploetz and Gregory, 1993) and *Fusarium oxysporum* Schlecht. (Bhatnagar and Beniwal, 1977) are the causal agents. It has also been found that the bud mite *Aceria mangiferae* Sayed transports spores on its body favoring fungal penetration (Gamlies *et al.*, 2007). Despite the fact that efforts have been made to develop an integrated pest management through phytosanitary pruning, soil fertilization, application of fungicides, growth regulators and other chemical compounds (Kumar *et al.*, 1993), biological control (BC) has not been part of this IPM (Michel-Aceves *et al.*, 2001). BC is an efficient and economic alternative, risk-free from the many and increasing problems derived from the overuse of agrochemicals. For BC of diseases, antagonistic microorganisms are used in the infection site before or after phytopathogens occur (Agrios, 2002). It is necessary to learn about the beneficial organisms, their habits, and to identify their function in regulating plant pathogens. Species of *Trichoderma* have been used successfully for BC of foliar pathogens (Nelson, 1991); they have great capacity to parasitize, compete for nutrients or produce compounds antagonistic against a variety of phytopathogens like *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., and *Pythium* spp. There are native strains of *Trichoderma* which have shown to control *in vitro* the two species of *Fusarium* associated to witches' broom of mango (Michel-Aceves *et al.*, 2001; 2005a). The objective of this investigation was to evaluate the antagonistic efficiency of native strains of *Trichoderma* for *in vitro* control of fungi that cause witches' broom of mango.

MATERIALS AND METHODS

Location of the area of study. Bioassays were carried out in the Phytopathology laboratory which belongs to the Center of Professional Studies (Centro de Estudios Profesionales), located at 14.5 km of Iguala-Cocula highway, at 18° 15' 16" Latitude North and 99° 39' 46" Longitude West, at 640 masl. Climate for this zone according to Köpen' classification and modified by García (1998), corresponds to Awo (w) (y) g, the driest of the warm, subhumid with summer rainfall, mean annual temperature 26.4°C and mean annual rainfall 767 mm.

Collection of soil samples. Soil samples were collected from a mango orchard in Tuxpan, Guerrero, located at 18° 13' and 18° 27' Latitude North and between 99° 29' and 99° 42'

además del control, lograr la seguridad alimentaria de adquirir alimentos libres de tóxicos y llevar una vida sana. Para esto, es necesario conocer a los organismos benéficos, aprender de sus hábitos e identificar la función que tienen para regular las poblaciones dañinas y reducir así el uso de plaguicidas. Lo anterior obliga a realizar esfuerzos para desarrollar cada vez más productos a base de organismos antagonistas, que actúan contra patógenos de enfermedades foliares. Es en este sentido, se han obtenido resultados satisfactorios de control biológico de fitopatógenos con especies del género *Trichoderma* spp. en un rango amplio de enfermedades del follaje, aún siendo éstas explosivas (Nelson, 1991), porque tiene una gran capacidad de parasitar, competir por nutrientes o producir compuestos que resultan antagónicos para una gran variedad de hongos fitopatógenos de los géneros *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., entre muchos otros. El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable, dadas las características de ser eficaz contra fitopatógenos foliares y del suelo en algunos cultivos. Asimismo, se requiere detectar la presencia y diversidad de cepas nativas, con el propósito de evaluarlas como agentes potenciales de control biológico (Papavizas, 1985). Existen reportes de cepas nativas de *Trichoderma* eficientes en el control *in vitro* de las dos especies de *Fusarium* asociadas con la “escoba de bruja” del mango (Michel-Aceves *et al.*, 2001; 2005a). Sin embargo, actualmente no se tiene información en la región Norte del Estado de Guerrero del efecto que puedan ejercer cepas nativas sobre los hongos fitopatógenos, por lo que es necesario generar información básica que proporcione elementos para incorporar al CB en un programa de manejo de la enfermedad. Con base en lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficiencia antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para controlar *in vitro* a los hongos causantes de la “escoba de bruja” del mango.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de trabajo. Los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Estudios Profesionales (CEP-CSAEGRO), ubicado en el km 14.5 de la Carr. Iguala-Cocula, coordenadas 18° 15' 16" Latitud Norte y 99° 39' 46" Longitud Oeste, a una altura de 640 msnm. El clima predominante para esta zona, de acuerdo a la clasificación de Köpen modificado por García (1998), corresponde a Awo (w) (y) g, al más seco de los cálidos subhúmedo con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 26.4°C y una precipitación promedio anual de 767 mm.

