

Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50[®] contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)*

Synergistic effect of *Trichoderma asperelleum* T8A and captan 50[®] against *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)

Abigail Peláez-Álvarez¹, Sergio de los Santos-Villalobos^{2,3§}, Enrico A. Yépez², Fannie Isela Parra-Cota⁴ y Reyna Trinidad Reyes-Rodríguez¹

¹Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros, Izúcar de Matamoros, Puebla, México. (mitsuki_abi@hotmail.com; reyes9503@hotmail.com). ²Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente, Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México. (yepezglz@gmail.com). ³Catedrático CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México. ⁴Campo Experimental Norman E. Borlaug, Cd. Obregón, Sonora, México. (fipc04@gmail.com). [§]Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue cuantificar la interacción Captan 50[®] - *Trichoderma asperellum* T8a como alternativa sinérgica para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC MYA456, agente causal de la antracnosis en el mango. La caracterización macroscópica, microscópica y molecular confirmaron la taxonomía de estos microorganismos como *T. asperellum* (T8a) y *C. gloeosporioides* (ATCC MYA 456), este último mostró la capacidad de causar antracnosis 100% de los frutos inoculados. El agente de control biológico, *T. asperellum* T8a, mostró una inhibición *in vitro* de 91% en el crecimiento del fitopatógeno, mediante mecanismos micoparasíticos. Así, ensayos de concentración mínima inhibitoria de Captan 50[®] vs. los microorganismos en estudio fueron realizados, observando que concentraciones iguales o mayores a 0.5 g L⁻¹ del fungicida inhibieron completamente el crecimiento del fitopatógeno, sin embargo, concentraciones menores (0.1 y 0.25 g L⁻¹) inhibieron el crecimiento de éste sólo en 36%. Por otro lado, el crecimiento de *T. asperellum* T8a fue inhibido 6% en dosis de 0.5 g L⁻¹ de Captan 50[®], no observando efectos sobre esta cepa a dosis menores del fungicida. De esta manera, la concentración de 0.1 g L⁻¹ de Captan 50[®] fue co-aplicada *in vitro* con *T. asperellum* T8a, observando una inhibición sinérgica de *C. gloeosporioides*

Abstract

The objective of this study was to quantify the interaction Captan 50[®] - *Trichoderma asperelleum* T8a as synergistic alternative to control *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC MYA 456, causal agent of anthracnose in mango. The macroscopic, microscopic and molecular characterization confirmed the taxonomy of these organisms as *T. asperelleum* (T8a) and *C. gloeosporioides* (ATCC MYA 456), the latter showed the ability to cause anthracnose to 100% of fruits inoculated. The bio-control agent *T. asperellum* T8a, showed an *in vitro* inhibition of 91% in the growth of phyto pathogen through parasitic fungi mechanisms. Thus, trials of minimum inhibitory concentration of Captan 50[®] vs. microorganisms under study were performed, noting that concentrations equal to or greater than 0.5 g L⁻¹ fungicide completely inhibited pathogen growth, however, lower concentrations (0.1 and 0.25 g L⁻¹) inhibited the growth of this only 36 %. Furthermore, *T. asperellum* T8a growth was inhibited 6% at doses of 0.5 g L⁻¹ of Captan 50[®], not observing effects on this strain at lower doses of the fungicide. Thus, the concentration of 0.1 g L⁻¹ Captan 50[®] was co-applied *in vitro* with *T. asperellum* T8a, observing a synergistic inhibition of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, it reached 99%.

* Recibido: enero de 2016
Aceptado: marzo de 2016

ATCC MYA456, alcanzó 99%. Los datos indican el potencial de la presente alternativa integrada para reducir la aplicación de Captan 50[®], potenciar el control de *C. gloeosporioides*, y reducir los problemas económicos/ambientales por el uso de este fungicida en campo.

Palabras claves: agente de control biológico, antracnosis, control químico, concentración mínima inhibitoria.

Introducción

El mango (*Mangifera indica* L.) ha sido cultivado y naturalizado tan extensamente que su distribución se puede considerar como pantropical -aun cuando su punto de origen exacto es desconocido- (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2011). Además, este fruto es considerado como uno de los más populares en áreas tropicales y países en desarrollo (FAO, 2013).

La producción mundial de mango es aproximadamente de 31×10^6 t año⁻¹. India contribuye con 43% de esta producción (principal país productor), y México ocupa el quinto lugar en este sector con una producción de más de 4%. El panorama para nuestro país cambia al considerar las exportaciones de mango fresco en el mercado internacional, debido a que México es el segundo exportador a nivel mundial con una participación 21%, lo que representa alrededor de 2×10^5 t año⁻¹ (FAO, 2013), traduciéndose aproximadamente en USD \$86 millones.

La producción de mango nacional y mundial presenta una cadena de valor similar, donde se han identificado etapas que la desestabilizan (puntos críticos), debido a la escasez de conocimiento científico y/o tecnologías sostenibles en torno a ellas, éstas son: el evento de floración, la generación/aprovechamiento de residuos agro industriales y el control de la antracnosis, siendo este último el principal problema en pre y poscosecha (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2011).

La antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, es la enfermedad de mayor impacto en la productividad y calidad del mango, la cual se encuentra distribuida en todas las zonas productoras del mundo (Litz, 2000). La clasificación taxonómica del agente causal es clase: Sordariomycetes, subclase: Hypocreomycetidae, orden: Hypocreomycetidae incertae sedis, familia: Glomerellaceae, género: *Glomerella*, especie: *cingulata*, siendo *C. gloeosporioides* su estado anamorfo (NCBI, 2014).

The data indicate the potential of this integrated alternative to reduce the application of Captan 50[®], enhance control of *C. gloeosporioides*, and reduce economic/environmental problems by the use of this fungicide in field.

Keywords: biological control agent, chemical control, anthracnose, minimum inhibitory concentration.

Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) has been cultivated and naturalized so widely that their distribution can be considered pantropical -even when its exact origin is unknown (Santos-Villalobos *et al.*, 2011). In addition, this fruit is considered one of the most popular in tropical areas and developing countries (FAO, 2013).

World production of mango is approximately 31×10^6 t yr⁻¹. India contributes 43% of this production (largest producer), and Mexico ranks fifth in this sector with a production of more than 4%. The outlook for our country changes when considering fresh mango exports in the international market because Mexico is the second largest exporter worldwide with a share of 21%, representing about 2×10^5 t yr⁻¹ (FAO, 2013), resulting in approximately \$ 86 million USD.

National and global production of mango has a chain value similar, where have been identified steps that destabilize (critical points), due to the lack of scientific knowledge or sustainable technologies around them, these are: flowering event, generation/use of agro industrial waste and control of anthracnose, the latter being the main problem in pre and post-harvest (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2011).

Anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is the disease of most impact on productivity and quality of mango, which is distributed in all producing areas of the world (Litz, 2000). The taxonomic classification of the causative agent is class: Sordariomycetes, subclass: Hypocreomycetidae, order: Hypocreomycetidae incertae sedis, family: Glomerellaceae, genre: *Glomerella*, species: *cingulata*, being *C. gloeosporioides* its anamorph state (NCBI, 2014).

