

Bol. Centro Invest. Biol. 45(3): 217-236

**COMPATIBILIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS
VEGETALES Y *TRICHODERMA HARZIANUM* Y SU
EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE *SCLEROTIUM
ROLFSII* SACC. Y *SCLEROTIUM CEPIVORUM* BERK**

SARITZA ALVARADO LUCENA¹; DILCIA ULACIO OSORIO²,
MARÍA E. SANABRIA CHÓPITE², MARÍA JIMÉNEZ TAMAYO².

^{1, 2} *Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, ¹ Decanato de
Agronomía. ² Posgrados de Agronomía. Programa Fitopatología.
Correo electrónico: satitza.alvarado@gmail.com*

Resumen. Se evaluó la compatibilidad *in vitro* de los extractos etanólicos (EE) del orégano silvestre (*Lippia origanoides*) y neem (*Azadirachta indica*), solos o combinados entre ellos y *Trichoderma harzianum*; aunado a esto, se determinó el efecto de ambos en el crecimiento micelial y formación de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* y *S. cepivorum*. Las hojas de ambas especies por separado, se secaron, molieron y maceraron en etanol (96%) por 24h, posteriormente, se obtuvo el EE por arrastre de vapor con el uso de un rotavapor. En el experimento se utilizaron dos concentraciones para *L. origanoides* (0,37 y 0,75%) y una para *A. indica* (2,25%). Hubo compatibilidad de *T. harzianum* con *A. indica*, *L. origanoides* al 0,37% y la combinación entre ellos. No obstante, el antagonista no creció en el medio con *L. origanoides* al 0,75%. En cuanto a los patógenos, *S. cepivorum* no se desarrolló en los tratamientos con *L. origanoides*, obteniéndose una inhibición de 71,4 % con el EE de *A. indica*, con respecto al testigo. En contraste, *S. rolfsii* creció en un 100% en aquellos tratamientos con *A. indica*, pero no lo hizo en las concentraciones individuales de *L. origanoides*. Confrontados con el antagonista, los tres hongos mostraron crecimiento en todos los tratamientos, pero en los de *L. origanoides*, no hubo formación de esclerocios de *S. cepivorum* y en *S. rolfsii* se retrasó 15 días, en comparación con el testigo. Se concluye que ambas estrategias tienen afinidad, presentando potencial para ser utilizados en un manejo integrado en estos patógenos. *Recibido: 13 enero 2011, aceptado: 06 octubre 2011.*

Palabras clave. Control biológico, extractos vegetales, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*, *Trichoderma harzianum*.

IN VITRO COMPATIBILITY BETWEEN PLANT EXTRACTS
AND *TRICHODERMA HARZIANUM* AND THEIR EFFECT IN THE
GROWTH OF *SCLEROTIUM ROLFSII* SACC. Y *SCLEROTIUM*
CEPIVORUM BERK.

Abstract. *In vitro* compatibility of the plant extracts of *Lippia organoides* and *Azadirachta indica* individually or combined and *Trichoderma harzianum* and their effect in the mycelial growth and sclerotia formation of *Sclerotium rolfsii* and *S. cepivorum* were evaluated. In the experiment used young and mature leaves from apparently healthy plants from both species were used. The leaves were naturally dry under shade, pulverized in a conventional blender and macerated with ethanol at 96%; with a rotavapor at 100 °C etanolic extracts were obtained. In the experiment were used two concentrations for *L. organoides* (0.37 y 0.75%) and one for *A. indica* (2.25%). The results indicated compatibility of *T. harzianum* with *A. indica*, *L. organoides* al 0.37% and the combination between both extracts. Nevertheless, in the culture media with *L. organoides* extract at 0.75 %, had not growth mycelial of antagonist. In the case of the pathogens, *S. cepivorum* not showed growth mycelial in the treatments with *L. organoides* and in the culture media with *A. indica* extract, the growth mycelial decreased in 71.4 % with respect to control. In contrast, the mycelium of *S. rolfsii* grew on culture media with *A. indica* extract in a 100 %, but not with *L. organoides* applied individually. In dual cultures pathogens-antagonist, the three fungi showed growth in all the treatments, but in these with *L. organoides*, *S. cepivorum* not formed sclerotia and their formation in *S. rolfsii* was retrased for 15 days, with respect to control. It is concluded that these strategies have compatibility with potential to be utilized in a diseases integrated management. *Received: 13 January 20011, accepted: 06 October 2011.*

Key words. Biological control, vegetal extracts, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum*, *Trichoderma harzianum*.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las aplicaciones indebidas e indiscriminadas de fungicidas, han sido objeto de numerosas restricciones en varios países, donde existe una fuerte presión por parte de los consumidores, exigiendo la limitación del uso de estos productos. Los agroquímicos de tipo tóxico, ocupan un lugar destacado como práctica de control de plagas, pero igualmente su uso tiene efectos adversos sobre el ambiente, los animales, las plantas, el hombre y las mismas plagas objeto de control, debido a que estas últimas, pueden desarrollar resistencia (Torrado, 1992).

Investigadores de diversas nacionalidades están en la búsqueda de métodos de control biológico alternativo y/o complementario al uso de químicos, con menores riesgos, pero con similar eficiencia a estos productos. En este sentido Belanger *et al.* (1995); Pereira *et al.* (1996); Ulacio *et al.* (2003); Ezziyyani *et al.* (2004) han comprobado los beneficios de la aplicación de antagonistas como *Trichoderma harzianum*, la incorporación de materia orgánica (Ulacio *et al.*, 2006) y el uso de extractos vegetales o sus componentes, para controlar diferentes patógenos (Briceño *et al.*, 1997; Carneiro *et al.* 1998; Ramírez *et al.* 2000; Díaz *et al.* 2002; Zapata *et al.* 2003; Rodríguez y Sanabria, 2005; Henríquez *et al.* 2005; Bittara *et al.* 2009) tanto en condiciones *in vitro*, invernadero como en campo.

En la naturaleza existe una gran diversidad de plantas que producen metabolitos secundarios (MS) tóxicos. Tal característica les permite actuar como antagonistas de patógenos bióticos y plagas (Zapata *et al.*, 2003, Castillo *et al.*, 2005; Rodríguez y Sanabria, 2005).