Muestreo. Para obtener las diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. se colectó una muestra de suelo representativa de una huerta de mango en Tuxpan, Guerrero, ubicada geográficamente entre los paralelos 18° 13' y 18° 27' Latitud Norte y entre los 99° 29' y 99° 42' Longitud Oeste; a una altura de 731 msnm, el clima es cálido seco con lluvias torrenciales, con una temperatura media anual de 37°C de abril a septiembre y temperatura promedio fría de 23°C y una

Longitud West, altitude 731 masl; with a dry, warm climate and torrential precipitation, mean annual temperature between April to September 37°C, mean low temperature during the same period of time 23°C, and mean rainfall 960 mm. Five soil sub-samples of approximately 1 kg each, were collected at 20 cm depth from 5 points (four corners and the center) around mango trees showing typical symptoms of witches' broom. The sub-samples were homogenized and a kilogram was labeled as a representative sample of the place. The superficial organic matter was discarded.

Isolation of native strains of *Trichoderma* spp. Isolation was performed aseptically and by serial dilutions starting with 1 g of soil and 10 mL of sterile distilled water, then an aliquot of 1 mL was mixed with 9 mL of sterile distilled water and the procedure was repeated again; a 0.5 mL aliquot was transferred and distributed over potato-dextrose-agar amended with chloramphenicol (500 mg L⁻¹) in a Petri plates which were incubated at 28°C + 2°C during 5-7 days. Colonies of *Trichoderma* spp. were identified by the shape, color, and the characteristic way of conidia growth, following the keys of Barnett y Hunter (1972); later, they were purified and features of the genus were recorded: hyaline and ramified conidiophore, not verticillated with individual phialides or in groups, phialoconidia hyaline, unicellular, ovoid, formed in terminal clusters. Cultures were kept in PDA slants at room temperature (22-24°C).

Origin of strains of the causal agents of witches' broom. *F. oxysporum* (Fo), strain GUE-AL001 and *F. subglutinans* (Fs), strain GUE-AL002, were provided by Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados in Montecillo, state of Mexico. These strains were originally obtained from diseased mango plants in Guerrero state.

Selection and identification of native strains of *Trichoderma*. Strains were selected based on its antagonistic capacity *in vitro* by inhibiting or delaying mycelial growth of Fs and Fo. The cellophane paper method was used (Dennis and Webster, 1971). Paper circles 9.0 cm in diameter, previously sterilized, were placed over PDA in Petri plates, then a 5 mm mycelial fragment of fungal growth eight days old of a native strain of *Trichoderma* was placed in the center of the paper and incubated at 28°C + 2°C for two days. Then, the paper was gently removed and the plate was inoculated with a 5 mm disc with Fs or Fo. Mycelial growth was recorded daily until the check covered the plate completely (approximately 12 days after). There were 11 treatments for each fungal species which corresponded to the 10 native strains of *Trichoderma* and the check, either Fs or Fo, distributed in a completely randomized experimental design with four replications. The following formula was applied to determine the percentage of mycelial growth inhibition: % inhibition = [(D1-D2)/D1x100] (Worasatit *et al.*, 1994); where: D1 = diameter of colony of *Fusarium* growing in PDA and free of inhibitors, and D2 = diameter of colony of *Fusarium* growing in PDA where *Trichoderma* spp. grew previously on the cellophane paper. Selected strains were identified to the species level based on

precipitación promedio de 960 mm. Se consideraron a los árboles de mango que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad “escoba de bruja”, y se colectaron 5 submuestras de alrededor 1 kg de suelo bajo los lineamientos del método cinco de oros (en las cuatro orillas y el centro de la parcela), las cuales se mezclaron y se homogenizaron, tomándose 1 kg como muestra representativa del lugar; se muestreó en los primeros 20 cm de profundidad eliminando la materia orgánica superficial en la zona de goteo del árbol.

Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. En el laboratorio, los aislamientos de *Trichoderma* spp. se realizaron por el método de dilución en placa, pesando 1 g del suelo colectado y colocándolo en un tubo de ensaye con 10 mL de agua destilada esterilizada, el cual se agitó manualmente durante 10 seg, luego se tomó una alícuota de 1 mL y se depositó en otro tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada esterilizada (10^{-1}) repitiendo el procedimiento; de una segunda dilución (10^{-2}) se tomó una alícuota de 0.5 mL dispersando uniformemente el inóculo sobre la superficie de una caja Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco laboratorios, Detroit, MI), adicionado con 500 mg L⁻¹ de cloranfenicol. El aislamiento se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas. Las cajas sembradas se incubaron a 28°C + 2°C durante 5-7 días. Las colonias de *Trichoderma* spp. se identificaron por la forma de crecimiento característico de cojines verdes de conidios, siguiendo las claves de Barnett y Hunter (1972); posteriormente se purificaron y observaron al microscopio compuesto las características del género, como es el desarrollo de un conidióforo hialino, muy ramificado, no verticilado, con fiálides individuales o en grupos, fialeconidios hialinos unicelulares, ovoides formados en pequeños racimos terminales, y las cepas axénicas se mantuvieron a temperatura ambiente en tubos inclinados con PDA y se etiquetaron para su conservación, hasta su posterior uso.