This ubiquitous pathogen produces hyphae hyaline unicellular, ovoid and elongated, with slightly curved conidia (10 to 15 microns in length and 5 to 7 microns wide).

Este patógeno ubicuo produce hifas hialinas unicelulares, ovoides y alargadas, con conidios ligeramente curvados (10 - 15 μm de longitud y 5 - 7 μm de ancho). Los acérvulos que se producen en el tejido infectado pueden ubicarse en forma subepidermal, epidermal o subcuticular con conidióforos cortos y erguidos (Bruce da Silva y Michereff, 2013). Esta enfermedad se presenta a nivel mundial y en todas las etapas fenológicas del cultivo, causando pérdidas considerables en producción ya que provoca la caída de más de 90% de los frutos cuando la enfermedad se presenta en intensidades superiores a 80%; incluso cuando los niveles de daño alcanzó 40%, la caída de frutos es superior a 50% (Espinosa *et al.*, 2004). Por esta razón, el manejo de la antracnosis en mango requiere de un control constante debido a que condiciones climáticas (temperatura y humedad) promueven la infección y desarrollo de la enfermedad, impactando negativamente la productividad de este cultivo.

Por décadas, la práctica agrícola mayormente utilizada para el control de esta enfermedad ha sido la aplicación de fungicidas sintéticos, los cuales incluyen benzimidazoles, ditiocarbamatos, cloroalquitios e inhibidores de la síntesis de ergosterol: difenoconazol, miclobutanil, y prochloraz (Peres *et al.*, 2004; Arias y Carrizales, 2007). Sin embargo, el uso de estos fungicidas no es una práctica económica y ambientalmente sustentable, ya que el uso excesivo de éstos ha conducido a fuertes problemas de contaminación ambiental, generando residuos tóxicos en los frutos y resistencia de los patógenos (Wu *et al.*, 2009). Así, por años, la presión social para reducir el uso de estos fungicidas sintéticos en la producción de mango y su presencia en el ambiente ha incrementado significativamente, conduciendo a la necesidad del desarrollo de alternativas sostenibles contra la antracnosis que permitan disminuir el uso y los problemas causados por estos fungicidas sintéticos.

En los últimos años, la aplicación de agentes de control de origen microbiano ha incrementado significativamente como una alternativa para el combate de enfermedades en cultivos agrícolas, a través de diversos mecanismos, tales como: antagonismos (parasitismo y antibiosis), y competencia por espacio y nutrientes, *i.e.* el control exitoso de *C. gloeosporioides* en mango se ha logrado a través del uso *Burkholderia cepacia* XXVI (producción de sideróforo), *Trichoderma viride* Tv1 (mecanismo de acción desconocido), *Bacillus subtilis* Pla10 (producción de antibióticos), entre otros (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012; Lakshmi *et al.*, 2013). Sin embargo, el nivel de éxito de esta alternativa en campo es

The acervuli produced in infected tissue can be placed in the form subepidermal, epidermal or subcuticular with upright short conidiophores (da Silva and Michereff Bruce, 2013). This disease is present worldwide and in all phenological stages of the crop, causing considerable losses in production and causing the fall of more than 90% of the fruit when the disease is present in intensities over 80%, even when damage levels reach 40%, fruit drop is greater than 50% (Espinosa *et al.*, 2004). For this reason, the management of anthracnose in mango requires constant control due to weather conditions (temperature and humidity) promote infection and disease development, negatively impacting the productivity of this crop

For decades, agricultural practice mostly used for the control of this disease has been the application of synthetic fungicides, which include benzimidazole, dithiocarbamate, chloroalquitio and inhibitors of the synthesis of ergosterol: difenoconazole, myclobutanil, and prochloraz (Peres *et al.*, 2004; Arias and Carrizales, 2007). However, the use of these fungicides is not an economically and environmentally sustainable practice because the overuse of these has led to serious problems of environmental pollution, generating toxic residues on fruits and pathogen resistance (Wu *et al.*, 2009). Thus, for years, social pressure to reduce the use of these synthetic fungicides in mango production and its presence in the environment has increased significantly, leading to the need to develop sustainable alternatives against anthracnose that allow to decrease the use and problems caused by these synthetic fungicides.

In recent years, the application of control agents of microbial origin has increased significantly as an alternative to combat diseases in agricultural crops, through various mechanisms, such as antagonisms (parasitism and antibiosis), and competition for space and nutrients, *i.e.* the successful control of *C. gloeosporioides* in mango has been achieved through the use *Burkholderia cepacia* XXVI (siderophore production), *Trichoderma viride* Tv1 (unknown mechanism of action), *Bacillus subtilis* Pla10 (production of antibiotics), among others (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011; de Santos-Villalobos *et al.*, 2012; Lakshmi *et al.*, 2013). However, the level of success of this alternative in field is variable due to their biological nature, where its efficiency is altered by environmental stimuli (biotic and abiotic) to which they are exposed. The aim of this work was the

variable debido a su naturaleza biológica, donde su eficiencia se ve alterada por los estímulos ambientales (bióticos y abióticos) al cual son expuestos. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo y evaluación *in vitro* de una alternativa eficiente y amigable con el ambiente para el control del agente causal de la antracnosis del mango, *C. gloeosporioides*. Esta alternativa se basa en el uso combinado y sinérgico de un agente de control de origen microbiano (*T. asperellum* T8a) y un fungicida sintético (Captan 50®), con la finalidad de minimizar las pérdidas en la producción de mango ocasionadas por esta enfermedad, así como los problemas ambientales del uso de fungicidas sintéticos utilizados convencionalmente.

Materiales y métodos

Hongo fitopatógeno y agentes de control de origen microbiano y sintético utilizados. El hongo fitopatógeno utilizado como agente causal de la antracnosis del mango fue la cepa ATCC MYA 456 de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). La cepa *Trichoderma asperellum* T8a (aislada de la rizósfera del árbol de mango) fue utilizada como agente de control biológico contra *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. La cepa T8a fue proporcionada por Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos (Colmena) del Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano, con sede en el Instituto Tecnológico de Sonora. Además, Captan 50® fue utilizado como fungicida sintético de uso convencional contra el hongo fitopatógeno en estudio.

