



Instituto Politécnico Nacional

Centro Interdisciplinario de
Investigación para el Desarrollo
Integral Regional
Unidad Michoacán



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN
AGRÍCOLA SUSTENTABLE

EFECTO ANTAGONISTA DE *Trichoderma harzianum*
CONTRA *Sclerotium cepivorum* Y *Sclerotium rolfsii*
AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN
EN CEBOLLA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN:

CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
SUSTENTABLE

PRESENTA:
ELEAZAR ZÚÑIGA MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS FERNANDO CEJA TORRES

Jiquilpan, Michoacán

Diciembre 2013



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 12:00 horas del día 22 del mes de Noviembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

“Efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii* agentes causales de la pudrición en cebolla”.

| Zúñiga | Mendoza | Eleazar | | | | | | | |
|------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Apellido paterno | Apellido materno | Nombre | | | | | | | |
| | | Con registro: | | | | | | | |
| | | <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">B</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">8</td> <td style="padding: 2px 5px;">2</td> <td style="padding: 2px 5px;">5</td> </tr> </table> | B | 1 | 1 | 0 | 8 | 2 | 5 |
| B | 1 | 1 | 0 | 8 | 2 | 5 | | | |

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis



 Dr. Luis Fernando Ceja Torres



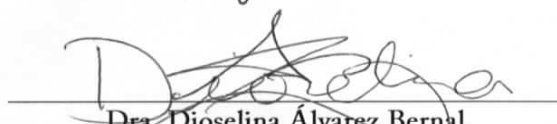
 M.C. Salvador Ochoa Estrada



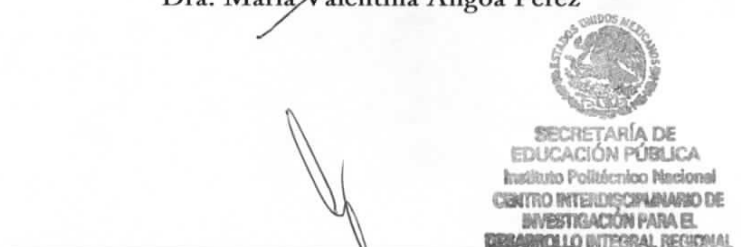
 Dr. José Venegas González



 Dra. María Valentina Angoa Pérez



 Dra. Dioselina Álvarez Bernal



 Dr. Guillermo Herrera Arreola.

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez Michoacán el día 5 del mes de diciembre del año 2013, el que suscribe Eleazar Zúñiga Mendoza alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B110825, adscrito a C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Luis Fernando Ceja Torres y cede los derechos del trabajo intitulado Efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfii* agentes causales de la pudrición en cebolla, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección zuniga_88@hotmail.com y lfceja@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ELEAZAR ZÚÑIGA MENDOZA

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por otorgarme una beca institucional indispensable para la realización de esta maestría y permitirme ser parte de tan distinguida institución.

Agradezco de forma especial al CIIDIR IPN Unidad Michoacán por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y brindarme todo su apoyo para culminar mis estudios de postgrado.

A la Secretaria de Investigación y Postgrado (SIP) por darme la oportunidad de participar en los proyectos y otorgarme una beca PIFI.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas del IPN (COFAA) por el apoyo económico brindado durante mis estudios.

De forma especial quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Luis Fernando Ceja Torres por permitirme trabajar en esta tesis y por la confianza que me brindó durante todo el trabajo. Por compartir sus conocimientos invaluable e instruirme en todo lo necesario para que este trabajo fuera posible. Su paciencia y perseverancia fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

El comité revisor de tesis es un eslabón fundamental en este trabajo y por eso quiero agradecer a quienes lo conforman. La Dra. Dioselina Álvarez Bernal, Dra. María Valentina Angoa Pérez, M.C. Salvador Ochoa Estrada y el Dr. José Venegas Gonzáles, sus contribuciones hicieron que este trabajo fuera más valioso. Agradezco el tiempo que dedicaron durante las revisiones a pesar de tener tantas actividades pendientes.

Agradezco también a las personas que en las aulas mostraron humildad al compartir sus conocimientos con sus alumnos, estos son los excelentes profesores del programa de maestría. A la Dra. Martha Velázquez Machuca, Dr. Francisco Covarrubias Villa, Dr. Rodrigo Moncayo Estrada, Dr. José Teodoro Silva García, Dr. Juan Manuel Catalán Romero, Dr. Sigifredo López Díaz y Luz Marcela Zacarías Núñez.

A la M.C. Miriam Arroyo Damián y el M.C. Carlos Escalera Gallardo quiero agradecerles de forma especial todo el apoyo, motivación, consejos y enseñanzas incesantes que me brindaron durante toda la maestría. Son excelentes personas y sé que siempre contaré con ustedes.

Quiero agradecer al personal de posgrado Beky, Lupita y Fabián, por su amabilidad y excelente desempeño laboral. Así como también a Jazmín, técnica del laboratorio de aguas por el apoyo y asesoría en la determinación de los análisis.

A Berenice Barocio por ayudarme durante el aislamiento e identificación de los hongos. A Lupita Oyoque por el apoyo brindado en el laboratorio.

También a Alejandra González Urías por lograr que cinco meses fueran suficientes para ser grandes amigos.

No podría faltar mi agradecimiento para todos mis compañeros de maestrías (Hugo, Facundo, Minerva, Guillermo, Consuelo, Ernesto, Vero, Ángel, Pepe, Ignacio) por hacer que mi estancia en el CIIDIR fuera la mejor.

A Susana Janet Santoyo Murguía, María Guadalupe Sámano Leyva y Carlos Alberto Godoy Ceja, a ustedes les debo los mejores momentos, las sonrisas en la maestría gracias a ustedes fueron incommensurables e inolvidables, los momentos difíciles fueron algo fácil de remediar cuando estaban presentes. A los tres ¡Gracias!

DEDICATORIA

A Dios

Quien siempre esta con migo y me ha dado la oportunidad de vivir y lograr una meta más en mi vida.

A Mis padres

Por seguir apoyándome incansablemente; en los momentos difíciles son ustedes mi fortaleza para salir adelante. Todo el esfuerzo y sacrificio puesto en este trabajo se los dedico porque sin ustedes nunca hubiese logrado esta meta. La mejor herencia que me pudieron haber dado fue brindarme una profesión y hacer de mí una persona de bien. Reconozco el gran esfuerzo que les ha costado darme una educación pero sé también que están muy orgullosos de lo que han logrado.

¡Los Quiero Muchísimo!

A todos mis hermanos

Ustedes han sido piezas fundamentales durante toda mi carrera, la confianza y apoyo que me han brindado siempre ha sido el ímpetu de mi éxito. Son mi fortaleza y los admiro con toda mi alma. Son un claro ejemplo a seguir por eso los quiero.

A mis sobrinos

Por ser las chispas que en momentos oscuros iluminan mi camino y son tantas que parece ser que siempre mi sendero es claro. Los quiero por ser parte de mi familia pero más aún por ocupar un lugar en mi vida.

Eleazar

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE CUADROS..... | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | V |
| RESUMEN..... | VI |
| ABSTRACT..... | VII |
| 1 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2 REVISION DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 Generalidades del cultivo de Cebolla..... | 3 |
| 2.1.1 Historia y Origen del Cultivo de Cebolla..... | 3 |
| 2.1.2 Descripción botánica..... | 3 |
| 2.2 Importancia económica del cultivo..... | 7 |
| 2.3 Principales productores de cebolla..... | 8 |
| 2.4 Producción nacional..... | 8 |
| 2.5 Enfermedades de la cebolla causadas por hongos..... | 10 |
| 2.6 Pudrición Blanca..... | 11 |
| 2.6.1 Distribución Geográfica..... | 11 |
| 2.6.2 Sintomatología..... | 11 |
| 2.6.3 <i>Sclerotium cepivorum</i> | 12 |
| 2.6.4 Ciclo biológico..... | 13 |
| 2.6.5 Rango de hospederos..... | 14 |
| 2.6.6 Diseminación de la enfermedad..... | 14 |
| 2.7 Tizón sureño..... | 14 |
| 2.7.1 Sintomatología..... | 15 |
| 2.7.2 <i>Sclerotium rolfsii</i> | 16 |
| 2.7.3 Ciclo biológico..... | 17 |
| 2.7.4 Rango de hospederos..... | 18 |
| 2.7.5 Diseminación de la enfermedad..... | 20 |
| 2.8 Combate de la pudrición causada por <i>S. cepivorum</i> y <i>S. rolfsii</i> | 20 |
| 2.8.1 Control cultural..... | 20 |
| 2.8.2 Control físico..... | 21 |
| 2.8.3 Variedades resistentes..... | 22 |
| 2.8.4 Control químico..... | 22 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.8.5 | Control biológico..... | 23 |
| 2.9 | El género <i>Trichoderma</i> dentro del control biológico..... | 24 |
| 2.10 | Taxonomía de <i>Trichoderma</i> | 26 |
| 2.11 | Morfología de <i>Trichoderma</i> | 27 |
| 2.12 | Fisiología de <i>Trichoderma</i> | 28 |
| 2.13 | Mecanismos de acción..... | 29 |
| 2.13.1 | Antibiosis..... | 29 |
| 2.13.2 | Competencia..... | 30 |
| 2.13.3 | Micoparasitismo..... | 30 |
| 2.14 | Control biológico de <i>S. cepivorum</i> con <i>Trichoderma</i> | 32 |
| 2.15 | Control biológico de <i>S. rolfsii</i> con <i>Trichoderma</i> | 33 |
| 3 | JUSTIFICACIÓN..... | 36 |
| 4 | HIPÓTESIS..... | 37 |
| 5 | OBJETIVOS..... | 37 |
| 5.1 | General..... | 37 |
| 5.2 | Específicos..... | 37 |
| 6 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 38 |
| 6.1 | Etapa <i>in vitro</i> | 38 |
| 6.2 | Material biológico..... | 38 |
| 6.2.1 | Aislamiento y producción de <i>Trichoderma harzianum</i> | 38 |
| 6.2.2 | Aislamiento y reproducción de patógenos..... | 39 |
| 6.2.3 | Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> ante <i>Sclerotium rolfsii</i> | 39 |
| 6.2.4 | Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> ante <i>Sclerotium cepivorum</i> | 40 |
| 6.2.5 | Clasificación antagónica de <i>T. harzianum</i> | 40 |
| 6.2.6 | Porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios..... | 40 |
| 6.2.7 | Parasitismo de <i>Trichoderma harzianum</i> en esclerocios de <i>S. cepivorum</i> y <i>S. rolfsii</i> | 40 |
| 6.3 | Etapa <i>in vivo</i> | 41 |
| 6.3.1 | Localización del sitio experimental..... | 41 |
| 6.3.2 | Colecta de muestras de suelo..... | 41 |
| 6.3.3 | Caracterización del suelo utilizado..... | 42 |
| 6.3.4 | Aislamiento de hongos en suelo infestado..... | 42 |
| 6.3.5 | Identificación molecular de la cepa nativa de <i>Trichoderma</i> sp. | 42 |

| | | |
|--------|---|----|
| 6.3.6 | Determinación de la densidad de inóculo en suelo infestado y viabilidad de los esclerocios de <i>S. cepivorum</i> y <i>S. rolfsii</i> . | 43 |
| 6.3.7 | Diseño experimental del ensayo <i>in vivo</i> . | 43 |
| 6.3.8 | Incidencia y severidad de la enfermedad. | 44 |
| 6.3.9 | Registro de temperaturas. | 44 |
| 6.3.10 | Riego y fertilización. | 44 |
| 6.3.11 | Análisis estadístico. | 44 |
| 7 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 46 |
| 7.1 | Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> ante <i>S. rolfsii</i> . | 46 |
| 7.2 | Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> ante <i>S. cepivorum</i> . | 49 |
| 7.3 | Clasificación antagónica de <i>Trichoderma harzianum</i> . | 51 |
| 7.4 | Porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios de <i>S. cepivorum</i> y <i>S. rolfsii</i> . | 54 |
| 7.5 | Parasitismo de <i>Trichoderma</i> en micelio y esclerocios de <i>S. cepivorum</i> y <i>S. rolfsii</i> . | 57 |
| 7.6 | Caracterización del suelo utilizado en el experimento. | 60 |
| 7.7 | Determinación de hongos en suelo infestado. | 60 |
| 7.8 | Identificación molecular de la cepa nativa de <i>Trichoderma</i> sp. | 61 |
| 7.9 | Determinación de la densidad de inóculo en suelo infestado y viabilidad de los esclerocios. | 61 |
| 7.10 | Incidencia de la enfermedad. | 62 |
| 8 | CONCLUSIONES | 66 |
| 9 | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 67 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Páginas |
|---------------|---|----------------|
| 1 | Caracterización físicoquímica del suelo utilizado..... | 60 |
| 2 | Secuencia depurada de <i>Trichoderma harzianum</i> | 61 |
| 3 | Incidencia final y grado de severidad causada por <i>S. cepivorum</i> y <i>S. rolfsii</i> | 62 |
| 4 | Registro de temperaturas..... | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Páginas |
|---------------|--|----------------|
| 1 | Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> frente a <i>S. rolfsii</i> | 47 |
| 2 | Esclerocios de <i>S. rolfsii</i> colonizados por <i>T. harzianum</i> a los 30 días de evaluación a 27 °C..... | 48 |
| 3 | Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> frente a <i>S. cepivorum</i> | 49-50 |
| 4 | <i>T. harzianum</i> colonizando la superficie de esclerocios de <i>S. cepivorum</i> a los 15 días de evaluación a 23 °C..... | 50 |
| 5 | Pruebas duales y controles de <i>T. harzianum</i> frente a <i>S. rolfsii</i> (Días de enfrentamiento: A=7, B=10 y C=30)..... | 53 |
| 6 | Producción de esclerocios de <i>S. cepivorum</i> en cultivo dual..... | 54 |
| 7 | Producción de esclerocios de <i>S. rolfsii</i> en cultivo dual..... | 55 |
| 8 | Enrollamiento de hifas de <i>T. harzianum</i> A) sobre hifas de <i>S. rolfsii</i> B). Visto al microscopio a 40X..... | 57 |
| 9 | Micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> sobre <i>S. rolfsii</i> . A) Lisis del micelio de <i>S. rolfsii</i> visto al microscopio a 100X. B) Conidios de <i>T. harzianum</i> sobre el micelio de <i>S. rolfsii</i> visto al microscopio a 40X..... | 58 |

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó tanto *in vitro* como *in vivo* la capacidad antagónica de una cepa de *Trichoderma* aislada de suelos de la región Ciénega de Chapala frente a *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii* patógenos causantes de pudrición en cebolla. Se colectaron muestras de suelo de parcelas productoras de cebolla de las cuales se logró aislar e identificar una cepa de *Trichoderma*. Los patógenos se obtuvieron a partir de esclerocios presentes en cebollas infectadas. Las pruebas *in vitro* se llevaron a cabo utilizando la técnica de cultivo dual, con ella se obtuvieron los porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) cada 24 hrs hasta el enfrentamiento antagonista-patógeno. También se obtuvo el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios así como el grado de antagonismo de *Trichoderma* y el parasitismo de los esclerocios. Para la prueba *in vivo* se estableció un experimento en macetas a campo abierto durante cuatro meses. Se trabajó con un diseño en bloques al azar con 10 tratamientos y cuatro repeticiones. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa aislada se identificó a nivel molecular como *Trichoderma harzianum* que logró un PICR ante *S. rolfsii* de 17.4% a las 48 hrs de enfrentamiento y ante *S. cepivorum* 22.2% a las 72 hrs. Respecto al porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios, los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) tanto para *S. rolfsii* como para *S. cepivorum* con respecto a los testigos. No obstante, en las pruebas contra *S. cepivorum* se logró un porcentaje de inhibición de esclerocios mayor al obtenido con *S. rolfsii* debido a que se obtuvieron porcentajes de 95.09% y 78.1% a los 15 y 30 días para cada patógeno respectivamente. En relación al parasitismo, *T. harzianum* presentó gran capacidad para parasitar esclerocios de ambos patógenos, sin embargo, destaca y en menor tiempo frente a *S. cepivorum* al obtener porcentajes mayores al 90%. La capacidad antagónica que presentó *T. harzianum* fue de 1 y 2 en la escala de Bell al enfrentarla frente a *S. cepivorum* y *S. rolfsii* respectivamente. Por otro lado, los resultados obtenidos en las pruebas *in vivo* respecto a la incidencia de la enfermedad causada por ambos patógenos y de acuerdo al análisis estadístico, muestra diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos, siendo la más alta la obtenida en el tratamiento 2 (*S. cepivorum*) la cual fue de 65.63%. Sin embargo, a pesar de haber obtenido menor incidencia *S. rolfsii*, el grado de severidad causado por este patógeno fue mayor.

ABSTRACT

In the present research was evaluated both *in vitro* and *in vivo* the antagonistic capacity of *Trichoderma* strain isolated from soil of the Cienega de Chapala region against *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium cepivorum* pathogens causing rot in onions. Soil samples onion producing plots were collected, which were able to isolate and identify a strain of *Trichoderma*. Pathogens were obtained from sclerotia present in infected onions. *In vitro* tests were conducted using a paired culture with it the percentage of inhibition of radial growth (PIRG) were obtained every 24 hrs until the antagonist -pathogen confrontation. Percent inhibition in sclerotia production and the degree of antagonism of *Trichoderma* and sclerotia parasitism was also obtained. To test *in vivo* was established an experiment in pots in the open field during four months. He worked with a randomized block design with 10 treatments and four replications. According to the results, the strain isolated was identified as *Trichoderma harzianum* molecular level which achieved PIRG to *S. rolfsii* 17.4% at 48 hrs of confrontation and to *S. cepivorum* 22.2% at 72 hrs. Regarding the percentage of inhibition in the production of sclerotia, statistical analysis showed significant differences ($P \leq 0.05$) for both *S. rolfsii* to *S. cepivorum* regarding witnesses. However, on testing against *S. cepivorum* a percentage inhibition of greater sclerotia was achieved to that obtained with *S. rolfsii* because percentages of 95.09% and 78.1% at 15 and 30 days respectively for each pathogen are obtained. In relation to parasitism, *T. harzianum* showed great ability to parasitize sclerotia of both pathogens, however, highlights and less time in front of *S. cepivorum* to get percentages greater than 90%. The antagonistic capacity provided *T. harzianum* was 1 and 2 on a scale of Bell to confront against *S. cepivorum* and *S. rolfsii* respectively. Furthermore, the results of *in vivo* tests in the incidence of disease caused by both pathogens and according to statistical analysis shows significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments, with the highest obtained in treatment 2 (*S. cepivorum*) which was 65.63%. However, despite lower incidence obtained of *S. rolfsii* the severity caused by this pathogen were higher.

1 INTRODUCCIÓN

China es el principal productor de cebolla a nivel mundial, en 2011 produjo 24,763,445 toneladas, ubicándose México en el décimo segundo lugar al producir en el mismo año 1,398,850 toneladas; sin embargo, en el continente americano ocupa el tercer lugar superado por Estados Unidos y Brasil (FAOSTAT, 2011). A nivel nacional, el estado de Michoacán ha ocupado los primeros lugares en producción; el cuarto lugar en 2010, el quinto en 2011 y el cuarto lugar en el año 2012 con 135,579.03, 141,032.71 y 155,108.47 toneladas respectivamente (SIAP, SAGARPA, 2013).

