



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONTROL BIOLÓGICO *in vitro* E *in vivo* DE *Colletotrichum* spp., OBTENIDOS DE FRUTOS DE AGUACATE HASS (*Persea americana* Mill.)

LAURA PATRICIA CHI GARCIA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

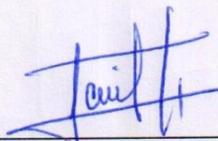
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

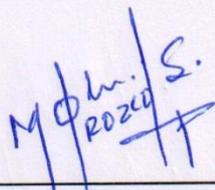
La presente tesis titulada: **Control biológico *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum* SPP., obtenidos de frutos de aguacate has (*Persea americana* Mill.)**. Realizada por la alumna: **Laura Patricia Chi Garcia**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR



Consejero: Dr. Daniel Nieto Ángel



Asesor: Dr. Mario Orozco Santos



Asesora: M. C. Victoria Ayala Escobar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio 2015.

DEDICATORIAS

A dios por haberme dado la vida y brindarme la sabiduría e inteligencia para encontrar el camino del éxito, por darme la fortaleza necesaria para no desfallecer y levantarme cada día.

A mi esposo, quien para mí es una persona muy especial en mi vida, a quien le agradezco su apoyo incondicional y por ser mi fortaleza. Gracias amor por estar a mi lado compartiendo este momento tan importante para mí. Te amo Fernando

A mis padres, las personas que más amo en mi vida, María y Luis a quienes les debo todo, porque han sacrificado gran parte de su vida para formarme.

A mis hermanos, por ser mi fortaleza a pesar de la distancia y por su apoyo para concluir mis estudios.

A mis sobrinos, quienes llenan mi vida de alegría y que son mi fuerza para seguir adelante y lograr mis sueños. Las amo mis tres pequeñas princesas y a mi pequeño príncipe.

De manera especial lo dedico a la memoria de mis abuelitos María Cándida, Luciano y Luis, por llenarme de amor y sabiduría durante toda su vida.

A todas las personas que Dios puso en mi camino durante mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por brindarme la dicha de poder disfrutar un logro más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme brindado el apoyo económico para poder llevar a cabo mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al COLEGIO DE POSTGRADUADOS, por brindarme los conocimientos necesarios para ser una profesionista y por la formación científica que adquirí durante el tiempo de mis estudios de maestría.

A mi consejero, el Dr. Daniel Nieto Ángel, por la confianza que deposito en mí y su apoyo para poder culminar mis estudios de maestría. Por su apoyo, ayuda y dedicación, por todos los conocimientos compartidos. Por haberme brindado la oportunidad de realizar el experimento de tesis en su laboratorio. Al igual que por su amistad, la cual hizo más placentero mi tiempo en el CP.

A mi asesora la M.C. Victoria Ayala, por todo el conocimiento y sabiduría compartidos, por su apoyo y la confianza que en mí depositó para realizar el trabajo de maestría y gracias por su colaboración en el tema de investigación. Además gracias por su linda amistad.

A mi asesor el Dr. Mario Orozco, por haber aceptado ser parte de mi consejo particular, por el tiempo que dedicó al proyecto de investigación, por sus consejos y observaciones y por el conocimiento compartido.

A la Dra. Leticia Robles, por todo su apoyo y por los conocimientos brindados durante la elaboración del proyecto de investigación y lo más importante gracias por la valiosa amistad que me brindo.

Al Maestro en Ciencias Andrés Quijano Ramayo, por su apoyo en la revisión del documento de tesis y del artículo. Al igual que por su valiosa amistad y por su apoyo incondicional y por estar siempre que lo necesito.

A mis amigos del CP, Yesi, Yolanda, Arturo, Edwin, Sergio, Luisa, Erendira, Sandra y a todos los demás que por cuestión de espacio no nombre pero saben que les agradezco el apoyo y la amistad que me brindaron.

A mis amigos del CICY, Emy, Anuar, los ingenieros Alberto, Rodolfo y Ángel; al Dr. Raúl Tapia, a la Dra. Deysi Pérez y a la M.C. Abril. Por haberme brindado su amistad y por su apoyo moral aun con la distancia.

Agradezco a mis padres, porque han sido para mí el motor de motivación para culminar con excito mis estudios de Maestría, por su apoyo moral y económico.

En especial a Lidia sierra, que más que una amiga ha sido para mí una hermana, quien a pesar de la distancia siempre esta y ha estado en los momentos más dolorosos de mi vida brindándome su apoyo incondicional y por la confianza otorgada. Te quiero mucho hermana, con cariño Laura.

A todas aquellas personas que de una u otra forma confiaron en mí y estuvieron en los momentos más alegres de mi vida.

**CONTROL BIOLÓGICO *in vitro* E *in vivo* DE *Colletotrichum* spp.,
OBTENIDOS DE FRUTOS DE AGUACATE HASS (*Persea americana* Mill.)**

Laura Patricia Chi Garcia. M.C.

Colegio de postgraduados, 2015.

RESUMEN

Para el manejo de la antracnosis causado por *Colletotrichum gloeosporioides* se han estado utilizando productos químicos, aplicados durante el desarrollo del cultivo y en el fruto como tratamiento postcosecha. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ocasiona daños a la salud y al medio ambiente y la generación de poblaciones resistentes; por lo anterior, en el presente estudio se evaluó la actividad antifúngica de dos antagonistas y tres extractos vegetales para inhibir el crecimiento del patógeno en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Los productos evaluados fueron: Formulado 45-2, Progranic Neemacar, Progranic cinnacar, Spectrum Trico Bio y Probac BS. Con los últimos cuatro productos mencionados se realizaron las pruebas de germinación de conidios y las pruebas *in vivo*. Los resultados indican que cuatro de los cinco productos evaluados inhibieron el crecimiento micelial al 100% bajo condiciones *in vitro*; mientras que el Formulado 45-2 (extracto de menta) inhibió el crecimiento de hasta un 95.6%, comparado con los cuatro productos restantes. En base a lo anterior el PROBAC BS (*Bacillus subtilis*) (0.5 ml/L) y el PROGRANIC cinnacar (Extracto de canela) (2.95 ml/L), fueron los que presentaron mayor eficiencia. Para las pruebas de germinación todos los tratamientos evaluados resultaron inhibir al 100% para 14 de los 15 aislados. Para el aislado 3 (*C. gloeosporioides*) se observó germinación con 2 productos el Progranic cinnacar y el Probac BS. Las pruebas de antagonismo demostraron que uno de los mecanismos de acción de la cepa *Trichoderma harzianum* fue competencia por espacio, lisis de la hifa, vacuolización y desintegración del citoplasma. En las pruebas *in vivo* se observó que la aplicación preventiva y curativa sin herida resultó ser mejor ya que en los resultados al evaluar lesión interna del fruto no se observó ninguna lesión para ninguno de los tratamientos en ningún aislado.

Palabras claves: Antracnosis, antagonistas, extractos vegetales, *in vitro* e *in vivo*.

**BIOLOGICAL CONTROL *in vitro* AND *in vivo* *Colletotrichum* spp., OBTAINED
HASS AVOCADO FRUITS (*Persea americana* Mill.)**

Laura Patricia Chi Garcia. M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

Abstract

For the management of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* has been used chemicals products applied during the crop growth and in the fruit as post-harvest treatment. However, indiscriminate use of these products has caused damage to health and the environment and the generation of resistant populations; therefore in this study the two antagonistic antifungal activities of three plants extracts to inhibit growth of the pathogen *in vitro* and *in vivo* conditions. The products evaluated were: Formulado 45-2®, Progranic Neemacar®, Progranic cinnacar®, Spectrum Trico Bio® y Probac BS®. Over the last four mentioned products we test conidia germination and *in vivo* tests were performed. The results indicate that four of the five products tested inhibited the mycelial growth at 100% under *in vitro* conditions; while Formulated 45-2 (peppermint extract) inhibited the growth of up to 95.6%, compared to the four remaining products. Based on the above, the Probac BS (*Bacillus subtilis*) (0.5 ml / L) and PROGRANIC cinnacar (Cinnamon Extract) (2.95 ml / L) were those with greater efficiency. For germination tests all treatments tested were inhibited by 100% for 14 of the 15 isolates. To isolate three (*C. gloeosporioides*) germination was observed with 2 Progranic cinnacar Products and Probac BS. Antagonism tests showed that one of the mechanisms of action of *Trichoderma harzianum* strain was competition for space, lysis of the hyphal, vacuolization and cytoplasmic disintegration. In the *in vivo* tests it was observed that the preventive and cur ative application without injury turned out to be better as in internal injury results in evaluating the fruit's no injury to any of the treatments was observed in any isolate.

Keywords: Anthracnose, antagonists, plant extracts, *in vitro* and *in vivo*.

CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Capítulo I. Revisión de literatura	3
2.1. Origen del cultivo	3
2.2. Importancia económica.....	3
2.3. Limitantes fitosanitarios	4
2.4. Antracnosis.....	5
2.4.1. Clasificación taxonómica.....	6
2.4.2. Ciclo de la enfermedad	6
2.4.3. Síntomas	7
2.5. Control de <i>Colletotrichum</i> spp.....	8
2.6. Control con productos biológicos y orgánicos.....	9
2.7. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma harzianum</i>	10
2.8. Mecanismos de acción de <i>Bacillus subtilis</i>	12
3. Objetivos	13
3.1. Generales.....	13
3.2. Específicos	13
4. Hipótesis	13
5. Capítulo II. Materiales y métodos	14
5.1. Estrategia experimental	14
5.2. Origen de los aislamientos	14
5.3. Reactivación y purificación	15
5.4. Lista de productos biológicos y orgánicos a evaluar	15
5.5. Evaluación <i>in vitro</i> de productos biológicos y orgánicos.	16
5.5.1. Selección de productos biológicos y orgánicos con mayor efectividad biológica	16
5.6. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i>	18
5.6.1. Porcentaje de colonización de <i>Trichoderma harzianum</i>	20

5.6.2. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma harzianum</i>	20
5.7. Efecto inhibitorio de los antagonistas.....	20
5.8. Germinación de esporas.....	21
5.9. Actividad antifúngica.....	22
5.10. Evaluación <i>in vivo</i> de los productos biológicos y orgánicos ...	22
5.11. Análisis estadístico	24
6. Capítulo III. Resultados y discusión.....	25
6.1 Cepas fungosas puras.....	25
6.2 Evaluación <i>in vitro</i> de los productos orgánicos y biológicos.....	25
6.2.1 Selección de los productos orgánicos y biológicos con mayor efectividad	25
6.2.2 Evaluación de los productos con mayor efectividad.....	29
6.3 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> con <i>T. harzianum</i>	34
6.3.1 Porcentaje de colonización	34
6.3.3 Mecanismos de acción.....	35
6.4 Efecto inhibitorio de los antagonistas.....	36
6.4.1 Porcentaje de inhibición de <i>T. harzianum</i>	36
6.4.2 Porcentaje de inhibición de <i>B. subtilis</i>	36
6.5 Germinación de esporas.....	38
6.6 Actividad antifúngica.....	40
6.7 Control <i>in vivo</i> de los productos orgánicos y biológicos	42
7. Conclusiones.....	44
8. Literatura citada	45
9. Anexos	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Principales países productores a nivel mundial de aguacate desde el año 1999 hasta el 2013 (FAOSTAT, 2015).	4
Figura 2. Ciclo patológico de la antracnosis causada por <i>Glomerella cingulata</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Agrios, 2002).	7
Figura 3. Síntomas de antracnosis a) en la superficie del fruto (CESAVEG®, 2008); b) en el interior del fruto (Rodríguez-López <i>et al.</i> , 2013).	8
Figura 4. Estrategia experimental.....	14
Figura 5. Prueba de antagonismo con <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figura 6. Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. En medio de cultivo PDA. a) <i>C. boninense</i> b) <i>C. kahawae</i> c) <i>C. acutatum</i> d) <i>C. fragarie</i>	25
Figura 7. Cultivo modificado con extracto de menta. a) Aislado 11 (<i>C. simmondsii</i> , b) Aislado 27 (<i>C. fragarie</i>).....	26
Figura 8. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento colonial de <i>Colletotrichum</i> spp., en medio de cultivo PDA modificado. a) Extracto de canela- <i>C. gloeosporioides</i> y b) Extracto de Neem más canela- <i>C. kahawae</i>	29
Figura 9. Antagonismo por cultivo dual a los 7 días de incubación.	34
Figura 10. Porcentaje de colonización de <i>T. harzianum</i> sobre <i>Colletotrichum</i> spp.	34
Figura 11. Mecanismos de acción de <i>T. harzianum</i> . a) Malformación de una hifa, b) Desintegración del citoplasma y c) Lisis de una hifa y vacuolización.	35
Figura 12. Porcentaje de inhibición de <i>Colletotrichum</i> spp. por <i>T. harzianum</i>	36
Figura 13. Pruebas de antagonismo, porcentaje de inhibición. a) <i>C. kahawae</i> (15) y b) <i>C. alienum</i> (2).	37
Figura 14. Porcentaje de inhibición de <i>Colletotrichum</i> spp. por <i>B. subtilis</i>	38
Figura 15. Germinación de conidios en medio modificado con Progranic cinnacar.	38
Figura 16. Porcentaje de germinación del aislado 3 (<i>C. gloeosporioides</i>) a las 15 horas. a) Probac BS, b) Progranic cinnacar y c) testigo	39
Figura 17. Actividad antifúngica. a) Formulado 45-2, b) Progranic neemacar, c) Progranic cinnacar, d) Spectrum Trico Bio y e) Probac BS.	40

Figura 18. Actividad antifungica a los tres días. a1) Crecimiento de <i>C. simmondsii</i> , a2) Conidios de <i>C. simmondsii</i> , b1) Crecimiento de <i>C. acutatum</i> y b2) Conidios de <i>C acutatum</i>	41
Figura 19. Preventivo-con herida del aislado 7 (<i>C. gloeosporioides</i>). a) Probac BS a concentración baja, b) Testigo químico y c) Testigo absoluto.	42
Figura 20. Lesión interna ocasionada por <i>Colletotrichum</i> spp. a) Necrosis dirigida a la semilla, b) Pudrición limitada al crecimiento del patógeno y c) Necrosis y pudrición de la pulpa.....	43

Lista de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Producción de aguacate por Estado.....	4
Cuadro 2. Aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidos de frutos con antracnosis.	14
Cuadro 3. Lista de productos biológicos y orgánicos.	16
Cuadro 4. Relación de extractos vegetales y microorganismos antagonistas a evaluar.....	17
Cuadro 5. Productos biológicos y orgánicos para evaluar efectividad y actividad antifúngica	18
Cuadro 6. Lista de biológicos y orgánicos para la prueba de germinación de esporas.....	21
Cuadro 7. Lista de biológicos y orgánicos a evaluar in vivo.	23
Cuadro 8. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) de <i>Colletotrichum</i> spp., con productos orgánicos y biológicos.	28
Cuadro 9. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) de <i>Colletotrichum</i> spp., con los productos seleccionados.	33
Cuadro 10. Porcentaje de germinación para el aislado 3 (<i>C. gloeosporioides</i>)....	39

1. Introducción

El aguacate hass (*Persea americana* Mill.) es originario de las partes altas del centro y este de México y partes altas de Guatemala (Flores R, 2009; Lavaire, 2013). Juega un papel muy importante dentro de la dieta alimentaria de la mayoría de las personas, debido a que posee un valor nutritivo balanceado y es consumido como fruto fresco y los aceites que se obtienen son utilizados en la industria cosmética y farmacéutica (Tomalá, 2002; Secretaria de Economía, 2012).

En este contexto, México ocupa el primer lugar a nivel mundial, con un total de producción de 1'277,238 Ton. Siendo el estado de Michoacán el de mayor importancia, ocupando el primer lugar con una producción anual de 1'193,751 Ton (SIAP, 2013; FAOSTAT, 2015). Sin embargo, entre los problemas que limitan su comercialización y exportación se encuentran las de orden fitosanitario (CESAVEG®, 2008; Alfonso, 2008; SAGARPA, 2011).