Procedencia de las cepas de los agentes causales de la “escoba de bruja” del mango. *F. oxysporum* (Fo), cepa GUE-AL001 y *F. subglutinans* (Fs), cepa GUE-AL002, fueron proporcionadas por el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Edo. de México, mismas que se aislaron de plantas de mango enfermas, en el estado de Guerrero.

Selección e identificación de las cepas nativas de *Trichoderma*. De las cepas aisladas se seleccionaron las que presentaron la mayor capacidad antagónica *in vitro*, al inhibir o retardar el crecimiento micelial de Fs y Fo. Se utilizó el método del papel celofán (Dennis y Webster, 1971), que consistió en cortar el papel en círculos de 9.0 cm de diámetro, los cuales se esterilizaron previamente y se colocaron cada uno bajo condiciones asépticas dentro de la caja Petri sobre el medio de cultivo PDA; luego se inoculó cada placa de agar, depositando en la parte central del papel un fragmento micelial de 5 mm de diámetro, de cada uno de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. de cultivos de 8 días de crecimiento, incubándose durante 2 días a 28°C + 2°C. Después de este

morphological features using the keys of Rifai (1969) and Bisset (1991). Additionally, samples were sent to Dr. Gary J. Samuels, Taxonomist of the USDA-ARS, in Beltsville, Maryland, USA, to corroborate identification.

Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. on *F. oxysporum* and *F. subglutinans*. The technique of Cherif and Benhamou (1990) was used to evaluate the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. A 5 mm disc with active fungal mycelium (eight days old) of Fs and/or Fo, was placed on one side of PDA Petri plates, and allowed to develop during three days. Then, 5 mm discs containing mycelium of *Trichoderma* spp. were placed on the other side of the plate and were incubated at 25°C with a 12 h photoperiod and 40% relative humidity. To determine the number of days for the first contact between hyphae of both fungi and the intersection zone, readings were taken every 24 h. The type of antagonisms was classified fifteen days after plating *Trichoderma* based on Bell *et al.* (1982), where: 1 = *Trichoderma* overgrows the pathogen completely and covers the medium surface completely, 2 = *Trichoderma* overgrows 2/3 of the medium surface, 3 = *Trichoderma* and the pathogen colonize each approximately half the medium surface, but neither one seems to dominate, 4 = the pathogen colonizes 2/3 of the medium surface and seems to withstand invasion by *Trichoderma*, and 5 = the pathogen overgrows *Trichoderma* completely and occupies all the medium surface. In a second experiment *in vitro*, there were three treatments which corresponded to the selected strain from the previous experiment, Thzcf-12, obtained from Armeria, Colima, Mexico, belonging to *T. harzianum* which has been successfully tested against *Fusarium*, and a commercial strain of *T. lignorum* which constitutes the active ingredient of Mycobac. Treatments were distributed under a completely randomized experimental design with four replications.

Statistical analysis. Results were subjected to an analysis of variance and mean comparison by Tukey ($p < 0.05$), using SAS (1999). Percent values were first transformed by the square root of $x+0.5$ before the analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of native strains of *Trichoderma* spp. Ten strains of *Trichoderma* were isolated from soil collected in Tuxpan. Michel-Aceves *et al.* (2001) were able to isolate 2 and 5 strains from soil from two orchards during the winter of 2001 in the same location, while Hernández (2005) isolated 10 and 2 from Tlaxmalac and Huitzuco, Guerrero (villages in the northern part of the state) during the spring; these strains were obtained from 15 plots where peanut (*Arachis hypogaea* L.) was cultivated. Arzate-Vega *et al.* (2006), isolated 25 from 15 banana (*Musa* spp.) plantations in Costa Grande, Guerrero, particularly in area of Tenexpa. It is important to notice that the season of the year may influence population density of *Trichoderma*; Windden and Abitbol (1980), found high populations during the spring and summer as compared to fall and winter in temperate zones in forest soils. Harman

período se retiró el papel transfiriéndolo cuidadosamente para evitar que alguna espora del hongo se diseminara y germinara en el medio de cultivo, y se inoculó en el centro de esa misma caja Petri, un disco de 5 mm de diámetro de las especies Fs y/o Fo, según el caso. Se midió diariamente el diámetro del crecimiento micelial del hongo hasta que el testigo cubrió completamente la caja, aproximadamente a los 12 días. Para cada especie se tuvieron 11 tratamientos, que correspondieron a las 10 cepas nativas de *Trichoderma* y el testigo que según el caso, Fs y/o Fo, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar, con 4 repeticiones. Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos, se calculó con base a la siguiente fórmula: % de inhibición = $[(D1-D2)/D1 \times 100]$ (Worasatit *et al.*, 1994); donde: D1 = diámetro de la colonia de *Fusarium* creciendo en cajas con PDA libre de inhibidores y D2 = diámetro de la colonia fungosa de *Fusarium* creciendo en cajas con PDA, donde anteriormente creció *Trichoderma* spp. sobre el papel celofán, impregnando al medio de cultivo de enzimas y metabolitos secundarios producidos por este hongo inhibidor. La cepa seleccionada se identificó a nivel de especie en base las características morfológicas con las claves de Rifai (1969) y Bisset (1991). Adicionalmente se envió al Dr. Gary J. Samuels, Taxónomo del laboratorio de Botánica Sistemática y Micología del USDA-ARS, en Beltsville, Maryland, EUA, para corroborar la identificación previa.

Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. Para evaluar la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990). Para cada tratamiento, se depositó en un extremo de cajas Petri con PDA un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo de colonias fungosas de 8 días de edad de Fs y/o Fo, y se dejaron desarrollar durante 3 días por su crecimiento lento. Posteriormente, en el otro extremo de la caja se depositaron discos de 5 mm de *Trichoderma* spp. incubándose a 25°C con un fotoperíodo de 12 h y 40% de humedad relativa. Se tomaron lecturas cada 24 h para determinar el número de días al primer contacto entre las hifas de los dos hongos, la zona de intersección, y a los 15 días después de la siembra de *Trichoderma* se clasificó el tipo de antagonismo según Bell *et al.* (1982), donde: 1 = *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2 = *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, 3 = *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro, 4 = el patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* y 5 = el patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa la superficie total del medio. En este segundo ensayo *in vitro* se realizaron tres tratamientos, que correspondieron a la cepa seleccionada en el ensayo anterior, la cepa Thzcf-12 aislada de Armeria, Colima, México, de la especie *T. harzianum* que ha sido evaluada exitosamente contra *Fusarium*, y una cepa comercial *T. lignorum*, ingrediente activo del Mycobac,

(2002) indicated that temperature and humidity are important parameters for the natural distribution in the soil of this antagonist; they also influence orchard management through the excessive use of chemicals which may affect population dynamics, such is the case of the fungicide benomyl (Ahmad and Baker, 1987) and application of citrulline, or by the high levels of saprophytes which compete for space and nutrients, considering that *Trichoderma* is an aggressive competitor (Papavizas, 1981).

Selection and identification of native strains. Percentage of inhibition varied significantly from 5.3 to 42.0% for Fs and from 41.9 to 62.9% for Fo (Table 1). The greatest percentage of inhibition was considered for selecting the best strains; it was 42.0% for Fs and 62.9% for Fo. Therefore, strain 2 was selected for the next experiments since it significantly inhibited both phytopathogens. In a similar experiment Arzate-Vega *et al.* (2006), selected 6 strains out of 25 which inhibited 45% the mycelial growth of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Inhibition percentages obtained in our investigation are lower than those reported by Michel-Aceves *et al.* (2005a) (73.0% for Fs and 69.5% for Fo). Likewise, Michel-Aceves *et al.* (2005b), reported 77.8% inhibition for *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen. Differences could be due to species of *Trichoderma*, origin, and antagonistic potential based on the differential production of chitinases and glucanases, including within the same species (Harman, 2002). High percentages of inhibition have been reported in similar investigations with phytopathogens of aerial plant parts; Michereff *et al.* (1995), found 62 to 89% inhibition of *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Meyer in yam (*Dioscorea* spp.); Arzate-Vega *et al.* (2006), reported 62 to 73% inhibition of *Mycosphaerella fijiensis* causal agent of black sigatoka of banana. Similarly, Sousa Rocha and Oliveira (1998) reported 100% inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. causal agent of anthracnose in passion fruit (*Pasiflora* spp.). Dr. Gary J. Samuels (USDA-ARS) corroborated the identification of the selected strain which corresponded to *T. harzianum* Rifai. The identification was based on the keys of Rifai (1969) and Bisset (1991): Conidiophore in flat pustules, hyaline, ramified, not verticillated, conidia unicellular, globoso to subglobose or ovoid, smaller than 3.5 μ m x 2.5 μ m in terminal, small clusters. The strain was assigned the code Thzn-2.

Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. over *F. subglutinans* and *F. oxysporum*. Hyphae of *Fusarium* spp. had contact with *Trichoderma* at different times, but the latter behaved as aggressive. The time for the first contact ranged from 2 to 3 days for Fs and from 3 to 4 for Fo. Less time for contact indicates greater aggressiveness by the antagonistic fungus (Michel-Aceves *et al.*, 2005a); therefore, strains Thzn-2 (native) and Thzcf-12 were more aggressive on *F. oxysporum* than *T. lignorum* (Table 2); however, Thzcf-12 and *T. lignorum* were more aggressive on Fs than Thzn-2. Michel-Aceves *et al.* (2005a), reported values of 3.67 to 6.67 days and in particular for Thzcf-12 (4.67 days). Similarly, Michel-Aceves *et al.*,