Las enfermedades del cultivo de la cebolla son consideradas un factor limitante para una buena producción en todos los países donde se cultiva esta hortaliza. Se considera que existen 50 enfermedades distintas que la afectan, de las cuales 30 de ellas son causadas por hongos, los cuales afectan tanto la raíz, el follaje y los bulbos en cualquier etapa de desarrollo del cultivo. En algunos casos los daños en los bulbos continúan incluso después de la cosecha en la etapa de almacenamiento (Mohan y Schwartz, 2000).

Entre las principales enfermedades del cultivo se encuentran la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*) y el tizón sureño (*Sclerotium rolfsii*). Los síntomas característicos de la primera, son amarillamiento progresivo desde las puntas hasta la base de las hojas más viejas, las cuales se marchitan y mueren (Valle, 1989; APS, 1995). En el caso del tizón sureño, consisten en un amarillamiento y marchitez de las hojas como resultado del daño causado en el cuello de la raíz (Aycock, 1966; Jenkins and Averre, 1986). Los patógenos que causan ambas enfermedades, producen esclerocios en la base de las plantas o sobre los bulbos y son la fuente principal de inóculo y de diseminación del hongo (Punja y Grogan, 1981; Crowe, 1995).

Entre las alternativas que se manejan para controlar y prevenir las pudriciones causadas por *S. cepivorum* y *S. rolfsii*, se encuentra el uso de productos químicos los cuales son ampliamente utilizados (Hagan y Olive, 1999; Delgadillo *et al.*, 2002). Sin embargo, debido principalmente a los altos costos de producción por la utilización de fungicidas (Coley-Smith, 1990) y la resistencia de los patógenos a estos (Rubio *et al.*, 2008), se

prueban otras alternativas para disminuir los daños, como es el caso del control biológico, mediante microorganismos antagonistas como *Trichoderma* sp., que ha demostrado ser efectivo para el control de plagas y enfermedades e incluso se ha comprobado que algunas especies, tienen la capacidad de estimular el crecimiento en algunas plantas (Stefanova *et al.*, 1999).

2 REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo de Cebolla

2.1.1 Historia y Origen del Cultivo de Cebolla

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una hortaliza que se conoce desde tiempos antiguos, puesto que cinco siglos antes de cristo, ya la consumían las personas dedicadas a construir las pirámides de Keops (Acosta *et al.*, 1993).

La cebolla y el ajo formaron parte de la dieta de los egipcios y Jones y Mann (1963) mencionan que “en Egipto hay dibujos de cebollas en las tumbas que datan de alrededor de 3200-2789 a.c.”. Del mismo modo en la Biblia se hace referencia de que en el tiempo del éxodo, los judíos la consumían como alimento en el año 1500 a.c. durante la edad temprana de las pirámides de Egipto las cebollas eran ofrecidas como una ofrenda funeraria (Acosta *et al.*, 1993).

En la época de la segunda guerra mundial fueron deshidratadas algunas variedades para facilitar su transporte y conservación. Posteriormente se estudió como influye el fotoperiodo, descubriendo así las variedades de día corto y día largo (Acosta *et al.*, 1993).

La cebolla ha tenido una larga domesticación, por lo tanto, la mayoría de los botánicos opinan que de forma silvestre esta hortaliza ya no existe. Su centro de origen se cree que probablemente sea la región de Irán, el oeste de Pakistán y Afganistán. Ya como centros secundarios se encuentran países de Asia Occidental y países del Mediterráneo, desde donde fueron introducidas a América (Acosta *et al.*, 1993).

2.1.2 Descripción botánica

2.1.2.1 Taxonomía

La cebolla pertenece al género *Allium* y a la familia Liliaceae, siendo una especie con una carga cromosómica diploide. El género *Allium* comprende más de 600 especies, de las cuales se cultivan aparte de la cebolla, *Allium sativum* (ajo), *Allium porrum* (puerro), *Allium*

ascalonicum (chalote), *Allium ampeloprasum* (ajo macho), y *Allium schoenoprasum* (cebollino), destacando por su importancia económica la cebolla y el ajo (Galmarini, 1997).

De acuerdo con Sarli (1980) citado por Galmarini (1997), *Allium cepa* L. comprende tres variedades:

var. *Typicum regel* “cebolla común”

var. *agregatum* “cebolla de bulbos compuestos”

var. *Viviparum* “cebolla de bulbo subterráneo”

2.1.2.2 Morfología

De acuerdo a la morfología podemos mencionar que la cebolla presenta una semilla trilocular que en estado inmaduro es de color blanquecino y de apariencia lisa, a medida que se va madurando también se va deshidratando y su apariencia se vuelve rugosa y de color negro (Acosta *et al.*, 1993). Presenta raíces que escasas veces superan los 25cm de profundidad y 15cm de forma lateral, son de color transparente y se encargan de la absorción de nutrientes. presenta también dos tipos de tallos, uno verdadero que se encuentra en la base del bulbo y un falso tallo que conforma los escapos florales los cuales son huecos y llegan a medir 1.5m de altura (Galmarini, 1997). Las hojas son tubulares con una parte basal que se engruesa a medida que se acumulan sustancias de reserva, también tiene una parte terminal, ésta se encarga de realizar la fotosíntesis de la planta (Aparicio, 2010). La formación del bulbo se lleva a cabo cuando las condiciones ambientales son favorables principalmente la temperatura y el fotoperiodo, estas inducen la acumulación de sustancias de reserva en las hojas basales lo que da lugar a la formación de un bulbo que dependiendo de la variedad tendrá diferente forma, color y tamaño (Galmarini, 1997).

2.1.2.3 Características agronómicas

El ciclo vegetativo del cultivo es de cuatro meses por lo que se considera de crecimiento rápido. La cebolla puede desarrollarse en distintos tipos de suelos; arenosos, francos, suelos

turbosos o bien con arcillas pesadas. Sin embargo, suelos bastante arcillosos (>35%) con piedras o altas concentraciones de sales puede ocasionar bajos rendimientos productivos (Silva *et al.*, 1982). Se desarrolla mejor en suelos que presentan una textura suelta, franco-arenosos o franco-arcillosos, debido a que esto permite un mejor desarrollo de los bulbos (Vallejo y Estrada, 2004).

Requiere suelos fértiles con una concentración de materia orgánica mayor a 4%, relación de Ca/Mg de 2 a 3 para una mejor producción. Debido a que es un cultivo demasiado sensible a concentraciones elevadas de sales, una saturación de Sodio (Na) o Magnesio (Mg) ocasionan problemas en el desarrollo. Se recomiendan suelos con un contenido salino menor a 1,2 dS/m (Vallejo y Estrada, 2004; Aljaro *et al.*, 2009).

Respecto al pH óptimo para el cultivo se recomiendan pH ligeramente ácidos en un rango de 6.0 a 6.5 (Silva *et al.*, 1982; Vallejo y Estrada, 2004; Aljaro *et al.*, 2009). Dentro de las exigencias minerales de esta hortaliza se encuentra el Nitrógeno (N) y el Potasio (K) los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de la planta (Bolaños, 2001). No obstante, la cebolla presenta exigencias nutricionales específicas en cada etapa de desarrollo, en este caso requiere altas concentraciones de nitrógeno durante la etapa de desarrollo vegetativo, pero estas deben disminuir al comienzo de la formación del bulbo, debido a que el nitrógeno inhibe este proceso, del mismo modo que una deficiencia en etapas tempranas acelera la formación (Silva *et al.*, 1982; Vallejo y Estrada, 2004). El Azufre (S) por su parte, es un elemento importante para esta hortaliza principalmente por ser un componente de muchos compuestos aromáticos importantes, tal es el caso del sulfuro de alilo. No obstante, su aplicación dependerá del tipo de cebolla que se desea cultivar ya sean cebollas dulces o de alto grado de pungencia lo que determina si se aplica o no azufre, considerando que a mayor concentración mayor pungencia (Galmarini, 1997; Bolaños, 2001).

Problemas con respecto a micronutrientes rara vez se presentan, sin embargo, puede haber deficiencias inducidas principalmente de Hierro (Fe) y Zinc (Zn) por un exceso de Fósforo (P) en suelos calcáreos, por otra parte, suelos arenosos muy lavados pueden presentar deficiencias de Boro (B) (Galmarini, 1997).

Como cualquier otro cultivo la cebolla requiere de suministro de agua, no obstante, la cantidad varía dependiendo del tipo de suelo y del estado fisiológico del cultivo principalmente. Durante los primeros dos meses del cultivo la humedad relativa constante entre 50 y 60% es apropiada, a medida que la cebolla comienza a madurar el riego debe suspenderse para evitar crecimiento radical y favorecer la maduración del bulbo, ya que un exceso de agua provoca retraso en la formación del bulbo hasta por 20 días, lo mismo que una deficiencia ocasiona mayor pungencia (Silva *et al.*, 1982; Vallejo y Estrada, 2004).

2.1.2.4 Fotoperiodo

El fotoperiodo tiene que ver con las horas luz que una variedad requiere para inducir el proceso de dulcificación. Es uno de los factores que influyen fuertemente para un buen desarrollo del cultivo de cebolla. Existen muchas variedades adaptadas a fotoperiodos distintos de día corto, intermedio y largo con exigencias de 11-12, 13-14, y más de 14 horas luz respectivamente (Vallejo y Estrada, 2004). Es muy importante considerar este factor ya que si se desea cultivar una variedad de día corto y las horas luz son largas la formación del bulbo se iniciara de forma prematura dando lugar a bulbos de tamaño pequeño. Por otra parte, si se cultiva una variedad de día largo y las horas luz son cortas, el efecto será que la cebolla no formara bulbo y formara solamente hojas (Acosta *et al.*, 1993). Generalmente la cebolla requiere de fotoperiodos largos, sin embargo, el rango se encuentra entre las 12 y las 16 horas luz dependiendo de la variedad (Castillo, 1999).

2.1.2.5 Termoperiodo

Otro de los factores climáticos que afectan y determinan el éxito del cultivo de cebolla es la temperatura. La cebolla es una hortaliza que se adapta a diferentes temperaturas a pesar de ser considerada de clima frío, también se cultivan en climas cálidos y templados con ambiente seco y luminoso, requiere temperaturas que oscilan entre los 18 y 25 °C, ya que por debajo de los 18°C los bulbos no se desarrollan bien (Aycaya, 2012). Por su parte, la SEA (2006) menciona que la temperatura mínima recomendada para este cultivo es de 13°C y que la temperatura óptima para el desarrollo vegetativo es de 13 a 24°C, sin embargo, puede soportar temperaturas máximas de 33°C.

Todo el desarrollo fisiológico de la planta se ve afectado por la temperatura desde la germinación de la semilla hasta la fase de floración pasando por la dulcificación. Para una germinación óptima de la semilla se requieren temperaturas del suelo entre los 18 y 20 °C (Silva *et al.*, 1982). Por su parte, el proceso de dulcificación se retrasa cuando se presentan temperaturas bajas, no obstante, si el cultivo está en la fase inicial y se presentan temperaturas mayores a 32°C se produce una formación de bulbo prematura indeseable (Vallejo y Estrada, 2004). Para el caso de la inducción floral el rango de temperatura va de los 9 a los 12°C si la planta proviene de semilla y si se produce de bulbo oscila entre los 5 y los 15°C (Acosta *et al.*, 1993). Cuando el objetivo del cultivo es la producción de bulbos y no de semillas y las plantas se exponen a periodos prolongados de temperaturas menores a los 10°C se induce a una floración prematura (Vallejo y Estrada, 2004).

2.2 Importancia económica del cultivo

La cebolla es una de las hortalizas más importante a nivel mundial, su demanda se ha extendido en todas partes y actualmente ocupa el segundo lugar dentro de las hortalizas más consumidas en todo el mundo, solamente la supera el consumo del jitomate (Pinzón, 2004; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2002; Aljaro *et al.*, 2009). Es una especie que se adapta a distintos climas en diferentes países, puede cultivarse en superficies pequeñas y dar altos rendimientos (Melgarejo *et al.*, 2010).

El consumo de esta hortaliza continua incrementándose principalmente en países asiáticos así como los rendimientos productivos a nivel mundial. En la década de 1997-2007 la producción creció más del 50% pasando de 43 millones de toneladas (MT) a 65 MT (Aljaro *et al.*, 2009). El incremento en el consumo de cebolla se debe, en parte, a las propiedades culinarias que presenta y más recientemente por los beneficios a la salud. Socioeconómicamente representa una excelente fuente generadora de empleos de forma directa e indirecta (Pinzón, 2009).

En México representa un peso importante no solo para el consumo interno sino por la importancia que generan las exportaciones. En el 2010 México ocupó el cuarto lugar dentro

de los países con mayores exportaciones de esta hortaliza de acuerdo al valor de producción (FAOSTAT, 2010).

La cebolla presenta varias ventajas de consumo ante otras hortalizas y posiblemente esto contribuye a que sea una de las más consumidas en el mundo. Puede ser consumida a partir de bulbo seco, bulbo fresco, en desarrollo intermedio e incluso de forma deshidratada (Castillo, 1999).

México ocupa el primer lugar de consumo de cebolla en fresco de la producción nacional casi el 88% se canaliza al mercado en fresco, el resto es para la elaboración de productos alimenticios (SAGARPA, 2003).

2.3 Principales productores de cebolla

De acuerdo con la FAO, la mayor concentración de superficie sembrada y mayor producción de esta hortaliza se encuentra en el continente asiático. En el periodo que comprende los años 2010-2011, en promedio Asia produjo el 65.85% de la producción total de cebolla, le siguió Europa, América, África y Oceanía con un promedio para este periodo de 11.67%, 11.52%, 10.61% y 0.36% respectivamente (FAOSTAT, 2011).

A nivel mundial China es sin duda el principal productor de cebolla. En el año 2011 las estimaciones de producción para este país fueron de 24,763,445 toneladas. Le siguen países como la India y Estados Unidos con un total de 15,929,600 toneladas y 3,353,120 toneladas respectivamente. México por su parte, se ubica en la décima segunda posición a nivel mundial al producir en 2011 un total de 1,398,850 toneladas de cebolla (FAOSTAT, 2011). Respecto a la producción obtenida en el continente americano, México ocupa el tercer lugar al ser superado únicamente por Estados Unidos y Brasil que produjo 1,523,320 toneladas en el 2011 (FAOSTAT, 2011).

2.4 Producción nacional

México tiene una buena participación en la producción de cebolla a nivel mundial. La primera aparición de México entre los 20 países productores de esta hortaliza en el mundo

fue en el año de 1971 al ocupar el décimo noveno lugar al producir apenas un total de 226,536 toneladas. Su mejor participación en el peldaño fue en 1999 al ocupar el sexto lugar con una producción de 1,226,990 toneladas. Nuevamente en 2007 logró estar entre los diez más productivos ocupando el octavo sitio con una producción de 1,387,190 toneladas. Para el año 2011 y a pesar de haber obtenido una producción mejor que en 2007 se coloca en el décimo segundo lugar con 1,398,850 toneladas de cebolla (FAOSTAT, 2011).

A nivel nacional los principales estados productores de cebolla han sido Chihuahua, Guanajuato, Tamaulipas, Morelos, Michoacán, Puebla, Baja California y Zacatecas (SIAP-SAGARPA, 2013).

Chihuahua se ha destacado en la producción de cebolla desde 1980 año en el cual ocupó el primer lugar a nivel nacional al producir 66,803 toneladas. El estado de Guanajuato a partir de 1987 a 1993 ocupó el primer lugar. A partir del año 2000 Baja California y Zacatecas han tenido buena participación misma que Guanajuato y Morelos han perdido productividad (SIAP-SAGARPA, 2013).

Por su parte el estado de Michoacán históricamente ha estado dentro de los diez mayores productores a nivel nacional. En 1980 ocupó el quinto lugar al producir 31,918 toneladas en 2,253 hectáreas. No obstante, a partir de 1999 se coloca dentro de los cinco mejores productores, ocupando el segundo lugar con una producción de 187,428.70 toneladas. En 2007 Michoacán ocupó el tercer lugar, en 2010 el cuarto, en 2011 el quinto y en 2012 el cuarto lugar con 169,305.57, 135,579.03, 141,032.71 y 155,108.47 toneladas respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2013).

En Michoacán los principales municipios que se dedican a la producción de cebolla son: Villamar, Jacona, Venustiano Carranza, Zamora, Ixtlán y recientemente Copandaro. En 2012 Villamar, Jacona y Venustiano Carranza cubrieron cerca de la mitad de la producción nacional al contribuir con el 44.62%. Villamar en 2012 presentó una superficie sembrada de 1.072 hectáreas de las cuales 923 fueron de riego y 149 de temporal. Jacona por su parte, tuvo una superficie sembrada de 422 hectáreas de las cuales 391 fueron de riego y 31 de

temporal. En el caso de Venustiano Carranza de las 353 hectáreas dedicadas al cultivo de cebolla 115 son de temporal y 238 son de riego (SIAP-SAGARPA, 2013).

La mayoría de la producción de cebolla se canaliza al consumo interno en estado fresco, el resto se exporta principalmente a Estados Unidos (SAGARPA, 2003). De acuerdo con las exportaciones México ocupó el primer en 2005 y el sexto lugar en el año 2010 al exportar 327,432 toneladas de cebolla (FAOSTAT, 2010).

2.5 Enfermedades de la cebolla causadas por hongos

El éxito de cualquier cultivo dependerá en gran medida de la prevención y control efectivo de las plagas y enfermedades presentes. Al igual que cualquier plaga, las enfermedades también causan serios daños en la producción que se reflejan en grandes pérdidas económicas para los productores (SEA, 2006).

En el caso de los hongos del suelo que afectan al cultivo a nivel mundial se han reportado los géneros: *Fusarium*, *Botrytis*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Phoma* y *Colletotrichum* (Schwartz y Mohan, 1996). En México también se ha reportado la presencia de *Phoma terrestris* y *Sclerotium rolfsii* en almácigos resultando positiva la prueba de patogenicidad, además, en suelo se han encontrado a *Fusarium culmorum*, *Penicillium sp.* y *Colletotrichum circinans* los cuales produjeron síntomas en bulbos (Montes *et al.*, 2003). En Brasil se han registrado pérdidas económicas por la presencia de *Pyrenochaeta terrestres* (Albuquerque y Albuquerque, 2009).

Alternaria porri y *Peronospora destructor* son otro par de hongos que a nivel mundial causan grandes pérdidas en cultivos de ajo y cebolla (Vijayalakshmi *et al.*, 2012; Colnago *et al.*, 2012). Recientemente en Argentina fue identificado *Colletotrichum circinans* causando enfermedad en cultivo de cebolla (Kiehr *et al.*, 2012).

Otros de los patógenos para el cultivo que han sido reportados en varias partes del mundo son *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii* (Pérez *et al.*, 1994; Montes *et al.*, 2003).

2.6 Pudrición Blanca

2.6.1 Distribución Geográfica

La pudrición blanca ha sido reportada en países de Europa, África, América y Oceanía afectando fuertemente no solo al cultivo de cebolla sino también al ajo (Villar *et al.*, 1990; Romero, 1993). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año de 1841 por Berkeley en Inglaterra reportando daños en cultivo de cebolla (Vares *et al.*, 1987). En 1903 se reporta en Italia pero esta vez afectando al cultivo del ajo. Posteriormente se registró la enfermedad en todo el mundo (Pinto *et al.*, 1998). Sin embargo, el estudio filogenético realizado por Couch y Kohn (2000), muestra que es posible que exista mayor diversidad genética en Europa centro de origen de la propagación de *S. cepivorum*.