Dentro de estas limitantes se encuentra la enfermedad denominada antracnosis la cual ocasiona pérdidas por decaimiento de frutos durante su almacenaje y comercialización (Freeman *et al.*, 1995; Alfonso, 2008). El agente causal de esta enfermedad es *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz y Sacc.

Este patógeno tiene la capacidad de infectar flores y frutos en desarrollo y etapa de maduración; también se presenta en hojas, ramas e inflorescencias (Nieto, 2013; Zamora *et al.*, 2001; Téliz y Mora, 2007).

En la superficie de los frutos se observan lesiones circulares de color café oscuro que pueden producir rajaduras en su interior y en periodos húmedos se observan masas de esporas de color rosa o salmón sobre las manchas (Lavaire, 2013). En el pericarpio se observan manchas circulares café oscuras y daños por ablandamiento y pudrición del mesocarpio (Prusky *et al.*, 2001).

Para su manejo y control se recomienda realizar buenas prácticas culturales antes y durante la cosecha. El uso de productos químicos durante el desarrollo del cultivo y aplicar al fruto como tratamiento postcosecha (CESAVEG®, 2008; Garbanzo, 2011).

En este contexto, el uso indiscriminado de productos químicos, ha ocasionado daños a la salud humana y al ambiente; al igual que la selección de patógenos resistentes (Bowers *et al.*, 2000; Janisiewicz y Criof, 1999; Carrillo *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2010). Debido a lo anterior es necesaria la búsqueda de alternativas biológicas para combatir los problemas fitopatológicos, eliminar o disminuir el uso de productos químicos sintéticos (Bowers *et al.*, 2000; Janisiewicz y Criof, 1999).

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar extractos vegetales y microorganismos antagonistas para el manejo y control *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum* spp. (Penz.) Penz y Sacc. obtenidos de frutos de aguacate has (*Persea americana* Mill.).

2. Capítulo I. Revisión de literatura

2.1. Origen del cultivo

México es el centro de origen del aguacate (*Persea americana* Mill.). La evidencia más antigua del consumo de este frutal data de 10,000 años a. C., la cual fue encontrada en una cueva localizada en Coxcatlán, Puebla. Este cultivo es originario de las partes altas del centro y este de México y partes altas de Guatemala. Sin embargo se cultiva desde el Río Bravo hasta el centro de Perú y en casi todas las áreas tropicales y subtropicales donde hay condiciones favorables para su desarrollo (Flores R, 2009; Lavaire, 2013).

2.2. Importancia económica

El aguacate juega un papel importante en la dieta alimenticia, como complemento en todo tipo de comidas, esto se debe a su alto contenido de proteínas, vitaminas, minerales y ácidos grasos monoinsaturados; es rico en glutathion (antioxidante) que bloquea la absorción en el intestino de las grasas que crean los radicales libres (Tomalá, 2002). Cabe mencionar que este frutal es rico en materia grasa del cual se pueden extraer aceites que una vez procesados son utilizados en la industria cosmética y farmacéutica (SE. 2012).

En este contexto, del año 1999 hasta el 2013 México ocupa el primer lugar a nivel mundial con una superficie cosechada de 144,243 hectáreas y un total de producción de 1´277,238 Ton (Figura 1) (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP, 2013; FAOSTAT, 2015). Los estados que presentan áreas con potencial productivo para este cultivo son: Michoacán, Jalisco, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Nuevo León, Tamaulipas y Puebla (SAGARPA, 2012).

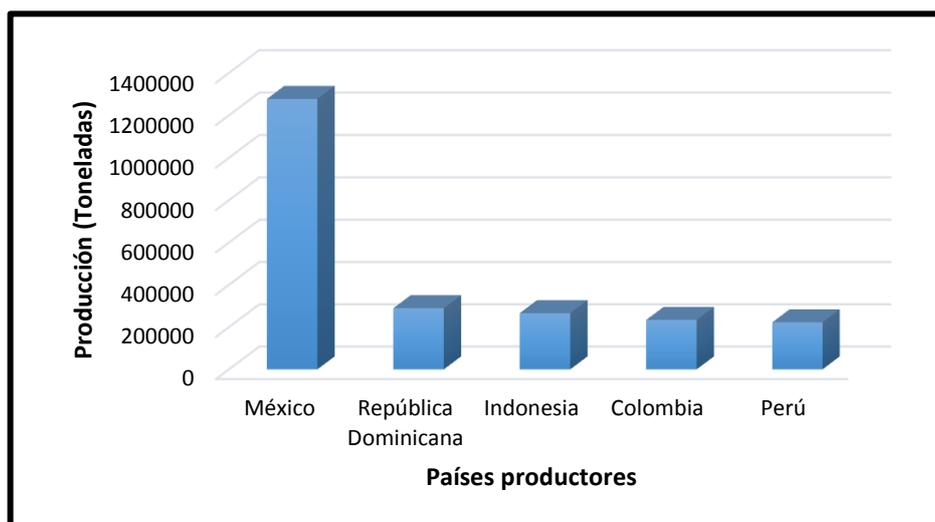


Figura 1. Principales países productores a nivel mundial de aguacate desde el año 1999 hasta el 2013 (FAOSTAT, 2015).

El estado de Michoacán ocupa el primer lugar con una producción anual de 1'193,751 Ton, seguido por Jalisco (87,387 Ton), el Edo. de México (56, 672 Ton), Nayarit (5,293) (Cuadro 1; SIAP, 2013).

Cuadro 1. Producción de aguacate por Estado.

Posición	Estado	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)
1	Michoacán	122,251	1,193,751
2	Jalisco	13,434	87,387
3	Edo. de México	6,671	56,672
4	Nayarit	5,293	34,345
5	Morelos	3,617	27,485

Fuente: SIAP, 2013

2.3. Limitantes fitosanitarios

Entre los problemas que limitan la comercialización y exportación de este cultivo son la presencia de plagas, entre las que se encuentran el barrenador pequeño del hueso (*Conotrachelus perseae* y *C. aguacatae*), el barrenador de ramas (*Copturus aguacatae*) y el barrenador grande del hueso (*Heilipus lauri*). Otras limitantes fitosanitarias, es el daño por trips (*Heliothrips haemorrhoidalis*), araña

roja (*Oligonychus perseae*) y agalla de la hoja (*Trioza anceps*) (CESAVEG®, 2008; Alfonso, 2008; SAGARPA, 2011).

Sin embargo, los problemas fitosanitarios de origen fungoso provocan una disminución en la productividad y rentabilidad. Por ejemplo, la roña del aguacatero (*Sphaceloma perseae*), la tristeza del aguacatero (*Phytophthora cinnamomi* Rands), el marchitamiento (*Verticillium albo-atrum*), la antracnosis (*Colletotrichum* spp.) (CESAVEG®, 2008; SAGARPA, 2011).

2.4. Antracnosis

Esta enfermedad ocasiona pérdidas por decaimiento del fruto durante su almacenaje y comercialización (Freeman *et al.*, 1995; Alfonso, 2008). Es una de las enfermedades principales que afecta la calidad del fruto y puede llegar a causar pérdidas de hasta el 20% (Rodríguez-López *et al.*, 2008). El agente causal es *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (fase asexual) y la fase sexual es *Glomerella cingulata* (Lavaire, 2013).

La importancia de este género es debido a que se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial y es considerado un patógeno de importancia en la agricultura porque puede afectar a una gran diversidad de especies vegetales (Agrios, 1995). Este patógeno también tiene la capacidad de infectar flores y frutos tanto en árboles en desarrollo como en producción, cabe mencionar que pueden ser infectados en cualquier etapa de su crecimiento (Nieto, 2013). Es considerado uno de los hongos más importantes que ocasiona pudriciones de los frutos en postcosecha (Bolkan *et al.*, 1976).

La antracnosis se puede manifestar en varias partes del aguacatero, cuando ataca frutos en desarrollo se le conoce como viruela y en frutos maduros como clavo (Zamora *et al.*, 2001). En hojas si la incidencia de esta enfermedad es alta puede causar defoliación y en flores provoca la caída o aborto del fruto (Téliz y Mora, 2007).

Las fuentes de inóculo de este patógeno son ramas, hojas, inflorescencias, las brácteas de las flores y frutos secos; en los cuales puede sobrevivir (Lavaire, 2013; Aranzazu, 1996).

Cabe mencionar que una sola especie de *Colletotrichum* tiene la capacidad de infectar varios hospederos y que un hospedero puede ser infectado por varias especies de este género (Pérez *et al.*, 2003).

2.4.1. Clasificación taxonómica

Su clasificación taxonómica de acuerdo a Agrios (1995), pertenece al reino: fungi; división: Eumycota, subdivisión: Deuteromycotina; clase: Coelomycetes, orden: Melanconiales, género *Colletotrichum*, Especie: *gloeosporioides*.

2.4.2. Ciclo de la enfermedad

En forma general *Glomerella cingulata* se presenta en la superficie de frutos invernantes y en canchales de algunos hospedantes, formando ascas en el interior de los peritecios. Sin embargo, en otros hospedantes casi no forma dichas estructuras sexuales; la fase asexual se reproduce excesivamente y forma masas de conidios en acérvulos. Cuando el clima es seco los conidios se mantienen unidos en una masa viscosa de consistencia firme y dura, pero en climas cálidos-húmedos las esporas se liberan y su dispersión puede ser por el aire o salpicadura de lluvia y por insectos (Agrios, 1995; Téliz y Mora, 2007).

Al adherirse uno de los conidios a la superficie del fruto, este germina si las condiciones de temperatura y humedad son favorables, los cuales se adhieren a la superficie del hospedero por medio de una capa mucilaginosa compuesta de polisacáridos y glucoproteínas que están presentes en el tubo germinativo y el apresorio (Agrios, 1995; Téliz y Mora, 2007). Los conidios que se encuentra en contacto con la superficie del fruto, al germinar producen un tubo germinativo que se hincha en el ápice para formar una estructura llamada apresorio, la cual mantiene al hongo adherido al fruto. Por lo general, el patógeno infecta al fruto

cuando este se encuentra en su etapa inmadura y permanece en la superficie de manera quiescente (Dickman *et al.*, 1982; Coates y Gowanlock, 1993).

En la etapa de maduración del fruto inicia el crecimiento del micelio e inmediatamente la formación de estructuras como son los acervulos y conidios por debajo de la cutícula, la cual se rompe liberando los conidios para iniciar nuevas infecciones (Figura 2; Agrios, 2002).

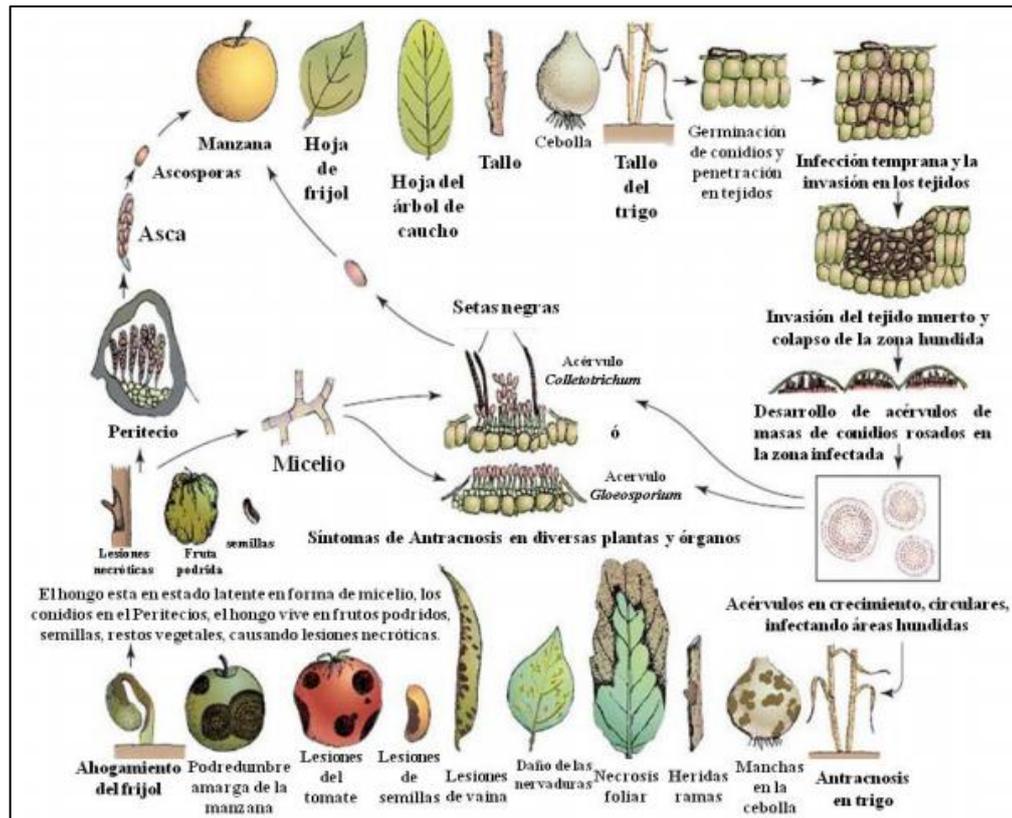


Figura 2. Ciclo patológico de la antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Agrios, 2002).

2.4.3. Síntomas

La antracnosis afecta hojas, brotes, inflorescencias y frutos. En las hojas se manifiesta como manchas circulares color café rojizo con un halo clorótico que se presentan en los bordes o en cualquier parte de la lámina foliar y producen defoliación cuando son muy extensas o numerosas (Lavaire, 2013; Morales y Ángel, 2007; Téliz y Mora, 2007).

En brotes tiernos provoca muerte descendente o torceduras al formarse lesiones laterales. En inflorescencia se pueden observar manchas oscuras en las ramificaciones o necrosis en los extremos (Lavaire, 2013). En ramas se observan manchas circulares de color café o púrpura que se necrosan rápidamente (Morales y Ángel, 2007; Téliz y Mora, 2007).

Los síntomas en fruto se presentan como lesiones circulares de color café oscuro en la superficie del fruto (Figura 3a), las cuales pueden producir rajaduras en su interior y en periodos húmedos se pueden observar masas de esporas de color rosado o salmón sobre las manchas (Lavaire, 2013). También se pueden observar la presencia de manchas circulares café oscuras en el pericarpio y daños por ablandamiento y pudrición del mesocarpio (Figura 3b; Prusky *et al.*, 2001).

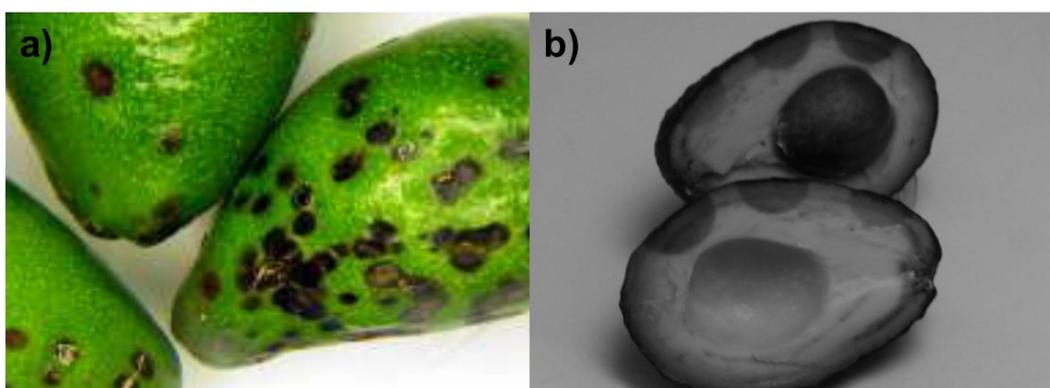


Figura 3. Síntomas de antracnosis a) en la superficie del fruto (CESAVEG®, 2008); b) en el interior del fruto (Rodríguez-López *et al.*, 2013).