Plantas como el neem (*Azadirachta indica*) han tenido impacto sobre algunos enemigos naturales de las plantas, con resultados prometedores (Schmutterer, 1995; Avello *et al.*, 2006). Otras como el cardón lefaria (*Cereus deficiens*), flor escondida (*Phyllanthus niruri*), rabo de alacrán (*Heliotropium indicum*), orégano silvestre (*Lippia organoides*), mata ratón (*Gliricidia sepium*) y algodón de seda (*Calotropis procera*) han resultado fungicidas o fungistáticos para hongos como *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani* (Zapata *et al.*, 2003) y para *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* (Rodríguez y Sanabria, 2005). No obstante, existe la necesidad de fomentar la investigación del uso de estos extractos, no solo en el crecimiento de los microorganismos patógenos, sino también en el de antagonistas, debido a que en algunas oportunidades, se realizan combinaciones de estrategias de control, sin conocer su afinidad.

Castillo *et al.* (2005) identificó alcaloides débilmente básicos, básicos, sales cuaternarias de amonio, fenoles, saponinas, aceites esenciales en EE obtenidos a partir de hojas de orégano colectadas en el estado Lara. Bolívar *et al.* (2009) además de los grupos de MS ya mencionados, reconocieron la presencia de antraquinonas en extractos etanólicos (EE) de plantas de la misma localidad. En el caso del neem, Capataz *et al.* (2007) relacionaron el efecto antialimentario sobre lepidópteros con la presencia de una gran cantidad de compuestos detectados en las suspensiones celulares, tales como la azadiractina.

En este sentido, se evaluó la compatibilidad de EE de *Lippia organoides* H.B.K (orégano silvestre) y *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) con

Trichoderma harzianum y su efecto en el crecimiento micelial y la formación de esclerocios de dos hongos del suelo de importancia agrícola, *Sclerotium rolfsii* Sacc y *S. cepivorum* Berk., causantes de pudriciones en muchos cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.

El ensayo se estableció en el Laboratorio de Fitopatología del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). El estudio se basó en pruebas *in vitro* para determinar la actividad del EE de orégano silvestre (*L. origanoides*) y del neem (*A. indica*), solos o combinados entre ellos y/o *T. harzianum*, sobre los hongos *S. rolfsii* y *S. cepivorum*. Para ello se colectaron hojas de las plantas en floración, aparentemente sanas, las de orégano silvestre, en Acarigua, estado Portuguesa y las de neem, en el Decanato de Agronomía, en Tarabana, estado Lara. En ambos casos el material vegetal se secó a la sombra, se pulverizó con la ayuda de una licuadora convencional Oster^{MR}.

El polvo obtenido se utilizó para la preparación de los EE, macerándolos por separado en 200 mL de etanol (96%) y se mantuvo en reposo por 24h. Posteriormente se filtró y se realizó la extracción del crudo por destilación con un rotavapor Brinkmann^{MR}, en el Laboratorio de Microtecnia e Histopatología vegetal del Postgrado de Fitopatología. Este proceso se repitió hasta que el líquido filtrado no presentó coloración alguna. El EE se guardó en refrigeración hasta realizar las pruebas de bioactividad.

OBTENCIÓN DEL ANTAGONISTA Y LOS PATÓGENOS.

Las cepas del antagonista y de los patógenos se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Fitopatología de la UCLA; provenientes de una parcela sembrada con ajo en Carache, estado Trujillo (*T. harzianum* y *S. cepivorum*) y de Acarigua, estado Portuguesa (*S. rolfsii*). La identificación de la especie de *Trichoderma* se realizó a través de la clave de Bisset (1991). Los hongos se mantuvieron en platos Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y se utilizaron para instalar los ensayos, a las dos semanas de desarrollo de sus estructuras vegetativas y reproductivas.

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS DE ORÉGANO SILVESTRES (*Lippia origanoides* H.B.K) Y NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss).

La determinación de los MS presentes en los EE de las plantas utilizadas en esta investigación se realizó según la metodología recomendada por Marcano y

Hasegawa (2002) y Vásquez *et al.* (2008). Las saponinas, glicósidos de compuestos esferoidales y triterpenoidales, se evidenciaron por la formación de una espuma persistente por más de 20 min al mezclar y agitar con agua en una proporción 1:1.

Los alcaloides, flavonoides, fenoles y antraquinonas se determinaron por cromatografía de capa fina, con cromatofolios de sílica/gel MERK^R a los cuales se dispensaron 20µl del EE a 7 mm de la base y una cámara para cromatografía con una fase móvil específica para cada grupo de MS. En el caso de los alcaloides se utilizó n-butanol+ácido acético+agua (9:2:1); para los flavonoides, una mezcla de benceno+ácido acético+agua (12:7:2); para los fenoles, ácido acético+agua (9:1) y para las antraquinonas sólo ácido acético. En el primer y segundo caso, el revelado de la cromatografía se hizo con una lámpara fluorescente de (UV). Los fenoles y las antraquinonas se detectaron al rociar el cromatofolio con cloruro férrico al 1% (coloración parda oscura) e hidróxido de amonio (coloración roja), respectivamente.

DETERMINACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD ENTRE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS(EE) Y *Trichoderma harzianum*.

Con el fin de evaluar la compatibilidad entre los EE de orégano silvestre y neem, con el aislado de *T. harzianum* se realizó la siembra del antagonista sobre medio de cultivo PDA, homogeneizado con los EE a las concentraciones de 2,25% p/v para neem y 0,37% y 0,75% p/v para el orégano, agregados una vez que el medio alcanzó unos 37 °C. Para la mezcla de ambos extractos se utilizó la de neem con orégano al 0,75% p/v. Se estableció un testigo que consistió en hacer crecer al hongo en medio PDA sin los EE. Se consideró la compatibilidad a través del inicio de formación tanto del micelio como de las esporas, independientemente del retraso en el tiempo. Las evaluaciones culminaron una vez que el testigo llenó completamente el plato Petri.

Con la ayuda de un sacabocado se cortaron discos de aproximadamente 5 mm de diámetro del cultivo del antagonista en PDA y se sembraron de manera individual en los platos Petri con PDA+EE. A fin de evitar la contaminación externa, el procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar. El ensayo constó de seis repeticiones para cada tratamiento establecido.

VARIABLES EVALUADAS.