Por otra parte, en México el patógeno está presente en los Estados de Puebla, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Chihuahua, Morelos, Aguascalientes, Querétaro, Zacatecas y Guanajuato (Pérez, 2002; Sánchez *et al.*, 2002), así como también en el Estado de México y Guerrero (Fundación Produce Querétaro, 2003).

2.6.2 Sintomatología

La enfermedad puede presentarse tanto en el crecimiento vegetativo como en la dulcificación y floración, incluso en postcosecha. Los síntomas son característicos, las plantas presentan un amarillamiento inicial progresivo desde las puntas hasta la base de las hojas más viejas, posteriormente se marchitan y finalmente mueren (Valle, 1989; APS, 1995). Tanto las raíces como el bulbo son atacadas por el hongo, mismo que se manifiesta en forma de abundante micelio blanco algodonoso en toda la superficie del bulbo. El hongo penetra y crece a través de las raíces y eventualmente penetra a la base del bulbo causando una descomposición semi-acuosa (Vares *et al.*, 1987; APS, 1995). Una vez que se ha presentado el micelio en la base de las plantas o sobre los bulbos, se pueden observar pequeños esclerocios de color blanquecino al inicio y finalmente negros, los cuales serán liberados al suelo tan pronto como el tejido donde se desarrollan se pudra por completo (APS, 1995; Crowe, 1995). Los síntomas de amarillamiento y marchites de las hojas solo se

presentan una vez que el patógeno ha crecido y penetrado en el tallo de la base del bulbo (Crowe, 1995).

Cuando el daño es severo las plantas pueden arrancarse fácilmente debido al daño producido en el sistema radical. En terreno altamente infestado la enfermedad genera grandes daños y en la parcela se pueden apreciar “lunares” como resultado de un gran número de plantas muertas (Valle, 1989).

Los ámbitos húmedos y fríos con temperaturas del suelo entre 10 y 23°C favorecen el desarrollo de esta enfermedad (Pinzón, 2004), sin embargo, temperaturas cercanas a los 24°C o menores de 10°C la inhiben (APS, 1995).

2.6.3 *Sclerotium cepivorum*

S. cepivorum es el agente causante de la pudrición blanca de la cebolla. Fue descrito por Berkeley en Inglaterra en el año de 1841 (Vares *et al.*, 1987). Es un hongo imperfecto que pertenece al Orden Mycelia Sterilia (Kimati *et al.*, 1997). La reproducción de este patógeno es a través de la formación de pequeños y numerosos esclerocios (APS, 1995), los cuales están compuestos de una masa densa y dura de hifas, pueden contener o no tejido del hospedante, contienen materias de reserva y pueden mantenerse en reposo cuando las condiciones ambientales son desfavorables (SECF, 2005). *S. cepivorum* forma esclerocios esféricos de color blanco inicialmente y se tornan negros a medida que van madurando, con un diámetro general que va de los 0.3 a 0.6 mm (Crowe, 1995). Los esclerocios son la fuente de inóculo y propagación principal del hongo, germinan mediante una respuesta producida por los exudados de las raíces de las plantas del género *Allium*. En ausencia del cultivo hospedante los esclerocios pueden permanecer inactivos por más de 20 años y germinar una vez que las condiciones ambientales le favorezcan (Coley-Smith *et al.*, 1990). La sobrevivencia del hongo en condiciones desfavorables se debe, en parte, a que las estructuras de resistencia del hongo tienen la capacidad de formar esclerocios secundarios dentro o adyacentes a los esclerocios originales (Coley-Smith *et al.*, 1990). Los esclerocios presentan un periodo de latencia constitutiva de uno a tres meses, y uno de latencia exógena

que es impuesta por factores como la luz, la temperatura, la micostasis la aireación entre otras (Coley-Smith y Cooke, 1971; Coley-Smith, 1990).

2.6.4 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *S. cepivorum* lo podemos dividir en cuatro etapas principales:

- a) los esclerocios son la principal fuente de inóculo y propagación del hongo, estos pueden permanecer viables en el suelo por más de 20 años en ausencia del hospedero y mantener un porcentaje de sobrevivencia mayor al 92% con una viabilidad de hasta 96% (Coley-Smith *et al.*, 1990).
- b) El proceso de germinación de los esclerocios ocurre una vez que las raíces de las plantas del genero *Allium* liberan los exudados, los cuales están compuestos de sustancias no volátiles de sulfóxidos, mismos que son metabolizados por la microflora del suelo, principalmente por bacterias de la rizosfera, para producir compuestos volátiles (sulfuros d n-propil y allilcisteina) que estimulan la germinación (Coley-Smith y King, 1969; Esler y Coley-Smith, 1983). Si el hospedante está ausente, las hifas del patógeno no logran sobrevivir y mueren después de la germinación (Entwistle, 1990).
- c) Posterior a la germinación, las hifas del hongo penetran las raíces por medio de un apresorio, después crece intra e intercelularmente entre las células del parénquima. El hongo produce enzimas como las poligaracturonasas y el pectintranselimininas que se encargan de destruir la pared celular. a su vez produce ácido oxálico que en unión con las poligaracturonasas quelatan el Ca^{++} y disminuyen el pH para favorecer la acción enzimática (Stone y Armentrout, 1985; Metcalf y Wilson, 1999).
- d) Una vez que la raíz ha sido infectada se produce abundante micelio en la base del tallo, que dará origen a nuevos esclerocios, el micelio se propaga planta a planta por el contacto de raíces sanas y enfermas (Crowe, 1995).

2.6.5 Rango de hospederos

S. cepivorum tiene un rango de hospederos que se limita únicamente a las especies del género *Allium*. Dentro de los hospederos que son afectados por este patógeno y que tienen importancia económica por ser plantas cultivadas tenemos a la cebolla “*Allium cepa* L.” al ajo “*Allium sativum* L.” al puerro “*Allium porrum* L.” y al chalote “*Allium ascalonicum* L.”. No obstante también afecta a especies silvestres como “*Allium vineale* L.”, “*Allium canadense* L.”, “*Allium ursinum* L.” y “*Allium fistulosum* L.” (Vares *et al.*, 1987).

2.6.6 Diseminación de la enfermedad

La forma en la cual el hongo puede diseminarse de un lugar a otro y causar enfermedad es muy variada. Los esclerocios son la fuente primaria de la enfermedad y estos pueden ser transportados a grandes distancias por bulbos o almácigos infestados. También el agua de riego puede transportarlos así como la maquinaria utilizada para arar la tierra, los animales e incluso el calzado de los trabajadores (APS, 1995; Crowe, 1995). Materiales vegetales que no pertenezcan al género *Allium* también pueden ayudar a distribuir los esclerocios de un lugar infestado a un lugar sano (APS, 1995). Estas son formas de transportar al patógeno a grandes distancias; no obstante, la enfermedad en una parcela se disemina a través del suelo al estar en contacto las raíces de una planta sana con una enferma (Valle, 1989; Crowe, 1995), de esta forma la enfermedad se vuelve monocíclica y el patógeno se acumula. Sin embargo, de acuerdo con Crowe (1995), la densidad necesaria para que el patógeno cause incidencia elevada de la enfermedad, es muy poca ya que la eficiencia de los esclerocios para germinar y causar infección es muy alta, por ello Crowe *et al.* (1980), menciona que se requiere de 0.001 a 0.1 eg⁻¹ (esclerocios por gramo de suelo) para una incidencia del 10 y 100% respectivamente.

2.7 Tizón sureño

Sclerotium rolfsii Sacc. es considerado un hongo cosmopolita con una distribución a nivel mundial; sin embargo, causa más problemas en regiones templadas y subtropicales (Remesal, 2011). El primer registro de *S. rolfsii* se atribuye a Piter Henry Rolfs en 1892,

reportado en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) causando podredumbre en raíz en el estado de Florida, USA (Rolfs, 1893). No obstante, fue hasta 1911 cuando Saccardo hace una descripción del patógeno y le asigna el nombre de *Sclerotium rolfsii* en honor a Rolfs (Saccardo, 1911).

Geográficamente se encuentra distribuido en todas las zonas mundiales de producción agrícola, ha sido reportado en zonas que comprenden los 45 grados de latitud norte y sur. En el continente americano está presente en estados del sur de Estados Unidos hasta Sudamérica, ha sido reportado también en África, Asia, Australia y Europa. Ha sido reportado también en el norte de China y Estados Unidos, incluso en Siberia “Rusia” (Aycock, 1966; Punja, 1985).

En México se tiene reportada la presencia del patógeno en varios estados del país. De acuerdo con Flores *et al.* (2008), quienes realizaron un estudio de diversidad genética de *S. rolfsii* en México, lograron aislar el patógeno desde el nivel del mar en el estado de Veracruz hasta los 1800 msnm en Guanajuato. De los 20 aislamientos realizados cuatro se obtuvieron de cebolla en los estados de Morelos, Guanajuato y dos Puebla. También en los estados de Guerrero y Sinaloa se logró aislar al patógeno (Flores *et al.*, 2008).

Por su parte Pérez *et al.* (2009), realizaron cinco aislamientos de *S. rolfsii*, dos se obtuvieron a partir de cebolla en los estados de Guanajuato y Morelos y los otros tres fueron colectados en Colima y Guanajuato.

2.7.1 Sintomatología

El patógeno se encuentra naturalmente en el suelo donde causa la enfermedad, cerca o sobre la superficie del mismo, si se tiene contacto con él y las condiciones ambientales son favorables puede atacar las hojas, tallos, frutos y flores de numerosas plantas, no obstante, el cuello de la raíz de la planta es el que usualmente se ve afectado (Aycock, 1966; Jenkins y Averre, 1986).

Debido a que existe un gran número de especies susceptibles al ataque de *S. rolfsii* la sintomatología que presentan puede ser muy variada, sin embargo, los primeros síntomas

de la enfermedad se presentan de dos a cuatro días después de la infección y consisten en un amarillamiento y marchitez de las hojas como resultado del daño causado en el cuello de la raíz (Aycock, 1966; Jenkins y Averre, 1986).

Por su parte, Jenkins y Averre (1986) mencionan que los síntomas iniciales pueden llegar a confundirse por el marchitamiento causado por hongos como *Fusarium* y *Verticillium* spp. o bacterias como *Erwinia* y *Pseudomonas* spp., no obstante, cuando *S. rolfsii* comienza formar abundante micelio y forma esclerocios, se puede identificar fácilmente.

Cuando el patógeno ataca bulbos o raíces carnosas, se puede producir una pudrición de las capas externas o de los tejidos internos de la raíz, ambos pueden pudrirse debido a las lesiones causadas por el hongo (Aycock, 1966). Al respecto, Jenkins y Averre (1986) mencionan que en cebolla el hongo provoca también un amarillamiento y marchitez comenzando por las hojas basales provocando ablandamiento entre los bulbos.

A pesar de que *S. rolfsii* tiene gran capacidad para causar la infección al hospedante, existen condiciones ambientales que limitan su actividad. Por ejemplo, la temperatura del suelo que requieren los esclerocios para causar la infección se encuentra entre 25 y 30°C como óptimo, no obstante, temperaturas menores a 20°C o mayores a 36°C limitan el crecimiento del hongo y disminuyen la severidad de la enfermedad (Lalet *al.*, 1997). Para que el esclerocio logre germinar se requiere de una temperatura óptima de 21 a 30°C ya que temperaturas menores a 15°C o mayores a 36°C la inhiben (Punja, 1985).

2.7.2 *Sclerotium rolfsii*

Sclerotium rolfsii Sacc. es el agente causal de la enfermedad conocida como Tizón sureño o Tizón del sur en numerosas hortalizas (Aycock, 1966). Fue descrito por primera vez en 1911 por Saccardo, a pesar de que en 1892 Henry Rolfs ya había reportado la enfermedad causada por el hongo (Saccardo, 1911). El hongo se caracteriza dentro de la clase deuteromicetes u hongos imperfectos, de acuerdo con Noyd (2000) pertenece al orden Mycelia Sterilia al no tener conocimiento del estado perfecto o sexual del hongo, Saccardo (1911) lo incluyó en el género *Sclerotium* el cual agrupa a todos aquellos hongos que

generan micelio estéril y producen esclerocios. *S. rolfsii* presenta una fase teleomorfa propuesta por Tu y Kimbrough (1975), conocida como *Athelia rolfsii* (Curzi).

S. rolfsii se caracteriza por producir abundante micelio compuesto por hifas tabicadas y micelio aéreo de color blanco y de forma abanicada debido a la formación de rizomorfos así como también por la formación de numerosos esclerocios de color café producidos tanto en condiciones naturales como de laboratorio (Agrios, 1999).

Presenta dos tipos de hifas: las primarias o hifas principales que tienen un diámetro de 5 a 9 μm con conexiones en argolla a nivel de septa características que facilitan la identificación de esta especie, las hifas secundarias también son llamadas alimentadoras, son las encargadas de penetrar a los tejidos del hospedante y son de menor diámetro de 2 a 4.5 μm (Bennett y Barry, 1987).

Cuando el micelio comienza a crecer y los rizomorfos se entrecruzan comienzan la formación de las estructuras reproductivas o esclerocios. Son esféricos principalmente con un diámetro de 0.5 a 2 mm pero en algunos casos pueden llegar a medir de 8 a 10 mm, son blancos en estado inmaduro y a medida que van madurando se tornan café marrón (Singh y Dwivedi, 1991).

2.7.3 Ciclo biológico

S. rolfsii tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo en ausencia del hospedero en forma de esclerocios de dos a cinco años (Baut y Rodriguez-Kabana, 1981). Los esclerocios son la fuente principal de inóculo y diseminación del patógeno y para que se presente una patogénesis primero deben germinar los esclerocios y para ello existen dos diferentes formas, una hifal y otra eruptiva, las cuales están determinadas por condiciones bióticas y abióticas. En la primera, el esclerocio germina y crece a través de hifas individuales que provienen de las células de la medula del esclerocio. En cambio cuando se produce una germinación eruptiva la cubierta del esclerocio se rompe y se expulsan agregados hifales, los cuales iniciaran a causar lesiones al hospedante (Punja y Grogan, 1981). Bajo condiciones ambientales favorables el hongo requiere infectar alguna planta susceptible

para continuar con su ciclo biológico y para ello requiere de estar en contacto con alguno de sus órganos ya sean hojas, raíces, tallos, flores o frutos (Aycock, 1966). Cuando las hifas del hongo están en contacto con el hospedero se genera una respuesta por parte del patógeno el cual comienza a producir compuestos como ácido oxálico y poligalacturonasas, mismas que se encargan de degradar la pared celular y facilitar la penetración del micelio una vez ocasionada la muerte del tejido (Bateman y Beer, 1965). La función del ácido oxálico juega un papel importante ya que al secuestrar el calcio (Ca) de las paredes celulares se transforma en oxalato de calcio ocasionando con esto un pH ácido favorable para la acción enzimática (Bateman y Beer, 1965). *S. rolfsii* produce una gran cantidad de enzimas encargadas de la degradación de los tejidos y probablemente esto explique el rango tan amplio de plantas susceptibles a su ataque (Punja, 1985). Transcurridos aproximadamente siete días después de la infección aparecerán los primeros esclerocios, que se formarán a medida que se entrecruzan los rizomas y la disponibilidad de sustrato disminuye (Sing y Dwivedi, 1991). Posteriormente los esclerocios pueden pasar al suelo y permanecer en estado latente hasta que se presenten condiciones que favorezcan su germinación, también puede permanecer en residuos del hospedero en forma de micelio o bien producir un ciclo secundario de infección si existen condiciones ambientales y sustrato disponible (Aycock, 1966; Smith *et al.*, 1988).

Algunas de las condiciones ambientales que favorecen al patógeno durante su ciclo biológico son dentro de las más importantes, la temperatura del suelo y el pH. En este sentido, Herrera (2004) menciona que temperaturas de 28 a 34°C favorecen el crecimiento e infección del hongo. En cuanto al pH se ha reportado que *S. rolfsii* crece mejor en pH ácidos en un rango de 2 a 7 con un óptimo entre 4 y 5 ya que a pH mayores a 7 la formación de esclerocios se inhibe (Punja, 1985; Herrera, 2004).

2.7.4 Rango de hospederos

Numerosos autores han reportado la importancia que tienen *S. rolfsii* para el sector agrícola debido al gran número de plantas susceptibles a su ataque y a los daños que genera en cultivos de importancia económica.

Al ser una especie cosmopolita su distribución en diferentes tipos de climas dificulta un número exacto de hospederos (Punja, 1985). Sin embargo, Aycock (1966), reporta una lista de plantas susceptibles al ataque del patógeno, incluye 500 hospederos distintos de 100 familias siendo la gran mayoría dicotiledóneas, principalmente leguminosas. No obstante, también afecta a monocotiledóneas como gramíneas y liliáceas. La mayoría de los hospedantes son angiospermas sin embargo, existen tres especies de gimnospermas que también son atacadas por el patógeno.

Dentro de los cultivos de mayor interés agrícola atacados por el patógeno se encuentran la papa (*Solanum tuberosum* L.), soya (*Glycine max* L.), altramuz (*Lupinus* spp.), arroz (*Oryza sativa* L.), banana (*Musa x paradisiaca* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), café (*Coffea* spp.), algodón (*Gossypium* spp. L.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), haba (*Vicia faba* L.), pepino (*Cucumis sativum* L.), melón (*Cucumis melo* L.), así como también en cacahuete, tomate y remolacha azucarera (Aycock, 1966). De acuerdo con Arnold (1986), los principales hospederos son *Ipomoea batatas* L., *Solanum tuberosum* L., *Phaseolus vulgaris* L. y *Helianthus annuus* L. también ha sido reportado en *Zea mays* y en *Dianthus caryophyllus* L. (Sepúlveda, 1993; González *et al.*, 2008). Al igual que muchos otros hospederos entre plantas frutales, malezas, hortalizas y plantas forestales (El-Katatnyet *al.*, 2001).

En México, Flores *et al.* (2008) lograron aislar al patógeno de diferentes plantas entre ellas el perejil (*Petroselinum crispum* Mill.), lenteja (*Lens esculenta* Moench), diente de león (*Taraxacum officinale* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), flor de pajarito (*Parthenium hysterophorus* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.), frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), cilantro (*Coriandrum sativum* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), chile (*Capsicum annum* L.) y soya [*Glycine max* (L.) Merrill].

2.7.5 Diseminación de la enfermedad

La diseminación de *S. rolfsii* es principalmente pasiva a través de esclerocios presentes en suelo contaminado. Cuando se realizan prácticas agrícolas tales como el arado, barbecho o irrigación del suelo pueden propagarse fácilmente los esclerocios de un lugar contaminado a uno completamente limpio (Aycock, 1966). El trasplante de plántulas contaminadas así como la utilización de semillas vegetativas son formas frecuentes de dispersar al patógeno a grandes distancias (Jenkins y Averre, 1986).

La forma de dispersión activa del patógeno es a través de la producción de basidiosporas, producidas por el teleomorfo de *S. rolfsii* sin embargo, en condiciones naturales pocas veces se ha descrito (Aycock, 1966).

2.8 Combate de la pudrición causada por *S. cepivorum* y *S. rolfsii*

Dado que ambos patógenos producen esclerocios y son la principal fuente de inóculo se presentan a continuación las prácticas que se desarrollan para el combate de cada patógeno.