distribuidos bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$), con el paquete estadístico SAS (1999). En el caso de los datos en porcentajes, antes de someterlos al análisis de varianza y prueba de Tukey, se transformaron mediante la fórmula: raíz de $x+0.5$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Se aislaron diez cepas de *Trichoderma* del suelo colectado en otoño de la huerta de mango en Tuxpan. Estos resultados superan el número de cepas obtenidas por Michel-Aceves *et al.* (2001), de suelo colectado durante el invierno del 2001 en 2 huertas del mismo lugar obteniendo 2 y 5 cepas, y también a los obtenidos por Hernández (2005) en Tlaxmalac y Huitzuco, Guerrero (poblaciones de la misma zona Norte de Guerrero), quien aisló durante la primavera en 15 parcelas donde se cultiva cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), 10 y 2 cepas, respectivamente. Arzate-Vega *et al.* (2006), aislaron 25 cepas en 15 huertas de plátano (*Musa* spp.) en la región de Costa Grande, Guerrero, particularmente en la zona platanera de Tenexpa. Es importante resaltar que la estación del año puede influir en la densidad de población de *Trichoderma*; Windden y Abitbol (1980), encontraron poblaciones altas en primavera y verano, comparado con otoño e invierno de zonas templadas en suelos forestales. Al respecto, Harman (2002) complementó lo anterior y especificó que la temperatura y la humedad son considerados como parámetros de importancia

(2005b), reported 5 and 7 days for contact between *T. harzianum* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, while, Arzate-Vega *et al.* (2006) reported 24 h for contact between eight strains of *Trichoderma* spp. and *M. fijiensis*, despite that the latter was given 16 days of growth advantage. Yates *et al.* (1999) found that the time for contact between a strain of *T. virens* Millar and hyphae of *F. moniliforme* Sheld was six days. It is important to analyze the intersection zone, since the greater the area of contact the more aggressive the antagonistic fungus (Michel-Aceves *et al.*, 2005a). For Fo, the greatest intersection zone was observed with *T. lignorum* (0.87 cm), and for Fs with Thzn-2 (0.85 cm). Michel-Aceves *et al.* (2005a), reported values of 4.02 and 2.61 cm for Fs and Fo with strain Thzcf-12, as well as 1.2 cm for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Michel-Aceves *et al.*, 2005b). Sousa Rocha and Oliveira (1998) observed intersection zone values of 1.93 and 4.5 cm between *Colletotrichum gloeosporioides* and different species of *Trichoderma* which overgrew the phytopathogen. Santamaría (2003) observed values from 0.53 to 0.54 and from 0.55 to 2.47 cm, when comparing intersection zones between *Trichoderma* and *Alternaria solani* Sorauer and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, respectively. The area of colonization where there is a competition for space and nutrients, is a way of exerting biocontrol because it reduces or stops mycelial development (Dennis and Webster, 1971). According to classification of antagonism by Bell *et al.* (1982), all strains of *Trichoderma* showed class 2 as they covered 75% of the Petri plate and stopped growth of both phytopathogens. Michel-Aceves *et al.* (2005a), reported classes 1, 2, and 3 against Fs and Fo; fewer strains showed class 1 against Fs as compared to Fo. They also indicated

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* a los 12 y 13 días, respectivamente, por cepas de *Trichoderma* spp.

Table 1. Percent mycelial growth inhibition of *Fusarium subglutinans* and *F. oxysporum* at 12 and 13 days, respectively, by strains of *Trichoderma* spp.

<i>F. subglutinans</i>		<i>F. oxysporum</i>	
Tratamiento	inhibición (%)	Tratamiento	inhibición (%)
Cepa nativa 2 ^y	42.02 b ^z	Cepa nativa 2 ^y	62.99 d ^z
” 1	30.35 ab	” 4	59.86 cd
” 10	28.33 ab	” 9	53.46 bed
” 3	25.59 ab	” 5	51.70 bed
” 4	23.57 ab	” 6	50.34 bed
” 5	21.42 ab	” 8	49.38 bed
” 9	17.26 ab	” 3	48.29 bed
” 6	13.09 ab	” 10	48.29 bed
” 7	5.71 a	” 1	45.90 bc
” 8	5.35 a	” 7	41.90 b
Testigo	0.00 a	Testigo	0.00 a

^yTratamiento seleccionado para ambos patógenos.

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

en la distribución natural de este antagonista en el suelo; además, también influye el manejo de las huertas mediante el uso excesivo de productos químicos que pueden influir en la dinámica poblacional, tal es el caso del fungicida Benomil (Ahmad y Baker, 1987) y la aplicación de citrolina (aceite agrícola), o bien, por la alta presencia de saprófitos que compiten por espacio y alimento, considerando que *Trichoderma* es un competidor agresivo (Papavizas, 1981).