Se evaluó el crecimiento micelial (CM) en centímetros (cm) y los días que tardó *T. harzianum* en formar el micelio y las esporas, comparando con el testigo (*Trichoderma* en PDA, sin EE). Las mediciones se hicieron cada 48h durante 15 días, sin embargo, se realizaron observaciones por un mes para detectar cambios en el comportamiento del antagonista.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL Y FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Sclerotium rolfsii* Y *Sclerotium cepivorum*.

Para evaluar la influencia de los EE de orégano silvestre y neem solos o combinados entre ellos sobre el crecimiento micelial y formación de esclerocios de *S. rolfsii* y *S. cepivorum* se midió el crecimiento de estos patógenos sobre el medio PDA homogenizado con cada EE, a las concentraciones antes mencionadas. Las mediciones se realizaron cada 48h durante 15 días, sin embargo, también se realizaron observaciones durante un mes. Los resultados se compararon con aislamientos de *S. rolfsii* y *S. cepivorum*, sembrados en medio PDA sin extractos, los cuales actuaron como testigos.

Para ambas especies de *Sclerotium* se utilizó la misma metodología, pero fue necesario ubicarlos a diferentes temperaturas, con el fin de darle las condiciones que estas especies requieren para promover su desarrollo micelial. El ensayo con *S. rolfsii* se estableció a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ (temperatura del Laboratorio de Fitopatología) y *S. cepivorum* a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

VARIABLES EVALUADAS.

Se evaluó el crecimiento micelial de los microorganismos, así como el tiempo de inicio en la formación de los esclerocios de los patógenos. El ensayo se realizó con seis repeticiones por tratamiento. Para ello, se colocó en el centro de cada plato Petri, un disco de agar con micelio y esclerocios de cada patógeno. El testigo consistió en sembrar cada uno de los patógenos en platos Petri con PDA, sin EE.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y *Trichoderma* sp. SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL Y FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Sclerotium rolfsii* Y *Sclerotium cepivorum*.

Para evaluar la influencia de los EE y el aislado de *T. harzianum* sobre el crecimiento micelial y formación de esclerocios de *S. rolfsii* y *S. cepivorum*, se midió el crecimiento de estos patógenos confrontados con el antagonista, sobre el medio PDA homogenizado con cada EE a las concentraciones antes mencionadas. Las mediciones se realizaron cada 48h durante 15 días, con observaciones durante 1 mes.

Los resultados se compararon con aislamientos de *S. rolfsii* y *S. cepivorum* confrontados con *Trichoderma*, sembrados en medio PDA sin extractos, los cuales actuaron como testigos. Para ambas especies de *Sclerotium* se utilizó la

misma metodología en cuanto a la temperatura requerida, mencionada anteriormente.

VARIABLES EVALUADAS

Se evaluó el crecimiento micelial de los microorganismos, así como el número de días para la formación de esclerocios de los patógenos y las esporas del antagonista, así como también, cualitativamente la formación del halo de inhibición o interacción entre las colonias; se realizaron observaciones al microscopio óptico del micelio en el punto de unión, con el fin de establecer el tipo de interacción antagonista-patógeno presente.

Para observar la interacción antagonista-patógeno, se tomó un corte fino de micelio en el punto de la interacción a las 78h después de sembrados ambos hongos, con la ayuda de un bisturí desinfectado con alcohol (96%); el mismo, se colocó en un porta-objeto flameándolo para permitir la expansión del agar y disminuir su grosor. Posteriormente se agregaron 2 gotas de lactofenol-azul de algodón, colocando un cubre-objeto. Este último se fijó con esmalte para uñas transparente, efectuándose las observaciones en el microscopio óptico con aumento de 40X.

DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los ensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento, estos últimos estuvieron conformados por las colonias de los hongos sembrados en cultivo dual (las colonias del patógeno y el biocontrolador en un mismo plato Petri en medio PDA, con o sin EE). Se realizó análisis de varianza para cada experimento, una vez cumplido los supuestos de normalidad. En aquellos casos donde hubo diferencias significativas entre tratamientos, fue necesario hacer la prueba de comparación de medias; para ello se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0,01$). Todos los análisis se obtuvieron a través del Programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) [SAS, 1995].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS DE ORÉGANO SILVESTRE (*LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K) Y NEEM (*AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS).

En los extractos etanólicos de ambas plantas se detectaron alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, aceites esenciales, faltando los flavonoides en el de neem. Las diferencias observadas con respecto a los grupos de MS obtenidos por Castillo *et al.* (2005) quienes no consiguieron flavonoides en EE de orégano silvestre y con Bolívar *et al.* (2009) los cuales no detectaron antraquinonas, se

podrían explicar por el hecho de que la presencia de estos compuestos está influenciada por las condiciones edafoclimáticas a las que están sometidas las plantas, al momento de la colecta (Leland *et al.*, 2006).

DETERMINACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD ENTRE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS (EE) Y *Trichoderma harzianum*.

El análisis de varianza reveló diferencias altamente significativas ($P \leq 0,01$) entre los tratamientos. *T. harzianum* fue compatible con los EE aplicados, excepto con la concentración de orégano al 0,75% (OR0,75) donde no hubo crecimiento micelial (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de los extractos etanólicos de orégano (*Lippia origanoides*) y neem (*Azadirachta indica*), en comparación con un testigo, en el crecimiento micelial *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. (Tukey $P \leq 0,01$).

| Tratamientos | CM (cm) ^{1,2} |
|--------------------------|------------------------|
| Papa dextrosa agar (PDA) | 9,0 a |
| Orégano 0,37% (OR0,37) | 9,0 a |
| Neem 2,25% (NE2,25) | 8,9 a |
| Neem+Orégano (NEOR) | 5,3 b |
| Orégano 0,75% (OR0,75) | 0,0 c |

¹ Letras iguales significan comportamientos similares estadísticamente. ² Los valores de crecimiento micelial son promedios de 6 repeticiones, excepto el testigo (5 repeticiones).

De los tratamientos con los EE, el de orégano al 0,37% (OR0,37) resultó ser el más compatible con *T. harzianum* ya que sobre el medio de cultivo, el antagonista manifestó mayor crecimiento micelial, siendo similar estadísticamente al testigo (PDA) [Tabla 1]. No obstante, se observaron modificaciones morfológicas de la colonia del hongo, evidenciándose un crecimiento aéreo con apariencia algodonosa.