2.8.1 Control cultural

Algunas de las prácticas culturales que se emplean para el control de *S. rolfsii* es el arado profundo y superficial Jenkins y Averre (1986) la remoción de plantas enfermas cuando se presentan los primeros síntomas ayudan a reducir el inóculo, el tratamiento a plantas y semillas con fungicidas antes del trasplante, así como el tratamiento del suelo o incluso la remoción de suelo en áreas donde se presentó la infección son prácticas que pueden ayudar a controlar a este patógeno (Singh y Dwivedi, 1991).

En el caso de *S. cepivorum* deben de evitarse la repetición frecuente de plantas del genero *Allium* para evitar una re-infestación (Vares *et al.*, 1987). La rotación de cultivos no ha resultado ser un método efectivo para el control de *S. cepivorum* debido a la persistencia de los esclerocios en el suelo ya que éstos solo germinan en respuesta a los exudados de las raíces de las plantas del genero *Allium* (Coley-Smith, 1990). En el caso de *S. rolfsii* la rotación de cultivos es poco efectiva debido al gran número de hospederos que posee, por

lo tanto, se requiere rotar con cultivos con un reducido nivel de susceptibilidad al patógeno (Punja, 1985).

La inundación es otra práctica que ha sido reportada como una medida de control de ambos patógenos. Al respecto, Garren (1961) menciona que al privar de oxígeno a *S. rolfsii* la inundación del suelo resulta ser efectiva para el control del patógeno, sin embargo, la inundación debe durar el tiempo necesario para que los esclerocios pierdan su viabilidad de lo contrario la inundación resulta favorable al patógeno ya que la humedad le beneficia (Garren, 1961). En cambio, Crowe (1995) menciona que los esclerocios de *S. cepivorum* eventualmente mueren durante periodos prolongados de humedad en el suelo pero que esto ocurre dependiendo de la temperatura, por lo que en lugares donde el clima es frío, este método pierde efectividad. La adición de cal es un método empleado para el control de *S. rolfsii* debido a que a un pH de 6.5 el crecimiento del hongo se ve afectado (Jenkins y Averre, 1986). Para el caso de *S. cepivorum* también se han evaluado la aplicación de estimulantes de la germinación como es el caso del extracto de puerro (Argüello *et al.*, 2009), compuestos azufrados que inducen a los esclerocios a germinar y que tiene como finalidad disminuir la densidad de inóculo en el suelo (Hovis y McDonald, 2002).

2.8.2 Control físico

En este método de control se describe la solarización del suelo, el cual, de acuerdo con Singh *et al.* (1990) es una técnica efectiva para reducir la viabilidad de los esclerocios de *S. rolfsii* hasta en un 90%, no obstante, Aimcra (1998), menciona que la aplicación de este método en superficies grandes pierde viabilidad, por lo que solo en pequeños lugares es efectiva y económica su aplicación.

Para el caso de *S. cepivorum*, Adams (1987), menciona que la temperatura y la baja humedad afectan la supervivencia de los esclerocios y que es posible alcanzar la dosis letal media a una temperatura de 35°C durante 129,6 hrs, debido no solamente al daño causado al esclerocio sino por la colonización de algunos microorganismos en la superficie del esclerocio tales como *Trichoderma*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Aspergillus* los cuales fueron reportados por McLean *et al.* (2001). Al respecto, Thaning y Gerhardson (2001),

mencionan que no encontraron ningún efecto negativo sobre la viabilidad de los esclerocios ni tampoco colonización de esclerocios después de someter el suelo a solarización con plástico oscuro durante a 10 a 13 semanas.

2.8.3 Variedades resistentes

Se han realizado estudios para evaluar la resistencia de la cebolla al ataque de *S. cepivorum* sin embargo, no han sido identificadas variedades inmunes al ataque del patógeno, Coley-Smith (1990), menciona que es posible que los factores climáticos y geográficos contribuyan a que los resultados que se plantean respecto a la resistencia de algunas variedades sean inconsistentes. Sin embargo, Crowe (1995), menciona que no existen especies del genero *Allium* inmunes al ataque de *S. cepivorum*.

Por su parte, Aimcra (2006), menciona que la utilización de variedades resistentes al ataque de *S. rolfsii* es una de las alternativas más prometedoras. De esta manera Hunger *et al.* (2002), citan como una posible alternativa para obtener variedades resistentes la aplicación de técnicas de ingeniería genética para obtener variedades que exuden menos por las raíces.

2.8.4 Control químico

Dentro de las alternativas para el control y prevención de la pudrición causada por *S. cepivorum* y *S. rolfsii* se encuentra el uso de productos químicos los cuales son ampliamente utilizados (Hagan y Olive, 1999; Delgadillo *et al.*, 2002). A pesar de ser considerados como una alternativa viable, los resultados obtenidos en evaluaciones en distintas partes del mundo muestran un comportamiento distinto del hongo ante los productos utilizados para su combate en este caso, *S. rolfsii* (Hagan y Olive, 1999).

De acuerdo con Punja (1985) la aplicación de algunos fungicidas es efectiva no solo para inhibir la germinación de los esclerocios sino que además impiden el crecimiento micelial del hongo.

De acuerdo con Coley-Smith (1990), el primer fungicida utilizado con éxito en el control de la pudrición causada por *S. cepivorum* fue el cloruro de mercurio y posteriormente se usaron el dicloran, el pentacloronitrobenceno, los bencimidazoles y las dicarboximidias.

Dentro de los fungicidas más utilizados para el control de *S. cepivorum* se encuentran el grupo de los dicarboximidias que incluye la proximidona (Stewart y Fullerton, 1991). También se encuentran los triazoles que agrupan al triadimefon, triadimenol y tebuconazole así como también el grupo piridinamina que incluye el fluazinam (Corbaz, 1994; Davies, 1994) citados por Delgadillo *et al.* (2002).

Por otro lado, Crowe (1995), menciona que muchos fungicidas pierden su efectividad debido a la degradación microbiana en el suelo y aquellos que tienen resistencia a este proceso tienden a acumularse causando contaminación en el suelo, tal es el caso de cloruro de mercurio (Coley-Smith, 1990).

2.8.5 Control biológico

El control biológico incluye estrategias y métodos para controlar las enfermedades a través de la actividad de organismos vivos distintos del hombre. El control biológico se define como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o un parásito, en estado activo o durmiente, por la acción de uno o más organismos” (Baker y Cook, 1974) citado por Melgarejo *et al.* (2005). En el control biológico interviene un elemento vivo junto con el huésped y el patógeno, llamado antagonista. En términos de control biológico, los antagonistas son agentes biológicos con potencial para interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales. Los antagonistas pueden ser de todo tipo de organismos: hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus, viroides y plantas (Melgarejo *et al.*, 2005).

La posibilidad de control biológico de la pudrición blanca de la cebolla ha sido investigada desde 1969 por Ghaffar, citado por Kay y Stewart (1994) y se han identificado tanto hongos como bacterias con potencial de control. El control biológico en este tipo de enfermedades

está orientado a disminuir la densidad de inóculo mediante antagonistas que destruyan los esclerocios o en algunos casos que eviten su formación (Cook, 1979).

Rai y Saxena (1975), lograron aislar a partir de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* diferentes antagonistas, mostrando mayor actividad antagónica los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Por su parte, Granados (2004), cita a Ayers y Adams (1981) los cuales informan la capacidad antagónica de *Sporidesmium sclerotiborum* para destruir los esclerocios de *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *S. cepivorum*. En este sentido, Singh *et al.*, (2003), evaluaron *in vitro* la capacidad antagónica de 186 cepas bacterianas y encontraron dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* “NBRI-N6 y NBRI-N” que lograron disminuir el crecimiento micelial de *S. rolfsii* de manera significativa. Por su parte, Errakhi *et al.* (2007) citado por Remesal (2011), reportan la capacidad que tienen algunas bacterias del género *Streptomyces* para disminuir la enfermedad causada por *S. rolfsii* en cultivo de remolacha.

Gliocladium catenulatum es reportado por Tsigbey y Nutsugah (1999), mencionan que el hongo redujo el crecimiento de las colonias, la formación de esclerocios y la maduración de *S. cepivorum* y sugieren que es posible su utilización dentro del control biológico de este patógeno.

2.9 El género *Trichoderma* dentro del control biológico

El género *Trichoderma* engloba a un conjunto de especies que han demostrado ser efectivas dentro del control biológico de plagas y enfermedades e incluso algunas de ellas tienen la capacidad de estimular crecimiento en algunas plantas (Stefanova *et al.*, 1999). Algunos de los hongos presentes en el suelo y que causan enfermedades en plantas cultivadas son los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* principalmente, sin embargo, *Trichoderma* spp. ha mostrado buenos resultados en el control de estos patógenos (Ezziyyani *et al.*, 2004).

El género *Trichoderma* está compuesto por un gran número de especies de hongos saprófitos presentes en ecosistemas terrestres: suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). *Trichoderma* ha sido considerado por muchos

autores como un modelo excepcional debido a las características favorables que posee, por ejemplo, puede cultivarse fácilmente en diferentes medios y crecer en diferentes sustratos, es de crecimiento rápido, es inocuo y pocas veces se comporta como patógeno, presenta distintos mecanismos de acción antagónica ante un gran número de patógenos y puede inducir crecimiento en algunas plantas (Falconí, 1997).

Trichoderma ha sido estudiado como un organismo importante dentro de la biodegradación, también como un bioindicador sin embargo, se le da mayor importancia como un organismo antagónico de patógenos del suelo (Falconí, 1997). Dentro de la agricultura, *Trichoderma* tiene un papel importante como antagonista de numerosos patógenos, tiene la capacidad de producir compuestos que actúan como fungicidas que inhiben el crecimiento al tiempo que producen enzimas que degradan las paredes celulares de las hifas de los patógenos, compiten con ellos no solo por nutrientes sino también por espacio y por oxígeno (Villegas, 2000).

De acuerdo con Fuentes *et al.*, (2001) citado por Cabos (2010), especies de *Trichoderma* como *T. harzianum*, *T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum* y *T. parceromosum* tienen capacidad antagónica frente a patógenos tales como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia bunodes*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea*, *Armillaria mellea*, *Phytium sp.* y *Cryptonectria parasitica*.

De acuerdo con Stefanova *et al.*, (1999) mediante de la producción de metabolitos no volátiles las especies de *T. harzianum* y *T. viride* logran reducir el crecimiento de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* y sugieren que se pueden emplear como biopreparados para combatir hongos del suelo en tabaco, hortalizas y granos. Suarez *et al.* (2008), evaluaron *in vitro* tanto cepas nativas de *Trichoderma harzianum* como cepas comerciales y encontraron que ambas poseen antagonismo sobre *Fusarium solani*.

En este sentido, Santander (2013), encontró que al combinar *T. harzianum* y *B. subtilis* a una concentración de 10^6 con/mL y 10^8 ufc/mL logró reducir la marchitez del pimentón causada por *P. capsici* en un 70%.

Son muchos los trabajos en los cuales las especies de *Trichoderma* han mostrado ser excelentes candidatos para ser utilizados dentro del control biológico. En este sentido, autores como Mónaco *et al.* (1998) mencionan que *T. harzianum* y *T. koningii* tienen la capacidad para parasitar esclerocios de *S. sclerotiorum*. Rodríguez *et al.* (1999) mencionan que es factible el uso de *Trichoderma* dentro del control biológico de hongos que causan daño a las semillas botánicas de caña de azúcar. Por su parte, Michel, (2001) y Michel *et al.* (2009) encontraron que diferentes especies del género *Trichoderma* presentan actividad micoparasítica sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. También ha sido reportado *Trichoderma* como biocontrolados *in vitro* sobre *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Cladosporium fulvis* y *Rhizoctonia sp.* (Ponce, 2002; Arzate *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008).

Estudios más recientes muestran el potencial que *Trichoderma* tiene para controlar patógenos de plantas, tal y como lo reporta Cruz *et al.* (2010), los cuales evaluaron cuatro cepas de *Trichoderma spp.* sobre *Sarocladium oryzae* (Sawada) las cuales mostraron capacidades potenciales de biocontrol frente a este patógeno. Por su parte, Otadoh *et al.* (2011), mencionan que las especies de *Trichoderma reesei* y *Trichoderma koningii* tienen potencial para ser utilizados como agentes de control biológico frente a *Fusarium oxysporium*. Así también, Nina *et al.* (2011), evaluaron a *Trichoderma* como control biológico del damping off en *Coffea arabica* y encontraron que *Trichoderma* tiene control antagónico ante *Rhizoctonia sp.* y *Fusarium sp.* Del mismo modo, *Trichoderma viride* resulto tener mayor eficiencia que *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* cuando fueron evaluados como antagonistas de patógenos como *Phytophthora spp.* *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia* (Noja y Medina, 2011).

2.10 Taxonomía de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue propuesto por Person en el año de 1794 y agregaba únicamente cuatro especies, posteriormente Rifai (1969), agrega nueve especies más y actualmente este género está compuesto por más de 30 especies con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Páez, 2006).

Taxonómicamente el género *Trichoderma* se encuentra dividido de la siguiente manera: pertenece al Reino: Fungi, División: Eumycota, Subdivisión: Deuteromycotina, Clase: Hyphomycetes, Orden: Hyphales, Familia: Moniliaceae, Género: *Trichoderma* spp. (Samuels, 1996; Kuhls *et al.*, 1997).

Presenta un estado sexual o teleomorfo colocado dentro de la Clase: Ascomycetes, Serie: Pyrenomycetes, Orden: Hipocreales, Género: Hypocrea. Tiene como sinónimo el género *Tolypocladium* (Carlier *et al.*, 1994).

La clasificación taxonómica de este género ha resultado problemática debido a que en sus inicios se clasificó de acuerdo a características morfológicas como la velocidad de crecimiento o características de la esporulación, de los conidios o conidióforos (Samuels, 1996). No obstante, los estudios de polimorfismo y secuenciación del ADN han ido confirmando especies de este género (Lieckfeldt *et al.*, 1998).

2.11 Morfología de *Trichoderma*

La mayoría de las colonias del género *Trichoderma* son de color blanco al inicio, posteriormente toman un color verde brillante o amarillento como resultado de una esporulación densa (Rifai, 1969). El micelio que producen es delgado y visto en el microscopio es fino. Posee hifas tabicadas con más de un núcleo por célula (Rosen *et al.*, 1974). Presenta conidióforos hialinos muy ramificados no verticulados, presentes en forma de penachos compactos que forman anillos con un sistema de ramas irregulares en forma de pirámide. Éstos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios de 2.5 a 3.0 μm con un solo núcleo haploide, ovoides y de color verde, su pared está compuesta de quitina y glucanos (Rifai, 1969; Rosen *et al.*, 1974).

Produce tres tipos de propágulos: hifas, conidios y clamidosporas, estas últimas se producen bajo ciertas condiciones nutrimentales o como respuesta a ciertas condiciones adversas. Son de vital importancia para la sobrevivencia del género (Lewis y Papavizas, 1984; Fernández-Larrea, 2001). Las clamidosporas pueden ser globosas o subglobosas, terminales o intercalares de color verde y con un diámetro menor a 15 μm (Samuels, 1996).

En medio de cultivo agar, *Trichoderma* crece y se desarrolla rápido, no forma micelio aéreo, produce abundantes conidios en forma de polvo de color verde-amarillo, y en algunos casos, los cultivos desprenden un olor a coco (Samuels, 1996).

En ambientes naturales las especies de este género tienden a utilizar un amplio rango de compuestos como fuente de carbono y nitrógeno, entre ellos monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, purinas, pirimidinas y aminoácidos (Danielson y Davey, 1973; Tye y Willets, 1973).

2.12 Fisiología de *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* están presentes en diferentes hábitat y suelos, no obstante, las condiciones ambientales influyen sobre la presencia de ciertas especies en un determinado lugar (Jensen y Wolffhechel, 1995). *Trichoderma* es un hongo aeróbico capaz de resistir un amplio rango de temperaturas, de acuerdo con McBeath y Adelman (1991) citado por Martínez *et al.* (2013), reportan una cepa aislada en suelo de Alaska que creció a 4 °C pero que toleró hasta 33 °C.

De acuerdo con Danielson y Davey (1973), el desarrollo de *Trichoderma* está relacionado con la temperatura, sin embargo, esta relación al parecer depende de la especie y del propio aislamiento, ya que *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum* Hammill toleran de 40 a 41 °C, *T. harzianum* 38 °C, *T. koningii* y *T. hamatum* 35 °C y *T. viride* y *T. polysporum* 31 °C. Por su parte Knudsen y Bin (1990), reportan para algunos aislamientos de *T. harzianum* una temperatura óptima de 20 °C.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* de *Trichoderma* ante algunos patógenos que forman esclerocios Rollan *et al.* (1999), mencionan que *Trichoderma* spp. coloniza mejor los esclerocios de *S. sclerotiorum* y *S. minor* a temperaturas de 25 a 30 °C, mientras que el mismo efecto ocurre entre 20 a 25 °C sobre *S. rolfsii*. Además, mencionan que la capacidad de las especies de *Trichoderma* para parasitar a los esclerocios, en general, fue mayor a 25 y 30 °C encontrando diferencias en el comportamiento de las especies.

Respecto al pH las especies del género *Trichoderma* se desarrollan en suelos con un rango de pH de 5.5 hasta 8.5, no obstante los valores óptimos se encuentran entre 5.5 y 6.5 declinando notablemente su crecimiento a pH cercanos al 8.5 (Besoain, 2005).

La humedad del suelo y la cantidad de materia orgánica también juegan un papel importante sobre el crecimiento de *Trichoderma*. En este sentido, Páez (2006) citado por Cholango (2009), mencionan que *Trichoderma* se desarrolla mejor en presencia de humedad, con un 60% como óptimo de humedad en el suelo. Por otro lado, a pesar de que los requerimientos nutricionales de los hongos filamentosos son pocos, *Trichoderma* crece mejor en suelos ricos en materia orgánica (Papavizas, 1985).

2.13 Mecanismos de acción

Han sido varios los mecanismos de acción reportados con los cuales el género *Trichoderma* ha logrado controlar el crecimiento y desarrollo de varios patógenos. Sin embargo, los principales que se reportan son el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por espacio y por nutrientes (Harman, 2000). De forma indirecta presenta otros mecanismos, entre ellos se encuentran la resistencia inducida, tolerancia al estrés mediante la producción de raíces, inactivación de enzimas producidas por patógeno, entre otros (Harman, 2000). De acuerdo con Jensen y Wilffhechel (1995), puede utilizar varios mecanismos a la vez para hacer más efectivo su antagonismo. Esta diversidad de mecanismos le permiten a *Trichoderma* spp. Ser excelentes antagonistas y exitosos colonizadores de un gran número de hábitat (Schuster y Schmoll, 2010).

2.13.1 Antibiosis

El mecanismo de antibiosis que ejerce *Trichoderma* spp. es mediante la producción de enzimas hidrolíticas o bien por metabolitos secundarios (Jensen y Wilffhechel, 1995). Mediante antibiosis se inhibe el desarrollo del patógeno o se causa la muerte del organismo por un compuesto metabolizado por el otro organismo. Cuando se lleva a cabo una interacción antagonista-patógeno se producen enzimas líticas extracelulares y antibióticos

por parte del antagonista que inhiben el crecimiento del patógeno (Schirmböck *et al.*, 1994).