Selección e identificación de especies nativas. El porcentaje de inhibición varió de forma significativa desde 5.3 a 42.0% en Fs y de 41.9 a 62.9% en Fo (Cuadro 1). El criterio para seleccionar las mejores cepas fue considerando el mayor porcentaje de inhibición; en Fs de 42.0% y para Fo 62.9%, de tal manera que la cepa 2 se seleccionó para los siguientes ensayos, puesto que inhibió de forma significativa a los dos fitopatógenos. En un trabajo similar Arzate-Vega *et al.* (2006), al evaluar a *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, seleccionaron 6 de 25 cepas que inhibieron al menos el 45% el crecimiento del micelio del fitopatógeno. Los porcentajes obtenidos en la presente investigación para ambos fitopatógenos son menores a los reportados por Michel-Aceves *et al.* (2005a), quienes al evaluar el efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento del micelio y el potencial reproductivo, los valores máximos de inhibición fueron de 73.0% en Fs y de 69.5% para Fo. Asimismo, Michel-Aceves *et al.* (2005b), en otra investigación, reporta un porcentaje de inhibición de 77.8%, para *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen. Estas diferencias pueden deberse entre otras cosas, a las especie de *Trichoderma*, al sitio de procedencia y al potencial antagónico que es diferente en cada una de ellas en cuanto a la producción de quitinasas y glucanasas, inclusive en cepas de la misma especie (Harman, 2002). En otros trabajos similares pero con otros hongos fitopatógenos de partes aéreas se han reportado altos porcentajes de inhibición; Michereff *et al.* (1995), al evaluar sobre una enfermedad foliar causada por *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Meyer en el cultivo del camote (*Dioscorea* spp.), indican una inhibición del 62 a 89%, Arzate-Vega *et al.* (2006), sobre *Mycosphaerella fijiensis* causante de la sigatoka del plátano de 62 a 73%. De igual manera, Sousa Rocha y Oliveira (1998) reportan valores de 100% de inhibición sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. causante de la antracnosis en el cultivo de la fruta de la pasión (*Pasiflora* spp.). El Dr. Gary J. Samuels (USDA-ARS) corroboró la identificación de la cepa seleccionada la cual corresponde a la especie *T. harzianum* Rifai. Se identificó con base en las claves de Rifai (1969) y Bisset (1991) observándose al microscopio compuesto las siguientes características: Conidióforo dispuesto en pústulas planas, hialino, ramificado, no verticilado, conidios unicelulares globosos a subglobosos u ovoides, menor que 3.5 m x 2.5 µm formados en pequeños racimos terminales. Se incluyó en el cepario con la simbología Thzn-2

Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *F.*

that strain Thzcf-12 showed class 1 for both phytopathogens, which is superior to the classification assigned to this strain in the present study. Different classes of antagonism have been obtained against several phytopathogens: Michel-Aceves *et al.* (2005b), classified the antagonism of 20 strains of *Trichoderma* against Fo, all resulting class 1, while only three were classes 1 and 2 against *Sclerotium rolfsii* Sacc.; Sousa Rocha and Oliveira (1998), reported antagonistic classification of 1, 2, and 3 against *C. gloeosporioides*, with greater incidence of strains with class 2; while Hernández (2005), reported classes 2, 3, 4, and 5 against *S. rolfsii* from six strains of *Trichoderma*.

CONCLUSIONS

The native strain Thzn-2 of *Trichoderma harzianum* has biocontrol potential by showing antagonism class 2 against *Fusarium subglutinans* and *F. oxysporum*. It is suggested to validate the effect of Thzn-2 under field conditions.

End of the abbreviated article

subglutinans y *F. oxysporum*. Las hifas de *Fusarium* tuvieron contacto con las hifas de *Trichoderma* en diferentes tiempos; ambas especies de *Fusarium*, a pesar de que se les dieron tres días de ventaja por su crecimiento lento, se observó que *Trichoderma* se comportó como agresivo. El tiempo al primer contacto mostró diferencias significativas; los valores oscilaron entre 2 y 3 días en el caso de Fs y entre 3 y 4 para Fo. Entre menor sea el tiempo de contacto mayor es la agresividad del hongo antagónico (Michel-Aceves *et al.*, 2005a); por lo tanto, las cepas Thzn-2 (nativa seleccionada) y Thzcf-12 en *F. oxysporum* son más agresivas en comparación con *T. lignorum* (Cuadro 2); sin embargo, es diferente en Fs pues las que presentaron mayor agresividad fueron Thzcf-12 y *T. lignorum* en comparación con la cepa nativa Thzn-2. Estos datos superan lo reportado por Michel-Aceves *et al.* (2005a), quienes indican valores entre 3.67 y 6.67 días y en particular para Thzcf-12 (4.67 días). De la misma manera Michel-Aceves *et al.*, (2005b), reportaron 5 y 7 días para el contacto de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En este sentido, Arzate-Vega *et al.* (2006) reportaron contacto a las 24 h después de la inoculación de ocho cepas de *Trichoderma* spp. a pesar de haber dado 16 días de ventaja a *M. fijiensis* por su crecimiento lento. Asimismo, Yates *et al.* (1999) en una cepa aislada de *T. virens* Millar reportaron seis días para el contacto entre hifas con *F. moniliforme* Sheld. Es importante observar la zona de intersección, pues entre mayor sea el área de contacto, mayor es la agresividad por parte del hongo antagónico (Michel-Aceves *et al.*, 2005a). Esta variable fue visible para las diferentes cepas de *Trichoderma* las cuales sobrecrecieron en diferente medida al fitopatógeno. La mayor zona de intersección se presentó en *T. lignorum* (0.87 cm) contra Fo y la cepa Thzcf-12 tuvo 0.77 cm, mientras que en Fs la cepa nativa Thzn-2 tuvo 0.85 cm a comparación con *T. lignorum* el cual presentó la menor zona con 0.67 cm. En un trabajo similar Michel-Aceves *et al.* (2005a), reportaron