Caracterización macroscópica, microscópica y molecular de los microorganismos en estudio. Los microorganismos utilizados fueron identificados a través de sus características macroscópicas y microscópicas, tales como: presencia de hifas hialinas; coloración del micelio y forma de las conidias (Gunnel y Gubler, 1992; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). Además, estos microorganismos fueron identificados molecularmente mediante la amplificación del gen 5.8S rRNA en su DNA genómico, por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (White *et al.*, 1990). Previamente, los microorganismos en estudio fueron crecidos en Caldo de Papa Dextrosa (PDB) para la obtención de micelio (incubación por 3 días a 28 °C), el cual se usó para la extracción del DNA genómico (Rader y Broda, 1985). Los amplicones obtenidos (~ 300 pb) fueron purificados utilizando el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Illustra) y secuenciados en ambos sentidos por la plataforma

development and *in vitro* evaluation of an efficient and environmentally friendly alternative to control the causal agent of anthracnose in mango, *C. gloeosporioides*. This alternative is based on the combined and synergistic use of a control agent of microbial origin (*T. asperellum* T8a) and a synthetic fungicide (Captan 50®), in order to minimize losses in mango production caused by this disease, thus as environmental problems from the use of synthetic fungicides used conventionally.

Materials and methods

Phyto pathogenic fungi and control agents of microbial and synthetic origin used. The phyto pathogen used as causal agent of anthracnose in mango was the strain ATCC MYA 456 from *Colletotrichum gloeosporioides*, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The strain *Trichoderma asperellum* T8a (isolated from mango tree) was used as biological control agent against *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. The strain T8a was provided by the edaphic and endophyte collection of microorganisms (hive) from the Biotech laboratory of Microbial Source, at Instituto Tecnológico de Sonora. Also, Captan 50® was used as synthetic fungicide of conventional use against the phyto pathogen fungi under study.

Macroscopic, microscopic and molecular characterization of microorganisms under study. The microorganisms used were identified through their macroscopic and microscopic characteristics, such as hyaline hyphae; mycelium color and conidia shape (Gunnel and Gubler, 1992, de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013.). Furthermore, these microorganisms were molecularly identified by amplification of 5.8S rRNA gene in its genomic DNA, by the polymerase chain reaction (PCR) (White *et al.*, 1990). Previously, the microorganisms under study were grown in broth Potato Dextrose (PDB) to obtain mycelium (incubation for 3 days at 28 °C), which was used for extraction of genomic DNA (Rader and Broda, 1985). The amplicons (~ 300 bp) were purified using the GFX PCR DNA kit and Gel Band Purification (Illustra) and sequenced in both directions by Sanger platform. Electropherograms obtained were analyzed using the Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems). The sequences obtained were compared with those deposited in the gene bank from NCBI.

Sanger. Los electroferogramas obtenidos fueron analizados utilizando el programa Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas depositadas en el banco de genes del NCBI.

Ensayos de patogenicidad de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 *in vivo*. Los ensayos de patogenicidad de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 fueron realizados en mangos verdes (cinco frutos por tratamiento), mediante la inoculación de 1×10^6 esporas en cinco puntos distantes de cada fruto. Posteriormente, éstos fueron incubados en una cámara húmeda a 28 ± 1 °C, humedad relativa de $85 \pm 5\%$, fotoperiodo de 12 h (540 Lux) - 12h (20 Lux) durante 15 días. El número de frutos que mostraron los síntomas característicos de la antracnosis fueron registrados, aislando el patógeno en estudio de las lesiones observadas de dichos frutos (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

Ensayos de confrontación *in vitro*. Ensayos de confrontación se llevaron a cabo con la finalidad de cuantificar la capacidad de control de *T. asperellum* T8a contra *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. Estos ensayos se desarrollaron co-inoculando 1×10^5 esporas de la cepa ATCC MYA 456 con 1×10^5 esporas de la cepa T8a (a una distancia de 6 cm del patógeno), en cajas de Petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA) como medio de cultivo, incubando éstas a 28 °C durante 8 día (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). El porcentaje de inhibición de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 se calculó utilizando la ecuación:

$$\%I = \frac{A1 - A2}{A1} * 100$$

Donde: %I= porcentaje de inhibición (%), A1= área de la caja de Petri (en mm²) cubierta por *C. gloeosporioides* inoculado sin el agente de control, A2 = área de la caja de Petri (en mm²) cubierta por *C. gloeosporioides* co-inoculado con *T. asperellum* T8a (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

Ensayos de concentración mínima inhibitoria *in vitro*. El impacto de diferentes dosis de Captan 50® sobre *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 y *T. asperellum* T8a fue evaluado a través de ensayos de concentración mínima inhibitoria. Para ello, 1×10^5 esporas de cada microorganismo estudiado fueron inoculadas en cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo, adicionado con un gradiente de concentraciones de Captan 50® (g L⁻¹): 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0. Las cajas de Petri fueron incubadas a 28° C durante 8 días. Las tasas de crecimiento fueron cuantificadas mediante la ecuación:

Pathogenicity tests of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 *in vivo*. Pathogenicity tests of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 were carried out in green mangoes (five fruits per treatment), by inoculating 1×10^6 spores in five distant points of each fruit. Subsequently, this were incubated in a humid chamber at 28 ± 1 °C, relative humidity of $85 \pm 5\%$, 12 h photoperiod (540 Lux) - 12h (20 Lux) for 15 days. The number of fruits that showed the characteristic symptoms of anthracnose were recorded, isolating the pathogen under study from lesions observed in these fruits (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

In vitro confrontation assays. Confrontation tests were conducted in order to quantify the control ability of *T. asperellum* T8a against *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. These assays were developed co-inoculating 1×10^5 spores of strain ATCC MYA 456 with 1×10^5 spores of strain T8a (at a distance of 6 cm from the pathogen), in petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) as culture medium, incubating them at 28 °C for 8 days (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). The inhibition percentage of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 was calculated using the equation.

$$\%I = \frac{A1 - A2}{A1} * 100$$

Where: % I = inhibition percentage (%), A1 = area of the Petri dish (in mm²) covered by *C. gloeosporioides* inoculated control without the control agent, A2 = area of the Petri dish (in mm²) covered by *C. gloeosporioides* co-inoculated with *T. asperelleum* T8a (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

In vitro minimum inhibitory concentration assays. The impact of different doses of Captan 50® on *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 and *T. asperelleum* T8a was evaluated through minimum inhibitory concentration assay. For this, 1×10^5 spores of each microorganism under study were inoculated in Petri dishes containing PDA as culture medium, added with a concentration gradient of Captan 50® (g L⁻¹): 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0. Petri dishes were incubated at 28 °C for 8 days. Growth rates were quantified by the equation:

$$TC = \frac{C2 - C1}{T2 - T1}$$

Where: TC = growth rate (mm² h⁻¹); C1 = initial growth (mm²); C2 = final growth (mm²); T1 = initial time (h); T2 = final time (h) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

$$TC = \frac{C2 - C1}{T2 - T1}$$

Donde: TC=tasa de crecimiento ($\text{mm}^2 \text{h}^{-1}$); C1= crecimiento inicial (mm^2); C2= crecimiento final (mm^2); T1= tiempo inicial (h); T2= tiempo final (h) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013).