De acuerdo con Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), *Trichoderma* produce distintos metabolitos secundarios, los cuales dependen de la cepa y los divide en tres grupos; Peptaiboles (oligopeptidos lineales), antibióticos polares (ácido heptelídico) y antibióticos volátiles (6-pentil- α -pirona). Tanto los peptaiboles como los compuestos polares actúan a corta distancia, es decir, cerca del hospedero (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991). Algunas especies de *Trichoderma* producen compuestos antifúngicos que actúan sobre *R. solani* y *R. rolfsii* y que ocasionan la desintegración de las hifas (Cook y Baker, 1989) citado por Martínez *et al.* (2013).

2.13.2 Competencia

La competencia es la habilidad de un microorganismo para utilizar un sustrato de forma más eficiente que otro. Pueden competir por nutrientes o espacio, oxígeno o luz. *Trichoderma* es un fuerte competidor por nutrientes como carbono, nitrógeno y hierro (Sivan y Chet, 1989; Inbar y Chet, 1997). Colonizan rápidamente el suelo y evitan la proliferación de otros organismos. Anke *et al.* (1991), registraron la producción de hidroxamato, un sideróforo producido por *Trichoderma* spp. bajo condiciones deficientes de hierro que le permite tomar el hierro de forma reducida y evitando la sobrevivencia de otros organismos al disponer de las pocas cantidades de este mineral.

Una de las características importantes de *Trichoderma* es su rápido crecimiento, lo que lo convierte en un buen competidor por espacio principalmente en condiciones *in vitro* (Reyes *et al.*, 2008). No obstante, *in vivo* la competencia de *Trichoderma* está relacionada con la capacidad para colonizar la raíz o el espacio adyacente a éstas (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

2.13.3 Micoparasitismo

El micoparasitismo es una interacción directa que se da entre el antagonista y el hongo patógeno (Inbar y Chet, 1997); en donde el antagonista utiliza al patógeno como alimento, siendo éste el principal mecanismo de acción utilizado por *Trichoderma* (Fernández-Larrea,

2001). De acuerdo con Harman (2000), es un proceso muy complejo que involucra no sólo el crecimiento del antagonista hacia el patógeno sino también un proceso de enrollamiento y destrucción de hifas.

El proceso de micoparasitismo se puede dividir en cuatro etapas principales de acuerdo con Chet y Benhamou (1998):

1. Crecimiento quimiotrófico. En esta etapa se lleva a cabo un quimiotropismo positivo en el cual *Trichoderma* detecta a su huésped a cierta distancia y crece hacia él.
2. Reconocimiento. esto implica la interacción de moléculas de lectinas-hidratos de carbono. La producción de lectinas se ha investigado en *Rhizoctonia solani* (Kühn) y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.). En todos los casos se encontraron evidencias directas de que las lectinas están involucradas en el micoparasitismo (Chet y Inbar, 1994; Pérez, 2004).
3. Adhesión y enrollamiento. Si la respuesta de reconocimiento es positiva las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las hifas del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos o apresorios y se enrollan alrededor de éstas (Golman *et al.*, 1994) citado por Pérez (2004). La adherencia de las hifas de *Trichoderma* se lleva a cabo mediante la unión de un azúcar presente en la pared del antagonista y una lectina en la pared del patógeno (Chet y Benhamou, 1998).
4. Actividad lítica. De acuerdo con Haran *et al.* (1996), en esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas que degradan las paredes celulares y posibilitan la penetración.

Las enzimas juegan un papel importante en el micoparasitismo, dentro de ellas la β -1,3 glucanasa se considera esencial dentro de este mecanismo debido a que participa en la degradación de la pared celular de los patógenos (Sanz *et al.*, 2005).

El micoparasitismo finaliza una vez que las células del hospedante pierden el contenido citoplasmático (Nico *et al.*, 2005).

2.14 Control biológico de *S. cepivorum* con *Trichoderma*

En un estudio realizado por Oliveira *et al.* (1982), acerca del antagonismo ejercido por *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium cepivorum*, encontraron que *Trichoderma* mostró buen control debido a que destruyó las hifas del patógeno y redujo en 65,6% el crecimiento micelial.

En 1994 Bautista y Acevedo realizaron un experimento *in vitro* y mediante cultivo dual evaluaron la capacidad antagónica de 16 cepas de *Trichoderma* spp. contra *S. cepivorum* resultando cinco de ellas con gran capacidad antagónica ante el patógeno debido a su rápido crecimiento y a que impidieron la formación de estructuras de resistencia por parte del patógeno.

Por su parte, Correa *et al.* (1996), mencionan que mediante la excreción de metabolitos secundarios como las tricozianinas, *T. harzianum* es capaz de controlar el crecimiento del micelio y la formación de esclerocios de *S. cepivorum*. De acuerdo con McLean y Stewart (2000), las especies de *T. harzianum*, *T. virens* y *T. koningii* presentaron en ensayos de invernadero capacidad antagónica sobre *S. cepivorum*.

Con respecto al micoparasitismo de esclerocios de *S. cepivorum* McLean *et al.* (2001), reportan la presencia de *Trichoderma* en esclerocios de *S. cepivorum* recuperados y mencionan que la solarización es más efectiva cuando se combina con algún control biológico. Clarkson *et al.* (2004), reportan la capacidad de *T. viridae* y *T. pseudokoningii* para degradar hasta en un 80% los esclerocios de *S. cepivorum* en suelo arcillo-limoso.

Con respecto a la cebolla, Obregón (2001), realizó un ensayo *in vitro* y menciona que *T. harzianum* tiene potencial antagónico para combatir la pudrición blanca de la cebolla causada por *S. cepivorum*, debido a que presentó una invasión de 50 y 75% sobre el patógeno.

Recientemente Ulacio *et al.* (2011), evaluaron el efecto de *T. harzianum* sobre la densidad y viabilidad inicial y final de esclerocios de *S. cepivorum*, así como también el efecto de los extractos vegetales, el nitrato de calcio, la solarización y el tebuconazole y mencionan que

el manejo de la pudrición blanca es factible mediante el manejo integrado ya que ellos obtuvieron la mayor producción con el tratamiento que incluía extractos vegetales, *T. harzianum* y Nitrato de calcio.

2.15 Control biológico de *S. rolfsii* con *Trichoderma*

La capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. ante patógenos como *S. rolfsii* ha sido reportada en varias ocasiones (Fernández-Larrea, 2001). Elad *et al.* (1980) mencionan que aislaron una cepa de *T. harzianum* y la evaluaron contra *S. rolfsii* y *R. solani* y encontraron que el antagonista era capaz de ocasionar lisis en las células del micelio de los patógenos, logrando con esto disminuir la enfermedad causada por esos agentes. Del mismo modo Silveira (1995) citado por González *et al.* (2005), encontró mejores resultados contra *S. rolfsii* en frijol, al tratar el suelo con biopreparado de *Trichoderma* TN-21, el cual redujo las afectaciones de la enfermedad en un 35,1%.

En un estudio realizado por Haran *et al.* (1996), encontraron que *T. harzianum* produce diferentes niveles de enzimas hidrolíticas cuando se encuentra compitiendo contra *S. rolfsii* o *R. solani* revelando con esto una selectividad enzimática dependiente del sustrato o patógeno a controlar. A su vez Benhamou y Chet (1996) mencionan que *T. harzianum* muestra micoparasitismo ante esclerocios de *S. rolfsii* mediante un proceso de hidrólisis enzimática. Siendo las glucanasas las responsables de la hidrólisis de los β -glucanos (González *et al.*, 2011).

Rollan *et al.* (1999), evaluaron el efecto de la temperatura sobre la capacidad antagónica de seis especies de *Trichoderma*; *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. longibrachiatum* frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfsii*. Encontraron que una temperatura de 20 a 25 °C *Trichoderma* logró colonizar a *S. rolfsii* pero a 30°C *S. rolfsii* creció sobre *Trichoderma* spp. inhibiendo su efecto antagónico.

De acuerdo con Sandoval y López (2000), la cepa de *T. harzianum* A-34 mostró una actividad antagonista e hiperparasítica *in vitro* sobre *S. rolfsii*. También *in vitro* Michel *et*

al. (2005) citado por Calvo *et al.* (2012), mencionan que tuvieron valores de inhibición de crecimiento de un 94% contra *S. rolfsii*.

En cultivo de remolacha Farías (2005), evaluó tres cepas nativas de *Trichoderma* correspondiente a *T. harzianum*, *T. parcenamosum* y *T. virens* contra *S. rolfsii* siendo *T. harzianum* la que presentó un control preventivo más eficaz. Del mismo modo (García *et al.*, 2006; Arias y Duarte, 2006) reportan potencialidades antagónicas de *T. harzianum* y *T. koningii* sobre *S. rolfsii*. En cultivo de maní al aplicar *T. harzianum* y *Rhizobium* aumentó el crecimiento de las plantas y se logró controlar la pudrición del tallo causada por *S. rolfsii* (Ganesan *et al.*, 2004).

En otro trabajo realizado por Correa *et al.* (2007), identificaron 20 cepas de *Trichoderma* pertenecientes a las especies de *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. crassum* y *T. viride*. Doce mostraron potencial antagónico ante *S. rolfsii* y cinco de ellas se clasificaron en la clase 1 en la escala de Bell *et al.*, (1982). Así mismo en el trabajo realizado por González *et al.* (2008), *T. viride* fue quien presentó mayor efecto antagónico ante *S. rolfsii*.

Con el fin de evaluar la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. tanto *in vitro* como en invernadero ante *S. rolfsii* y *R. solani*, Hoyos *et al.* (2008) realizaron ocho aislamientos de los cuales todos mostraron efectos ante los patógenos *in vitro*, no obstante, en invernadero solo cuatro fueron altamente eficaces.

Más recientemente se han confirmado las potencialidades de *T. harzianum* ante *S. rolfsii*, *S. cepivorum* y otros patógenos (García *et al.*, 2010). En este sentido Yaqub y Shahzad (2010), mencionan que *in vitro* *T. harzianum* y *T. pseudokoningii* inhibieron el crecimiento, causaron enrollamiento de micelio y lisis de hifas de *S. rolfsii*.

El mecanismo de antibiosis también ha sido reportado ya que fue evaluada la especie de *T. asperellum* misma que al estar en contacto con *S. rolfsii* produjo compuestos volátiles como el 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, entre otros, los cuales presentaron *in vitro* actividad fungística sobre el patógeno (Ruiz, 2011).

En cultivo de cebolla son pocos los trabajos encontrados respecto al control de *S. rolfsii* con especies del genero *Trichoderma*. No obstante, Aparicio (2010) evaluó el crecimiento, el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides totales y la actividad de peroxidasa en tres variedades de cebolla con diferentes grados de pigmentación inoculadas con *T. harzianum* y su relación con el control de *S. rolfsii*. Encontró que todas las variedades presentaron aumento en el desarrollo, hubo cambios en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides siendo las variedades roja y morada las de mayor contenido. La severidad de la enfermedad causada por *S. rolfsii* fue menor en las plantas tratadas con *T. harzianum* y a su vez fue menor en las variedades pigmentadas que en la variedad blanca.

3 JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la cebolla en la región Ciénega de Chapala es sin duda uno de los más importantes, siendo el municipio de Villamar el principal productor en el estado de Michoacán.

Entre las principales enfermedades del cultivo se encuentran la pudrición blanca y la pudrición sureña, ocasionadas por dos hongos del género *Sclerotium*; ambos afectan directamente los bulbos, por lo que pueden causar pérdidas en la producción que pueden llegar al 100% cuando se presentan las condiciones favorables para que se desarrollen dichas enfermedades.

Debido a que no existe en la región un manejo integrado para combatir a *S. cepivorum* y *S. rolfsii*, los productores hacen uso excesivo de productos químicos, sin considerar la resistencia que adquieren los patógenos a estos, razón por la cual en muchos de los casos son poco efectivos y solo incrementan los costos de producción.

Por lo anteriormente señalado, el presente trabajo pretende contribuir al control de *S. cepivorum* y *S. rolfsii* por medio de la utilización de *Trichoderma* como agente antagonista de estos hongos y diversificar los métodos de control.

4 HIPÓTESIS

El hongo *Trichoderma harzianum* tiene un efecto antagonista sobre *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii*, tanto *in vitro* como en el cultivo de la cebolla.

5 OBJETIVOS

5.1 General

- Determinar el efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii*.

5.2 Específicos

- Identificar la especie a nivel molecular de una cepa de *Trichoderma sp.* aislada de suelo dedicado a la producción de cebolla, de la región Ciénega de Chapala.
- Evaluar *in vitro* e *in vivo*, el efecto antagónico de la cepa aislada de la región (*Trichoderma sp.*) sobre *S. cepivorum* y *S. rolfsii*.
- Determinar los mecanismos de acción de *Trichoderma sp.* ante cada uno de los patógenos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en dos etapas una *in vitro* y la otra *in vivo*.

6.1 Etapa *in vitro*.

La fase *in vitro* se realizó en los meses de marzo y abril de 2013 en el laboratorio de Fitopatología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán.

6.2 Material biológico

6.2.1 Aislamiento y producción de *Trichoderma harzianum*.

El hongo antagonista se aisló mediante la técnica de diluciones decimales, la cual consistió en diluir 10 g de suelo en un frasco de vidrio con 90 ml de agua destilada estéril, a continuación se agitó con la mano durante cinco minutos. De la primera dilución se tomó 1 ml y se depositó en un tubo de ensayo con tapa rosca que contenía 9 ml de agua destilada estéril, se agitó durante 30 segundos aproximadamente en un agitador vórtex, de ahí se tomaron con una micropipeta 0.3 ml y se colocaron en una caja Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) acidificado con ácido láctico al 85%, esnseguida se incubó durante cuatro días a una temperatura de 25°C ±2. Crecieron varias colonias de hongos, algunas con características morfológicas propias del género *Trichoderma* spp. como es la coloración verde brillante (Rifai, 1969). El aislado se purificó por medio de punta de hifa y fue crecido en PDA. La reproducción del hongo se realizó utilizando bolsas de polipapel de 2 kg en las cuales se agregaron 200 g de arroz y 60 ml de agua destilada, posteriormente fueron esterilizadas dos días seguidos durante 15 minutos a 121 °C, una vez estéril el sustrato se dejó enfriar y después se inoculó con 5 discos de 0.5 cm de diámetro que contenía el micelio de *T. harzianum* crecido en PDA durante ocho días, las bolsas se colocaron en un agitador orbital para matraces con plataforma EBERBACH durante 48 hrs y después se mantuvo en una incubadora digital con control de temperatura de la marca Thermo Electron Corporation® modelo 3721 a una temperatura de 25°C ±2 durante un mes.

6.2.2 Aislamiento y reproducción de patógenos.

Tanto *S. cepivorum* como *S. rolfsii* fueron aislados a partir de esclerocios obtenidos de bulbos de cebollas infestadas colectadas en los campos muestreados. Los esclerocios fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2%, enjuagados cinco veces con agua destilada estéril, secados en papel absorbentes estéril y crecidos en papa dextrosa agar (PDA) durante un mes a una temperatura de 23 y 27 °C para *S. cepivorum* y *S. rolfsii* respectivamente. Para el caso de *S. rolfsii* se adicionaron 50 g de harina de frijol a un litro de medio (PDA) y se esterilizó a 121°C durante 15 min., esto para favorecer la producción de esclerocios del patógeno que serían utilizados para inocular los respectivos tratamientos.

6.2.3 Confrontación *in vitro* de *Trichoderma harzianum* ante *Sclerotium rolfsii*.

La capacidad antagónica de *T. harzianum* fue evaluada enfrentando este hongo con *S. rolfsii* mediante cultivo dual (Cherify Benhamou, 1990). Para ello fue necesario poner en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) dos discos de micelio activo (cultivo de 48 hrs) de 0.5 cm de diámetro, uno de *T. harzianum* y otro de *S. rolfsii*. Los discos se colocaron al mismo tiempo, opuestos y equidistantes de tal forma que el patógeno quedó frente al antagonista. Se utilizaron tratamientos control los cuales consistían en poner un disco de 0.5 cm de diámetro de micelio activo del patógeno y del antagonista en el centro de una caja Petri, individualmente. Cada tratamiento incluido los controles se realizaron con cuatro repeticiones. Finalmente se rotularon cuidadosamente cada una de las cajas y se incubaron a 27 °C. Tanto el crecimiento del antagonista como el crecimiento del patógeno fueron registrados cada 24 hrs. La toma de datos finalizó hasta que el patógeno colonizó toda la caja en el tratamiento control. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) usando la fórmula de Samaniego utilizada por Ezziyyani *et al.*, (2004), $PICR = (R1-R2)/R1*100$ donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno con el antagonista. El porcentaje de parasitismo se determinó a partir del contacto entre ambos hongos, midiendo el avance del antagonista sobre el patógeno.

6.2.4 Confrontación *in vitro* de *Trichoderma harzianum* ante *Sclerotium cepivorum*.

Para el caso de *S. cepivorum* se utilizó la misma metodología anteriormente descrita con la variante de que el disco de 0.5 cm de diámetro con micelio de *S. cepivorum* se sembró dos días antes de colocar a *T. harzianum*, esto debido a que presenta un crecimiento más lento que el antagonista. También cabe mencionar que la temperatura de incubación para este patógeno fue de 23°C.

6.2.5 Clasificación antagónica de *T. harzianum*.

La clasificación del antagonismo de la cepa de *Trichoderma* aislada se determinó utilizando la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), después de 15 días de enfrentamiento. La escala engloba cinco categorías que van del uno al cinco dependiendo el grado de antagonismo, en la categoría 1: *Trichoderma* cubre totalmente la caja Petri y crece sobre el patógeno, en el 2: *Trichoderma* crece en 2/3 de la caja Petri, en el 3: Tanto *Trichoderma* como el patógeno colonizan cada uno la mitad de la caja Petri, en el 4: El patógeno coloniza las 2/3 partes de la caja Petri y finalmente en el 5: El patógeno cubre completamente la caja Petri y crece sobre *Trichoderma*. Después de 15 días de enfrentamiento se determinó el antagonismo.

6.2.6 Porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios.

Después de 30 días de enfrentamiento antagonista-patógeno (15 para *S. cepivorum*) se procedió a contar los esclerocios producidos en cada una de las cajas Petri así como en los controles. El porcentaje de inhibición de los esclerocios se obtuvo mediante el promedio de las cuatro repeticiones por tratamiento.

6.2.7 Parasitismo de *Trichoderma harzianum* en esclerocios de *S. cepivorum* y *S. rolfsii*.

Los esclerocios producidos en las pruebas duales, fueron colectados para evaluar el parasitismo de *Trichoderma*. Para ello primero se lavaron los esclerocios con agua destilada

estéril y posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto, nuevamente se lavaron cinco veces con agua destilada estéril y después se secaron bajo campana de flujo en papel absorbente estéril, finalmente se tomaron al azar 20 esclerocios de *S. rolfsii* y *S. cepivorum* producidos en las pruebas duales, se realizaron cuatro repeticiones haciendo un total de 80 esclerocios evaluados para cada patógeno, los cuales fueron sembrados en PDA e incubados a 27°C (*S. rolfsii*) y 23°C (*S. cepivorum*). Cuatro días después de la siembra se determinó el porcentaje de esclerocios viables y parasitados. Los valores se obtuvieron como el promedio de cuatro repeticiones por patógeno.

6.3 Etapa *in vivo*.

6.3.1 Localización del sitio experimental.

El estudio desarrollado en macetas a campo abierto, se realizó en la comunidad de La Palma, municipio de Venustiano Carranza, Michoacán, a una altitud de 1520 msnm. Se utilizó suelo infestado naturalmente con *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii* obtenido de parcelas productoras de cebolla de dicha comunidad y de parcelas en las que nunca se ha cultivado cebolla, este último suelo fue sometido a esterilización en autoclave a 121 °C (15 Lb de presión) durante tres días seguidos durante una hora cada vez.