Cuadro 2. Características cuantitativas del cultivo apareado entre diferentes cepas de *Trichoderma* spp., *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum*.
 Table 2. Quantitative characteristics of paired cultures between different strains of *Trichoderma* spp., *Fusarium subglutinans*, and *F. oxysporum*.

Tratamiento	Días a 1er. contacto		Zona intersección (cm)		Clase antagonismo ^y	
	Fs	Fo	Fs	Fo	Fs	Fo
Thzn-2	3 a ^z	3 b	0.85 a	0.80 a	2	2
Thzcf-12	2 b	3 b	0.72 a	0.77 a	2	2
<i>T. lignorum</i>	2 b	4 a	0.67 a	0.87 a	2	2

^yClase de antagonismo según Bell *et al.* (1982); el antagonista cubre el 75% del medio.

^zMedias dentro de las columnas con la misma letra son estadísticamente iguales.

valores para la cepa Thzcf-12 de 4.02 y 2.61 cm para Fs y Fo, respectivamente, mientras que en otra investigación con esta misma cepa contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* fue de 1.2 cm (Michel-Aceves *et al.*, 2005b), todos estos mayores a los obtenidos en la presente investigación. En otro estudio contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, Sousa Rocha y Oliveira (1998), reportaron entre 1.93 y 4.5 cm de la zona de intersección de las diferentes especies de *Trichoderma* sobrecreciendo al fitopatógeno. Asimismo, Santamaría (2003) al comparar la zona de intersección de *Trichoderma* contra *Alternaria solani* Sorauer y *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, obtuvo valores entre 0.53 a 0.54 y de 0.55 a 2.47 cm, respectivamente. La colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio (Dennis y Webster, 1971). De acuerdo a la clasificación de antagonismo de Bell *et al.* (1982), todas las cepas de *Trichoderma* mostraron clase 2, al cubrir el 75% de la caja Petri y detener el crecimiento de los fitopatógenos. Michel-Aceves *et al.* (2005a), reportaron contra Fs y Fo clases de antagonismo 1, 2 y 3; en Fs obtuvieron menor número de cepas con antagonismo 1, comparado con lo encontrado con Fo. Reportaron que la cepa Thzcf-12 presentó clase 1 para ambos fitopatógenos, el cual es superior al clasificado en este trabajo. Se han obtenido diferentes clases de antagonismo contra diferentes patógenos, Michel-Aceves *et al.* (2005b), clasificó el antagonismo de 20 cepas de *Trichoderma* contra Fo y todas resultaron clase 1, mientras que con *Sclerotium rolfsii* Sacc., sólo 3 fueron clase 1 y 2, y en las demás cepas, el fitopatógeno fue más agresivo. Sousa Rocha y Oliveira (1998), reportaron clasificación antagónica de 1, 2 y 3 contra *C. gloeosporioides* en el cual se manifiesta con mayor número de cepas clase 2; mientras tanto, Hernández (2005), reportó antagonismo clases 2, 3, 4 y 5 de 6 cepas aisladas de *Trichoderma* contra *S. rolfsii*.

CONCLUSIONES

La cepa nativa Thzn-2 de la especie *Trichoderma harzianum* tiene potencial de biocontrol por la inhibición y antagonismo clase 2 sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum*, y se sugiere continuar con las evaluaciones de campo para validar dicha eficacia.

LITERATURACITADA

Agrios, N.G. 2002. Fitopatología. 2a. Edición. Editorial Limusa S.A. de C.V. México, D.F. 837 p.

Ahmad, J.S., and Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77:182-189.

Arzate-Vega, J., Michel-Aceves, A.C., Domínguez-Márquez, V.M. y Santos-Eméstica, O.A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp., sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:98-104.

Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3th ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN, USA. 241 p.