En cuanto al tiempo de formación de micelio, *T. harzianum* inició el crecimiento en los tratamientos con los EE, 2 días después con respecto al testigo, excepto en OR0,75, en el cual no se evidenció crecimiento; no obstante, en OR0,37, las características morfológicas en cuanto a densidad del micelio, cambiaron entre el tercer y cuarto día, al observarse micelio mas ralo y transparente.

La formación de esporas de *T. harzianum* se retrasó de 4 a 9 días con respecto al testigo (que los formó a los 2 días de desarrollo del micelio). OR0,37 fue el tratamiento que duró mayor tiempo en formarlas (11 días) siendo escasas con respecto al testigo y a los tratamientos NE2,25 y NEOR, en los cuales, a pesar de la limitación en el crecimiento micelial de *T. harzianum* y el retraso en el inicio de la formación tanto del micelio (3 días) como las esporas (6 y 10 días, respectivamente), presentaron mejores condiciones para el antagonista. Esto se deduce debido a que, en estos dos últimos tratamientos hubo formación abundante de esporas, similar al testigo, cubriendo el plato de Petri de manera homogénea.

Los resultados de esta investigación con respecto a la formación de micelio y esporas de *T. harzianum*, demostraron la alta capacidad saprofitica competitiva de este hongo antagonista para crecer en diferentes sustratos, tal como lo afirmaron Chet e Imbar (1994). Sin embargo, la mayor concentración de MS en el orégano al 0,75%, ejerció un efecto fungicida en el hongo, mientras que a 0,37%, ejerció un efecto fungistático, al limitar la formación de las esporas. Esta situación hace pensar que el extracto de orégano afectó el potencial de inóculo de *Trichoderma* al producir un micelio, que aunque al inicio fue estimulado para crecer en forma algodonosa, posteriormente se debilitó al punto de observarse casi transparente en el medio de cultivo.

De acuerdo a Albornoz (1980) y Marcano y Hasegawa (2002) los efectos fungistáticos y fungicidas están relacionados con los diferentes MS presentes en las plantas, en mayor o menor grado. En este sentido, Azcón-Bieto *et al.* (1993) señalaron que flavonoides, polifenoles y taninos presentes en la planta de orégano silvestre, tienen un efecto antagónico sobre el crecimiento de microorganismos; por otra parte, Pernía *et al.* (2001) le atribuyen a los compuestos fenólicos, la inhibición en el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos cultivados en condiciones *in vitro*. De esta manera, estos pudieran ser los posibles responsables del efecto inhibitorio observado para *Trichoderma*, en este ensayo.

El extracto de neem, aunque también retrasó el crecimiento micelial y la formación de esporas, con respecto al testigo, cualitativamente, ejerció un efecto estimulante en las características del micelio, amortiguando al extracto de orégano, cuando ambos se combinaron. Estos resultados coinciden parcialmente con los de Depieri *et al.* (2005) los cuales evaluaron en condiciones *in vitro* la compatibilidad de extractos de las hojas de neem con el hongo *Beauveria bassiana*, en cuanto a su crecimiento micelial, producción y viabilidad de los conidios, bajo concentraciones de 0,5; 1 y 1,5%. Los resultados indicaron que los

extractos de las hojas fueron compatibles con el entomopatógeno en todas las concentraciones probadas.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL Y FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Sclerotium rolfsii*.

El análisis de varianza del crecimiento micelial de *S. rolfsii* sometido a los diferentes tratamientos para el crecimiento micelial de *S. rolfsii* sobre los diferentes tratamientos mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0,01$). El extracto de orégano en ambas concentraciones, ejerció un efecto fungicida sobre *S. rolfsii*, al inhibir en 100% el crecimiento del micelio (3). Al final de las evaluaciones (15 días), el mayor crecimiento micelial del patógeno se obtuvo en los medios donde se involucró el neem (NE2,25 y NEOR) igualando al testigo (Tabla 2).

En el extracto de neem al 2,25% (NE2,25) *S. rolfsii* produjo un micelio aéreo abundante, blanco, de apariencia algodonosa, de rápido crecimiento y colonización. Los resultados con este patógeno coinciden en parte con los encontrados por Carneiro *et al.* (1998) quienes al evaluar el efecto del extracto de la hoja de neem en el moho polvoriento de la planta de haba (*Erysiphe polygoni*) encontraron que el mismo no fue eficiente para su control.

Por otra parte, los resultados del presente ensayo en cuanto al crecimiento micelial de *S. rolfsii* en el extracto de neem, afianzan la idea de que esta planta pudiera poseer uno o más MS que estimulan el desarrollo de algunos hongos, ya que el efecto fue similar a lo observado con *T. harzianum*.

La formación de esclerocios en aquellos tratamientos donde creció micelio de *S. rolfsii*, se retrasó entre 2 a 5 días, con respecto al testigo. El mayor retraso se observó cuando se combinaron los EE, lo que evidenció la regulación ejercida por los componentes de la planta de orégano. En este sentido, Díaz *et al.* (2002) al cuantificar y caracterizar el aceite esencial del orégano mexicano (*L. graveolens*) encontraron que dentro de los metabolitos que conforman este aceite, la fracción fenólica fue el componente principal, al cual le atribuyeron la capacidad antimicrobiana sobre microorganismos fitopatógenos. Estos resultados podrían fundamentar los encontrados en esta investigación, para *S. rolfsii*.

Por otra parte, la efectividad del EE de orégano silvestre en la reducción y control del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos, ha sido señalada por Briceño *et al.* (1997), Mota *et al.* (2002) y Henriques (2006) en *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. Este último autor, al igual que Dubey y Kishore (1987) resaltaron la bioactividad de las especies pertenecientes a la familia Verbenacea, a la cual pertenece *L. origanoides*, mostrando el potencial de

esta planta para controlar enfermedades como el mal de panamá y la antracnosis en frutales.