2.5. Control de *Colletotrichum* spp.

Para el control de *Colletotrichum* spp. en el cultivo se recomienda realizar buenas prácticas antes y en el momento de la cosecha. Se recomienda realizar podas con la finalidad de eliminar la fuente de inóculo y reducir la humedad en el follaje; así como el uso de productos químicos durante el desarrollo del cultivo y al fruto como tratamiento postcosecha (CESAVEG®, 2008; Garbanzo, 2011).

En este contexto, el uso indiscriminado de productos químicos para el control de enfermedades en los cultivos, ha ocasionado daños a la salud humana y al ambiente (Bowers *et al.*, 2000; Janisiewicz y Criof, 1999). Cabe mencionar que

cada vez son mayores las restricciones de orden higiénico-sanitario sobre el uso de estos compuestos, debido a sus efectos tóxicos y de residuos y la inducción de patógenos resistentes (Carrillo *et al.*, 2005). Montero y colaboradores probaron que el uso de un gran número de productos químicos confiere a *C. gloeosporioides* alta variabilidad genética.

Debido a lo anterior es necesaria la búsqueda de alternativas biológicas y orgánicas para combatir los problemas fitosanitarios y con ello disminuir o sustituir el uso de productos químicos. Una alternativa sería el uso de microorganismos antagonistas (control biológico) o extractos de plantas con propiedades antimicrobianas (Bowers *et al.*, 2000; Janisiewicz y Criof, 1999).

2.6. Control con productos biológicos y orgánicos.

Diversos autores han realizado estudios con extractos vegetales y microorganismos antagonistas, los cuales no solo lo han trabajado con especies del género *Colletotrichum*, agente causal de la antracnosis, también lo han usado para el control de diversas enfermedades en plantas y patógenos de frutos en postcosecha.

Se han realizado estudios para determinar la actividad biocontroladora de diversas especies del género *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. en el cultivo de café bajo condiciones experimentales. En este estudio concluyeron que el microorganismo antagonista *Trichoderma* spp., logró inhibir el crecimiento de ambos patógenos bajo condiciones experimentales (Nina *et al.*, 2011).

En el cultivo de arroz para combatir la enfermedad denominada tizón de la vaina o mancha oriental causado por *Rhizontonia* spp., se evaluaron trece aislamientos de *Trichoderma* spp en condiciones de laboratorio y semicontroladas. En dicho estudio todos los aislamientos evaluados mostraron una elevada actividad antagónica, pero en condiciones semicontroladas tres de cinco microorganismos antagonistas resultaron inhibir el 50% (Reyes *et al.*, 2008).

Guédez y colaboradores en 2009, evaluaron el efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre hongos patógenos postcosecha del cultivo de fresa, en este trabajo evaluaron la enfermedad denominada podredumbre blanda causada por *Rhizopus stolonifer* y la podredumbre negra por *Mucor* spp., *Aspergillus niger* y *Phythium* spp., en el cual observaron que el mecanismo de acción del antagonista fue el de micoparasitismo y resultó ser un excelente controlador *in vitro* debido a la rapidez del crecimiento y la capacidad para reducir el crecimiento de los fitopatógenos antes mencionados.

Otro estudio que han realizado fue en papaya en postcosecha, en el cual probaron el potencial antifúngico de cuatro extractos vegetales (ajo, limón, canela y neem) sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*; en este trabajo el extracto de ajo y de canela resultaron más efectivos ya que inhibieron el 100% para supresión de crecimiento micelial y la germinación de conidios *in vitro* e *in vivo* resultaron controlar la antracnosis (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2013).

2.7. Mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum*

Este género posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos del suelo. Las especies de este género actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas (Ezziyani *et al.*, 2004; Fernández-Larrea, 2001).

Es considerado un excelente biocontrolador para ser estudiado debido a que es fácil de aislar, se puede cultivar en varios sustratos, por su capacidad reproductiva, tienen plasticidad ecológica; efecto estimulante sobre los cultivos y actúan como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos; además de que tienen un eficaz control para una amplia gama de fitopatógenos (Fernández-Larrea, 2001; Cervantes A., 2007).

Para los especies del género *Trichoderma* se han descrito varios mecanismos de acción entre estos se encuentran: competencia por espacio o nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia

inducida, actividad lítica, adhesión y enrollamiento. De los antes mencionados los tres primeros son considerados los principales (Infante *et al.*, 2009; Fernández-Larrea, 2001).

La competencia por espacio o nutrientes es considerada un mecanismo de antagonismo muy importante; el cual se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos hacia un mismo requerimiento, siempre que la utilización por uno de los microorganismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Fernández-Larrea, 2001).

El micoparasitismo es una simbiosis antagónica entre microorganismos en la cual se ven implicadas enzimas extracelulares como son: quitinasas y celulasas (Infante *et al.*, 2009). Mishaghi (1984) y Adams (1990) citados por Infante y colaboradores, determinaron que culmina con la pérdida del contenido citoplasmático del patógeno.

La adhesión o enrollamiento se presenta cuando hay un reconocimiento positivo del antagonista con el patógeno; las hifas se adhieren a las del patógeno utilizando estructuras parecidas a ganchos o apresorios, las cuales se enrollan alrededor. En este mecanismo todo es dirigido por procesos enzimáticos (Pérez N., 2004). Chet y Elad (1983), citado por Infante y colaboradores, en donde menciona que la adherencia de las hifas del *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

El mecanismo denominado antibiosis es la acción directa del antibiótico o algún metabolito tóxico producido por un microorganismo sobre otro sensible a este compuesto (Vero y Mondino, 1999). Webster y Lomas (1964), citado por Infante y colaboradores, determinaron que este género produce gliotoxina y viridina; Oliver y Germain, citado por el mismo autor publicaron que *T. harzianum* Rifai produce trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

Cabe mencionar que los antagonistas no solo tiene un modo de acción, lo cual es importante ya que mientras más modos de acción tenga un aislamiento mayor será su efectividad y se reduce el riesgo que el patógeno genere resistencia, lo anterior también se puede disminuir mediante el uso de combinación de diferentes antagonistas (Infante *et al.*, 2009; Fernández-Larrea, 2001).

2.8. Mecanismos de acción de *Bacillus subtilis*

Las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más efectivas para el control de enfermedades foliares y de raíz, también se les considera como colonizadores eficaces debido a la diversidad genética tanto en el suelo como en la rizosfera (Fernández-Larrea, 2001).

El mecanismo de acción de algunas especies es dirigido por su perfil bioquímico. Producen metabolitos biológicamente activos capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo normal de algunos hongos fitopatógenos (Layton *et al.*, 2011).

Bacillus subtilis es una de las bacterias más estudiadas a nivel mundial por su actividad biocontroladora, esto se debe a que en su información genética expresan genes los cuales codifican para la síntesis de metabolitos peptídicos antibióticos que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos, entre los antibióticos más importantes se encuentran: glamicidina, surfactin, iturin y fengycin (Agricultura orgánica, 2015).

Existen otros mecanismos de acción, volviendo a este antagonista de alto espectro como biocontrolador, que son: la competencia por espacio o nutrientes, produce metabolitos bioactivos con efecto antibiótico y antifúngico; lipopéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos provocando vacuolización y destruyen el tubo germinativo y el micelio (Agricultura orgánica, 2015; Prograc® BS, 2014). Cabe mencionar que tienen la capacidad de producir sideróforos, enzimas líticas y fitohormonas como las auxinas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

3. Objetivos

3.1. Generales

Evaluar diversos extractos vegetales y microorganismos antagonistas para el control *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum* spp., obtenidos de aguacate hass (*Persea americana* Mill.)

3.2. Específicos

1. Reactivar los aislamientos de *Colletotrichum* spp.
2. Evaluación *in vitro* con extractos vegetales y microorganismos antagonistas.
3. Evaluar el efecto de los extractos vegetales y los microorganismos antagonistas sobre la germinación de esporas
4. Determinar si los productos evaluados tienen actividad fungicida o fungistática
5. Determinar el mecanismo de acción de *T. harzianum*
6. Evaluar la afectividad de extractos vegetales y microorganismos antagonistas *in vivo*.

4. Hipótesis

El control biológico y orgánico utilizando microorganismos antagonistas y extractos vegetales son efectivos para disminuir el grado de severidad en los frutos afectados por *Colletotrichum* spp. bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*.

5. Capítulo II. Materiales y métodos

5.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental que se llevó a cabo para realizar el presente trabajo de investigación se encuentra detallado en la figura 4.

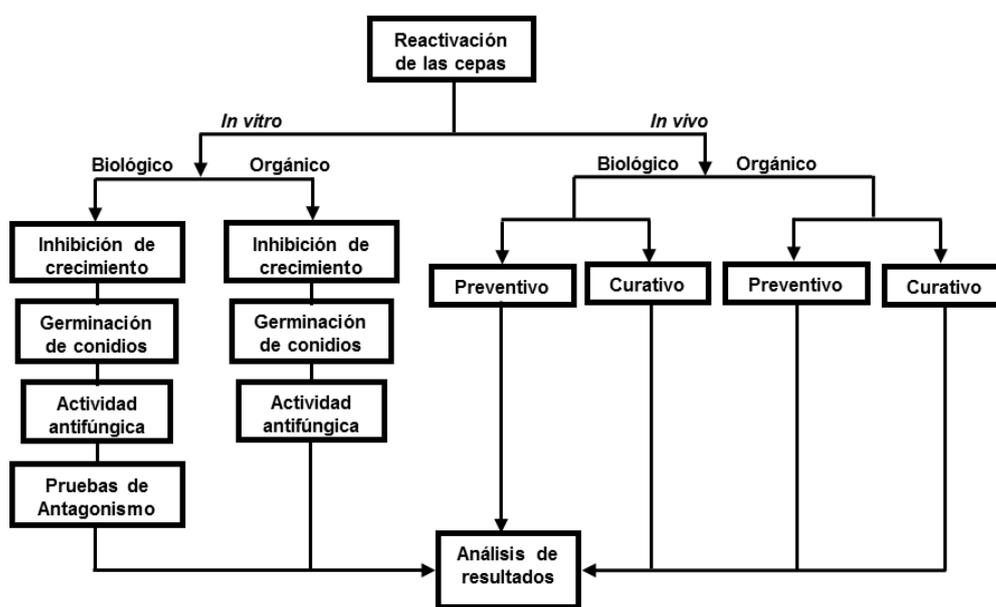


Figura 4. Estrategia experimental.

5.2. Origen de los aislamientos

Los aislamientos que se utilizaron en el presente estudio fueron 15 cepas de siete especies de *Colletotrichum*, previamente aislados mediante cultivos monosporicos en Papa Dextrosa Agar (PDA Difco™) de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis. Los cuales fueron colectados en cuatro municipios del estado de Michoacán (Cuadro 2). En análisis previos realizados por la Dra. Leticia Robles Yerena, se seleccionaron por ser más patogénicos.

Cuadro 2. Aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos con antracnosis.

Municipio	Especie	Clave
Uruapan	<i>C. alienum</i>	1
Uruapan	<i>C. alienum</i>	2
Uruapan	<i>C. gloeosporioides</i>	3
Uruapan	<i>C. alienum</i>	4

Uruapan	<i>C. gloeosporioides</i>	5
Uruapan	<i>C. gloeosporioides</i>	6
Uruapan	<i>C. gloeosporioides</i>	7
Uruapan	<i>C. gloeosporioides</i>	8
Ario	<i>C. boninense</i>	9
Ario	<i>C. kahawae</i>	10
Ario	<i>C. simmondsii</i>	11
Ario	<i>C. acutatum</i>	12
Ario	<i>C. kahawae</i>	15
Periban	<i>C. alienum</i>	19
Salvador	<i>C. fragariae</i>	27

5.3. Reactivación y purificación

Se tomó un cilindro de 0.5 cm de diámetro de los aislamientos almacenados a -20°C y se depositaron en cajas de Petri de 100 x 15 mm conteniendo medio de cultivo PDA, las cajas inoculadas fueron incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con luz continua, hasta observar desarrollo colonial. La purificación se realizó por sub-cultivos en medio de cultivo PDA conteniendo 200 mg/L de estreptomicina.

5.4. Lista de productos biológicos y orgánicos a evaluar

Los productos biológicos y orgánicos fueron proporcionados por la empresa Grupo ultraquimia (Promotora Técnica Industrial S.A. de C.V.). En el cuadro 3 se muestra el nombre comercial del producto, el ingrediente activo y la dosis recomendada en campo.

Cuadro 3. Lista de productos biológicos y orgánicos.

Producto	Ingrediente activo (Extracto)	Dosis (ml/L)
Formulado 45-2	Menta (<i>Mentha piperita</i>)	10
Progranic citrus	Cítricos (<i>Citrus</i> spp.)	10
Progranic mega	Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>)	25
Progranic gamma	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	15
Progranic nimicide	Nemm (<i>Azadirachtha indica</i>)	10
Progranic Neemacar	Nemm (<i>Azadirachtha indica</i>) y Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	20
Progranic omega	Chicalote (<i>Argemone mexicana</i>)	7.5
Progranic cinnacar	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	5
Spectrum trico Bio	<i>Trichoderma harzianum</i>	2
Probac BS	<i>Bacillus subtilis</i>	5

5.5. Evaluación *in vitro* de productos biológicos y orgánicos.

5.5.1. Selección de productos biológicos y orgánicos con mayor efectividad biológica

Para realizar la selección de productos biológicos y extractos vegetales con mayor efectividad se utilizó el método de agar modificado (Adeniyi and Olufolaji, 2014). Para lo cual se tomó la concentración recomendada para su aplicación en campo y dos concentraciones una menor y otra mayor.

La técnica de agar modificado se realizó como se describe a continuación. Se preparó medio de cultivo PDA y antes de su solidificación se mezcló con cada una de las dosis (Cuadro 4). Posteriormente se vertió en cajas Petri de 100 x 15 mm. Se incluyó un testigo absoluto (PDA sin producto) y un testigo químico imazalil (100 y 1000 ppm). En total se utilizaron 33 tratamientos con tres repeticiones cada uno.

Cuadro 4. Relación de extractos vegetales y microorganismos antagonistas a evaluar.

Producto	Ingrediente activo (Extracto)	Dosis (ml/L)
Formulado 45-2	Menta (<i>Mentha piperita</i>)	5, 10, 15
Progranic citrus	Cítricos (<i>Citrus</i> spp.)	5, 10, 15
Progranic mega	Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>)	20, 25, 30
Progranic gamma	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	10, 15, 20
Progranic nimicide	Nemm (<i>Azadirachtha indica</i>)	5, 10, 15
Progranic Neemacar	Nemm (<i>Azadirachtha indica</i>) y Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	15, 20, 25
Progranic omega	Chicalote (<i>Argemone mexicana</i>)	2.5, 7.5, 12.5
Progranic cinnacar	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	1, 5, 9
Spectrum trico Bio	<i>Trichoderma harzianum</i>	1, 2, 3
Probac BS	<i>Bacillus subtilis</i>	1, 5, 9
Testigo químico	Imazalil	0.1g/L, 1g/L

Después de 24 horas de la preparación del medio con cada una de las dosis, se depositó en el centro de las cajas Petri un disco de 0.4 cm de diámetro con crecimiento micelial de 8 días de edad de las 15 cepas, las placas inoculadas se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con luz continua. El diámetro de la colonia fungosa se midió cada 24 horas con un vernier digital, hasta que el testigo absoluto cubrió totalmente la superficie del medio de cultivo (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2013).

Finalmente los productos seleccionados que fueron utilizados para los ensayos de efectividad y actividad biológica *in vitro* fueron: Formulado 45-2, Progranic Neemacar, progranic cinnacar, progranic BS y Spectrum Trico Bio. Para cada uno de los productos seleccionados se evaluó 7 concentraciones. Se incluyó un testigo químico imazalil (100 ppm) (Cuadro 5) y un testigo absoluto. En total se evaluaron 37 tratamientos con tres repeticiones cada uno.