6.3.2 Colecta de muestras de suelo.

De parcelas productoras de cebolla se obtuvieron las muestras de suelo, para lo cual el productor ubicó tres sitios donde hubo presencia de la enfermedad en el ciclo del cultivo anterior, estos sitios se marcaron con banderillas numeradas. De cada sitio se obtuvieron tres submuestras para formar una muestra compuesta, la cual se analizó en laboratorio para corroborar la presencia del patógeno. Una vez confirmada la presencia del patógeno se colectó el suelo de 2.5 m de radio de cada área señalada a una profundidad de 10 cm aproximadamente (Conles *et al.*, 2011), de ahí se obtuvieron 200 kg de suelo que fue homogenizado perfectamente antes de ser colocado en las macetas donde se estableció el cultivo (Jiménez *et al.*, 2012).

6.3.3 Caracterización del suelo utilizado.

Con la finalidad de conocer la estructura fisicoquímica del suelo se utilizaron las siguientes metodologías: textura por el método de Bouyucos (Alcántar, 1992), materia orgánica por Walkley-Black (Alcántar, 1992), fósforo por Olsen (Van Reeuwijk, 1999), conductividad eléctrica por medio de pasta de saturación (Alcántar, 1992) y pH con un Potenciómetro y una relación (1:2) suelo: agua (Alcántar, 1992).

6.3.4 Aislamiento de hongos en suelo infestado.

Con la finalidad de conocer cuáles eran algunas de las especies de hongos con los cuales interaccionaba *Trichoderma* en el suelo naturalmente infestado, se procedió a utilizar la técnica de dilución en placa bajo las mismas condiciones y siguiendo el mismo procedimiento utilizado para el caso del aislamiento de *Trichoderma* mencionado anteriormente. Transcurridos cuatro días de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, se transfirieron a PDA las colonias con apariencia distinta. De cada colonia aislada se obtuvo un cultivo puro utilizando la técnica de punta de hifa, posteriormente el cultivo puro se incubó a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante ocho días. Finalmente se realizaron las preparaciones de cada hongo en porta objetos con azul de algodón, para observarlos al microscopio e identificarlos morfológicamente de acuerdo a las características descritas por Barnett y Hunter (1999).

6.3.5 Identificación molecular de la cepa nativa de *Trichoderma* sp.

Una vez pura la cepa de *Trichoderma*, se hizo la extracción del ADN del hongo, así como la amplificación y secuenciación de la región intergenética transcripcional (ITS) del gene rDNA 18S por PCR, llevado a cabo por la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas profesora investigadora del Colegio de Postgraduados.

6.3.6 Determinación de la densidad de inóculo en suelo infestado y viabilidad de los esclerocios de *S. cepivorum* y *S. rolfsii*.

La densidad de inóculo de ambos patógenos se determinó utilizando la técnica de Tamizado húmedo (Adams, 1979). La viabilidad del inóculo se obtuvo poniendo a crecer diez esclerocios previamente desinfectados en una caja Petri con PDA incubados durante cinco días a 25°C. La prueba se realizó por triplicado para ambos patógenos.

6.3.7 Diseño experimental del ensayo *in vivo*.

Durante cuatro meses (20 de Enero al 20 de Mayo de 2013) fue establecido un experimento en macetas a campo abierto en una explanada cerca del sitio de recolección del suelo con antecedentes de alta incidencia de la enfermedad, considerado en el ensayo como suelo infestado. Se trabajó con un diseño en bloques al azar con 10 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estaba compuesta por cuatro macetas con dos kg de suelo y dos bulbos de cebolla cada una de la variedad Suprema. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: 1. *S. cepivorum*-*Trichoderma*, 2. *S. cepivorum*, 3. *S. cepivorum*-Químico, 4. *Trichoderma*, 5. Control, 6. *S. rolfsii*, 7. *S. rolfsii*-*Trichoderma*, 8. Suelo infestado, 9. Suelo infestado-*Trichoderma* y 10. Suelo infestado-Químico. En los primeros siete tratamientos, el suelo fue sometido al proceso de esterilización en autoclave a 121 °C, durante tres días seguidos, una hora cada día. En los tratamientos químicos se utilizó el ingrediente activo Tebuconazole y el tratamiento control únicamente contenía suelo estéril.

En el caso de *Trichoderma harzianum*, después de mantenerlo por más de 15 días en incubación para que esporulara lo suficiente, se procedió hacer la aplicación de inóculo a los respectivos tratamientos. Las densidades que se aplicaron correspondieron a 4.1×10^4 , 5.8×10^6 y 6.4×10^6 conidios/mL a los 0, 30 y 60 días después del trasplante (ddt) respectivamente. La primera y tercera aplicación se realizó de manera sólida aplicando 20 g de arroz inoculado al momento del trasplante y a los 60 ddt. La segunda aplicación fue un concentrado líquido de conidios equivalente a 3 ml por planta o bien 6 ml por maceta. Los patógenos *S. cepivorum* y *S. rolfsii* fueron inoculados con una densidad de 0.2 esclerocios/g de suelo aplicados al momento del trasplante.

6.3.8 Incidencia y severidad de la enfermedad.

Se realizaron revisiones periódicas cada semana para determinar la incidencia de la enfermedad causada por cada uno de los patógenos evaluados, la cual se determinó mediante la fórmula: $\%I = \text{Número de plantas enfermas} * 100 / \text{Número total de plantas}$. La severidad se determinó de acuerdo a una escala de cinco clases utilizada por Moreno y Acevedo (2002). La escala comprende las siguientes categorías: clase 0: Plantas sanas, sin síntomas; clase 1: 1 a 25% de hojas con amarillamiento apical, marchitamiento inicial; clase 2: 26 a 50% de hojas con amarillamiento, inicio de muerte descendente; clase 3: 51 a 75% de hojas amarillas y necrosadas, muerte descendente avanzada; clase 4: 76 a 100% del tejido necrótico, bulbos con formación de micelio blanquecino y esclerocios.

6.3.9 Registro de temperaturas.

Durante cuatro meses que permaneció el experimento en condiciones de campo se registró diariamente la temperatura con la ayuda de un termómetro de máximas y mínimas, marca ACURITE® modelo 880. Con los valores registrados, se determinó la temperatura media mensual, así como el promedio de todo el periodo de evaluación.

6.3.10 Riego y fertilización.

Se aplicó un riego ligero por goteo (1.25 L por maceta) cada semana que incluía la fertilización, misma que estaba compuesta de Fosfonitrato, ATS, Multi-K, Multi-K-S, Map, Calcio y Magnisal en las siguientes concentraciones 9, 1.4, 2.5, 2.5, 98, 2.2 y 1.2 kg/ha⁻¹ diluidos en 200 L de agua respectivamente, la fertilización se ajustaba semanalmente dependiendo del desarrollo fisiológico de la planta.

6.3.11 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de las pruebas *in vitro* e *in vivo* se analizaron por GLM mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) para determinar

diferencias significativas entre tratamientos, con el programa
Statistic Analysis System (SAS Institute, 1988).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Confrontación *in vitro* de *Trichoderma harzianum* ante *S. rolfsii*.

La confrontación antagónica de *T. harzianum* ante *S. rolfsii* fue más agresiva y evidente mostrando ambos microorganismos una fuerte competencia por el sustrato ya que crecieron de forma rápida y unieron sus micelios a las 44 hrs de enfrentamiento en la mitad de la caja Petri, a partir de este momento los micelios de los hongos formando un fuerte halo de inhibición el cual se fue tornando de color café claro debido a la degradación del micelio de *S. rolfsii* al tiempo que *T. harzianum* mantuvo una fuerte esporulación en este sitio de inhibición. Sin embargo, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) obtenido de la evaluación de *T. harzianum* sobre el patógeno fue de 9.8 % y 17.4 % a las 24 y 48 horas (Figura 1). A partir de las 48 horas de enfrentamiento se dejó de evaluar el PICR ya que el testigo había llenado completamente la caja Petri, no obstante se continuaron las evaluaciones del crecimiento de *T. harzianum* para determinar el porcentaje de micoparasitismo hasta los 15 días, por lo que a partir del segundo día se consideró como tal. Bajo estas condiciones se mantuvo una fuerte competencia entre el antagonista y el patógeno, ambos resistiendo el mecanismo de su contrincante y compitiendo por espacio, por nutrientes y posiblemente por oxígeno tal como lo mencionan (Sivan y Chet, 1989; Inbar y Chet, 1997) ya que ninguno accedía a dejar pasar a su oponente. Transcurridas 96 horas *S. rolfsii* comenzó a formar rizomorfos que comenzaron a sobrepasar a *T. harzianum* no obstante, de acuerdo a las observaciones en el microscópio, las estructuras del patógeno fueron afectadas tres días después de que estas crecieron sobre el antagonista. Transcurridas 240 y 360 hrs se procedió a evaluar el porcentaje de micoparasitismo el cual aumentaba a medida que el tiempo transcurría, en este sentido *Trichoderma harzianum* logró destruir las hifas del patógeno. A los 10 y 15 días se muestra también el grado de micoparasitismo (Figura 1).

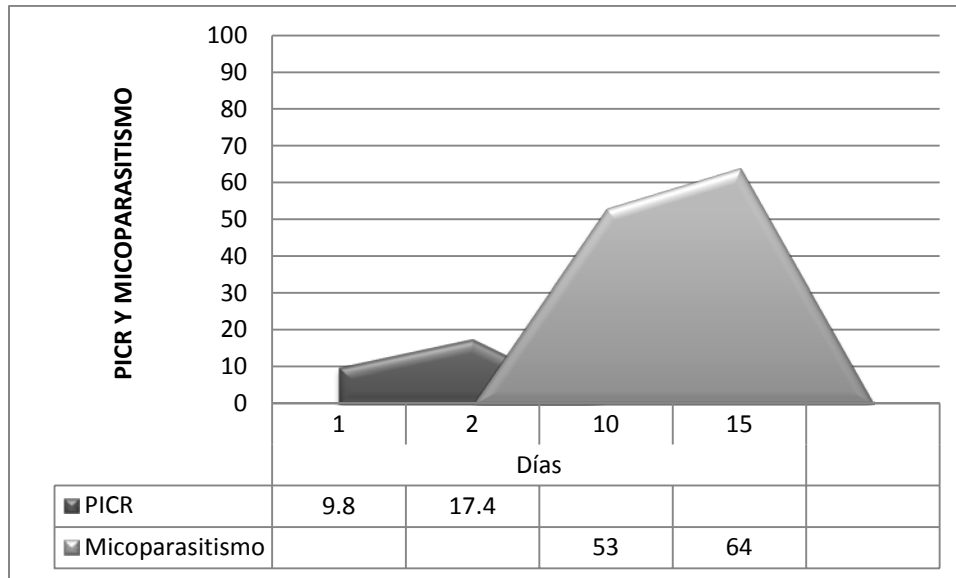


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y micoparasitismo de *T. harzianum* frente a *S. rolfsii*.

PICR fueron obtenidos por Folgueras *et al.* (2008), al evaluar también el efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii* y dos especies de *Fusarium* encontrando que *Trichoderma* spp. mostró una mejor inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* al lograr un PICR de 62.5% a las 96 horas de evaluación en cultivo dual; no obstante, la temperatura de incubación no es reportada por estos autores, sin embargo, se considera que la temperatura tiene un efecto importante sobre la capacidad del antagonista o la agresividad del patógeno si fuera el caso de que la temperatura sea óptima para alguno de los dos, lo que favorece a uno de los organismos y deja en desventaja al otro. Al respecto Rollan *et al.* (1999), evaluaron la capacidad antagónica de varias especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. harzianum* frente a *S. rolfsii* a diferentes temperaturas (15, 20, 25 y 30°C) y encontraron mejores resultados a temperatura de 25°C debido a que lograron un buen porcentaje de colonización y parasitismo de los esclerocios. El mayor porcentaje de colonización para *T. harzianum* se obtuvo a una temperatura de 25°C y el menor a una de 30°C, evidenciando la importancia de la temperatura al hacer una evaluación *in vitro*. Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran también buenos porcentajes de colonización y parasitismo de esclerocios a pesar de haber evaluado a 27°C (Figura 2). Por su parte Rollan *et al.* (1999), mencionan que a una temperatura de 30°C *S. rolfsii* presentó un desarrollo

activo y fue capaz de crecer y anular el efecto ejercido por *Trichoderma* spp. En otro estudio realizado por Choudary *et al.* (2007), al evaluar *in vitro* la capacidad antagonista de 13 aislamientos de *Trichoderma* encontraron que la cepa Th 001 resultó ser la mejor al lograr inhibir 83% el crecimiento radial de *S. rolfsii*, así como también inhibió en 92 y 80% el crecimiento radial de *R. solani* y *F. oxysporum* respectivamente. A pesar de que en este trabajo se lograron (PICR) menores a los de estos autores, el micoparasitismo ejercido por el antagonista resultó ser muy efectivo. Resultados más contrastantes a los obtenidos en el presente estudio fueron reportados por Michel *et al.* (2005) citado por Calvo *et al.* (2012), los cuales mencionan porcentajes de inhibición de crecimiento de 94% contra *S. rolfsii*.



Figura 2. Esclerocios de *S. rolfsii* colonizados por *T. harzianum* a los 30 días de evaluación a 27 °C.

Por otro lado, González *et al.* (2008), evaluaron también la capacidad antagonista de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre patógenos del cultivo de frijol, entre ellos *S. rolfsii*, y encontraron que la cepa C-66 que pertenecía a *T. viride*, seguido de *T. harzianum* A-34 que fueron las que mostraron mejor actividad hiperparasítica ante *S. rolfsii*. En este sentido y tomando en consideración las observaciones macroscópicas y microscópicas que se hicieron en este estudio, *T. harzianum* presentó una fuerte interacción micoparasítica una vez que los micelios de ambos organismos interaccionaron. Antes de la interacción de los micelios ya existía cierto porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* por lo que es probable que *T. harzianum* haya estado compitiendo con algún antibiótico volátil. En este sentido Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), mencionan que *Trichoderma* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios que actúan a corta o larga distancia como es

el caso de los antibióticos polares y los volátiles. Así pues, Dal Bello *et al.* (1997), mencionan que en cultivo *in vitro* *T. hamatum* logró inhibir el crecimiento micelial de *S. rolfsii* mediante la producción de metabolitos volátiles, sin embargo, observaron que el efecto de inhibición disminuía a medida que transcurría el periodo de exposición.

Cabe la posibilidad de que al momento de la interacción de los diferentes micelios se presentaran micoparasitismo y a la vez antibiosis del tipo de los peptaiboles o los compuestos polares, que son metabolitos que actúan a corta distancia ya que de acuerdo con Jensen y Wilffhechel (1995), *Trichoderma* puede utilizar varios mecanismos a la vez para hacer más efectivo su antagonismo.

7.2 Confrontación *in vitro* de *Trichoderma harzianum* ante *S. cepivorum*.

A pesar de que *S. cepivorum* se estableció dos días antes que *T. harzianum*, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial fue evidente, porque solo transcurrieron 24 hrs de establecer la prueba dual para obtener un valor de 9.09 % y de 22.2% a las 72 hrs (Figura 3). Precisamente a los tres días se dejó de medir el PICR ya que los controles habían llenado por completo la caja. A los diez días de establecida la prueba se determinó el micoparasitismo sobre el patógeno (Figura 3), al mismo tiempo en el cual la producción de esclerocios mostró diferencias significativas.

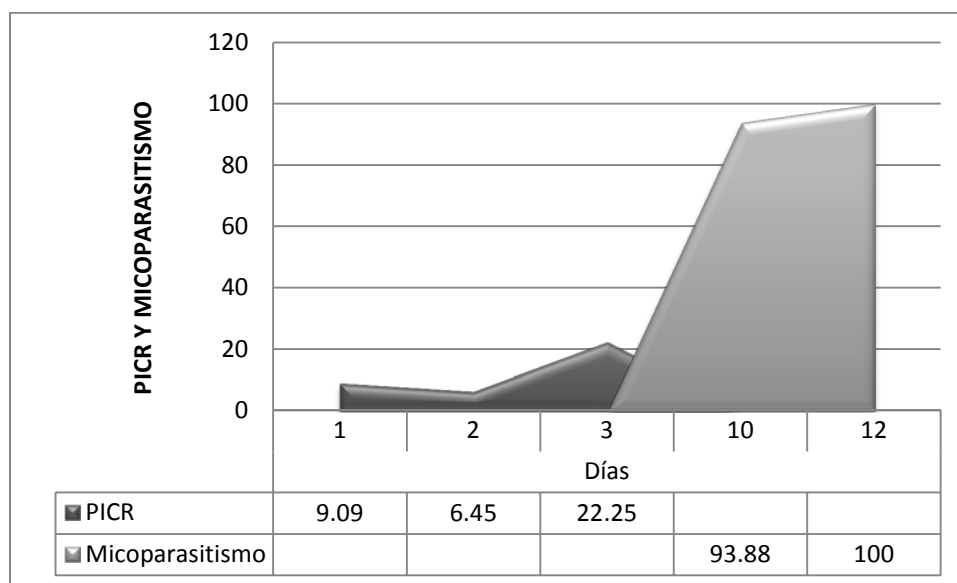


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y micoparasitismo de *T. harzianum* frente a *S. cepivorum*.

A los 12 días de evaluación, *T. harzianum* logró crecer en el 100% de la caja Petri, colonizando los esclerocios de *S. cepivorum* (Figura 4), creciendo sobre el patógeno e incrementando su esporulación principalmente en la zona donde se habían formado los esclerocios del patógeno. También en ensayo *in vitro* Obregón (2001) evaluó a *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotium cepivorum* y encontró potencial antagónico para combatir la pudrición blanca de la cebolla causada por este patógeno debido a que presentó una invasión de 50 a 75%. Se logró observar una competencia por espacio y nutrientes por parte de *Trichoderma* ya que rápidamente colonizó gran parte de la caja Petri, esta característica de competencia respecto al crecimiento acelerado del antagonista la señala Reyes *et al.* (2008) y la considera como un mecanismo importante principalmente en cultivo *in vitro*.



Figura 4. *T. harzianum* colonizando la superficie de esclerocios de *S. cepivorum* a los 15 días de evaluación a 23 °C.

La especificidad que tiene el antagonista por el patógeno es otra de las características importantes que deben considerarse al hacer una evaluación ya que diversas investigaciones

han manifestado alta especificidad entre antagonista-patógeno y uno de esos autores es Hoyos *et al.* (2008), los cuales evidenciaron alta especificidad de los aislamientos de *Trichoderma* por el patógeno y consideran que *Trichoderma* es altamente selectivo en su ataque, inclusive la efectividad de una misma especie pero diferente aislamiento tiende a ser distinta ya que ellos encontraron que *T. asperellus* T-71 fue específico para *S. rolfsii* pero no para *R. solani*, y *T. asperellus* T-109 muy efectivo contra *R. solani*.

En el presente trabajo *Trichoderma* logró controlar en menor tiempo a *S. cepivorum* que a *S. rolfsii*, siendo posible que exista un grado de especificidad del antagonista ante cada patógeno tal y como lo mencionan Hoyos *et al.* (2008). Es posible que la inhibición que se llevó a cabo en esta prueba se deba a la capacidad de *Trichoderma* para colonizar el medio de cultivo debido a que su crecimiento es más activo que el de *S. cepivorum* o bien por esta especificidad que pudiera tener esta cepa ante este patógeno y no igual ante *S. rolfsii*.