Ensayos de sinergismo *T. asperellum* T8a - captan 50[®] contra *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. Ensayos de confrontación triple se llevaron a cabo con la finalidad de cuantificar la capacidad de control del sinergismo *T. asperellum* T8a - Captan 50[®] contra *C. gloeosporioides* ATCC MYA456. Los ensayos fueron desarrollados mediante la co inoculación de 1×10^5 esporas de la cepa ATCC MYA 456 y T8a (a una distancia de 6 cm) en cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo, adicionado con 0.1 g L^{-1} de Captan 50[®]. Las cajas de Petri inoculadas fueron incubadas a 28 °C durante 8 día (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). El porcentaje de inhibición de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 fue calculado utilizando la ecuación 1.

Análisis estadísticos. Todos los experimentos fueron replicados independientemente tres veces. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el método de Tukey-Kramer ($p=0.05$), utilizando el software JMP-SAS v 8.0.2.

Resultados y discusión

Características macro y microscópicas de los microorganismos estudiados. La antracnosis, causada por el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*, es la principal enfermedad que afecta la producción de mango a nivel mundial, conduciendo a pérdidas de 90% de la producción cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de este agente causal (Arauz, 2000). En el presente estudio se evaluó el control de este fitopatógeno a través del sinergismo entre un agente de control biológico y un fungicida sintético (*T. asperellum* T8a y Captan 50[®], respectivamente).

La cepa ATCC MYA 456 de *C. gloeosporioides* presentó, a nivel macroscópico, micelio hialino que rápidamente se convirtió en algodonoso de color gris oscuro, presentando lento crecimiento en cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo, cubriendo dichas cajas en su totalidad después de 7 días, en incubación a 28 °C (Figura 1a); a

Synergism assays *T. asperelleum* T8a - Captan 50[®] against *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. Triple confrontation assays were conducted in order to quantify the control ability from synergism *T. asperelleum* T8a - captan 50[®] against *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. The assays were developed by co-inoculating 1×10^5 spores of strain ATCC MYA 456 and T8a (at a distance of 6 cm) in Petri dishes containing PDA as culture medium supplemented with 0.1 g L^{-1} capture 50[®]. Inoculated Petri dishes were incubated at 28 °C for 8 days (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). The inhibition percentage of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 was calculated using equation 1.

Statistical analysis. All experiments were replicated three times independently. The data obtained were analyzed by analysis of variance test (ANOVA) one-way and Tukey-Kramer method ($p=0.05$) using the JMP-SAS v 8.0.2 software.

Results and discussion

Macro and microscopic characteristics of the organisms studied. Anthracnose, caused by the plant pathogenic fungus *C. gloeosporioides*, is the main disease affecting mango production worldwide, leading to losses of 90% of production when environmental conditions are favorable for the development of this causal agent (Arauz, 2000). In the present study was evaluated the control of this plant pathogen through the synergism between a biological control agent and a synthetic fungicide (*T. asperelleum* T8a and captan 50[®], respectively).

Strain ATCC MYA 456 of *C. gloeosporioides* showed at macroscopic level, hyaline mycelium that quickly became cottony dark gray, showing slow growth in Petri dishes containing PDA as culture medium, with full coverage after 7 days, incubation at 28 °C (Figure 1a); microscopically showed mycelium and septate conidia, the latter ovoid (Figure 1b), these characteristics have been previously reported for this species by Montero-Tavera *et al.*, (2010). The control agent of microbial origin, *T. asperellum* T8a, macroscopically showed mycelium with green/white concentric rings in the presence of periods of 12 h light/dark grown in Petri dishes containing PDA as culture medium, and incubated at 28 °C (Figure 1c), and at microscopic level showed septate hyphae and the presence of typical phialides for this genre, housing conidia (Figure 1d) (Druzhinina *et al.*, 2011). Molecular characterization of these microorganisms was performed by amplification and sequencing the 5.8S rRNA gene, showed 100% coverage

nivel microscópico presentó micelio y conidias septadas, estas últimas de forma ovoide (Figura 1b), dichas características han sido previamente reportadas para esta especie por Montero-Tavera *et al.* (2010). El agente de control de origen microbiano, *T. asperellum* T8a, presentó macroscópicamente micelio con anillos concéntricos verdes/blancos en presencia de periodos de 12 h de luz/oscuridad, crecido en cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo, e incubado a 28° C (Figura 1c), y a nivel microscópico mostró hifas septadas y la presencia de las fiálides típicas de éste género, albergando las conidias (Figura 1d) (Druzhinina *et al.*, 2011). La caracterización molecular de estos microorganismos realizada mediante la amplificación y secuenciación del gen 5.8S RNAr, mostró una cobertura 100% e identidad 99% comparada con las secuencias de nucleótidos de las especies de *C. gloeosporioides* y *T. asperellum* previamente reportadas en la base de datos del NCBI, confirmando la taxonomía e identidad de los microorganismos estudiados.

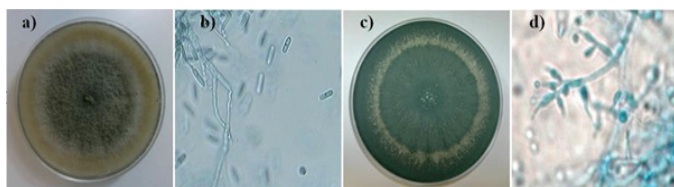


Figura 1. Microorganismos utilizados en este estudio. Características macroscópicas y microscópicas de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 (a y b), y *T. asperellum* T8a (c y d), inoculados en cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo, e incubadas a 28° C durante 7 días.

Figure 1. Microorganisms used in this study. Macroscopic and microscopic characteristics of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 (a and b), and *T. asperellum* T8a (c and d), inoculated in Petri dishes containing PDA as culture medium, and incubated at 28° C for 7 days.

Ensayos de patogenicidad de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. El principal problema en el control de la antracnosis es la gran diversidad genética, y en consecuencia patogénica, de las cepas de *C. gloeosporioides* en campo, por ejemplo, en 1992 se reportaron alrededor de 600 variantes de esta especie (Bailey y Jeger, 1992). Además, Bonde *et al.* (1991) distinguieron diversas formas patogénicas basadas en sus hospederos específicos y características culturales. De esta manera, estudios sobre el grado de patogenicidad específico de cada cepa de este fitopatógeno son necesarios para diseñar estrategias eficientes de control en campo. Así, ensayos de patogenicidad de *C. gloeosporioides* ATCC 456 fueron

and 99% identity compared with the nucleotide sequences of the species *C. gloeosporioides* and *T. asperellum* previously reported in the database from NCBI, confirming the taxonomy and identity of the microorganisms under study.

Pathogenicity assays of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. The main problem in anthracnose control is the great genetic diversity and in consequence pathogenic, strains of *C. gloeosporioides* in field, for example, in 1992 were reported around 600 variants of this species (Bailey and Jeger, 1992). Moreover, Bonde *et al.*, (1991) distinguished various pathogenic forms based on their specific hosts and cultural characteristics. Thus, studies on the degree of specific pathogenicity of each strain of the phytopathogen are necessary to design efficient control strategies in field. Thus, testing pathogenicity of *C. gloeosporioides* ATCC 456 were developed *in vivo*, noting that this strain showed the ability to cause anthracnose at 100% of the inoculated mangos, disease characterized by the appearance of black spots that coalesce to form irregular lesions (Figure 2). This reinforces the evidence reported on species of the genus *Colletotrichum*, considered the most successful within the group of plant pathogenic fungi for the severity of the disease causing its host plant. Moreover, its ability to cause latent or quiescent infections places this genus within the major postharvest pathogens (Jeffries *et al.*, 1990).