Cuadro 5. Productos biológicos y orgánicos para evaluar efectividad y actividad antifúngica

Producto	Ingrediente activo (Extracto)	Dosis ml/l
Formulado 45-2	Menta (<i>Mentha piperita</i>)	3, 6, 9, 12, 15, 19, 21
Progranic Neemacar	Nemm (<i>Azadirachtha indica</i>) y Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	2.1, 4.2, 6.3, 8.4, 10.5, 12.6, 15.0
Progranic cinnacar	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	1, 1.65, 2.3, 2.95, 3.6, 4.25, 5.0
Spectrum trico Bio	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 0.8, 1.0
Probac BS	<i>Bacillus subtilis</i>	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 0.8, 1.0
Testigo químico	Imazalil	0.1g/L

El porcentaje de efectividad se calculó utilizando la fórmula de Abbot's, es la siguiente:

$$\% \text{ Efectividad} = \left(1 - \frac{\varnothing_{\text{tratamiento}}}{\varnothing_{\text{testigo}}} \right) 100$$

Donde:

$\varnothing_{\text{tratamiento}}$: tamaño de crecimiento con tratamiento

$\varnothing_{\text{testigo}}$: media del tamaño de crecimiento del testigo

(Henderson and Tilton, 1955).

5.6. Prueba de antagonismo *in vitro*

Para las pruebas de antagonismo, las 15 cepas de *Colletotrichum* spp. se crecieron en cajas Petri de 100 x 15 mm con medio PDA y se incubaron 10 días a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con luz continua.

El hongo *T. harzianum*, se aisló del producto concentrado. Se tomó 5 μL y se depositó en una caja Petri con medio PDA y se plaqueó. Se incubó a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas con luz continua. Concluido el tiempo, se transfirió una espora germinada a otra caja Petri con medio PDA y se incubó por 7 días a las mismas condiciones.

En cajas de Petri de 100 x 15 mm con medio PDA, se sembró mediante la técnica de cultivo dual, en un extremo un disco de 0.4 cm de diámetro a partir de un cultivo de *T. harzianum* con siete días de edad y en el otro extremo la cepa de *Colletotrichum* spp. con diez días de edad. Se incluyeron dos testigos: 1) Siembra de un disco de *T. harzianum* en un solo extremo; 2) siembra de un disco del mismo tamaño de *Colletotrichum* spp. Cada uno con tres repeticiones. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con luz continua. Posteriormente se realizaron observaciones y mediciones cada 24 horas hasta que el desarrollo de los hongos cubrieron completamente la superficie del medio (Guédez *et al.*, 2009).

Las pruebas de antagonismo con *Bacillus subtilis* se llevaron a cabo como se muestra en la figura 5. A partir de una concentración de 1×10^{11} esporas/L se tomaron alícuotas de 15 μL (1.5×10^6 esporas) del antagonista y se sembraron discos de 0.4 cm con crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp. con 10 días de edad. Las cajas inoculadas se incubaron a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 días, con luz continua y se midió diariamente el crecimiento del antagonista y el fitopatógeno (Baños *et al.*, 2004).

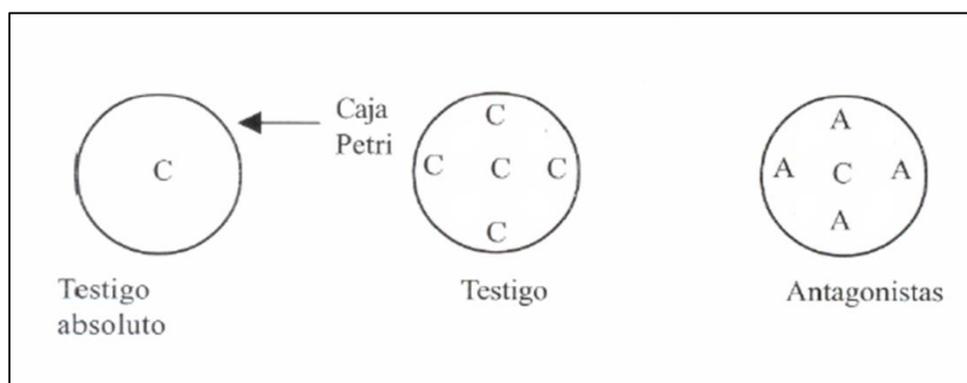


Figura 5. Prueba de antagonismo con *Bacillus subtilis*.

C: *Colletotrichum* spp.; A: antagonista

5.6.1. Porcentaje de colonización de *Trichoderma harzianum*

Se utilizó la técnica reportada por Cherif y Benhamou en 1990. Consistió en medir cada 24 horas el crecimiento de ambos hongos sembrados por cultivo dual. Los valores utilizados para calcular el porcentaje de colonización fueron a partir de medias y resultados superiores al 50% fueron considerados efectivos.

La fórmula para obtener el porcentaje de colonización de *T. harzianum* sobre *Colletotrichum* spp., es la siguiente:

$$C = \frac{DTP}{DE} (100)$$

Donde:

C: Porcentaje de colonización

DTP: Distancia recorrida por la colonia de *T. harzianum* sobre la colonia del patógeno en el eje que separa ambas colonias.

DE: Distancia entre ambos puntos de siembra.

(Rollan *et al.*, 1999)

5.6.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum*

De entre 5-7 días de incubación, tiempo en que *T. harzianum* alcanzó a invadir los aislamientos, se tomó una porción de los hongos con parte de medio de cultivo en la franja de unión, se colocó en un portaobjetos con una gota de glicerol más azul de algodón y se observó en un microscopio OLYMPUS BX41 a 40X en contraste de fases, para saber el mecanismo de acción del antagonista (Guédez, *et al.*, 2009).

5.7. Efecto inhibitorio de los antagonistas

Para determinar el efecto inhibitorio, se midió el crecimiento del hongo antagónico y el del fitopatógeno. El porcentaje de inhibición se estimó en base a la diferencia obtenida entre el crecimiento del patógeno confrontado con el antagonista y el crecimiento del patógeno sin antagonista multiplicado por 100 entre la media del aislamiento testigo (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2013).

5.8. Germinación de esporas

Para determinar el efecto de los biológicos y orgánicos sobre la capacidad de germinación de esporas, en cajas Petri de 100 x 15 mm se depositó medio PDA al cual previamente se adicionó cada una de las dosis (Cuadro 6).

Cuadro 6. Lista de biológicos y orgánicos para la prueba de germinación de esporas.

Producto	Ingrediente activo (Extracto)
Formulado 45-2	Menta (<i>Mentha piperita</i>)
Progranic Neemacar	Nemm (<i>Azadirachtha indica</i>) y Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)
Progranic cinnacar	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)
Spectrum trico Bio	<i>Trichoderma harzianum</i>
Probac BS	<i>Bacillus subtilis</i>

La suspensión de esporas se preparó con la ayuda de un hematocitometro. A partir de un cultivo con 10 días de edad en medio de cultivo Agar Extracto de Malta (AEM) o Agar Harina de maíz (AHM); con una aguja de disección se tomó una porción del crecimiento o masa de esporas si se observaba y se depositó en un tubo de 2 ml en el cual previamente se adiciono 1 ml de agua destilada estéril y se homogenizo. El conteo de células se realizó con la cámara de Neubauer para obtener una suspensión final de 1×10^4 esporas/ml (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

A partir de esta suspensión se depositaron en el medio 20 μ L (200 esporas), cada tratamiento se realizó con tres repeticiones; las cajas se incubaron a temperatura ambiente y la germinación se evaluó a las 3, 6, 9, 12 y 15 horas después de la inoculación. Las esporas fueron consideradas germinadas cuando el largo de su tubo germinativo alcanzó la mitad del diámetro de la espora (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

5.9. Actividad antifúngica

Al concluir la evaluación *in vitro*, los discos de 0.4 cm de diámetro de los tratamientos que resultaron con un PICM del 100%, se tomaron y fueron depositados en cajas de Petri con medio PDA sin tratamiento. Las cajas sembradas fueron incubadas a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con luz continua. La evaluación se realizó a los tres y seis días de incubación, para lo cual se observó si había crecimiento del fitopatógeno en cada uno de los tratamientos. En los que se observó crecimiento del fitopatógeno se realizaron preparaciones en glicerol para corroborar que se trata del fitopatógeno en estudio.

5.10. Evaluación *in vivo* de los productos biológicos y orgánicos

Se seleccionaron frutos aparentemente asintomáticos y con la misma madurez fisiológica, obtenidos de la central de abastos. La evaluación se realizó con los 15 aislamientos de *Colletotrichum* spp., los cuales se sembraron en cajas Petri con medio Agar aguacate (AG) y se incubaron por 7 días a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con luz continua. Concluido el tiempo de incubación se realizaron sub-cultivos en cajas con medio PDA, las cuales fueron incubadas a las mismas condiciones por 10 días.

Los frutos se lavaron superficialmente con detergente y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos, concluido el tiempo se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre sanitas estériles (Landro-Valenzuela *et al.*, 2013). Paralelamente se prepararon las concentraciones de cada uno de los productos a evaluar (Cuadro 7).

Cuadro 7. Lista de biológicos y orgánicos a evaluar *in vivo*.

Producto	Microorganismo antagonista/Extracto de plantas	Concentración ml/litro medio
Progranic Neemacar	Nemm (<i>Azadirachtha indica</i>) y Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	0.5, 2.1, 4.2
Progranic cinnacar	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	1.65, 2.3
Spectrum trico Bio	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.5, 0.8, 1.0
Probac BS	<i>Bacillus subtilis</i>	0.01, 0.1, 0.5
Testigo químico	Imazalil	0.1g/L

Se realizaron cuatro pruebas: **1) Preventivo con herida**; la superficie del fruto se asperjo con la dosis correspondiente y 48 horas después, se inoculo depositando sobre la herida un disco de 0.5 cm de diámetro con crecimiento del patógeno. **2) Preventivo sin herida**: se realizó de la misma manera como la prueba 1, con la diferencia que el inoculo se depositó en la superficie del fruto sin herida. **3) Curativo con herida**: El fruto se inoculó depositando sobre la herida un disco de 0.5 cm de diámetro con crecimiento del patógeno y 48 horas después se asperjo con la dosis correspondiente. **4) Curativo sin herida**: se realizó de la misma manera como la prueba 3, con la diferencia que el inoculo se depositó en la superficie del fruto sin herida (Landero-Valenzuela *et al.*, 2013).

La herida se realizó haciendo un pequeño orificio de aproximadamente 1 cm con una aguja de disección previamente esterilizada. Se incluyeron testigos absolutos y en total fueron trece tratamientos para cada prueba con tres repeticiones (Landero-Valenzuela *et al.*, 2013). Posteriormente los frutos se colocaron en recipientes de plástico, en los cuales se colocaron sanitas estériles previamente humedecidas con agua destilada estéril, los recipientes se introdujeron en bolsas y fueron cerradas a manera de crear una cámara húmeda (Landero-Valenzuela *et al.*, 2013).

Se hicieron dos evaluaciones a los 3 y 6 días, en la primera se midió el diámetro de crecimiento del hongo sobre la superficie del fruto y en la segunda se midió la misma variable y además se abrió el fruto en donde se realizaron las dos

inoculaciones y se midió el diámetro de la lesión (Landro-Valenzuela *et al.*, 2013).

5.11. Análisis estadístico

Los datos en porcentaje de todos los ensayos realizados (*in vitro* e *in vivo*) se transformaron en proporciones para someterse a un análisis de varianza (ANDEVA) aplicando el modelo estadístico lineal completamente al azar con una caja Petri como unidad experimental. Cuando el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre tratamientos se realizó una comparación de medias por el método de Tukey (Baños *et al.*, 2004).

6. Capítulo III. Resultados y discusión

6.1 Cepas fungosas puras

Se obtuvieron las 15 cepas puras que inicialmente fueron mencionadas en el presente trabajo (Figura 6). Las cepas fueron incubadas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, Freeman *et al.* (1996), mencionan que temperaturas entre 20 a 28°C son óptimas para el crecimiento del fitopatógeno en estudio.

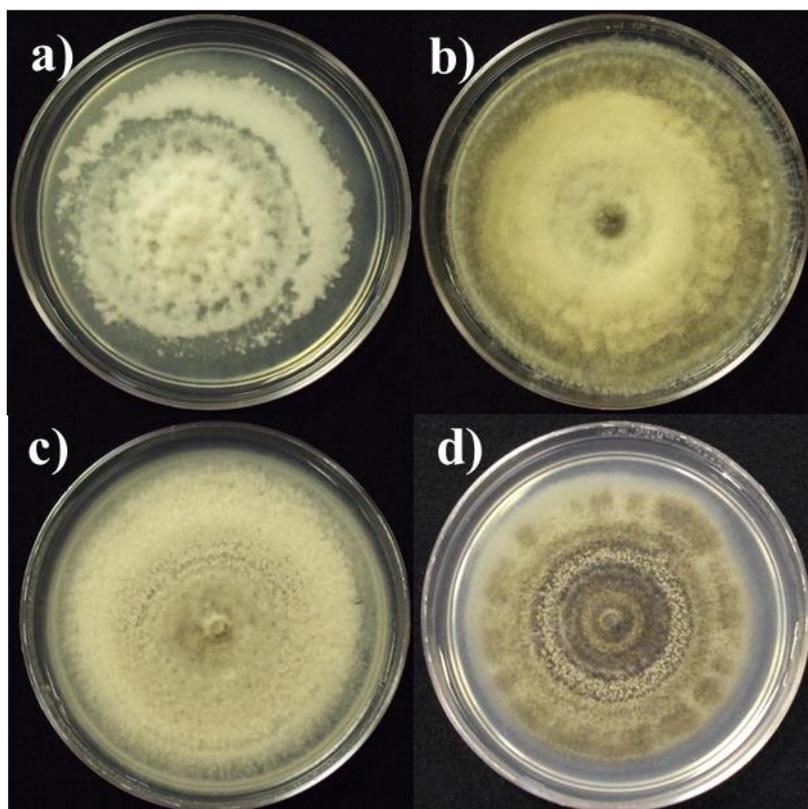


Figura 6. Aislados de *Colletotrichum* spp. En medio de cultivo PDA.
a) *C. boninense* b) *C. kahawae* c) *C. acutatum* d) *C. fragarie*

6.2 Evaluación *in vitro* de los productos orgánicos y biológicos

6.2.1 Selección de los productos orgánicos y biológicos con mayor efectividad

Los productos Progranic neemacar (15, 20 y 25 ml/L) y Progranic cinnacar (5 y 9 ml/L); mostraron una eficiencia del 100% de inhibición del crecimiento para todos los aislamientos. Los dos productos biológicos evaluados, el Spectrum Trico Bio (1, 2 y 3 ml/L) y el Probac BS (1, 5 y 9 ml/L), también presentaron el mismo resultado; al igual que el testigo químico imazalil (Cuadro 8). Para el producto

Formulado 45-2, en ninguna de las concentraciones evaluadas (5, 10 y 15 ml/L) y para ninguno de los aislados alcanzó el 100% de eficiencia (Figura 7), presentando diferencias estadísticamente significativas; el porcentaje obtenido varió entre el 70 hasta 97.93% (Cuadro 8).