7.3 Clasificación antagónica de *Trichoderma harzianum*.

Transcurridos 15 días de confrontación, se procedió a determinar el grado de antagonismo obteniendo los siguientes resultados: en el enfrentamiento de *T. harzianum* contra *S. cepivorum* tres días antes de la determinación del antagonismo, la cepa del antagonista colonizó por completo el sustrato creciendo sobre el patógeno en su totalidad, mostrando una interacción micoparasítica sobre los esclerocios que se formaron hasta ese momento, en los cuales el antagonista esporuló de forma abundante; con base en estos resultados le fue asignada la calificación 1 en la escala de Bell *et al.* (1982).

En el caso del enfrentamiento de *T. harzianum* contra *S. rolfsii*, este patógeno mostró resistencia frente al antagonista 24 horas después de que los micelios se encontraran, posteriormente formo rizomorfos que le permitieron crecer sobre el antagonista, no obstante, *T. harzianum* destruyó estas estructuras y ejerció una fuerte interacción micoparasítica ante el patógeno. Estos resultados coinciden con los reportados por Alvarado *et al.* (2011), ellos mencionan que en el punto de confrontación entre *S. rolfsii* y *Trichoderma* se detectó una banda color crema donde *S. rolfsii* extendió sus hifas por

encina de *Trichoderma*. Sin embargo, mencionan que después de varios días se observó una degradación paulatina del micelio del patógeno.

A los 15 días de enfrentamiento, *Trichoderma* logró colonizar dos terceras partes de la caja Petri y en este sentido se le otorgó a este patógeno un grado de antagonismo 2 dentro de la escala de Bell *et al.* (1982). *S. rolfsii* se caracteriza por ser un patógeno de crecimiento rápido por lo que obtener una cepa con un grado de antagonismo 2 resulta ser bueno. Al respecto, Hernández (2005) citado por Arzate *et al.* (2006), evaluó 6 cepas de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii* y clasificó el antagonismo en las clases 2, 3, 4 y 5. Asimismo Michel *et al.* (2005), citado también por Arzate *et al.* (2006), reportaron que de 20 cepas evaluadas solo tres detuvieron el crecimiento de *S. rolfsii* con la clase 1 y 2 y en el resto de las cepas los fitopatógenos fueron más agresivos con antagonismo 4 y 5. Estos resultados manifiestan la agresividad del patógeno para competir por espacio y nutrientes al igual que *Trichoderma*. En otro estudio realizado por Corrêa *et al.* (2007), evaluaron 20 especies nativas de *Trichoderma* y una cepa comercial, encontraron que todas las cepas evaluadas mostraron inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* en cultivo dual, logrando porcentajes de inhibición que oscilaron entre 18,97 y 44,12% con respecto al testigo. Sin embargo, las cepas CEN220, CEN249, CEN260, CEN262 y CEN266 lograron colonizar y esporular sobre *S. rolfsii* a las 120 horas por lo que les fue asignada la calificación 1 en la escala de Bell *et al.* (1982). Es importante mencionar que la temperatura a la que ellos evaluaron fue a 25 °C y en este trabajo la temperatura fue de 27 °C. De acuerdo con Rollan *et al.* (1999), al evaluar diferentes especies de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfsii* encontraron diferentes porcentajes de colonización y parasitismo al evaluar a temperaturas distintas. En este sentido, reportan que las especies de *Trichoderma* evaluadas mostraron los porcentajes de colonización más altos contra *S. rolfsii* cuanto fueron evaluadas a temperaturas de 20 y 25 °C. Sin embargo, cuando la temperatura de incubación fue de 30 °C, a pesar de que *Trichoderma* logró buena colonización, a los 10 días de incubación *S. rolfsii* creció sobre el antagonista y formó esclerocios, logrando con esto anular el efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma*. La temperatura evaluada en nuestro ensayo resulta ser favorable para un buen desarrollo del patógeno, sin embargo,

éste no logró crecer sobre *T. harzianum*, al contrario fue el antagonista quien parasitó al patógeno y esporuló sobre él en las pruebas duales (Figura 5).

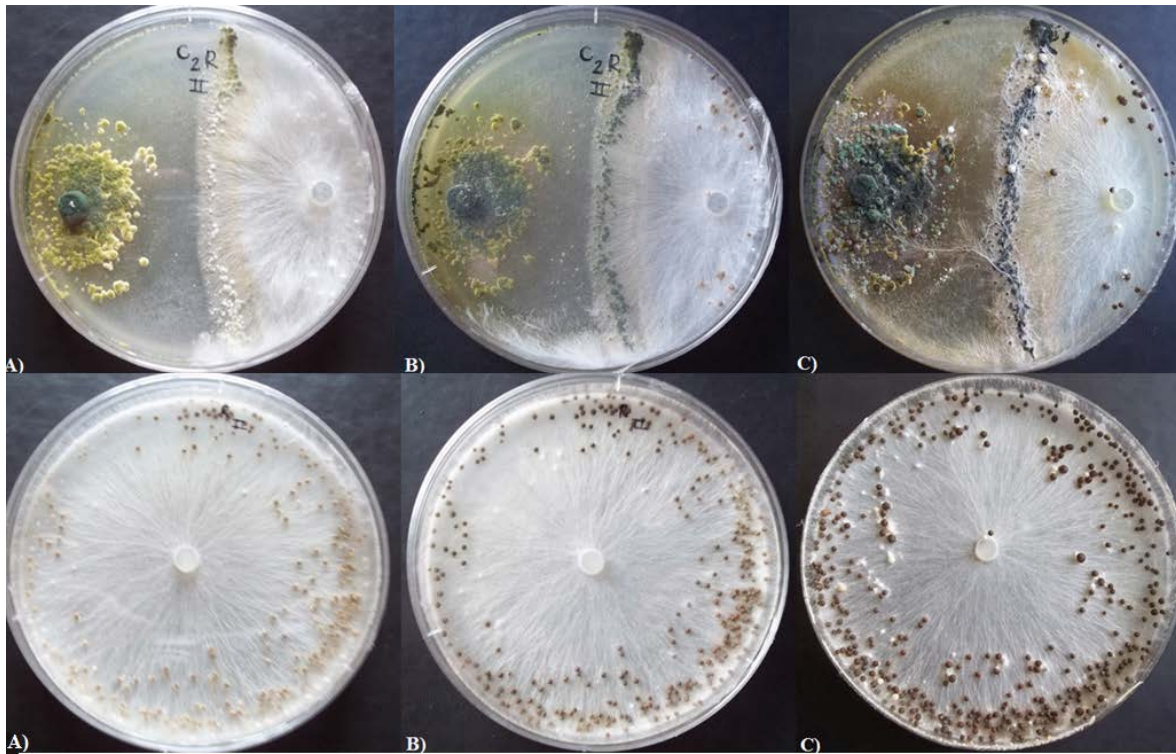


Figura 5. Pruebas duales y controles de *T. harzianum* frente a *S. rolfsii* (Días de enfrentamiento: A=7, B=10 y C=30).

De acuerdo con Michel (2001), entre menor sean los días de contacto entre el antagonista y el patógeno más agresividad existe por parte del hongo antagonístico o bien menor resistencia del fitopatógeno, cuestión que también ha sido referida por Guédez *et al.* (2012). En este sentido, Hernández (2005) citado por Arzate *et al.* (2006), reporta contacto después del segundo día después de la siembra, entre *Trichoderma* spp. y *S. rolfsii*. Sin embargo, en el presente trabajo el tiempo que transcurrió antes de que los micelios de *Trichoderma harzianum* y *S. rolfsii* se unieran fue de 44 hrs después de la siembra, por lo que se considera un tiempo corto. Considerando lo mencionado por Michel (2001), *Trichoderma* mostró agresividad ante el patógeno, sin embargo, debido a que la unión de los micelios se dio en la mitad de la caja Petri, se podría considerar que el patógeno también presentó un grado elevado de agresividad frente al antagonista.

7.4 Porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios de *S. cepivorum* y *S. rolfsii*.

En el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios se evidenciaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en ambos patógenos con respecto al testigo. Se puede observar que en el caso de *S. cepivorum* (Figura 6), la inhibición de estructuras de resistencia por parte de *T. harzianum* fue mayor que la que se obtuvo en las pruebas con *S. rolfsii* (Figura 7).

La formación de esclerocios de *S. cepivorum* en el testigo se presentó a los ocho días después de la siembra a 23 °C, no obstante en la prueba dual fue hasta los nueve días cuando comenzaron a formarse los primeros esclerocios del patógeno, logrando con esto el antagonista retrasar 24 horas la formación de estructuras de resistencia por parte del patógeno. La producción de esclerocios después de haber transcurrido 15 días de enfrentamiento en la prueba dual (Figura 6), en promedio fue de 211 esclerocios por caja, comparado con 4,292 esclerocios en el testigo en el cual estaba ausente *Trichoderma harzianum*, logrando con esto un porcentaje de inhibición de 95.09 %. Cabe mencionar que los esclerocios que lograron formarse, no obstante que fueron pocos a los 15 días, también *Trichoderma* logró colonizarlos y esporular fuertemente sobre ellos.

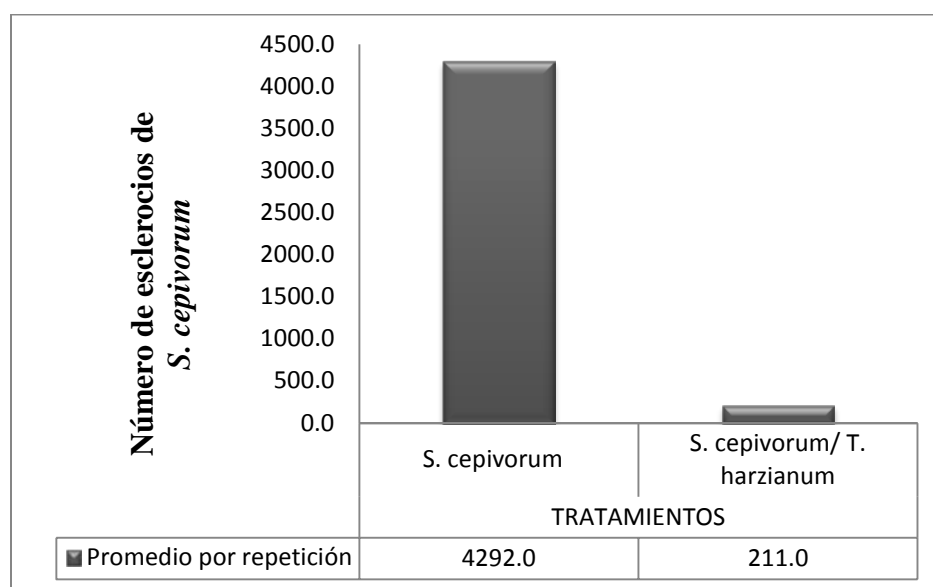


Figura 6. Producción de esclerocios de *S. cepivorum* en cultivo dual.

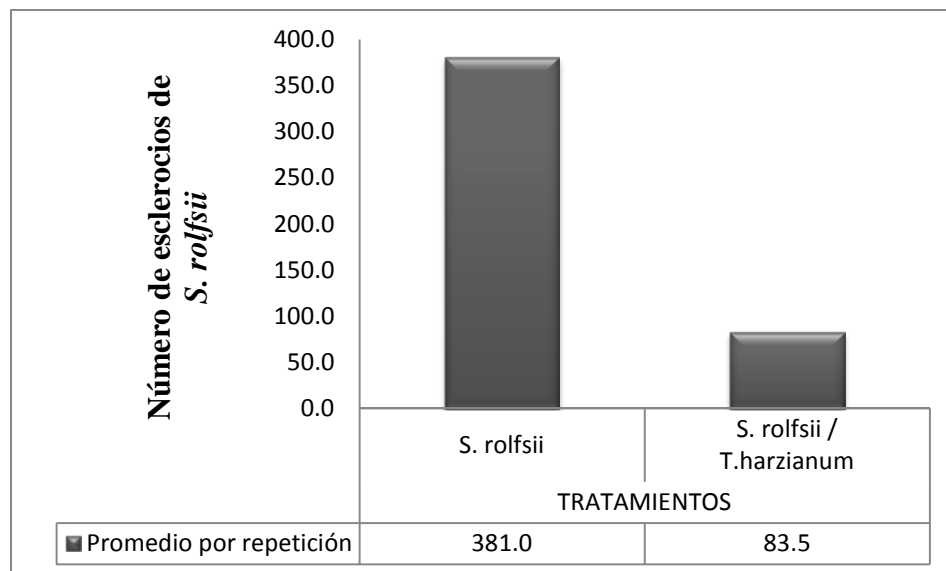


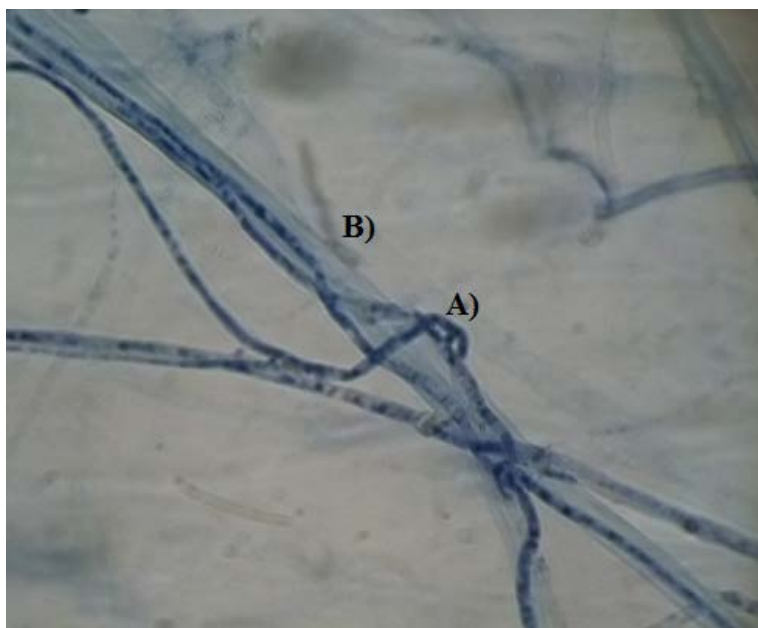
Figura 7. Producción de esclerocios de *S. rolfsii* en cultivo dual.

Por otro lado, *T. harzianum* mostró mayor capacidad para inhibir los esclerocios de *S. rolfsii* que la que presentó al inhibir el crecimiento radial de este patógeno. A diferencia de *S. cepivorum*, en *S. rolfsii* el antagonista logró retrasar la formación de esclerocios 84 hrs, ya que en las cajas que contenían el testigo los primeros esclerocios se formaron a las 84 hrs después de la siembra (dds) a 27 °C, no obstante en la prueba dual se presentaron después de transcurridas 168 hrs. Estos resultados coinciden en parte con los reportados por Alvarado *et al.* (2011), al obtener también retraso en la producción y número de esclerocios. Estadísticamente se presentaron diferencias en la producción de esclerocios al comparar los promedios de las pruebas duales con los de los testigos. Para este patógeno y debido a la resistencia que presentó ante el antagonista se logró evaluar la producción de esclerocios después de transcurridos 30 días de enfrentamiento. Para este periodo el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios fue de 78.1 % con respecto al testigo ya que este último logró producir en promedio 381 esclerocios por caja y en las pruebas dual solamente se formaron en promedio 83.5 esclerocios. Al igual que en *S. cepivorum*, también contra *S. rolfsii*, *T. harzianum* logró colonizar y esporular sobre los esclerocios pero en menor medida y hasta los 30 días, a diferencia de *S. cepivorum* el cual fue invadido después de 15 días en cultivo dual.

En un estudio realizado por Dal Bello *et al.* (1997), al evaluar los metabolitos volátiles producidos por *T. hamatum* contra patógenos del suelo, encontraron que estos compuestos provocaban variaciones en el aspecto y color de los patógenos y en el caso de *S. rolfsii*, los compuestos volátiles de *T. hamatum* lograron inhibir por completo la formación de esclerocios después de transcurridos 20 días de evaluación. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo en cuanto a diferencias significativas en la producción de esclerocios fueron obtenidos por Flores *et al.* (2006), los cuales evaluaron dos concentraciones de aceite de Nim, *Trichoderma* sp. y Vitavax-200 encontrando diferencias altamente significativas en los tres tratamientos con respecto al testigo y logrando además un porcentaje de inhibición del 100% al utilizar el fungicida Vitavax. Otras investigaciones han sido reportadas respecto a la inhibición de los esclerocios de *S. rolfsii* pero utilizando extractos vegetales e incluso una combinación de extractos vegetales y *Trichoderma*. Recientemente también Alvarado *et al.* (2011), lograron evaluar la compatibilidad que tiene los extractos vegetales del orégano (*Lippia origanoides*) y neem (*Azadirachta indica*) con *Trichoderma harzianum* y determinaron el efecto que tienen los extractos solos y en combinación con *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial y la formación de esclerocios de *S. cepivorum* y *S. rolfsii*, encontrando diferencias altamente significativas ($P \leq 0,01$) en los tratamientos. Los tratamientos que contenían extracto de orégano inhibieron el crecimiento micelial de *S. rolfsii* en un 100%, pero al estar el extracto de orégano y *Trichoderma harzianum* juntos, éste último estimuló el crecimiento del patógeno. En las evaluaciones contra *S. cepivorum* también encontraron diferencias altamente significativas, el antagonista mostró habilidad no solo para reducir el crecimiento micelial sino también para parasitar e inhibir la germinación de esclerocios. Sin embargo, la acción antagónica de *Trichoderma* fue más efectiva con *S. cepivorum* que con *S. rolfsii*. (Alvarado *et al.*, 2011). Estos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación ya que también *Trichoderma harzianum* logró un mejor control tanto del crecimiento micelial como de la formación y parasitismo de esclerocios al enfrentarse a *S. cepivorum* que con *S. rolfsii*.

7.5 Parasitismo de *Trichoderma* en micelio y esclerocios de *S. cepivorum* y *S. rolfsii*.

La cepa de *T. harzianum* evaluada en el presente trabajo mostró aparentemente poca efectividad para inhibir el crecimiento del micelio de los patógenos, no obstante manifestó una excelente capacidad para parasitar y destruir tanto el micelio como los esclerocios, principalmente de *S. cepivorum* que fueron los que presentaron mayor parasitismo. Los resultados obtenidos en la interacción hifal durante la evaluación de *T. harzianum* con *S. rolfsii* coinciden con los reportados por otros autores. En este caso *T. harzianum* también mostró enrollamiento en las hifas del patógeno (Figura 8) como lo han reportado diferentes autores (García *et al.*, 2006; Yaqub y Shahzad, 2010; Alvarado *et al.*, 2011).



**Figura 8. Enrollamiento de hifas de *T. harzianum* A) sobre hifas de *S. rolfsii* B).
Visto al microscopio a 40X**

Observaciones al microscopio confirmaron la interacción hifal, mostrándose deformación de hifas, desprendimiento del micelio y en etapas avanzadas lisis y degradación total de las hifas (Figura 9). De acuerdo a los cuatro tipos de interacción hifal que presenta *Trichoderma* (lisis, vacuolación, enrollamiento y penetración) Martínez *et al.* (2008), la

cepa evaluada en el presente ensayo presentó al menos dos de estos mecanismos como fue el caso de la lisis y enrollamiento aunque posiblemente también la vacuolación.