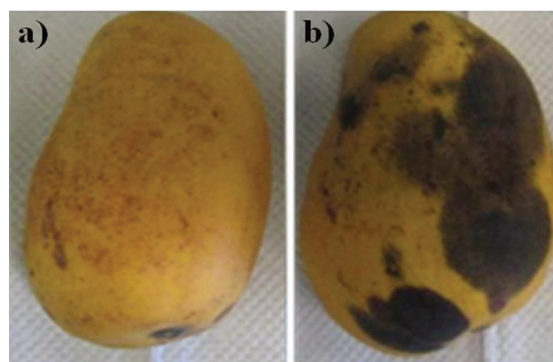


Figura 2. Ensayo de patogenicidad de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 *in vivo*. a) fruto no inoculado; y b) fruto inoculado con 1×10^6 esporas del fitopatógeno estudiado, e incubado en una cámara húmeda (28 ± 1 ° C, humedad relativa de $85 \pm 5\%$, fotoperiodo de 12 h (540 Lux) - 12 h (20 Lux), durante 15 días).

Figure 2. Pathogenicity assay of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 *in vivo*. a) uninoculated fruit; b) fruit inoculated with 1×10^6 spores of the phyto-pathogen studied, and incubated in a humid chamber incubated (28 ± 1 ° C, relative humidity $85 \pm 5\%$, photoperiod of 12 h (540 Lux) - 12 h (20 Lux) For 15 days).

desarrollados *in vivo*, observando que esta cepa presentó la capacidad de causar la antracnosis en 100% de los mangos inoculados, enfermedad caracterizada por la aparición de manchas negras que coalescen para formar lesiones irregulares (Figura 2). Lo anterior refuerza las evidencias reportadas sobre las especies del género *Colletotrichum*, consideradas como las más exitosas dentro del grupo de hongos fitopatógenos para la severidad de la enfermedad que causa a su planta hospedera. Además, su capacidad de causar infecciones latentes o quiescentes ubica a este género dentro de los patógenos más importantes a nivel post-cosecha (Jeffries *et al.*, 1990).

Ensayos de confrontación entre *T. asperellum* T8a y *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. En los últimos años, el control de la antracnosis se ha centrado principalmente en el uso de métodos físicos (poda, luz ultravioleta y atmósferas modificadas) y químicos (fungicidas sintéticos, cobre e inhibidores de colesterol) (Stevens *et al.*, 1997; Ker, 2001; Karabulut y Baykal, 2004; Arias y Carrizales, 2007). Sin embargo, estas alternativas presentan problemas económicos, ambientales y de eficiencia en el control del agente causal. Por lo cual, la generación u optimización de alternativas de control sostenible de esta enfermedad es determinante para incrementar la competitividad del cultivo del mango. En el presente trabajo, la cepa *T. asperellum* T8a fue evaluada como agente de control de origen microbiano contra *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, y posteriormente el impacto de la incorporación de Captan 50® a dicha interacción fue estudiado.

Los ensayos de confrontación mostraron la capacidad de *T. asperellum* T8a para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, en 91%, esto a través de mecanismos micoparasíticos, observando un sobrecrecimiento en el hongo fitopatógeno por la cepa T8a (Figura 3), evidenciando la capacidad de la cepa T8a como alternativa promisorio de control de origen microbiano contra el agente causal de la antracnosis (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). El comportamiento micoparasítico observado de la cepa T8a, ha sido evidenciado para el género *Trichoderma* (estado teleomorfo: *Hypocrea*), el cual ha sido estudiado por poseer formas de vida biotrófica y saprófita, cuya capacidad para micoparasitar (mediante la biosíntesis de enzimas líticas) ha sido enfocada para la protección de plantas contra diversas enfermedades fúngicas, es decir, su aplicación como agente de control biológico (Atanasova *et al.*, 2013).

Ensayos de concentración mínima inhibitoria de los microorganismos estudiados por captan 50®. captan 50® es un fungicida de contacto muy potente que contiene

Confrontation assays between *T. asperelleum* T8a and *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. In recent years, control of anthracnose has focused primarily on the use of physical and chemical methods (pruning, ultraviolet light and modified atmospheres) and chemicals (synthetic fungicides, copper and cholesterol inhibitors) (Stevens *et al.*, 1997; Ker, 2001; Karabulut and Baykal, 2004; Arias and Carrizales, 2007). However, these alternatives have economic, environmental and efficiency problems in controlling the causative agent. Therefore, generation or optimization of alternative sustainable control of this disease is crucial to increase the competitiveness of mango. In this paper, strain *T. asperelleum* T8a was evaluated as microbial control agent origin against *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, and then the impact of the incorporation of Captan 50® to such interaction was studied.

Confrontation assays showed the ability *T. asperellum* T8a to inhibit growth of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, in 91%, this through mycoparasitic mechanisms, observing an overgrowth in the phytopathogenic fungus by strain T8a (Figure 3), demonstrating the ability of T8a strain as a promising alternative of control of microbial origin against the causative agent of anthracnose (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013). The mycoparasitic behavior observed of strain T8a has been demonstrated for *Trichoderma* (teleomorph state: *Hypocrea*), which has been studied by possessing biotrophic forms of life and saprophyte, whose mycoparasitic ability (through biosynthesis of lytic enzymes) has been focused for the protection of plants against various fungal diseases, that is, its application as a biological control agent (Atanasova *et al.*, 2013).

Minimum inhibitory concentration assays of microorganisms studied by captan 50®. Captan 50® is a very powerful contact fungicide containing N-trichloromethylthio, and belongs to the group of phthalimides. This fungicide interacts with cellular thiols producing thiophosgene, which is a toxic compound that interferes with breathing process of fungal cells, inhibiting spore germination and hindering their growth and development (Bravoag, 2013).

Anthracnose control in mango through captan 50® has been carried out using five applications of 2 kg ha⁻¹ each, for a total of 10 kg ha⁻¹; however, this fungicide is very persistent in the environment (Alpuche, 1990), leading to residual effects on the fruits. In addition, these applications of captan 50® favor the generation of resistance from plant pathogenic fungi, thus the repression of the population and diversity of those fungi susceptible to this fungicide, limiting their ecological role.

el grupo N-triclorometilitio, y pertenece al grupo de las Ftalimidias. Este fungicida interactúa con los tioles celulares produciendo tiosfeno, el cual es un compuesto tóxico que interfiere en el proceso de respiración de las células fúngicas, inhibiendo la germinación de las esporas y dificultando su crecimiento y desarrollo (Bravoag, 2013).