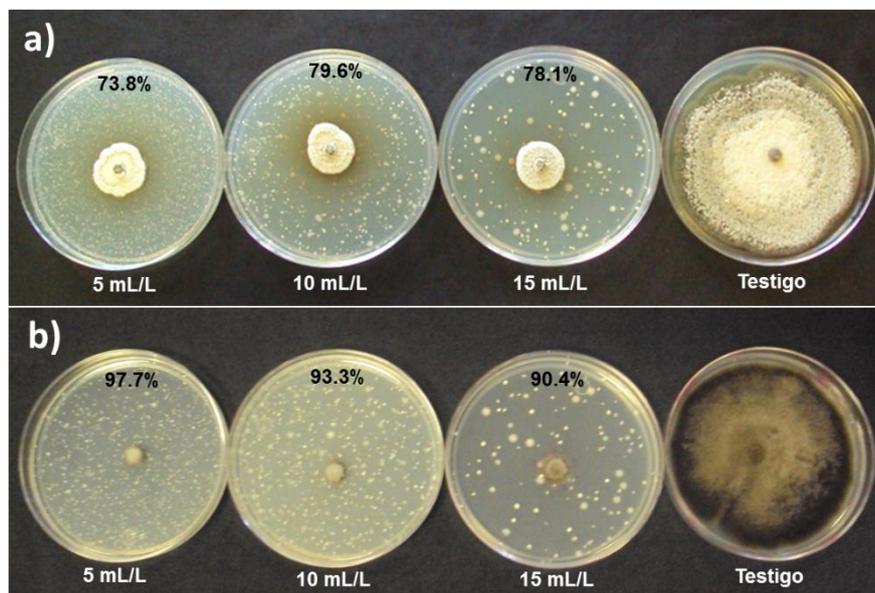


Figura 7. Cultivo modificado con extracto de menta. a) Aislado 11 (*C. simmondsii*), b) Aislado 27 (*C. fragarie*).

El Progranic citrus a la concentración más alta evaluada (15 ml/L), para el aislado 15 (*C. kahawae*), presentó el 100% de inhibición del crecimiento micelial y en los restantes el porcentaje osciló entre 40.7-93.7. Para la concentración baja, los aislados 10 (*C. kahawae*) y 15 (*C. kahawae*), el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) fue de 81.53 y 84.6 respectivamente; y en las cepas faltantes el porcentaje fue de 16.26 hasta 68.2, presentando diferencias significativas para las concentraciones baja y alta; y con los resultados obtenidos para Progranic cinnacar, Progranic neemacar, Spectrum Trico Bio y Probac BS (Cuadro 8).

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Barrera-Necha y García-Barrera, (2008), quienes reportan que el aceite esencial de limón mexicano no reduce significativamente el crecimiento de *Fusarium* sp. quienes evaluaron concentraciones mayores bajo condiciones *in vitro*.

Para los productos Progranic mega (Extracto de gobernadora), el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para las tres concentraciones evaluadas (20, 25 y 30 ml/L) resultó de entre 69.56 hasta 93.7; para el Progranic gama (Extracto de ajo) los resultados obtenidos fueron entre 31.9 hasta 86.7; el progranic nimicide para las tres concentraciones evaluadas mostró eficiencia de 52.16-85.7 %; y el Progranic omega entre 55.36 ha 89.6%, presentando diferencias estadísticamente significativas con los resultados obtenidos para los productos Progranic cinnacar, Progranic neemacar, Formulado 45-2, Spectrum Trico Bio y Probac BS (Cuadro 8).

Los resultados obtenidos difieren con lo reportado por Moreno-Limón *et al.* (2011), que realizaron estudios sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp utilizando extractos de gobernadora y reportan la inhibición de ambos patógenos de hasta el 100%, estos resultados son diferentes a los obtenidos en el presente trabajo. Con respecto al extracto de ajo, Landero-Valenzuela *et al.*, (2013), reportan resultados diferentes a los obtenidos, ya que al evaluar a 10 y 15% reportan inhibición del 100% del crecimiento de *C. gloeosporioides* bajo condiciones *in vitro*.

De los 10 productos evaluados, se seleccionaron los que presentaron el mayor porcentaje de eficiencia para el control de todos los aislados. Los orgánicos: Progranic cinnacar, Progranic neemacar, y Formulado 45-2; los dos primeros mostraron el PICM de 100 y el ultimo un máximo de 97.93, en el cual se evaluó concentraciones menores comparado con los productos orgánicos faltantes. Y los dos biológicos presentaron un PICM de 100. Los resultados de estos productos comparados con las muestras faltantes presentan diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 8). Los resultados obtenidos en Progranic cinnacar y Progranic neemacar con inhibición del 100 %, difieren con los obtenidos por Amadioha (2000), que reportó que el extracto de semillas de neem redujo el crecimiento radial de *Pyricularia oryzae* bajo condiciones *in vitro* hasta de un 83.6%.

Cuadro 8. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) de *Colletotrichum* spp., con productos orgánicos y biológicos.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL																
CLAVE DE LOS AISLAMIENTOS																
Producto (Extracto)	DOSIS (ml/L)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	19	27
Menta	5	94.3 b	94.6 ab	97.93 ab	96.16 ab	97.83 ab	91.26 ab	92.13 b	97.2 a	91.23 abc	94.76 ab	76.43 bc	77.36 ab	93 bc	94.36 ab	97.33 a
	10	92.8 bc	84.57 cde	96.46 ab	93.7 abc	97.46 ab	88.63 abc	90.66 bc	93.6 ab	95.06 ab	92.96 ab	79.76 bc	82.4 ab	89.86 cd	90.63 bc	91.37 ab
	15	89.5 cd	85 cde	90.23 bc	91.43 bc	91.96 c	83.83 b-e	70 cd	92.97 abc	86.03 bc	90.9 b	81.5 bc	81.1 ab	86.3 cde	87.56 bcd	76.5 a-d
Cítricos	5	48.2 h	68.2 g	42.46 g	40.53 h	62.36 f	53.5 h	28.4 h	56.9 h	53.66 g	81.53 cd	18.56 i	16.26 e	84.6 def	40.96 k	48.87 cde
	10	80.6 ef	87.03 bcd	63.46 e	62 e	77.4 e	60.2 gh	52.2 ef	71.53 fg	68.83 def	91.5 ab	40.33 h	34.6 de	98.56 ab	61.83 i	79.1 a-d
	15	91.53 bc	91.03 bcd	77.63 d	76.4 d	84.9 d	88.2 a-d	64.83 bc	75.76 efg	88.96 abc	95.53 ab	43.46 gh	40.7 cde	100 a	72.56 h	76.4 a-d
<i>Larrea tridentata</i>	20	85.2 de	73.46 fg	84.3 cd	87.4 c	86 d	76.3 c-f	76.8 de	79.4 d-g	69.56 de	80.2 de	80.16 bc	71.13 abc	78.13 fg	79.7 e-h	94.07 ab
	25	86.26 d	76.86 ef	94.3 ab	92.36 bc	93.66 bc	82.26 b-f	80.1 de	83.1 cde	79.96 cd	87.9 bcd	79.9 bc	75.86 ab	86.5 cde	83.1 def	91.03 ab
	30	89.8 bcd	82.43 def	93.7 ab	91 bc	92.83 c	83.73 b-e	84.9 bcd	86.83 bcd	82.8 bc	90.06 bc	83.96 b	78.6 ab	90.46 dc	86 cde	78.1 abcd
Ajo	10	40.1 i	43.7 i	52.96 f	45.4 gh	53.56 g	33.56 i	44.5 i	60.1 h	56.16 fg	35.53 i	71 cd	80 ab	73.03 g	49.53 j	35.53 e
	15	36.7 i	50.43 hi	55.63 f	47.2 gh	55.53 g	31.9 i	49.73 i	59.33 h	61.43 efg	42.7 hi	73.6 bcd	62.36 bcd	80.16 ef	49.53 j	41.93 de
	20	48.1 h	57.87 hi	68.46 e	55.23 f	60.9 f	36.8 i	52.93 h	70.63 g	59.03 efg	50.86 h	76.9 bc	78.6 ab	86.7 cde	49.13 j	55.27 b-e
Neem	5	79.33 fg	80.16 def	77.46 d	75.16 d	79.76 e	73.86 ef	71.8 fg	82.9 cde	64.73 efg	61.93 g	52.16 fg	61.16 bcd	84.8 def	75.46 gh	84.4 abc
	10	78.93 fg	80.8 def	77.43 d	75.26 d	80.3 e	74.5 ef	73.73 fg	82.73 de	67.16 def	64.5 fg	64.6 de	68.96 a-d	83.8 def	79.06 e-h	77.6 a-d
	15	80.8 ef	79.23 def	81.96 d	79.83 d	79.16 e	73.8 ef	80.73 ef	75.66 efg	69.13 de	72 ef	57.1 ef	62.3 bcd	85.7 de	82.33 d-g	87.5 a-d
Neem más canela	15	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	20	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	25	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Chicalote	2.5	75.23 g	79.2 def	78.56 d	73.93 d	76.46 e	69.26 fg	71.26 g	81.06 def	58.23 efg	62.2 g	65.7 de	62.13 bcd	82.83 ef	76.26 fgh	80.43 a-d
	7.5	78.43 fg	81.47def	80.9 d	77.03 d	79.33 e	74.76 def	73.56 fg	83 cde	59.93 efg	63.9 fg	76.63 bc	55.36 bcd	85.3 de	79.2 e-h	82.27 a-d
	12.5	79.5 fg	80.5def	81.63 d	77.46 d	80.4 e	75.43 c-f	73.46 fg	84.76 b-e	64.93 efg	65.4 fg	82.03 b	61.36 bcd	85.7 de	81.06 d-g	89.6 ab
Canela	1	19.2 j	11.4 j	16.96 h	4.3 i	18.76 h	2.36 j	4.13 j	27.1 i	14.13 h	8.56 j	4.4 j	6.76 e	28.53 h	11.6 l	64.4 abcd
	5	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	9	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>T. harzianum</i>	1	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	2	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	3	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>B. subtilis</i>	1	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	5	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	9	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Imazalil	0.1g/L	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	1.0g/L	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a

Datos con la misma letra en la misma columna no presentan diferencias estadísticamente significativas, Tukey ($P < 0.05$).

6.2.2 Evaluación de los productos con mayor efectividad

Los productos Progranic cinnacar (extracto de canela), a las concentraciones desde 2.3 hasta 5ml/L y el Progranic neemacar (extracto de Neem más canela) desde 4.2 a 15 ml/L; tuvieron una eficiencia del 100% de inhibición del crecimiento micelial (Figura 8a; 8b, respectivamente) para todos los aislados; al igual que el testigo químico imazalil a 0.1 g/L, estos resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) (Cuadro 9).

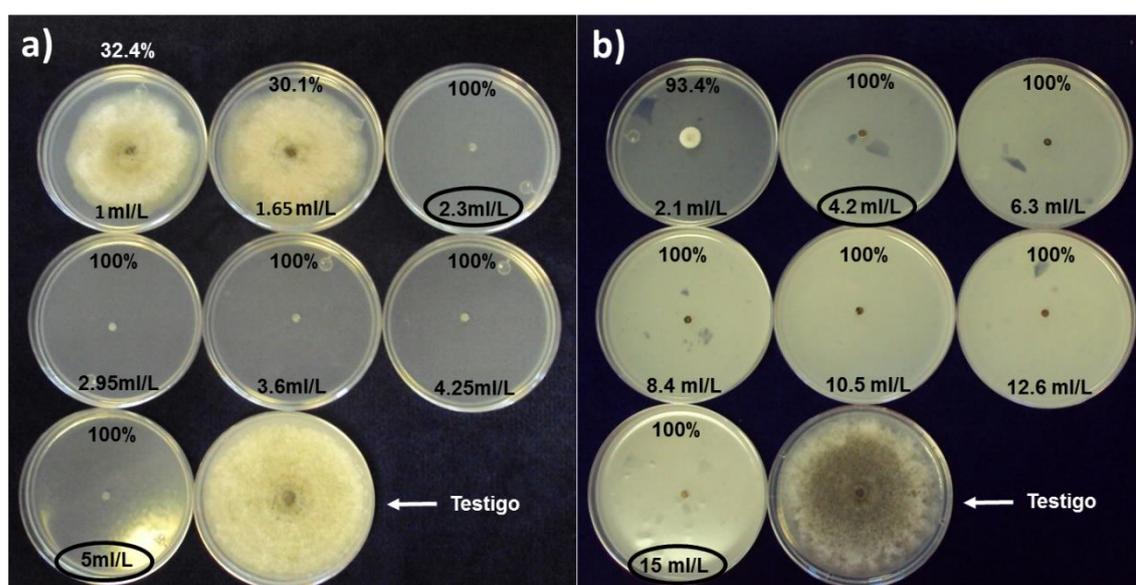


Figura 8. Inhibición *in vitro* del crecimiento colonial de *Colletotrichum* spp., en medio de cultivo PDA modificado. a) Extracto de canela-*C. gloeosporioides* y b) Extracto de Neem más canela-*C. kahawae*.

Resultados similares obtuvieron Landero-Valenzuela *et al.* (2013), quienes al evaluar el extracto de canela a las concentraciones de 0.0050, 0.0100, 0.0150% inhibió el 100% del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. En forma similar, Maqbool *et al.* (2011), demostraron que al aplicar aceite de canela *in vivo* a una concentración de 0.4%, no se observa crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y *C. musae*.

En cuanto al extracto de neem mas canela se observó que para obtener el 100% de eficiencia la dosis fue más alta comparado con el extracto de canela, esto podría deberse al contenido de extracto de Neem, ya que Landero-Valenzuela *et al.* (2013), demostraron que la efectividad del extracto de semillas de Neem sobre

el crecimiento de *C. gloeosporioides*, fue menor comparado con el extracto de canela.

Para el Formulado 45-2 (Extracto de menta), en ninguna de las concentraciones evaluadas se obtuvo el PICM de 100, el menor porcentaje de eficiencia fue en la concentración de 3 ml/L para el aislado de *C. kahawae* (15) que fue de 23.97% y el porcentaje de eficiencia vario entre el antes mencionado hasta 97.4% y para 21 ml/L el PICM osciló entre 60.5-97.7%. Presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con algunas concentraciones de los otros productos (Cuadro 9).

Los resultados antes mencionados son similares a los obtenidos por Cáceres *et al.* (2014), quienes al evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos a partir de especias obtenidos por hidrodestilación contra diferentes tipos de hongos patógenos alimentarios (*F. oxysporum*, *A.alternata*, *G. candidum*, *Trichoderma* spp., *P. digitatum* y *A. niger*), demostraron que el extracto acuoso de orégano presentó la mejor capacidad de inhibición de crecimiento radial del micelio a una concentración de 40 mg/L. Estos autores atribuyen la actividad biológica a los compuestos fenólicos encontrados en el análisis de la composición química (Eugenol, Timol y Carvacrol).

Sin embargo, Barrera-Necha y García-Barrera (2008), quienes evaluaron la actividad antifúngica de nueve aceites esenciales comerciales, reportaron la baja efectividad del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha piperita*) sobre el crecimiento de *Fusarium* spp. aislados de papaya a las diferentes concentraciones probadas (100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sin embargo en el presente estudio se utilizaron concentraciones mayores a los antes mencionado, esa podría ser la razón por la cual obtuvieron una baja eficiencia.

En los resultados de las pruebas *in vitro*, los productos biológicos Probac BS (*B. subtilis*) a las concentraciones de 0.5 ml/L y 1.0 ml/L y Spectrum Trico Bio (*T. harzianum*) a 1.0 ml/L, mostraron un porcentaje de efectividad de 100% para todos los aislamientos (Cuadro 9); igualando estos resultados con los obtenidos para el testigo químico Imazalil. Las diferencias estadísticamente significativas

($P < 0.05$) se presentaron con los resultados obtenidos para el Formulador 45-2 y en concentraciones bajas del extracto de canela y Spectrum Trico Bio (Cuadro 9). Para el bio-controlador (*T. harzianum*) a la dosis de 1×10^{-4} ml/L dos cepas presentaron porcentaje de eficiencia nulo esto debido a que en el medio modificado no se observó crecimiento del antagonista

Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de los reportados por Reyes *et al* (2008), quienes al evaluar la actividad antagónica de 13 aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia* sp., por el método de cultivo dual, obtuvieron que el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) osciló entre 42.33-83.31%. La razón por la cual se observó diferencia podría ser por el método utilizado, debido a que según lo obtenido por dichos autores resultan favorecidos los aislamientos que presentan mayor capacidad para competir por el sustrato, ya que cubren el espacio vital y utilizan con mayor facilidad los nutrientes disponibles, demostrando que los antagonistas actúan por antibiosis, micoparasitismo directo o penetración.