Tabla 2. Efecto de los extractos de orégano (*Lippia origanoides*) y Neem (*Azadirachta indica*), en comparación con un testigo, en el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* (Tukey $P \leq 0,01$)

| Tratamientos | CM (cm) ^{1,2} |
|--------------------------|------------------------|
| Neem 2,25% (NE2,25) | 9,0 a |
| Neem+Orégano (NEOR) | 9,0 a |
| Papa Dextrosa Agar (PDA) | 8,8 b |
| Orégano 0,37% (ORE0,37) | 0,0 c |
| Orégano 0,75% (ORE0,75) | 0,0 c |

¹ Letras iguales significan comportamientos similares estadísticamente. ² Los valores de crecimiento micelial son promedios de 6 repeticiones.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y TRICHODERMA HARZIANUM EN EL CRECIMIENTO MICELIAL Y FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Sclerotium rolfsii*.

Como resultado de las pruebas de confrontación entre *S. rolfsii* y *T. harzianum* sobre los diferentes tratamientos, el análisis de varianza para el crecimiento micelial de *S. rolfsii* fue altamente significativo ($P \leq 0,01$). A diferencia de lo observado con orégano (OR0,37 y OR0,75) en el ensayo anterior, donde el patógeno creciendo solo se inhibió en 100% (Tabla 2) en éste, la presencia de *Trichoderma* estimuló el crecimiento de *S. rolfsii*, (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de los extractos de orégano (*Lippia origanoides*) y neem (*Azadirachta indica*) y *Trichoderma* sp., en comparación con un testigo en el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* (Tukey $P \leq 0,01$).

| Tratamientos | CM (cm) ^{1,2} |
|--------------------------|------------------------|
| Neem 2,25% (NE2,25) | 8,18 a |
| Neem+Orégano (NEOR) | 7,56 a |
| Papa Dextrosa Agar (PDA) | 6,85 a |
| Orégano 0,37% (OR0,37) | 1,76 b |
| Orégano 0,75% (OR0,75) | 1,28 b |

¹ Letras iguales significan comportamientos similares estadísticamente. ² Los valores de crecimiento micelial son promedios de 6 repeticiones.

Con respecto al inicio en la formación de esclerocios de *S. rolfsii*, los tratamientos donde se involucró el neem (NE2,25 y NEOR) duplicaron el

número de días, en comparación con el testigo que inició la formación de los esclerocios a los 10 días de inoculado en el medio, observándose un retraso mayor (25 días) y menor cantidad de esclerocios en OR0,37 y OR0,75.

El tiempo de formación tanto del micelio como las esporas de *Trichoderma* en presencia del patógeno sobre el medio con los extractos vegetales (EV), también fue diferente a lo observado en el ensayo donde solo estuvo presente el antagonista. En NE2,25 y NEOR, el tiempo de inicio en la formación de micelio y esporas fue igual al testigo (menos de 24 h para el micelio y 2 días para las esporas) mientras que en ORE0,37 y ORE0,75, se retrasaron 5 y 12 días, respectivamente. Llamó la atención que en ORE0,75, *T. harzianum* logró formar tanto micelio como esporas, situación que no se observó cuando el antagonista creció solo sobre este extracto, a esta concentración.

Los resultados en los tratamientos con orégano, pueden deberse a que el patógeno al encontrarse doblemente amenazado, utilizó su máxima energía (potencial de inóculo) y su habilidad saprofítica competitiva para producir micelio y estructuras de resistencia garantizando así, su sobrevivencia. Sin embargo, la formación de micelio para ambos (antagonista-patógeno) fue poca y no hubo contacto entre ellos. El comportamiento observado tanto en el patógeno como en el antagonista cuando estuvieron confrontados, principalmente en ORE0,75 evidenció, que ambos microorganismos activaron estímulos de percepción y emitieron señales de alerta para poner en práctica mecanismos que les permitieran sobrevivir en un medio que a ambos les resultaba adverso.

Esta respuesta pudiera ser explicada con lo señalado por Baker (1987) en cuanto a que, en las relaciones de confrontación entre hongos hay un estímulo direccional del antagonista hacia el hospedero antes del contacto, mediante sustancias difusibles llamadas lectinas, las cuales se ha comprobado que participan en el reconocimiento y que según Neethling y Nevalainen (1996) están presentes en especies de *Trichoderma*. Este estímulo y posterior reconocimiento, fue señalado por Barak *et al.* (1985) e Imbar y Chet (1997) en una investigación entre *Trichoderma* spp y *S. rolfssii*, lo que pudiera estar relacionado con los resultados del presente estudio, debido a que esta estimulación, activación y posterior expresión de señales, no pudieron realizarla los patógenos cuando crecieron individualmente.

El mayor crecimiento micelial para *S. rolfssii* y *T. harzianum* al estar confrontados en los diferentes medios, se obtuvo en NE2,25 y NEOR, donde se comprobó el efecto estimulante del extracto de neem para el crecimiento de ambos microorganismos, al compararlo con el crecimiento observado en PDA. Se pudo detectar además, la alta capacidad saprofítica competitiva de *S. rolfssii*,

cuya cepa se manifestó más agresiva y con mayor velocidad de crecimiento y colonización, con respecto al antagonista; tanto en PDA como en NE2,25.

Después de 20 días de confrontación, se observó un cambio en el micelio de *S. rolfsii* en todos los tratamientos, incluyendo al testigo; evidenciándose una destrucción paulatina del micelio que había crecido de manera abundante, tornándose transparente. Posiblemente esto se debió a una predación ejercida por parte de *Trichoderma*, uno de los mecanismos de acción señalado por Baker y Griffin (1995) y Benítez *et al.* (2004). No obstante, *S. rolfsii* logró formar un pequeño número de esclerocios, al compararlo con el testigo.

En la confrontación *S. rolfsii*-*Trichoderma* en PDA (testigo) se observó una vez más, la característica agresiva del patógeno. El crecimiento micelial también fue rápido y con mayor capacidad de colonización que el antagonista. En el punto de confrontación se detectó una banda color crema donde *S. rolfsii* extendió sus hifas por encima de *Trichoderma*; No obstante, en el transcurso de varios días se observó el mismo proceso degenerativo del micelio de *S. rolfsii*, descrito anteriormente.

En las observaciones microscópicas realizadas en el punto de interacción entre el antagonista y el patógeno sobre PDA, se observó micelio de *T. harzianum* enrollando las hifas del patógeno, comprobándose el micoparasitismo señalado por Bruce *et al.* (1995); Ulacio *et al.* (2002) y Benítez *et al.* (2004).