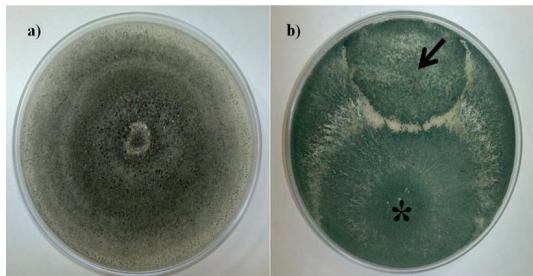


Figura 3. Ensayos de confrontación entre *T. asperellum* T8a y *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, a través de mecanismos micoparasíticos (indicado por una flecha).

Figure 3. Comparison tests between *T. asperellum* T8a and *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, through mycoparasitic mechanisms (indicated by an arrow).

El control de la antracnosis en mango a través de captan 50[®] se ha llevado a cabo mediante cinco aplicaciones de 2 kg ha⁻¹ cada una, para un total de 10 kg ha⁻¹; sin embargo, este fungicida es muy persistente en el ambiente (Alpuche, 1990), conduciendo a efectos residuales en los frutos. Además, estas aplicaciones de captan 50[®] propician la generación de resistencia por parte de hongos fitopatógeno, así como la represión de la población y diversidad de aquellos hongos susceptibles a este fungicida, limitando su papel ecológico.

De esta manera, ensayos de concentración mínima inhibitoria de captan 50[®] sobre *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 y *T. asperellum* T8a fueron desarrollados con la finalidad de conocer: i) el potencial efecto inhibitorio del fungicida residual sobre *T. asperellum* T8a cuando sea inoculado, lo cual limitaría su efectividad; y ii) la mínima concentración de captan 50[®] que en co-inoculación con *T. asperellum* T8a no interfiera con su desarrollo, pero que contribuya al control incrementado de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456.

Estos ensayos mostraron que concentraciones iguales o mayores a 0.5 g L⁻¹ de captan 50[®] adicionadas a cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo, inhibieron en su totalidad el crecimiento de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, sin embargo, concentraciones menores (0.1 y 0.25 g L⁻¹) inhibieron el crecimiento del patógeno 36% (Figura 4).

Minimum inhibitory concentration assays of captan 50[®] on *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 and *T. asperellum* T8a were developed in order to know: i) the potential inhibitory effect of residual fungicide on *T. asperellum* T8a when it is inoculated, which would limit its effectiveness; and ii) the minimum concentration of captan 50[®] that in co-inoculation with *T. asperellum* T8a does not interfere with its development but contribute to increased control of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456.

These essays showed that concentrations equal to or greater than 0.5 g L⁻¹ captan 50[®] added to Petri dishes containing PDA as culture medium, entirely inhibited the growth of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456; however, lower concentrations (0.1 and 0.25 g L⁻¹) inhibited the growth of the pathogen by 36% (Figure 4). Furthermore, the growth of *T. asperellum* T8a was inhibited 93% when inoculated at the highest concentration tested (15 g L⁻¹), and only 16% when 0.5 g L⁻¹ of captan 50[®] was used, in comparison to 100% inhibition in growth of the phytopathogenic at the same dose. These results probe greater resistance from control agent of microbial origin to the inhibitory effects of captan 50[®] compared to the phytopathogenic fungus under study, similar observations on the resistance of strains of the genus *Trichoderma* to synthetic fungicides have been reported, i.e. *Trichoderma asperelloides* and *Trichoderma harzianum* strains developed in increased concentrations of synthetic fungicides such as captan, 2350 ppm; thiabendazole, 20 ppm; and a mixture of capture-carboxin, 1500 ppm (Chaparro *et al.*, 2011).

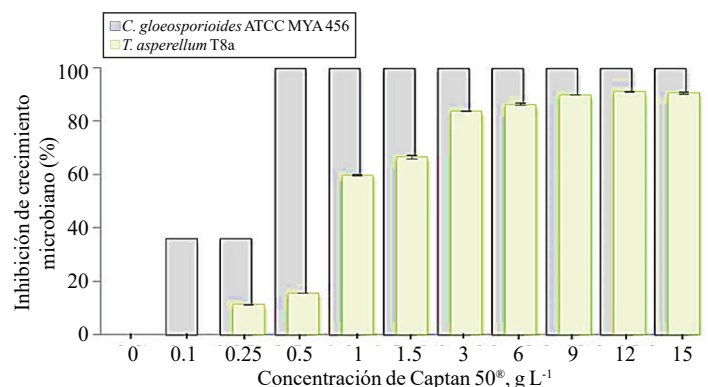


Figura 4. Concentración mínima inhibitoria de Captan 50[®] sobre *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 (barras color gris) y *T. asperellum* T8a (barra color verde), en cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo e incubadas a 28 °C durante 7 días.

Figure 4. Minimum inhibitory concentration of Captan 50[®] on *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 (gray bars) and *T. asperellum* T8a (green bar) in petri dishes containing PDA as culture medium and incubated at 28 °C for 7 days.

Por otro lado, el crecimiento de *T. asperellum* T8a fue inhibido 93% cuando se inoculó en la concentración más alta evaluada (15 g L^{-1}), y sólo 16% cuando se utilizó 0.5 g L^{-1} de Captan 50®, en comparación con la inhibición 100% en el crecimiento del fitopatógeno a la misma dosis. Estos resultados evidencian una mayor resistencia del agente de control de origen microbiano a los efectos inhibitorios de captan 50® en comparación con el hongo fitopatógeno en estudio, observaciones similares sobre la resistencia de cepas del género *Trichoderma* a fungicidas sintéticos han sido reportados, *i.e.* cepas de *Trichoderma asperelloides* y *Trichoderma harzianum* se desarrollaron en concentraciones incrementadas de fungicidas sintéticos, tales como: captan, 2350 ppm; tiabendazol, 20 ppm; y una mezcla de captan-carboxina, 1 500 ppm (Chaparro *et al.*, 2011).

En el presente estudio la concentración de captan 50® seleccionada para ensayos posteriores fue 0.1 g L^{-1} , esto con la finalidad de potenciar el control del fitopatógeno a través de la sinergia del fungicida estudiado y la cepa micoparasítica T8a, debido a que 0.1 g L^{-1} de captan 50® inhibe el crecimiento de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 en 36%, sin mostrar efectos inhibitorios sobre *T. asperellum* T8a.

Ensayos de sinergismo *T. asperellum* T8a - Captan 50® contra *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. El ensayo de confrontación entre la co inoculación de los agentes de control (0.1 g L^{-1} de captan 50® + *T. asperellum* T8a) vs. *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 mostró un efecto sinérgico de esta interacción para el control del agente causal de la antracnosis; es decir, la dosis seleccionada de captan 50® (0.1 g L^{-1}) inhibió 36% el crecimiento de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, y *T. asperellum* T8a en 91%, después de 8 días de incubación a 28°C , utilizando PDA como medio de cultivo. Sin embargo, la interacción de los agentes de control (0.1 g L^{-1} de captan 50® + *T. asperellum* T8a) incrementó la inhibición del crecimiento del fitopatógeno hasta 99%, bajo las mismas condiciones de cultivo (Figura 5).