En contraparte, en el presente estudio el método evaluado favorece el crecimiento del antagonista, debido a que al usar el medio modificado *T. harzianum* crece en la superficie de todo el medio cubriendo con mayor rapidez el espacio vital. En los estudios realizados por Guédez *et al.* (2009), demostraron la capacidad de *T. harzianum* para reducir el crecimiento de patógenos postcosecha en fresa (*Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium* spp.) cuando está en contacto con el patógeno y observaron que el mecanismo de acción fue de micoparasitismo.

Astorga-Quirós *et al* (2013), evaluaron la actividad antagónica por cultivo dual de *B. subtilis* contra tres principales patógenos de ajo (*Sclerotium cepivorum*, *Penicillium* spp. y *Pseudomonas marginalis*). En su estudio obtuvieron que la cepa de *B. subtilis* tuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de 14.087% ante *S. cepivorum* y 3.328% para *Penicillium* sp. Por lo anterior concluyeron que este antagonista no es un buen biocontrolador. Comparado con los datos obtenidos en el presente estudio podríamos concluir que este

antagonista ante *Colletotrichum* spp. puede considerarse como un buen biocontrolador *in vitro* ya que se obtuvo un porcentaje de eficiencia de 100%.

Los resultados obtenidos por Xing y Westphal (2007), demostraron que el aislamiento de *B. subtilis* que probaron para determinar la inhibición de 12 cepas de *Fusarium virguliforme*, agente causal de la enfermedad denominada síndrome de muerte súbita de la soja; inhibió el crecimiento de todas las cepas evaluadas, resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

Cuadro 9. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) de *Colletotrichum* spp., con los productos seleccionados.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL (PICM)																
CLAVE DE LOS AISLAMIENTOS																
Producto	DOSIS (ml/L)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	19	27
Extracto de menta	3	92.94 abc	88.02 ab	97.39 abc	97.2 a	95.47 a	91.8 abc	93.49 ab	98.8 a	87.74 abc	93.28 ab	98.28 ab	25.4 de	23.97 gh	94.78 a	93.36 abc
	6	92.75 abc	88.8 ab	96.91 abc	96.9 ab	94.43 a	92.5 abc	94.7 ab	98.9 a	86.85 abc	91.4 abc	91.9 abc	26.55 de	33.7 fg	94.78 a	92.63 a-d
	9	90.65 a-d	86.77 ab	97.21 abc	97.21 a	95.33 a	90.4 abc	95.19 ab	98.35 ab	90.31 abc	92.55 ab	92.55 ab	50.68 c	54.94 e	95.66 a	92.24 a-d
	12	88.29 b-e	87.69 ab	96.77 abc	96.54 ab	94.78 a	90.6 abc	95.54 ab	100 a	90.14 abc	93.38 ab	93.38 ab	44.35 cd	50.71 ef	100 a	92.01 a-d
	15	89.71 a-d	81.32 ab	96.73 abc	95.21 ab	95.68 a	90.4abc	95.56 ab	98.7 ab	91.15 abc	90.9 abc	90.9 abc	61.72 bc	63.3 de	100 a	91.4 a-d
	19	91.03 a-d	88.49 ab	97.6 abc	97.69 a	94.75 a	91.7 abc	95.02 ab	98.2 ab	92.36 ab	91.7 abc	92.1 abc	44.88 cd	69.7 cde	100 a	92.95 a-d
	21	92.26 abc	88.73 ab	97.71 ab	97.82 a	95.73 a	91.2 abc	95.28 ab	98.21 ab	90.78 abc	89.6abc	89.6 abc	60.48 bc	75.3 bcd	100 a	94.34 ab
Extracto de Neem más canela	2.1	95.6 ab	92.08 ab	86.79 bcd	85.4 cde	88.9 ab	86.47 bc	87.3 abc	100 a	65.91 d	93.43 ab	93.43 ab	79.75 ab	69.8 cde	100 a	95.45 ab
	4.2	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	6.3	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	8.4	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	10.5	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	12.6	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	15	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Extracto de canela	1	31.63 g	16.78 d	13.43 f	11.46 h	32.41 d	20.37 ef	14.88 e	37.56 e	0 f	11.3 f	13.8 f	0 f	5.51 h	39.89 e	20.68 g
	1.65	28.8 g	14.07 d	13.95 f	11.45 h	30.15 e	19.04 ef	14.58 ef	34.86 e	0 f	13.19 f	13.19 f	11.11 ef	23.33 gh	41.22 de	17.18 g
	2.3	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	2.95	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	3.6	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	4.25	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	5	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>T. harzianum</i>	1x10 ⁻⁴	17.93 hi	10.05 d	0 g	0 i	4.25 a	9.49 f	0 e	8.54 f	10.18 ef	3.59 f	3.59 f	15.6 ef	4.86 h	8.43 f	0 h
	0.001	8.12 i	10.03 d	21.1 f	33.43 g	16.56 ef	25.69 e	14.45 ef	17.79	20.18 e	31.62 e	31.62 e	43.9 cd	52.93 e	12.17 f	52.44 f
	0.01	58.02 f	58.67 c	64.41 e	59.75 f	60.43 c	65.75 d	73.02 cd	63.37 d	66.31d	76.41 cd	76.41 cd	80.21 ab	81.9 a-d	58.97 cd	73.84 e
	0.1	80.13 de	81.37 b	80.03 d	80.62 e	91.97 a	82.4 c	84.7 bcd	81.23 c	81.47 bc	83.8 bcd	83.8 bcd	90.34 a	92.27 ab	92.07 a	84.12 d
	0.5	77.08 e	80.76 b	86.34 bcd	89.3 bcd	89.47 ab	84.33 c	83.9 bcd	85.57 bc	80.3 bc	85.6 a-d	85.6 acd	92.41 a	92.59 ab	100 a	84.5 cd
	0.8	91.35 a-d	96.2 ab	100 a	96.54 ab	100 a	93.7 abc	96.24 ab	100 a	89.42 abc	96.38 ab	96.38 ab	96.98 a	97.33 a	97.92 a	95.46 ab
	1	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	92.68 a
<i>B. subtilis</i>	1x10 ⁻⁴	55.31 f	60.96 c	66.47 e	62.66 f	75.03 b	66.6 d	71.38 d	53.82 d	78.19 cd	71.59 d	71.59 d	80.44 ab	85.2 abc	70.56 bc	74.08 e
	0.001	83.4 cde	87.13 ab	85.77 cd	84.9 de	94.99 a	86.33 bc	86.9 abc	83.41 c	87.98 abc	90.3 abc	90.3 abc	91.34 a	91.56 ab	87.88 ab	88.63 bcd
	0.01	91.57 a-d	91.41 ab	99.16 abc	92.8 abc	97.14 a	91.8 abc	94.2 ab	97.88 ab	100 a	97.45 ab	97.45 ab	97.23 a	96.04 a	92.02 a	95.3 ab
	0.1	96.75 ab	97.55 ab	100 a	97.54 a	100 a	96.8 ab	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	0.5	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	0.8	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	1	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Imazalil	0.1g/L	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a

6.3 Pruebas de antagonismo *in vitro* con *T. harzianum*

6.3.1 Porcentaje de colonización

Se evaluó de entre 5 a 7 días, tiempo en el cual el antagonista alcanzó invadir al hongo fitopatógeno. Ninguno de los aislamientos presento un valor menor al límite de porcentaje inferior que es del 50%. Los aislamientos que presentaron el mayor porcentaje de colonización son: 10 (*C. kahawae*) (Figura 9), 12 (*C. acutatum*), 2 (*C. alienum*) y 11 (*C. simmondsii*); el porcentaje fue de 88.2, 88.12, 87.98 y 86.93 respectivamente.

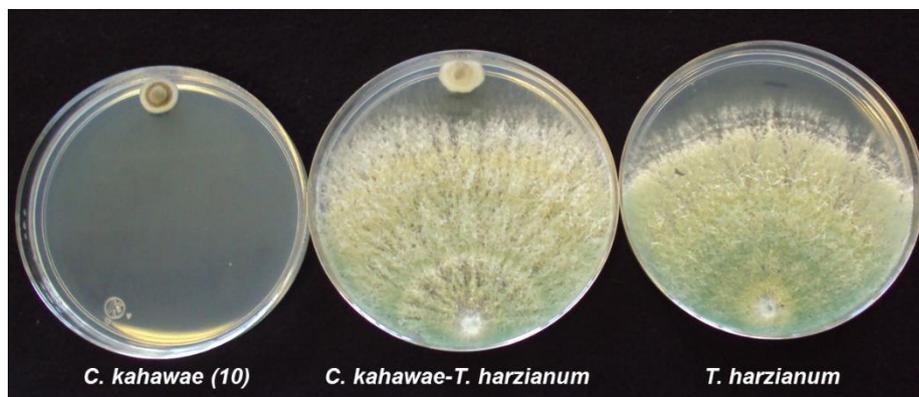


Figura 9. Antagonismo por cultivo dual a los 7 días de incubación.

Los aislados anteriores solo presentaron diferencias estadísticamente significativas con el aislado 19 (*C. alienum*) con un porcentaje de 77.99, que fue el menor obtenido (Figura 10).

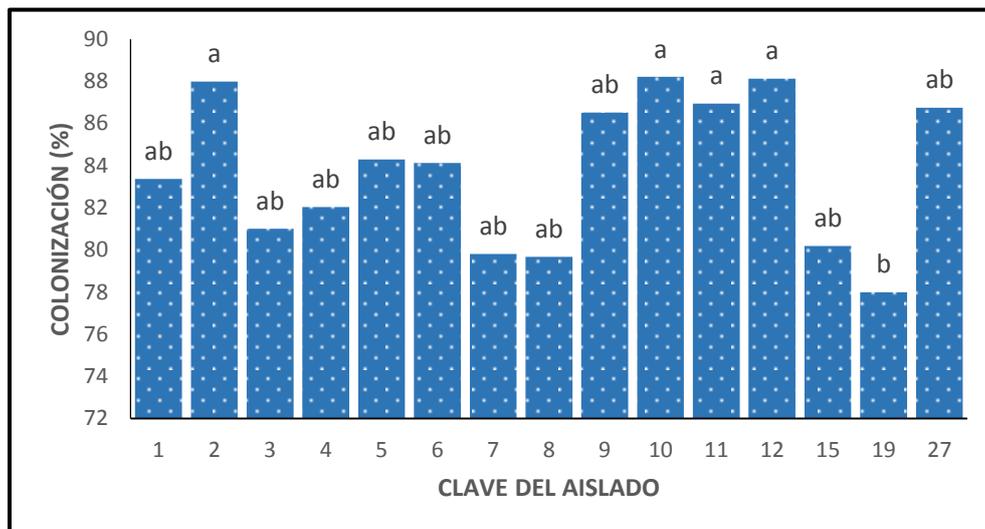


Figura 10. Porcentaje de colonización de *T. harzianum* sobre *Colletotrichum* spp.

Estudios similares fueron obtenidos por Landero-Valenzuela, quien reporto que ninguna de las cepas de *C. gloeosporioides* evaluadas por cultivo dual con diversas especies de *Trichoderma* presento un menor porcentaje de colonización del 50% (Tesis Doctoral, 2013). Infante *et al.* (2009), mencionan al género *Trichoderma* como una de las especies más utilizadas como biocontrolador de hongos fitopatógenos.

6.3.3 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción que se observaron para todos los aislados fueron: malformación de una hifa (Figura 11a), desintegración de citoplasma (Figura 11b), lisis de una hifa y vacuolización (Figura 11c). Nieblas-Nuñez, (2012); reporto la lisis y malformación de la hifa como interacciones microscópicas de diversas especies de dicho antagonista contra *Lasiodiplodia theobromae*. Plata-Caudillo, (2010); reportaron vacualización y desintegración del citoplasma contra varios hongos asociados al decaimiento por botriosfaeria.

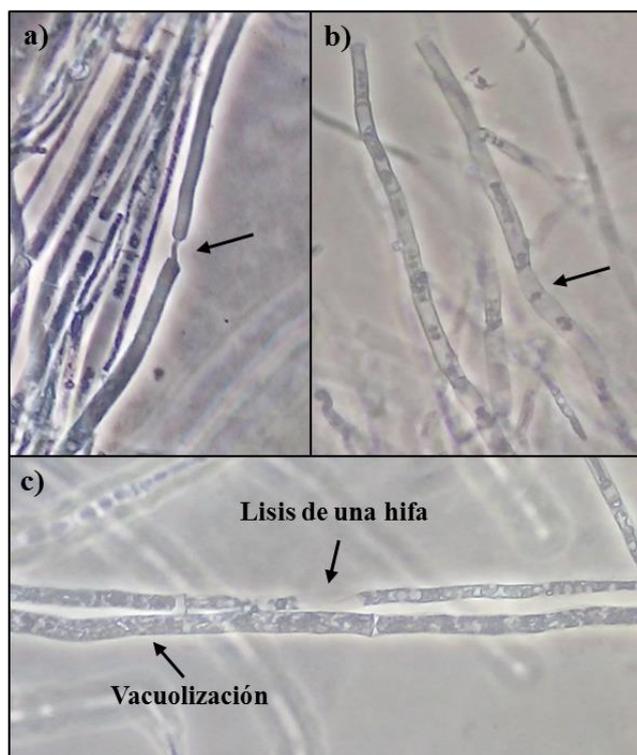


Figura 11. Mecanismos de acción de *T. harzianum*. a) Malformación de una hifa, b) Desintegración del citoplasma y c) Lisis de una hifa y vacuolización.

6.4 Efecto inhibitorio de los antagonistas

6.4.1 Porcentaje de inhibición de *T. harzianum*

Se evaluó de entre 5-7 días de incubación, los aislamientos presentaron porcentaje de inhibición de 0 hasta 22%, estos resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas (Figura 12). Los aislamientos que presentaron el menor porcentaje son: 9 (*C. boninense*) y 12 (*C. acutatum*); y el de mayor porcentaje fue el aislado 5 (*C. gloeosporioides*).

Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Astorga-Quiros *et al.* (2013), quienes reportaron que *Trichoderma* presentó un potencial muy alto sobre el PICM que fue de 40.21 contra *S. cepivorum* y de 45.03 sobre *Penicillium* sp. Por lo tanto ellos reportaron a este antagonista como un buen controlador comparado con *B. subtilis* contra los mismos patógenos.

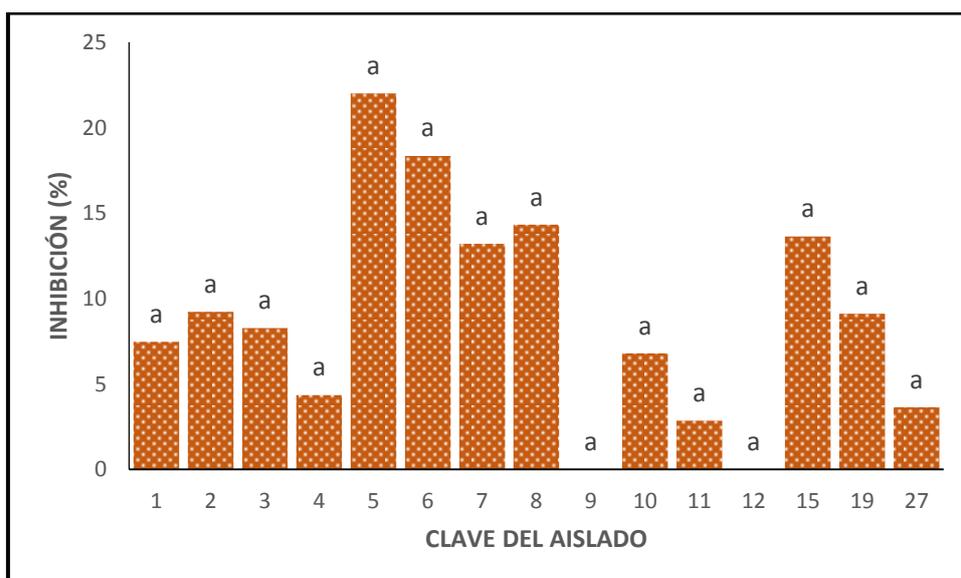


Figura 12. Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum* spp. por *T. harzianum*

6.4.2 Porcentaje de inhibición de *B. subtilis*

En comparación con el porcentaje de inhibición de *T. harzianum* fue mayor el obtenido con *B. subtilis* aunque el crecimiento del biocontrolador fue menor comparado con el otro antagonista. El porcentaje mayor fue de 54.14 para el

aislado 15 (*C. kahawae*) (Figura 13a) y el menor fue de 0.907% sobre *C. alienum* (2) (Figura 13b).