DETERMINACIÓN DEL EFECTO IN VITRO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES EN EL CRECIMIENTO MICELIAL Y FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *Sclerotium cepivorum*.

El resultado del análisis de varianza para el crecimiento micelial de *S. cepivorum* fue altamente significativo ($P \leq 0,01$) para los tratamientos. La Tabla 4, muestra el comportamiento del crecimiento micelial de este hongo patógeno de las especies de Alliaceae. En general se observó que todos los EE afectaron en mayor proporción a *S. cepivorum*, al compararlo con los resultados obtenidos con *S. rolfsii* (Tabla 2). Una completa inhibición se obtuvo en todos aquellos tratamientos donde se involucró el orégano silvestre, en los cuales la formación de micelio se suprimió en un 100%, en comparación con el testigo (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de los extractos etanólicos de orégano (*Lippia organoides*) y neem (*Azadirachta indica*) solos o combinados en comparación con un testigo en el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium cepivorum* (Tukey $P \leq 0,01$) a 15 días después de inoculado el patógeno.

| Tratamientos | CM (cm) ^{1,2} |
|-------------------------|------------------------|
| Papa Dextrosa Agar(PDA) | 8,92 a |
| Neem 2,25% (NE2,25) | 2,55 b |
| Neem+Orégano (NEOR) | 0,00 c |
| Orégano 0,37% (OR0,37) | 0,00 c |
| Orégano 0,75% (OR0,75) | 0,00 c |

¹ Letras iguales significan comportamientos similares estadísticamente. ² Los valores de crecimiento micelial son promedios de 6 repeticiones.

A pesar de que *S. rolfsii* y *S. cepivorum* pertenecen al mismo género de hongos, es evidente que sus características fisiológicas, culturales y ecológicas difieren. En el segundo caso, el crecimiento de éste patógeno es muy lento, es probable que una menor concentración de orégano y de otros extractos vegetales con acción fungicida, pudieran mantener la inhibición total en el crecimiento de su micelio, tal como lo señalaron Ramírez *et al.* (2000) al estudiar la actividad fungicida de la afinina purificada de *Heliopsis longipes* y del extracto crudo de la raíz de la misma planta sobre *S. rolfsii* y *S. cepivorum*, encontraron que la estimación de la dosis letal media para la afinina purificada y el extracto crudo fue menor para *S. cepivorum* (entre 5 y 10 µg/mL) y mayor para *S. rolfsii* (entre 15 y 20 µg/mL).

Así mismo, el crecimiento micelial de *S. cepivorum* observado en el tratamiento con neem (NE2,25) se inhibió en un 72% (2,55 cm), al compararlo también con el testigo (8,92 cm) (Tabla 4). En el caso del neem, al parecer, los compuestos que resultaron estimulantes para el crecimiento de *S. rolfsii*, fueron inhibitorios para *S. cepivorum*; no obstante, es posible que la temperatura a 10 °C (favorable al crecimiento de *S. cepivorum*), pudiera haber tenido algún efecto que impidió la liberación de sustancias volátiles del extracto en el medio de cultivo. Otra posibilidad es que este hongo carezca de algún componente que no le permitió metabolizar los compuestos que posee el neem, como sí ocurrió con *S. rolfsii*.

La formación de esclerocios de *S. cepivorum* solo se produjo en el testigo y el tratamiento con neem, siendo escasos en este último, retardándose en 10 días, con respecto al testigo, a diferencia de lo que ocurrió con la formación de esclerocios de *S. rolfsii*, cuya formación se dio en menor tiempo. Este resultado

evidenció la baja capacidad saprofítica competitiva de *S. cepivorum* señalada por Schwartz y Mohan (1995).

DETERMINACIÓN DEL EFECTO *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS VEGETALES Y TRICHODERMA HARZIANUM EN EL CRECIMIENTO MICELIAL Y FORMACIÓN DE ESCLEROCIOS DE *S. cepivorum*.

Como resultado del ensayo de confrontación entre *T. harzianum* y *S. cepivorum*, el análisis de varianza resultó con diferencias altamente significativas ($P \leq 0,01$) entre los tratamientos. En la Tabla 5 se puede observar que hubo crecimiento micelial del patógeno en todos los tratamientos, a diferencia de lo que ocurrió cuando éste creció individualmente (Tabla 4), repitiéndose lo observado con *S. rolfsii*, cuando se confrontó con el antagonista (Tabla 3).

No obstante, el crecimiento de *S. cepivorum* fue muy bajo, aún en el testigo, en el cual la acción antagonista de *Trichoderma* resultó muy efectiva, a diferencia de lo observado con *S. rolfsii*. Al respecto, Lorito *et al.* (1994) señalaron que *T. harzianum*, produce enzimas líticas y quitinolíticas que inhiben el crecimiento de las hifas de muchos fitopatógenos.

El resultado en el testigo (PDA) entre *S. cepivorum* y *Trichoderma*, demostró la alta eficiencia en el control de este patógeno por parte del antagonista, debido a la habilidad de sus propágulos para reducir el crecimiento micelial y parasitar e inhibir la germinación de esclerocios (Cook y Baker, 1983), por su rápido crecimiento y colonización (Rahe y Utkhede, 1985), su alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperatura (Schwartz y Mohan, 1995) y la multiplicidad de mecanismos para desplazar a los hongos fitopatogenos (Yedidia *et al.* 1999; Ahmed *et al.* 2003 y Ezziyyani *et al.* 2004).

El micelio de *S. cepivorum* fue significativamente menor en OR0, 37 y OR0, 75, al compararlo con el testigo, quien se comportó de manera similar a NEOR (Tabla 5). El mayor crecimiento micelial en presencia de *Trichoderma* correspondió al tratamiento NE2, 25. Estos resultados coincidieron con los señalados para *S. rolfsii* en el presente ensayo en cuanto a que, los microorganismos en situación de peligro liberan y perciben estímulos bioquímicos expresados como señales de reconocimiento de acuerdo a lo investigado por Baker (1987).