Estos resultados sugieren el siguiente mecanismo de acción de la combinación de los agentes de control utilizados: la concentración de 0.1 g L^{-1} de captan 50® no afecta el crecimiento de *T. asperellum* T8a, pero sí el desarrollo de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, por lo cual, cuando ambas cepas microbianas son co-inoculadas en cajas de Petri conteniendo PDA adicionado con 0.1 g L^{-1} de captan 50®, se inhibe o retarda el crecimiento del fitopatógeno sin afectar el desarrollo de *T. asperellum* T8a, proporcionando primeramente una ventaja en la competencia por espacio

In the present study the concentration of captan 50® selected for further trials was 0.1 g L^{-1} , this in order to enhance the control of the phytopathogen through the synergy of the fungicide and the mycoparasitic strain T8a, due to 0.1 g L^{-1} captan 50® inhibits the growth of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 in 36%, without showing inhibitory effects on *T. asperellum* T8a.

Synergism assays *T. asperelleum* T8a - captan 50® against *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456. The confrontation assay between the co-inoculation of control agents (0.1 g L^{-1} capture 50® + *T. asperelleum* T8a) vs. *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 showed a synergistic effect of this interaction for control of the causal agent of anthracnose; *i.e.*, the selected dose captan 50® (0.1 g L^{-1}) inhibited 36% growth of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 and *T. asperellum* T8a in 91% after 8 days of incubation at 28°C , using PDA as culture medium. However, the interaction of control agents (0.1 g L^{-1} captan 50® + *T. asperellum* T8a) increased growth inhibition of the phytopathogen to 99%, under the same culture conditions (Figure 5).

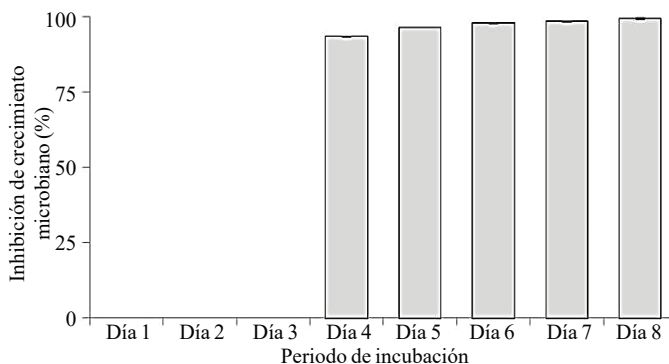


Figura 5. Inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 a través de la sinergia entre *T. asperellum* T8a y 0.1 g L^{-1} Captan 50®. Los ensayos fueron desarrollados en cajas de Petri conteniendo PDA como medio de cultivo, adicionado con 0.1 g L^{-1} Captan 50®, co-inoculando los microorganismos en estudio a una distancia de 6 cm, con incubación a 28°C por 8 días.

Figure 5. Growth inhibition of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456 through the synergy between *T. asperellum* T8a and 0.1 g L^{-1} Captan 50®. The assays were carried out in Petri dishes containing PDA as culture medium, added with 0.1 g L^{-1} Captan 50®, co-inoculating the microorganisms under study at a distance of 6 cm, incubated at 28°C for 8 days.

These results suggest the following mechanism of action of the combination of control agents used: the concentration of 0.1 g L^{-1} capture 50® does not affect the growth of *T.*

y nutrientes de la cepa T8a, y posteriormente cuando *T. asperellum* T8a intercepta el micelio del fitopatógeno con crecimiento retardado por la dosis de captan 50[®] utilizada, se inicia el micoparasitismo. De esta manera, se demuestran la capacidad de la cepa T8a para sobrevivir en ambientes con moléculas remanentes de captan 50[®], lo cual potencia su capacidad de control biológico bajo la compatibilidad específica con dicho fungicida sintético, representando una promisorio herramienta para el control sostenible de enfermedades fúngicas en los cultivos.

Resultados similares han sido reportados por Shaiesta *et al.* (2013), mostrando la capacidad de una cepa de *Trichoderma harzianum* para tolerar altas dosis de captan (3 g L⁻¹), carbendazim (1 g L⁻¹), bitertanol (1 g L⁻¹), hexaconazole (1 g L⁻¹), y mancozeb (3 g L⁻¹), cuantificando una inhibición de su crecimiento en 36.6%, 90.8%, 40%, 16.1% y 11.7%, respectivamente. Además, Ordentlich *et al.* (1990) reportó un incremento de la productividad de papa cv. Draga y cv. Desiree 46% y 80%, respectivamente, debido a la reducción de la infección causada por *Verticillium dahliae*, mediante un control integrado por la aplicación de *Trichoderma harzianum* y captan.

Conclusión

El uso integrado de *T. asperellum* T8a y una dosis baja de captan 50[®] (0.1 g L⁻¹) condujo a la inhibición del crecimiento *in vitro*, de manera incrementada y sinérgica, de *C. gloeosporioides* ATCC MYA 454, cepa patógena causante de antracnosis en el mango. Lo cual representa una alternativa sostenible promisorio para el control de la antracnosis en huertas de mango, así como el control de diversas enfermedades en cultivos de interés. La aplicación de esta alternativa presenta potenciales ventajas en comparación con la aplicación excesiva de fungicidas sintéticos, i) la cepa T8a fue aislada de la rizósfera de árboles de mango de huertas en producción, lo cual sugiere una interacción planta x microorganismo y microorganismos x microorganismo exitosa cuando sea aplicada en campo; ii) *T. asperellum* T8 mantuvo su capacidad de inhibir el crecimiento del fitopatógeno *in vitro* en presencia del fungicida sintético evaluado, lo cual evidencia que su capacidad micoparasítica no se ve comprometida aun cuando existan moléculas remanentes de captan 50[®] en el agro-sistema, como consecuencia de su aplicación excesiva y constante al cultivo del mango; y iii) el uso de esta tecnología permitirá la aplicación reducida de captan 50[®] debido a la

asperelleum T8a, but it does affect the development of *C. gloeosporioides* ATCC MYA 456, whereby, when both microbial strains are co-inoculated in Petri dishes containing PDA supplemented with 0.1 g L⁻¹ captan 50[®], it is inhibited or retards the growth of the phytopathogen without affecting the development of *T. asperellum* T8a, first providing an advantage in the competition for space and nutrients of T8a strain, and then when *T. asperelleum* T8a intercepts the mycelium of the phytopathogen with stunted growth by the dose of captan 50[®], mycoparasitism starts. In this way, it is demonstrated the ability of strain T8a to survive in environments with remaining molecules of captan 50[®], which enhances its biocontrol ability under the specific compatibility with the synthetic fungicide, representing a promising tool for sustainable control of fungal diseases in crops.