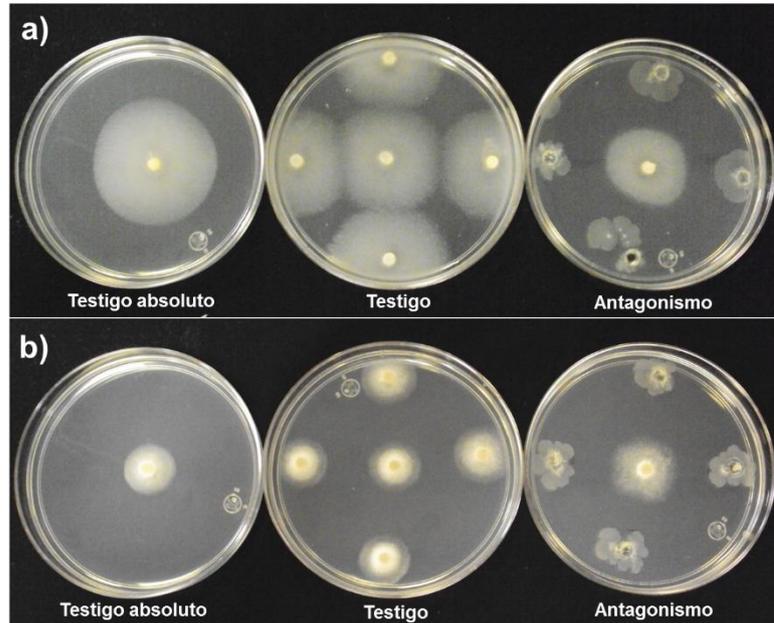


Figura 13. Pruebas de antagonismo, porcentaje de inhibición. a) *C. kahawae* (15) y b) *C. alienum* (2).

El mayor porcentaje no presenta diferencias estadísticamente significativas con los aislados: 19 (*C. alienum*) y 5 (*C. gloeosporioides*) (Figura 14). Este antagonista ha sido usado para reemplazar el uso de agroquímicos para combatir enfermedades causadas por fitopatógenos. La razón por la cual aunque presenta un potencial de crecimiento menor, su capacidad biocontroladora es mediada por su perfil químico, ya que producen múltiples metabolitos biológicamente activos; en el caso de *B. subtilis* produce Iturin A y fengycin que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo y crecimiento normal de otros microorganismos (Layton *et al.*, 2011).

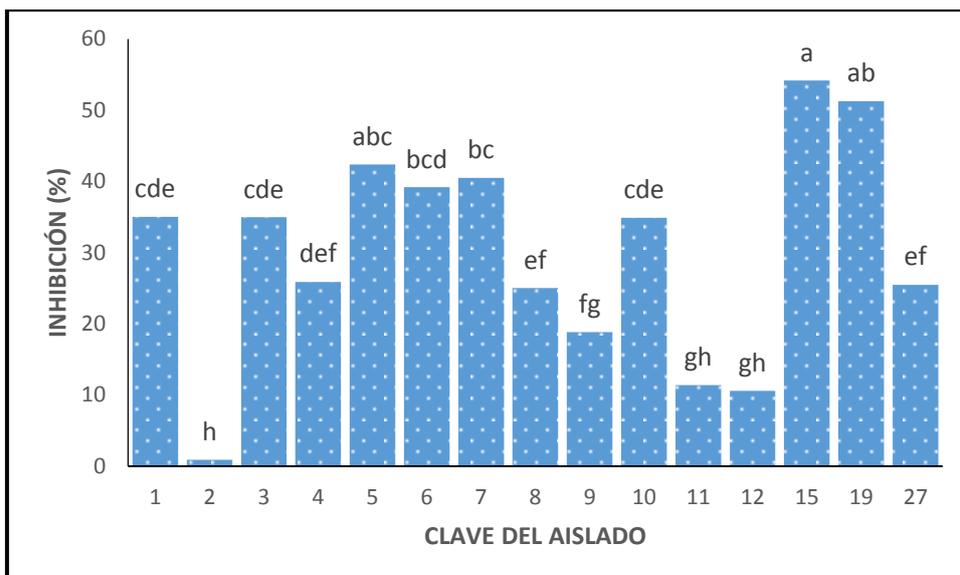


Figura 14. Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum* spp. por *B. subtilis*

6.5 Germinación de esporas

El porcentaje de germinación de esporas fue de 0% (Figura 15) con todos los tratamientos evaluados que fueron cuatro productos (Progranic neemacar, cinnacar, Spectrum Trico Bio y Probac BS) para 14 de los 15 aislados evaluados; comparado con el testigo químico con el mismo resultado; no presentan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$); el testigo absoluto presentó porcentajes de 94-99.5% que comparado con los resultados de los tratamientos presentan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).



Figura 15. Germinación de conidios en medio modificado con Progranic cinnacar.

El aislado 3 (*C. gloeosporioides*), para las concentraciones probadas con los productos Progranic cinnacar y Probac BS, presentó porcentaje de germinación de 7.5-14.83 (Figura 16b) y 3.83-7.5 (Figura 16a) respectivamente; presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), con el testigo químico y el absoluto que para este aislado mostró un porcentaje de germinación de 96 (Cuadro 10).

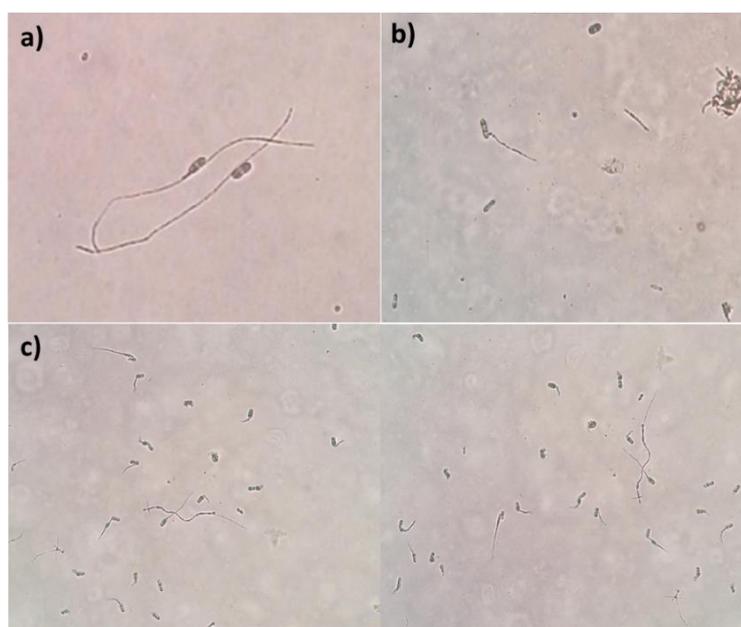


Figura 16. Porcentaje de germinación del aislado 3 (*C. gloeosporioides*) a las 15 horas. a) Probac BS, b) Progranic cinnacar y c) testigo

Cuadro 10. Porcentaje de germinación para el aislado 3 (*C. gloeosporioides*).

TRATAMIENTO (mL/L)	Germinación (%) 15 horas
P3T1-P3T5	0 g
P6T1-P6T5	0 g
(P8T1) 0.01	4.67 ef
(P8T2) 0.0325	7.5 cde
(P8T3) 0.055	3.83 f
(P8T4) 0.0775	5.16 def
(P8T5) 0.1	7.5 cde
(P10T1) 1.65	14.83 b

(P10T2) 1.8125	9.5 c
(P10T3) 1.975	8.17 cd
(P10T4) 2.1375	7.83 cde
(P10T5) 2.3	7.5 cde
Testigo absoluto	96.0 a

6.6 Actividad antifúngica

Los cajas de Petri inoculadas con los cilindros de las pruebas *in vitro* que resultaron con un PICM de 100, se evaluaron a los seis días de incubación. Para los productos biológicos se observó crecimiento del microorganismo antagonista (Figura 17d y 17e); para los tratamientos con los productos orgánicos: Progranic cinnacar y Progranic neemacar, no se observó desarrollo micelial en ninguno de los tratamientos (Figura 17b y 17c). Pero en el producto Formulado 45-2 si se observó crecimiento del hongo fitopatógeno (Figura 17a)

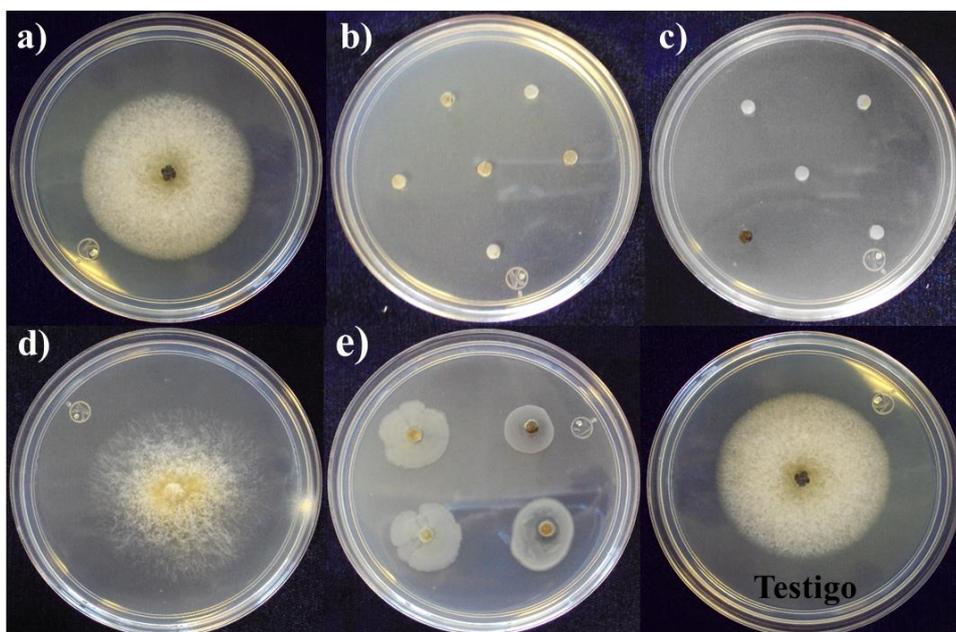


Figura 17. Actividad antifúngica. a) Formulado 45-2, b) Progranic neemacar, c) Progranic cinnacar, d) Spectrum Trico Bio y e) Probac BS.

Con excepción de los aislamientos 11 (*C. simmondsii*) y 12 (*C. acutatum*) para Spectru Trico Bio, en los cuales se observó crecimiento de los fitopatógenos antes mencionados en una de las dosis evaluadas (Figura 18a1 y 18b1), respectivamente; el cual se corroboró observando una preparación de los conidios correspondientes a cada uno de los patógenos antes mencionados (Figura 18a2 y 18b2).

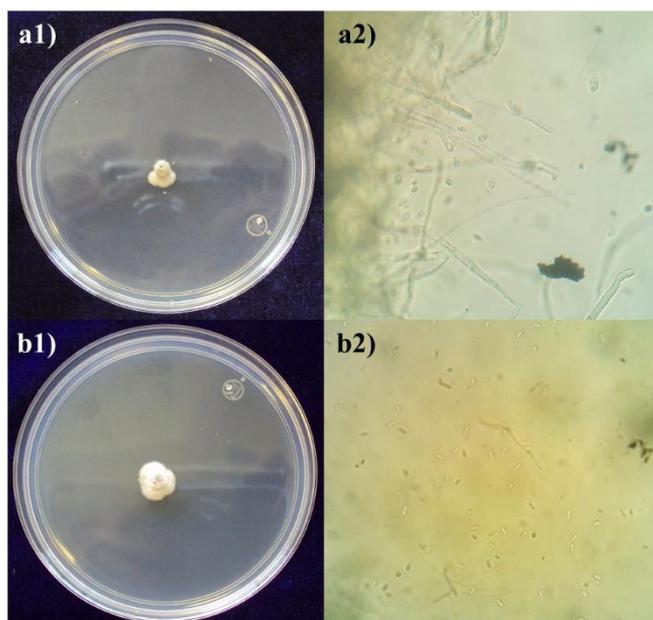


Figura 18. Actividad antifúngica a los tres días. a1) Crecimiento de *C. simmondsii*, a2) Conidios de *C. simmondsii*, b1) Crecimiento de *C. acutatum*, b2) Conidios de *C. acutatum*.

En base a los resultados obtenidos se concluye que la actividad antifúngica de los productos evaluados *in vitro*, resultó ser fungicida, debido a que no se observó desarrollo micelial del patógeno en las cajas Petri con PDA, con excepción de únicamente dos cepas en una sola dosis evaluada, sin embargo como fue únicamente en una sola dosis se podría concluir que el producto es fungicida ya que en las dosis faltantes se observó crecimiento del antagonista. Con excepción del producto Formulado 45-2 que resultó ser fungistático ya que se observó crecimiento para todas las dosis que resultaron inhibir el 100% del crecimiento micelial.

6.7 Control *in vivo* de los productos orgánicos y biológicos

La evaluación se realizó a los 6 días de incubación, midiendo dos variables que fueron el crecimiento del fitopatógeno sobre la superficie del fruto y lesión interna.

1) Preventivo-con herida: El producto Probac BS resulto el más efectivo ya que logro inhibir el crecimiento en la superficie del fruto de 12 aislados en un total de 15; el crecimiento que se observo fue de 0.515 mm para el aislado 2 (*C. alienum*), 0.4 mm para el 7 (*C. gloeosporioides*) (Figura 19a) y 0.52 mm para el 15 (*C. kahawae*). Comparado con el testigo absoluto que fue de 0.575, 0.815 (Figura 19c) y 0.625 mm respectivamente. Sin embargo comparado con el testigo químico en el cual no se observó desarrollo del micelio para ninguno de los aislamientos (Figura 19b).

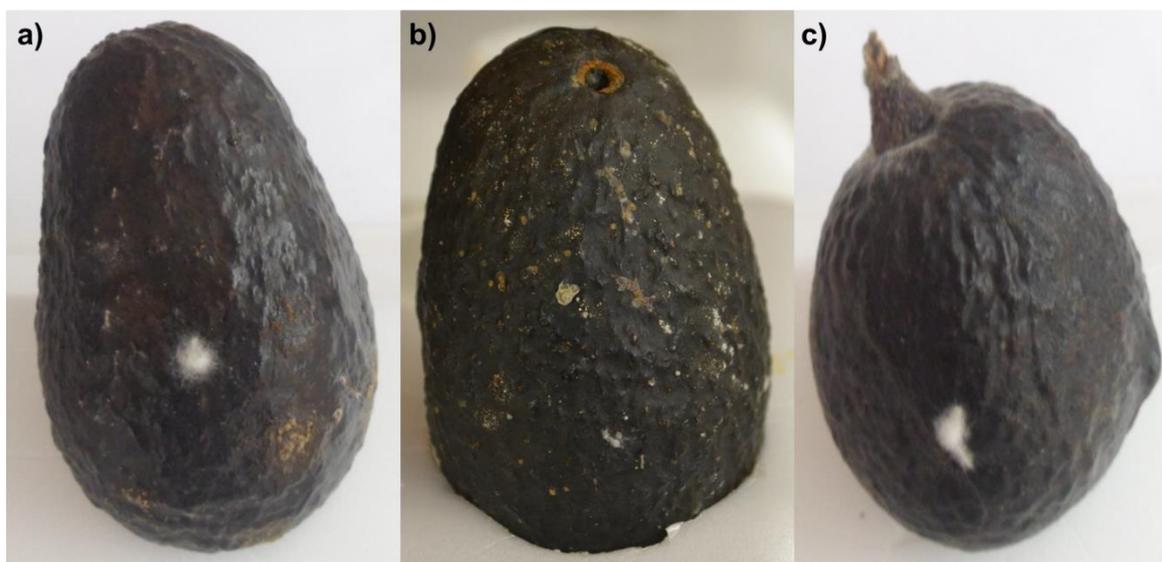


Figura 19. Preventivo-con herida del aislado 7 (*C. gloeosporioides*). a) Probac BS a concentración baja, b) Testigo químico y c) Testigo absoluto.