A diferencia de *S. rolfsii* (Tabla 3), se pudo comprobar la vulnerabilidad del micelio de *S. cepivorum* en el extracto de orégano (en ambas concentraciones) al no permitir la formación de esclerocios que sí se observó a los 15 días para NE2, 25 y a los 18 días para NEOR, retrasándose entre 6 y 9 días, en comparación con el testigo. De esta forma, dado que los esclerocios son estructuras de resistencia

que le permiten a los hongos sobrevivir y reproducirse, desde el punto de vista epidemiológico, con la aplicación del extracto de orégano, se pudiera romper el ciclo biológico de *S. cepivorum* en el campo.

Tabla 5. Efecto de los extractos etanoicos de orégano (*Lippia origanoides*) y neem (*Azadirachta indica*) solos y combinados y *Trichoderma* sp. en comparación con un testigo en el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium cepivorum* (Tukey $P \leq 0,01$)

| Tratamientos | CM (cm) |
|--------------------------|---------|
| Neem 2,25% (NE2,25) | 5,88 a |
| Neem+Orégano (NEOR) | 4,67 ab |
| Papa Dextrosa Agar (PDA) | 3,68 b |
| Orégano 0,37% (OR0,37) | 1,08 c |
| Orégano 0,75% (OR0,75) | 0,75 c |

¹ Letras iguales significan comportamientos similares estadísticamente. ² Los valores de crecimiento micelial son promedios de 6 repeticiones.

El comportamiento de *Trichoderma* confrontado con *S. cepivorum* fue diferente tanto a lo observado creciendo solo en los EE, como confrontado con *S. rolfsii*. Mientras que, con este último logró formar tanto micelio como esporas en ambas concentraciones del orégano; con *S. cepivorum*, no pudo formar las esporas y en NEOR lo hizo 14 y 15 días después con respecto a NE2, 25 y PDA, respectivamente.

Tomando en cuenta lo anterior, pareciera que *S. rolfsii* resultó ser un aliado para la sobrevivencia de *Trichoderma*, bajo condiciones fuertes de estrés. Es posible que dado el carácter agresivo mostrado por este fitopatógeno en presencia del antagonista (característica que no se observó con *S. cepivorum*), el mismo envió las señales de reconocimiento con mayor rapidez, permitiendo al antagonista maximizar su potencial de inóculo ante los componentes tóxicos o volátiles del extracto de orégano.

El mayor crecimiento micelial para *S. cepivorum* y *Trichoderma* sp. En los diferentes medios, se obtuvo en NE2,25 y NEOR, similar a lo observado en la confrontación con *S. rolfsii*. No obstante, el efecto antagonista de *Trichoderma* fue más evidente con *S. cepivorum*.

Los resultados obtenidos *in vitro* al estudiar el efecto de los EE de *L. origanoides*, *A. indica* y *T. harzianum*, en la inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii* y *S. cepivorum* confirmaron que ambas estrategias presentan compatibilidad con potencial para ser incluidas en un plan de manejo integrado contra ambos patógenos. No obstante, se debe tener presente tanto la concentración del extracto vegetal, como el momento de aplicación, a fin de garantizar la sobrevivencia del antagonista.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA) por el financiamiento de los Proyectos 009-AG-2005 y 010-AG-2005 y a Ana Gómez, asistente del Laboratorio de Fitopatología, por su apoyo para cumplir con los objetivos de este trabajo de investigación.

LITERATURA CITADA

- AHMED, S., M. EZZIYANI, C. PEREZ AND M. CANDELA. 2003. Effect of Chitin on biological control activity of *Bacillus* sp and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant pathology 109: 418-426.
- ALBORNOZ, A. 1980. Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de plantas. UCV. Caracas, publicaciones. 592 p.
- ARAUJO, D. D. RODRÍGUEZ Y M. E. SANABRIA. 2007. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense*. Causante del Mal de Panamá, algunos extractos vegetales y fungicidas. Fitopatología Venezolana. 21(1):2-8.
- AZCON-BIETO, J. Y B. TALOM. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. 1^{era} edición internacional. McGraw-Hill de España. Health Care Group. Madrid. 283p.
- BAKER, R. 1987. Mycoparasitism: Ecology and physiology. Canadian Journal of Plant Pathology 9: 370-379.
- BAKER, R. AND G. GRIFFIN. 1995. Novel approaches to integrated pest management. In: R. Reuveni (ed.). Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. Boca Raton. Florida. CRC Press. pp 153-182.
- BITTARA, F.; D. RODRIGUEZ; M.E. SANABRIA; J. MONROY Y J. L. RODRIGUEZ. 2009. Evaluación de fungicidas y productos vegetales en el combate de la sarna polvorienta de la papa. Interciencia. 34 (4):265-269.
- CASTILLO, J. M.E. SANABRIA; D. RODRÍGUEZ Y O. CRESCENTE. 2005. Metabolitos secundarios en plantas silvestres del Parque Nacional Terepaima, estado Lara. SABER. 17:280-282.
- BARAK, R.; Y. ELAD; D. MIRELMAN AND I. CHET. 1985. Lectins: A possible basis for specific recognitions in the interaction of *Trichoderma harzianum* and *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 75: 458-462.
- BELANGER, R.; N. DUFOR; J., CARON AND N. BENHAMOU. 1995. Cronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism biocontrol. Science Technology 5: 41-54.
- BENÍTEZ, T.: A. RINCÓN; M. LIMÓN AND A. CODÓN. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Internacional Microbiology 7: 249-260.
- BISSET, J. 1991. A revision of genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. Canadian Journal of Botanical 69: 2373-2417.