Similar results have been reported by Shaiesta *et al.*, (2013), showing the ability of a strain of *Trichoderma harzianum* to tolerate high doses of captan (3 g L⁻¹), carbendazim (1g L⁻¹), bitertanol (1g L⁻¹), hexaconazole (1g L⁻¹) and mancozeb (3 g L⁻¹), quantifying growth inhibition in 36.6%, 90.8%, 40%, 16.1% and 11.7%, respectively. Furthermore, Ordentlich *et al.*, (1990) reported an increase in productivity of potato cv. Draga and cv. Desiree 46% and 80%, respectively, due to the reduction of the infection caused by *Verticillium dahliae* through an integrated control applying *Trichoderma harzianum* and captan.

Conclusion

The integrated use of *T. asperellum* T8a and a low dose and captan 50[®] (0.1 g L⁻¹) led to *in vitro* growth inhibition, in an increased manner and synergistically of, *C. gloeosporioides* ATCCMYA454, pathogenic strain responsible for anthracnose in mango. Which represents a promising alternative for sustainable control of anthracnose in mango orchards, thus control of various diseases in crops of interest. The application of this alternative has potential advantages compared to the excessive application of synthetic fungicides, i) T8a strain was isolated from the rhizosphere of mango trees from orchards in production, suggesting a successful plant x microorganism and microorganisms x microorganism interaction when applied in field; ii) *T. asperelleum* T8 maintained its ability to inhibit the growth of the phytopathogen *in vitro* in presence of synthetic fungicide, which shows that its mycoparasitic capacity is not compromised even when there are remnants of captan 50[®] molecules in the agro-system, as a result of excessive and constant application to mango cultivation; and iii) use of this

baja dosis utilizada, la cual en combinación con la cepa T8a potenciará el control de *C. gloeosporioides*, reduciendo los problemas económicos y ambientales por el uso de captan 50®.

technology will allow reduced application of captan 50® due to the low dose used, which in combination with T8a strain will boost the control of *C. gloeosporioides*, reducing the economic and environmental problems by the use of captan 50®.

Literatura citada

End of the English version



- Alpuche, L. 1990. Los fungicidas: aspectos generales. In: Albert, L. (Coord.). Los plaguicidas. El Ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo. 215-217 pp.
- Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. *Plant Dis.* 84(6):600-611.
- Arias, B. y Carrizales, L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, estado Monagas, Venezuela. *Bioagro.* 19(1):19-25.
- Atanasova, L.; Druzhinina, I. S. and Jaklitsch, W. M. 2013. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. In: Mukherjee, P. K.; Horwitz, B. A.; Singh, U. S.; Mukherjee, M. and Schmoll, M. (Eds.). *Trichoderma: biology and applications*. CABI, Wallingford. 10-42 pp.
- Bailey, J. A.; O'Connell, R. J.; Pring, R. J. and Nash, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J. A. and Jeger, M. J. (Eds.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*, Wallingford UK: CAB International. 88-120 pp.
- Bonde, M. R.; Peterson, G. C. and Maas, G. L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* spp. pathogenic to strawberry. *Phytopathology.* 81(12):1523-1528.
- Bravoag, 2013. Captan 50. Salicitudes/fichas técnicas/ ft captan50.pdf.
- Bruce da Silva, C. F. and Michereff, S. J. 2013. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. *Rev. Caatinga.* 26(4):130-138.
- Chaparro, A.; Carvajal, L. and Orduz, S. 2011. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agric. Sci.* 2:301-307.
- de los Santos-Villalobos, S.; Barrera-Galicia, G. C.; Miranda-Salcedo, M. A. and Peña-Cabrieles, J. J. 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(8):2615-2623.
- de los Santos-Villalobos, S.; de-Folter, S.; Délano-Frier, J. P.; Gómez-Lim, M. A.; Guzmán-Ortiz, D. A.; Sánchez-García, P. and Peña-Cabrieles, J. J. 2011. Critical aspects on the integral management of mango: flowering, anthracnose and industrial waste. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2(2):221-234.
- de los Santos-Villalobos, S.; Guzmán-Ortiz, D. A.; Gómez-Lim, M. A.; Délano-Frier, J. P.; de-Folter, S. and Peña-Cabrieles, J. J. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control.* 64(1):37-44.
- Druzhinina, I. S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B. A.; Kenerley, C. M.; Monte, E.; Mukherjee, P. K.; Zeilinger, S.; Grigoriev, I. V. and Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(10):749-759.
- Espinosa, J.; Arias, J.; Rico, H.; Miranda, M. y Chávez, X. 2004. Dinámica del daño y control de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) en mango en Michoacán. INIFAP 5:1-28.
- FAO. 2013. FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/>.
- Gunnell, P. S. and Gubler, W. D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic on strawberry. *Mycologia* 84:157-165.
- Jeffries, P.; Dodd, J. C.; Jeger, M. J. and Plumbley, R. A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathol.* 39(3):343-366.
- Karabulut, O. A. and Baykal, N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection* 23(5):431-435.
- Ker, C. K. 2001. Sensitivity of mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, to the fungicide prochloraz in Taiwan. *Proc Natl. Sci. Counc. Repub. China B.* 25(3):174-179.
- Lakshmi, B. K. M.; Kumari, D. A.; Kumar, A. K.; Babu, J. D. and Reddy, P. N. 2013. Mitigating postharvest losses caused by anthracnose disease in mango by using bio agents, botanicals and ISR chemicals. *Acta Hort.* 1012:661-670.
- Litz, R. E. 2000. World mango breeding problems and perspectives: a biotechnology overview. In: *Proceedings Simposium Mango. Control de la floración y mejoramiento genético.* INIFAP. 1-7.
- Montero-Tavera, V.; Morales-García, J. L.; González-Chavira, M. M. y Anaya-López, J. L.; Corona-Torres, T. y Gálvez-Mariscal, A. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1(2):159-174.
- NCBI. 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/browser/wwwtax.cgi?id=474922>.
- Ordentlich, A.; Nachmias, A. and Chet, I. 1990. Integrated control of *Verticillium dahliae* in potato by *Trichoderma harzianum* and captan. *Crop Protection.* 9(5):363-6.
- Peres, N. A.; Souza, N. L.; Peever, T. L. and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. *Plant Dis.* 88(2):125-130.
- Rader, U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol.* 1(1):17-20.
- Ragazzo-Sánchez, J.; Robles-Cabrera, A.; Lomelí-González, L.; Luna-Solano, G. y Calderón-Santoyo, M. 2011. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 17(1):5-11.
- Shaiesta, S.; Sahera, N. and Shaheen, K. 2013. Efficacy of Fungicides against *Trichoderma* spp. causing green mold disease of oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*). *Res. J. Microbiol.* 8(1):13-24.
- Stevens, C.; Khan, V. A. and Lu, J. Y. 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biol. Control.* 10(2):98-103.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. 315-322 pp.
- Wu, C. H.; Bernard, S. M.; Andersen, G. L. and Chen, W. 2009. Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microb Biotechnol.* 2(4):428-440.