Para la prueba preventiva-sin herida, el Probac BS a la dosis baja y media resultaron ser las más efectivas ya que lograron inhibir el crecimiento de 13 aislados a partir de un total de 15. Para las pruebas: Curativo-con herida y sin herida, el tratamiento a base de *T. harzianum* a dosis baja fue el mejor, ya que inhibió el crecimiento de 14 aislados de un total de 15. Ambas variables no inhibieron el crecimiento del aislado 15 (*C. kahawae*).

Evaluación de fruto abierto: En las pruebas preventivo y curativo ambas sin herida, no se observó lesión interna para ninguno de los aislados en ningún tratamiento. Sin embargo en las que se realizó herida si se observaron lesiones internas; las cuales fueron de tres tipos: 1) Necrosis dirigida a la semilla (Figura 20a), 2) Pudrición limitada al crecimiento del patógeno (Figura 20b) y 3) Pudrición y necrosis y pudrición de la pulpa (Figura 20c).

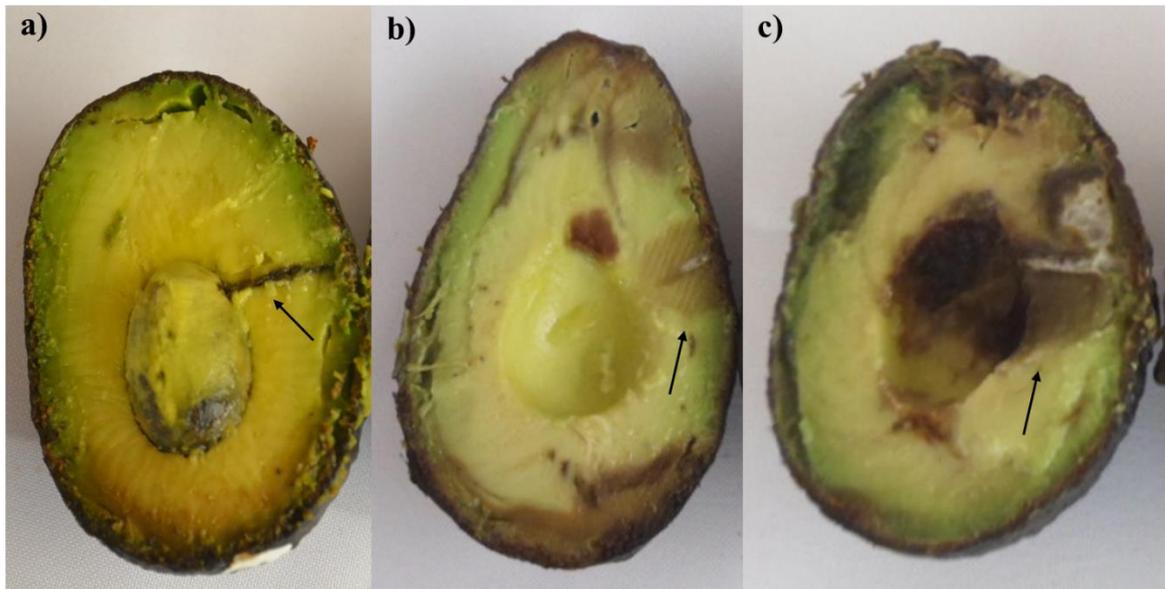


Figura 20. Lesión interna ocasionada por *Colletotrichum* spp. a) Necrosis dirigida a la semilla, b) Pudrición limitada al crecimiento del patógeno y c) Necrosis y pudrición de la pulpa

Preventivo-con herida. Se observó que para los tratamientos, Probac BS a dosis baja y media; y Progranic cinnacar en las dos concentraciones evaluadas, no se observó lesión interna en el fruto, pero solo para tres (9: *C. boninense*, 15: *C. kahawae*, 19: *C. alienum*) de 15 aislados. Comparado con el testigo químico en el cual en todos los aislados se observó lesión interna.

Curativo-con herida. Para esta prueba el Progranic cinnacar resulto ser el mejor ya que en 6 de 15 aislados no se observó lesión interna en el fruto a la dosis más alta evaluada.

7. Conclusiones

1. En los análisis *in vitro*, los productos biológicos mostraron efectividad del 100% a dosis menores en contra de *Colletotrichum* spp. y los orgánicos presentaron el mismo resultado a dosis mayores.
2. El producto Formulado 45-2, para algunos aislamientos presento hasta el 97% de eficiencia comparado con los anteriores no presenta diferencia significativas para estos aislamientos por lo tanto es considerado eficiente para el control de este patógeno bajo condiciones *in vitro*.
3. Las pruebas de antagonismo mostraron que *Bacillus subtilis* tuvo un mayor porcentaje de inhibición comparado con *T. harzianum*, aun cuando el ultimo mencionado presenta un mayor porcentaje de colonización.
4. Los productos Progranic neemacar, cinnacar, Spectrum Trico Bio y Probac BS; presentaron actividad fungicida y el Formulado 45-2 fungistatica.
5. Los cinco productos evaluados para la germinación resultaron efectivos ya que inhibieron el 100% de germinación.
6. En las pruebas *in vivo* los tratamientos preventivo y curativo sin herida resultaron mejores debido a que no se observó lesión interna del fruto

8. Literatura citada

- Adeniyi D. O. and Olufolaji D. B. 2014. Bio-Efficacy of Tropical Phytoextracts against Pathogen (*Lasiodiplodia theobromae*) on Cashew. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. Vol. 4. No. 2. pp.1700-1709.
- Agricultura orgánica, 2015. Biocontrol. (Consultado el 28 de Abril de 2015). Disponible en: http://www.controlbiologico.com/ep_bacillus_subtilis.htm
- Alfonso B., J. A. 2008. Manual técnico del cultivo de aguacate Hass (*Persea Americana* L.). Fundacion Hondureña de Investigación agrícola (FHIA).
- Amadioha, A.C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protection. Vol. 19. No. 5. pp. 287-290.
- Aranzazu, F. 1996. Determinación de la presencia de enfermedades quiescentes causadas por (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz). en frutos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). 20p.
- Astorga-Quirós K., K. Meneses-Montero, C. Zuñiga-Vega, J. Brenez-Madriz y W. Rivera-Méndez. 2013. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en marcha. 27 (2): 82-91.
- Baños G. P., E. Zavaleta M., M. Colinas L., I. Luna R. y J. Gutiérrez A. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. Y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. Revista Mexicana de fitopatología, Vol. 22, Núm. 2. pp. 198-205.
- Barrera-Necha L. y García-Barrera L. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya* L.). Revista UDO agrícola. Vol. 8 No.1. pp 33-41.
- Bolkan H. A., F. Cupertino P., J. Dianese C. and A. Takatsu. 1976. Fungi associated with pre and post-harvest fruit rots on papaya and their control in central Brazil. Plant diseases Reporter No. 60. pp. 605-609.
- Bowers J. H. y J. Locke. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. Plant disease. Vol. 84. No. 3. pp. 300-305.
- Cáceres R.I., R. Colorado V., E. Salas M., V. Muñoz C. y L. Hernández O. 2014. Actividad antagónica *in vitro* de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxisporum*, *Alternaria alternata*, *Geotricum candidum*, *Trichoderma*

- spp., *Penicillium digitatum*, y *Aspergillus niger*. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 31. No.2. pp 105-112.
- Carrillo F.J., R. García E., M. Muy R., A. Sañudo B., I Márquez Z., R. Allende M., Z. García R., M. Patiño V. y E. Galindo F. 2005. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. Y Sacc.] y su efecto en la calidad postcosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de fitopatología, vol. 23, núm. 1, pp.24-32.
- Cervantes A. Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos. 2007. (Consultado el 28 de Abril de 2015), Disponible en: http://www.infoagro.com/hortalizas/microorganismos_beneficiosos_cultivos.htm.
- CESAVEG®, 2008. Campaña de manejo fitosanitario del aguacatero.
- Cherif M. y Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices lycopersici* Phytopathology. Vol. 80. pp. 1406-1414.
- Coates L. M. and Gowanlock D. 1993. Infection process of *Colletotrichum* species in tropical and subtropical fruits. Proceedings in an international conference held at Chiang Mai Thailand. Australian Centre for international agricultural research ACIAR. Vol. 30. pp. 162-168.
- Dickman M. B., S. Patil S. and E. Kolatukkudi P. 1982. Purification characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* on *Carica papaya*. Physiological Plant Pathology. 20. pp. 333-347.
- Ezziyyani M., C. Pérez S., A. Sid A., M. Requena E. y M. Candela E. 2004. Anales de biología 26: 35-45.
- FAOSTAT, 2015. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consultado el 27 de Mayo de 2015.
- Fernández-Larrea O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. 2001. Manejo integrado de plagas. No. 62. pp. 96-100.
- Flores R, 2009. El aguacate (*Persea americana* Mill.), no solo un alimento. (En línea) <http://www.tlahui.com/medic/medic28/aguacate.htm>
- Freeman S., T. Katan y E. Shabi. 1995. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almonds fruits with molecular and

- pathogenicity tests. American society for microbiology. Vol. 62, No. 3. p. 1014-1020.
- Freeman S., T. Katan y E. Shabi. 1996. Characterization of *Colletotricum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity test. Applied and Environmental Microbiology, Washington, Vol. 62, No.3, p.1014-1020.
- Garbanzo S. M., 2011. Manual de aguacate. Buenas prácticas de cultivo variedad hass. Ministerio de agricultura y ganadería. Agencia de servicios agropecuarios de Frailes.
- Guédez C., L. Cañizalez, C. Castillo y R. Olivar. 2009. Efecto antagónico de *trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 29, núm. 1. pp. 34-38.
- Henderson, C.F. and E. W. Tilton, 1955. Tests with acaricides against the brow wheat mite, J. Econ. Entomol. 48:157-161
- Infante D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal. Vol. 24. No. 1. pp. 14-21.
- Janisiewicz W. J. y A. Criof M. 1999. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. Plant disease. Vol. 76. No. 6. pp. 550-560.
- Landero-Valenzuela N., D. Nieto A., D. Téliz O., R. Alatorre R., M. Orozco-Santos y C. Ortiz G. 2013. Potencial antifúngico del extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya* L.) en poscosecha. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 4. No. 1. pp. 047-062.
- Lavaire E. 2013. Manuel técnico del cultivo de aguacate en Honduras (*Persea Americana* Mill.).
- Layton C., E. Maldonado, L. Monroy, L. Corrales y L. Sánchez. 2011. *Bacillus* spp.; Perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. Vol. 9. No. 15. pp. 113-214.
- Maqbool M, Asgar A, Alderson AP, Muda-Mohamed MT, Siddiqui Y y NoosheenZ. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling

- anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. 62(1): 71-76.
- Montero T. V., J. Morales G., M. González C. J. Anaya L., T. Corona T. y A. Gálvez M. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 1. No. 2. pp. 159-174.
- Moreno-Limón S., González-Solís L.N., Salcedo-Martínez S.M., Cardenas-Avila M.L y Perales-Ramírez A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotanica*. No. 32. pp 193-205.
- Nieblas-Núñez, N. 2012. Evaluación del potencial de *Trichoderma* sp. y *Glomus intraradices* para controlar a *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los agentes causales de la muerte regresiva en vid (*Vitis vinífera* L.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Nieto A. D. Manejo Integrado de la Antracnosis (*Colletotrichum* sp.) del papaya. 2013. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 31 (Suplemento).
- Nina R., S. Hugh, JC. Almanza, M. Loza-Murguía. 2011. *Journal of the Selva Andina Research Society*. Vol. 2. No. 1. pp. 43-52.
- Pérez C. L., M. Saquero J. y J. Beltran H. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. Como agente causal de la antracnosis en ñame *Discorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. V. No. 1. pp. 24-35.
- Pérez N. 2004. Manejo ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. pp. 296.
- Plascencia-Jatomea M., G. Viniestra, R. Olayo, M. Castillo-Ortega y K. Shirai. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*. 3 (10): 582-586.
- Plata-Caudillo J.A. 2010. Aislamiento y evaluación *in vitro* del efecto de *Trichoderma* spp. nativas sobre hongos patógenos de la madera de vid aislados en la región vitivinícola de Ensenada, Baja California. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada.
- Prograc® BS. 2014. Hoja técnica bioagricsimputs. Promotora Técnica Industrial S.A. de C.V.

- Prusky D., J. McEvoy L., B. Leverentz y W. Conway S. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology*, Saint Paul. Vol. 91. No. 11. p. 1105-1113.
- Reyes Y., B. Martínez y D. Infante. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. Sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista de protección vegetal*. Vol. No. 2. pp. 112-117.
- Rodríguez-Lacherre M y Veneros-Terrones R. 2011. Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedentes de zonas de distribución del distrito Trujillo (Perú). *Revista de la facultad de ciencias*.
- Rodríguez-López E. S., E. Cárdenas-Soriano, S. J. Hernández-Delgado, A. Gutiérrez-Diez y N. Mayek-Pérez. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz, y Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileña de fruticultura*. Vol. 35, No. 3. p. 898-905.
- Rodríguez-López E., J. González-Prieto y N. Mayek-Pérez. 2008. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea Americana* Mill.): aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 27, No. 1, pp. 53-63.
- Rollan M C., I. Nico A. y Mocano C. 1999. Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotium*, *S. minor* y *S. rolfsii*. *Investigación Agrarian, Producción y Protección vegetal*. 14. pp. 33-48.
- SAGARPA, 2011. Monografía de cultivos. Subsecretaría de fomento a los agronegocios. pp.2.
- SE (Secretaría de Economía), 2012. Monografía del sector aguacate en México: Situación actual y oportunidades de Mercado.
- SIAP, 2013. Cierre de la producción agrícola por cultivo en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Tejera-Hernández B., M. Rojas-Badía M., Heydrich-Pérez M. 2011. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Vol. 42. No. 3. pp. 131-138.
- Téliz, D. y A. Mora. 2007. El aguacate y su manejo integrado. Segunda edición. Grupo Mundi-Prensa. México D.F. 321p.

- Tesis doctoral, Landero-Valenzuela N. 2013. Extractos vegetales y *Trichoderma* spp., en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Sacc. En frutos de papaya maradol (*Carica papaya* L.) en postcosecha.
- Tomalá M. 2002. Evaluación de tratamientos para aumentar la germinación en la semilla de aguacate. (En línea) <http://zamo-oto-02.zamorano.edu/tesis>
- Vero M. S., P. Mondino. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. Horticultura Internacional. Año 7. No.26.
- Xing LJ and Westphal A. 2007. Inhibition of *Fusarium virguliforme* by Prokaryotes *in vitro*. Subtropical Plant science. 59: 24-29.
- Zamora M., T. Cárdenas, E. Cajuste, F. Jacques, M. Colinas T. 2001. Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en frutos de aguacate "Hass". Agrociencia. Vol.35. No. 2. pp. 237-244.
- Zavala-León M., J. Tun-Suárez M., J. Cristobal-Alejo, E. Ruiz Sánchez, O. Gutierréz-Alonso, M. Vázquez-Calderón y R. Méndez-Gonzáles. 2005. Revista Chapingo serie Horticultura. Vol. 11. No. 2. pp. 251-255.

9. Anexos

Anexo 1. Recetas para la preparación de medios de cultivo.

MEDIO	CANTIDAD (g)	VOLUMEN (ml)
Papa Dextrosa Agar (PDA)	39	1000
Agar extracto de malta (AEM)	33	1000