- BOLIVAR, K.; M. E. SANABRIA; D. RODRÍGUEZ; M. DE CAMACARO; D. ULACIO; L. J. CUMANA Y O. CRESCENTE. 2009. Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz)Penz & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango. Revista Científica UDO AGRICOLA. 9(1):175-181.
- BRICEÑO, M.; D. RUBIO; C. RODRÍGUEZ; C. DABOIN Y A. MEDINA. 1997. Efecto de compuestos vegetales sobre el crecimiento micelial, producción y germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum in vitro*. Fitopatología Venezolana.10:32-33.
- BRUCE, A.; U. SRINIVASAN; H. STAINES AND T. HIGHLEY. 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp and their role in biocontrol of wood decay fungi. International biodeterioration & biodegradation. pp 337-353.
- CAPATAZ, J.; F. OROZCO; R. VERGARA Y R. HOYOS.2007. Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Sp.odoptera frugiperda* J. E. Smith en condiciones de laboratorio. Rev.Fac.Nal.Agr. Medellín 60(1):3703-3715. Print version ISSN 0304-2847.
- CARNEIRO, S.; E. PIGNON AND M. VASCONCELLOS. 1998. Effectiveness of neem extracts in controlling the powdery mildew of bean plant. Summa phytopathol.33: 34-39.
- CHET, I. AND J. IMBAR. 1994. Biological of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology. 48:34-37.
- COOK, J. Y K. BAKER. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota.APS Press. 539 p.
- DEPIERI, R.; S. MARTINEZ AND A. MENEZES. 2005. Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Blas). Vuill (Deuteromycetes) with neem seed extract and leaves an the emulsive oil. Neotropical Entomology. 34: 601-606 pp.
- DÍAZ, R; F. BUSTILLOS Y J. IBAVE. 2002. Elucidación estructural de los componentes del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*), sus propiedades antimicrobianas y sus variaciones por condiciones abióticas. Memoria. XXIX. Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Monterrey. México. 120 p.
- DUBEY, N. AND N. KISHORE. 1987. Fungitoxicity of some higher plants and synergistic activity essential oils. Tropical Science 27:23-27.
- EZZIYYANI, M.; C. PEREZ; A. SID; M. REQUENA Y M. CANDELA. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimentón (*Capsicum annum* L.).Annales de Biología 26: 35-45.
- HENRIQUES, L. 2006. Efecto de los extractos etanolicos de *Lippia organoides* H.B.K, *Opuntia* sp y *croton rhamnifolius* sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. 25 p.
- HENRIQUEZ, L.; D. RODRÍGUEZ; M. E. SANABRIA Y O. CRESCENTE. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopercisi* con extractos de *Opuntia* sp.; *Lippia organoides* y *Corton rhamnifolius*. SABER. 17:133-134.
- IMBAR, J. AND I. CHET. 1997. Lectins and biocontrol. Critical Reviews in Biotechnology. 141 p.
- LELAND, J.; C. KIRAKOSYAN; P. KAUFMAM; S. WABER; J. DUKE Y H. BRIELMANN. 2006. Nature products from plant. Segunda edición. CRC Press Taylor & Francis Group. 551 pp.

- LORITO, M.; G. HARMAN; C. HAYES; R. BROADWAY; A. TRANSMO; S. WOO, AND A. DIPIETRO. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- MARCANO, D. Y M. HASEGAWA. 2002. Fitoquímica orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. 588 p.
- MOTA, J.; M. PESSOA; F. VIANA Y M. ANDRADE. 2002. Efeito de extractos e oleos essenciais de plantas medicinais no controle *in vitro* de *Lasiodiphodia theobromae*. *Fitopatologia Venezolana*. 15: 2-6
- NEETHLING, D. AND H. NEVALAINEN. 1996. Mycoparasitic species of *Trichoderma* produce lectins. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 141-146.
- PEREIRA, J., G. CHAVEZ, L. ZAMBOLIN, K. MATSUOKA, R. ACUNA AND F. DO VALE. 1996. Control of *Sclerotium cepivorum* by the use of vermicompost, solarization, *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*. *Summa-Phytopathologica* 22: 228-234.
- PERNÍA, E.; M. TOSTA; E. GARCIA, S. COMPAGNONE Y A. SUAREZ. 2001. Compuestos fenólicos como posibles responsables de mecanismos de resistencia de Musaceas a la sigatoka negra y amarilla (*Mycosp.haerella fijensi* y *M. munisiota*). V Congreso Venezolano de Química. Memorias. Facultad de Ciencias. Universidad del Zulia. pp. 196-197.
- RAHE, J. AND R. UTKHEDE. 1985. Integrated biological and chemical control of Sclerotial pathogens. pp. 124-126. In: Ecology and Management of Soliborne Plant Pathogens. C.A. Parker, A:D Rovira, K:J: Moore, P:T: W. Wog and J:F: Kollomorgen (eds.). American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- RAMÍREZ, E.; L. LUCAS; G. VIRGEN Y J. TORRES. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*. 34: 207-215.
- RODRÍGUEZ, D. Y M. SANABRIA. 2005. Efecto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que la causan. *Interciencia*. 30: 739-744.
- SCHWARTZ, H. AND S. MOHAN. 1995. Compendium of onion and garlic disease. American Phytopathological Society (APS). St. Paul Minnesota. USA. 54 p.
- SCHMUTTERRER, H. 1995. The neem tree *Azadirachta indica* A. juss and other Meliaceae plants. VCH, Weinheim. 696 p.
- SAS INSTITUTE INC. 1995. SAS user's guide: Statistics, version 6. 4th edition. Cary, North Carolina, USA. 956 p.
- TORRADO, A. 1992. Residuos de plaguicidas en hortalizas. Conferencias. I Curso nacional de hortalizas de clima frío. Tibaitata Mosquera. Colombia. pp. 187-192.
- ULACIO, D.; J. SALAS; P. QUERALES Y M. SANABRIA, 2002. Micobiota del suelo de zona productoras de papa del estado Mérida y su relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro* 14: 11-16.
- ULACIO, D.; E. ZAVALA; A. MARTÍNEZ Y A. PEDROZA. 2006. Strategies for Management of *Sclerotium cepivorum* Berk. in Garlic. *Journal of Plant Pathology* 88: 253-261.

- ULACIO, D.; E. ZAVALA; R. ESPINOSA; F. DELGADILLO; A. PEDROZA Y A. MARTÍNEZ. 2003. Materia orgánica y antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su impacto en el progreso de la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 21: 346-354.
- VÁSQUEZ, C.; O. APONTE; J. MORALES; M.E. SANABRIA Y G. GARCIA. 2008. Biological studies of *Oligonychus punicae* (ACARIU:Tetranychidae) on grapevine cultivars. Exp. Appl. Acarol. 45:59-69.
- YEDIDIA, I.; N. BENHAMOU AND I. CHET. 1999. Induction of defence responses in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* applied and environmental. Microbiology.65:1061-1070.
- ZAPATA, R.; M. SANABRIA Y D. RODRIGUEZ. 2003. Reduccion del desarrollo de hongos fitopatógenos con extractos de cardón lefaria (*Cereus deficiens* Otto & Diert). Interciencia.28:302-306.