Bell, D.K., Well, H.D., and Markham, C.R. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.

Bhatnagar, S.S., and Beniwal, S.P.S. 1977. Involvement of *Fusarium oxysporum* in causation of mango malformation. *Plant Disease Reporter* 61:894-898.

Bisset, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. *Canadian Journal of Botany* 69:2373-2417.

Chávez-Contreras, X., Vega-Piña, A., Tapia-Vargas, L.M. y Miranda-Salcedo, M.A. 2001. Mango, su Manejo y Producción en el Trópico Seco de México. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Campo Experimental del Valle de Apatzingán. INIFAP-CIAPAC. Libro Técnico Número 1. Apatzingán, Michoacán, México. 110 p.

Cherif, S.S., and Benhamou, C.S. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80:1406-1414.

Dennis, C., and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species - groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society* 57:25-39.

Freemann, 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.

- Freemann, S., Maimon, M., and Pinkas, Y. 2000. Etiology of mango malformation disease using GUS transformants of *Fusarium subglutinans*. *Acta Horticulturae* 509:731-758.
- Gamlies, A.E., Szejnberg, A., Maymon, M., Belausou, E., Paleusky, E., and Freeman, S. 2007. Interaction of the mango but mite (*Aceria mangifera*) causal agent of mango malformation disease. In the 28 th Congress of the Israel Phytopathological Society. Bet Dagan, Israel. 325 p.
- García, Z.R. 1998. Modificaciones al sistema de clasificación de Kopen. Cuarta Edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 59 p.
- Harman, G.E. 2002. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). Cornell University, Geneva, N.Y. www.iicasaninet.net/pub/sanueg/html (Consulta: 29/10/05).
- Hernández, N.M.M. 2005. Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en el cultivo de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) con *Trichoderma* spp. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola. Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Iguala, Guerrero, México. 107 p.
- Kumar, J., Singh, U.S., and Beniwal, S.P.S. 1993. Mango malformation: one hundred years of research. *Annual Review of Phytopathology* 31:217-232.
- Michel-Aceves, A.C., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ochoa-Moreno, M.E., Mesina-Escamilla, J.C. 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, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ariza-Flores, R. y 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* 11:273-278.
- Michel-Aceves, A.C., Reyes-De La Cruz, A., Otero-Sánchez, M.A., Rebolledo-Domínguez, O. y Lezama-Gutiérrez, R. 2005b. 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.
- Michereff, S.J., Da-Silveira, N.S.S., Reis, A., and Mariano, R.L.R. 1995. Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of yam. *Mycopathologia* 130:103-108.
- Mora, A.J.A. 2000. Patogénesis y epidemiología de la “Escoba de bruja” [*Fusarium subglutinans* (Wollemwed y Reinking) y *F. oxysporum* (Schlecht.)] del mango (*Mangifera indica* L.) en Michoacán, México. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. México. 107 p.
- Nelson, E.B. 1991. Handbook of Applied Mycology. pp-327-355. In: D.K. Arora, B. Rai, K.G. Mukerji, and G.R. Knudsen (eds.). Current limits to biological control of fungal phytopathogens. Volume 1: Soil and Plants. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 800 p.
- Noriega-Cantú, D.H., Téliz-Ortíz, D., Mora-Aguilera, G., Rodríguez-Alcazar, J., Zavaleta-Mejía, E., Otero-Colinas, G., and Campbell, C.L. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico, with traditional and integrated management. *Plant Disease* 83:223-228.
- Papavizas, G.C. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. *Phytopathology* 71:121-125.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23:23-54.
- Ploetz, R.C., and Gregory, N.F. 1993. Mango Malformation in Florida: distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships among strains within and among different orchards. *Acta Horticulturae* 341:388-394.
- Ploetz, R.C. 1994. Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango trees affected by malformation. *Canadian Journal of Botany* 72:7-9.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116:1-56
- Santamaría, D.M. 2003. Control biológico de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary y *Alternaria solani* (Ellis y Martin) en jitomate con cepas nativas de *Trichoderma* spp., bajo condiciones *in vitro* e invernadero. Tesis de Licenciatura. Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Cocola, Guerrero, México. 92 p.
- SAS Institute, Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC, USA. 1028 p.
- Sousa Rocha, J.R., and Oliveira, N.T. 1998. *In vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of antracnose in the passion fruit (Passiflora). *Boletín Micológico* 13:103-110.
- Widden, P., and Abitbol, J.J. 1980. Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce forest soil. *Mycologia* 72:775-784.
- Worasatit, N., Sivasithampam, K., Ghisalberti, E.L., and Rowland, C. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research* 98:1357-1363.
- Yates, I.E., Meredith, F., Smart, W., Bacon, C.W., and Jaworski, A.J. 1999. *Trichoderma viride* suppresses fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme*. *Food Protection* 62:1326-1332.