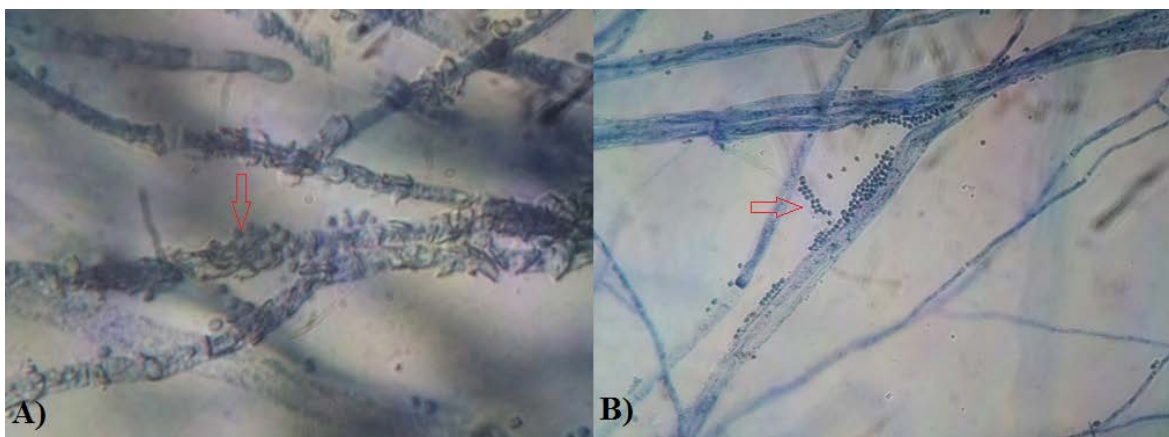


Figura 9. Micoparasitismo de *T. harzianum* sobre *S. rolfsii*. A) Lisis del micelio de *S. rolfsii* visto al microscopio a 100X. B) Conidios de *T. harzianum* sobre el micelio de *S. rolfsii* visto al microscopio a 40X.

Por otro lado, *T. harzianum* fue capaz de crecer y esporular sobre los esclerocios de *S. cepivorum* y *S. rolfsii*, no obstante fue más evidente el parasitismo en los esclerocios del primer patógeno a pesar de que el tiempo de exposición frente al antagonista fue de 15 días en comparación a los 30 días que duró el enfrentamiento con *S. rolfsii*. Trabajos sobre el micoparasitismo que ejercen algunas especies de *Trichoderma* sobre los esclerocios producidos por algunos patógenos ya han sido reportados, como es el caso de Mónaco *et al.* (1998), los cuales evaluaron la capacidad de *T. harzianum* y *T. koningii* de parasitar esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* encontrando al cabo de un mes altos porcentajes de parasitismo en ambas especies, además de que *T. harzianum* tiene la capacidad de destruir los esclerocios de este patógeno.

Granados (2004), al evaluar el efecto antagónico de hongos asociados a esclerocios de *S. cepivorum* encontró diferentes antagonistas, entre ellos ocho aislamientos de *Trichoderma* de los cuales tres fueron efectivos (T2, T3 y T6), no obstante los mejores resultados los encontró con antagonistas como *Gliocladium* sp. y *Beauveria bassiana*, En el presente trabajo, con *T. harzianum* se obtuvieron mejores resultados respecto al parasitismo de esclerocios de *S. cepivorum*, al obtener porcentajes mayores al 90 % (Figura 10). Para el

caso de *S. rolfsii* los porcentajes de parasitismo fueron menores que los de *S. cepivorum*, no obstante se encuentran por encima del 50%. Respecto a eficiencia de ambos patógenos, los resultados obtenidos concuerdan con los de Alvarado *et al.* (2011), quienes mencionan que *T. harzianum* mostró mayor eficiencia en el control de *S. cepivorum* que con *S. rolfsii* debido a la capacidad que tiene para reducir el crecimiento micelial y parasitar los esclerocios.

Por otra parte, Rollan *et al.* (1999), obtuvo diferentes porcentajes de parasitismo de esclerocios de *S. rolfsii* al evaluar a diferentes temperaturas seis especies de *Trichoderma* (*T. koningii*; *T. hamatum*; *T. pseudokoningii*; *T. harzianum*; *T. aureoviride* y *T. longibrachiatum*) encontrando para el caso de *T. harzianum* porcentajes menores al 20% cuando evaluaron a 15 y 20 °C, los mejores porcentajes los obtuvieron a 25 °C con valores mayores al 60% y los peores a 30 °C temperatura a la cual solo *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* fueron efectivos. Estos resultados coinciden con los de este trabajo, con porcentajes de parasitismo por arriba del 50% a una temperatura de 27 °C en el caso de *S. rolfsii*.

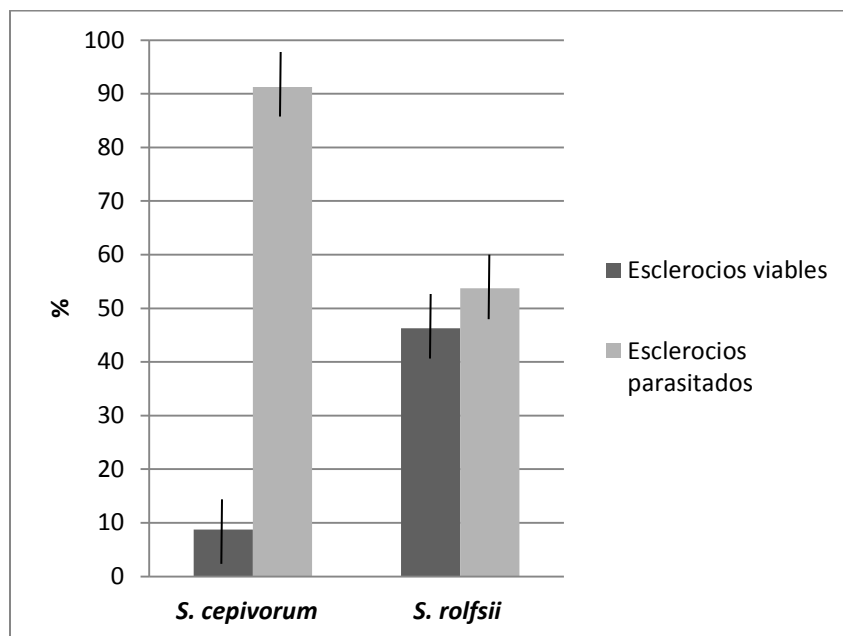


Figura 10. Porcentaje de esclerocios de *S. cepivorum* (15 días) y *S. rolfsii* (30 días) parasitados por *Trichoderma harzianum*.

7.6 Caracterización del suelo utilizado en el experimento.

Algunas de las características fisicoquímicas del suelo utilizado en este trabajo se presentan en el cuadro 1. El porcentaje de materia orgánica se encuentra por debajo de lo recomendado para el cultivo de cebolla según Bruzón (1988) citado por Vallejo y Estrada (2004), quienes reportan porcentajes mayores a 4% para este cultivo. Respecto al pH, Aljaro *et al.* (2009) mencionan valores ligeramente ácidos que van de 6 a 6.5 para el cultivo; en este sentido, el suelo esterilizado está dentro del rango que mencionan los autores y el suelo infestado está ligeramente por debajo. Los valores de conductividad eléctrica del suelo están dentro de los tolerados para el cultivo los cuales son de 0.887 dS/m y 0.751 dS/m para el suelo estéril e infectado a una temperatura de 23.7 y 24.4 °C respectivamente, y de acuerdo con Aljaro *et al.* (2009) recomiendan valores menores a 1,2 dS/m por lo que se consideran buenos.

Cuadro 1. Caracterización físicoquímica del suelo utilizado

| Suelo | M.O. (%) | Textura | pH | C.E (dS/m) | Fósforo (ppm) |
|------------------|----------|-----------|------|------------|---------------|
| Estéril | 3.376 | Arcillosa | 6.11 | 0.887 | 16.24 |
| Infestado | 2.961 | Arcillosa | 5.94 | 0.751 | 27.82 |

7.7 Determinación de hongos en suelo infestado.

De acuerdo al método de aislamiento de dilución en placa y a las características descritas por Barnett y Hunter (1999) para hongos imperfectos, se lograron aislar e identificar a partir del suelo utilizado en este trabajo 6 hongos que pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*, este último utilizado como antagonista contra los patógenos *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum*, los cuales también estaban presentes en el suelo utilizado. Ria y Saxena (1975), encontraron colonizando esclerocios de *S. sclerotiorum* a los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium*. Así también, McLean *et al.* (2001), encontraron colonizando en este caso esclerocios de *S. cepivorum* los géneros *Fusarium*, *Mucor* y *Trichoderma*. En este sentido, los géneros encontrados en este trabajo coinciden con los que reportan diferentes autores, quienes mencionan que son los géneros más comúnmente encontrados en suelo y a los cuales

agregan otros como *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Monilia*, entre otros (Mayea *et al.*, 1991; Giri *et al.*, 2005) citados por (Arias y Piñeros, 2008).

7.8 Identificación molecular de la cepa nativa de *Trichoderma* sp.

La cepa aislada del suelo de la región cebollera, que inicialmente se identificó como *Trichoderma* a nivel morfológico, se confirmó su identidad a nivel de especie como *Trichoderma harzianum*, al compararla con la base de datos del GenBank. La comparación de las secuencias moleculares obtenidas del hongo, indicó que se alineó con las secuencias del teleomorfo *Hypocrea lixii* (número de acceso MIAE00042) correspondiente a *Trichoderma harzianum* con la máxima identidad (100%). En el (Cuadro 2) se muestra la secuencia que se obtuvo y que fue comparada con los datos del GenBank.

Cuadro 2. Secuencia depurada de *Trichoderma harzianum*

```
GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC
AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCCGCCGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTTT
ATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTG
TCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTA
GCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGC
ACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACC
TCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
```

7.9 Determinación de la densidad de inóculo en suelo infestado y viabilidad de los esclerocios.

La densidad de inóculo inicial presente en las muestras de suelo infestado naturalmente por *S. cepivorum* y *S. rolfsii* fue de 0.21 y 0.012 esclerocios/G⁻¹ de suelo respectivamente. La viabilidad fue mayor en esclerocios de *S. rolfsii* ya que presentó un porcentaje de germinación de 96.6 % mientras que para *S. cepivorum* fue de 83.3%. Resultados similares fueron reportados por Ulacio *et al.* (2011), para *S. cepivorum* quienes trabajaron en una

parcela con diferentes grados de infestación y la dividieron en 12 subparcelas y la densidad inicial mayor que se presentó en una de las subparcelas fue de 270 esclerocios/Kg⁻¹ de suelo de los cuales 235 fueron esclerocios viables.

7.10 Incidencia de la enfermedad.

Durante la evaluación *in vivo*, la incidencia de la enfermedad provocada por *S. cepivorum* a los 25 ddt fue nula, a diferencia de *S. rolfsii* que para esta fecha provocó los primeros síntomas de amarillamiento característicos del ataque de este patógeno, con un porcentaje de incidencia de 18.8% en los tratamientos 6 (Suelo estéril-*S. rolfsii*) y 7 (Suelo estéril-*S. rolfsii*-*Trichoderma*), siendo su incidencia final de 50.0% y 53.1% respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Incidencia final y grado de severidad causada por *S. cepivorum* y *S. rolfsii*.

| Tratamiento | Nº total de plantas | Nº de plantas enfermas | Incidencia (%) | Grado de severidad | (%) Plantas muertas |
|---|---------------------|------------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| 1. <i>S. cepivorum</i> - <i>Trichoderma</i> | 32 | 8 de * | 25.00 | 1 | 0 |
| 2. <i>S. cepivorum</i> | 32 | 21 a | 65.63 | 1 | 0 |
| 3. <i>S. cepivorum</i> -Químico | 32 | 5 ef | 15.63 | 1 | 0 |
| 4. <i>Trichoderma</i> | 32 | 0 f | 0.00 | 0 | 0 |
| 5. Control (suelo estéril) | 32 | 0 f | 0.00 | 0 | 0 |
| 6. <i>S. rolfsii</i> | 32 | 16 abc | 50.00 | 4 | 12.5 |
| 7. <i>S. rolfsii</i> - <i>Trichoderma</i> | 32 | 17 ab | 53.13 | 4 | 9.4 |
| 8. Suelo infestado | 32 | 13 bc | 40.63 | 3 | 3.13 |
| 9. Suelo infestado- <i>Trichoderma</i> | 32 | 9 de | 28.13 | 3 | 3.13 |
| 10. Suelo infestado-Químico | 32 | 11 cd | 34.38 | 1 | 0 |

*=Medias con letra distinta indican diferencia significativa según la prueba de Tukey (P≤0.05)

El 12.5% de las plantas del tratamiento 6, murieron entre los 33 a 35 días después de mostrar los primeros síntomas de amarillamiento hasta que se presentó micelio algodonoso en la base del bulbo y éste se desprendió fácilmente del disco caulinar, estando la parte

foliar seca y el bulbo colonizado por esclerocios de color café marrón; acorde al grado de severidad 4. El 9.4% de plantas muertas ocurrió en el tratamiento 7, con el mismo grado de severidad. Cabe señalar que en este caso las plantas murieron entre los 19 a 28 días. En un estudio realizado por Ulacio *et al.* (2012), en el cultivo de frijol, el lapso que transcurrió para que se presentaran los síntomas causados por *S. rolfsii* fueron a los 16 días después de la siembra (dds) en tratamientos que contenían Calcio (Ca) y Calcio-*Trichoderma* (CaTri). En ese estudio, el tratamiento que presentó mayor retraso en los síntomas fue la solarización-tebuconazole (SolTeb) a los 42 (dds). La presencia del patógeno se confirmó cuando el micelio se presentó en la superficie del suelo y se formaron esclerocios color marrón claro.

Los tratamientos que contenían como patógeno a *S. cepivorum*, presentaron los primeros síntomas a los 33 ddt. La mayor incidencia (65.6%) fue en el tratamiento donde se inoculó a *S. cepivorum* y la menor fue en el tratamiento 3 donde se utilizó Tecobunazole. Tanto el control como el tratamiento 4 no presentaron incidencias de la enfermedad (Cuadro 3). Sin embargo en el suelo infestado naturalmente, aun cuando se aplicó dicho fungicida (tratamiento 10), la incidencia se duplicó, con respecto al tratamiento 3. El tebuconazole es un producto que ha dado buenos resultados no solo al inhibir el crecimiento radial de *S. cepivorum* sino que también impide que *S. rolfsii* no forme esclerocios (Delgadillo *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2009). No obstante, Delgadillo *et al.* (2002), mencionan que la efectividad del tebuconazole está estrictamente relacionada con la densidad de inóculo en el suelo y la frecuencia de aplicaciones y reporta que al aumentar la densidad de inóculo disminuye la efectividad hasta en un 42.6% y al aumentar la frecuencia de aplicaciones aumenta a 87.2% y esto se refleja en altos costos de producción (Coley- Smith, 1990).

Los daños que se presentaron en los tratamientos 1, 2 y 3 inoculados con *S. cepivorum*, fueron menores (grado de severidad 1), comparados a los que ocasionó *S. rolfsii* en los tratamientos 6 y 7 (Cuadro 3), ya que el primero solamente ocasionó un retraso en el desarrollo de las plantas de cebolla, pero no produjo la muerte como fue el caso de *S. rolfsii*.

Estos resultados posiblemente se deban por una parte a las condiciones ambientales, principalmente la temperatura que no favoreció el desarrollo de *S. cepivorum*, debido a que se incrementó de 23.8 °C en el primer mes del cultivo a 25.6 °C en el siguiente mes. La temperatura promedio registrada durante la evaluación de éste trabajo fue de 26.4 °C (Cuadro 4) por lo que se considera inapropiada para el desarrollo de *S. cepivorum*. De acuerdo con Adams y Papavizas (1971) la temperatura óptima para la germinación de los esclerocios de *S. cepivorum* es de 20 °C con un rango de 15 a 25 °C. Además, el rango de temperatura a la que se desarrolla la enfermedad es de 10 a 18 °C con un óptimo de 15 °C. En este sentido, a temperaturas mayores de 24 °C las plantas permanecen saludables aun en suelo fuertemente infestado (Walker, 1969; citado por Granados, 2004). Por otra parte, se puede observar en el cuadro 3, que los tratamientos 1 y 9 que incluyen *T. harzianum* presentaron una reducción en la incidencia de 40% y 12% con respecto a los tratamientos 2 y 8 que no lo incluyen, evidenciando posible antagonismo frente a este patógeno. No obstante, este efecto en la incidencia no se logró en las evaluaciones con *S. rolfsii* debido a que los tratamientos 6 y 7 fueron estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$), pero el porcentaje de plantas muertas si fue menor en el tratamiento que incluía al antagonista.

Cuadro 4. Registro de temperaturas

| Mes | Tem. Min (°C) | Tem. Max (°C) | Tem \bar{X} (°C) | \bar{X} Global (°C) |
|---------|---------------|---------------|--------------------|-----------------------|
| Ene-Feb | 22 | 28 | 23.8 | |
| Feb-Mar | 18 | 36 | 25.6 | |
| Mar-Abr | 18 | 34 | 28.9 | 26.4 |
| Abr-May | 24 | 30 | 27.0 | |

Respecto a la densidad de inóculo, se considera que la aplicada en los tratamientos respectivos fue apropiada para causar incidencia de la enfermedad en un porcentaje mayor al 62%, ya que Ponce *et al.* (2008), mencionan que densidades de inóculo de *S. cepivorum* de 0.021, 0.052 y 0.44 esclerocios/G⁻¹ de suelo causan una incidencia de la enfermedad final de 51.93, 62.75 y 82.9% respectivamente. Al respecto Crowe (1995), menciona que la densidad de inóculo de *S. cepivorum* necesaria para causar una incidencia elevada es baja debido a la eficiencia que tienen los esclerocios para germinar y causar enfermedad. Por su

parte, Delgadillo *et al.* (2002), encontraron que una densidad de *S. cepivorum* de 50 esclerocios/Kg⁻¹ de suelo causa una incidencia de 100%. Tomando en cuenta estos valores, la densidad de inóculo aplicada en los tratamientos del presente trabajo, se considera suficiente para causar porcentajes elevados de incidencia de la pudrición blanca, tal y como sucedió en los tratamientos en los que se inocularon los patógenos, aunque su agresividad dependió de las temperaturas.

Las plantas de cebolla de los tratamientos 4 (inoculación de *Trichoderma harzianum* en suelo estéril) y 5 (suelo estéril) no manifestaron síntomas evidentes de la enfermedad, quizás debido a que el antagonista tuvo la ventaja de establecerse sin ninguna competencia inicial entre en suelo y el cultivo. *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir en forma de clamidosporas, además la alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y abundante gama de sustratos sobre los que puede crecer, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Pérez, 2004; Infante *et al.*, 2009) y también a que la densidad de inóculo aplicada, fue la adecuada. A este respecto, Ezziyyani *et al.* (2004), reportan densidades iniciales que oscilan entre 1.2×10^6 y 8.1×10^7 que comparado con el aplicado, se encuentra dentro del rango. Considerando la importancia que existe entre las densidades del antagonista ante el patógeno y que a mayor densidad del antagonista mejor control de la enfermedad se puede decir que si las concentraciones del *Trichoderma* hubieran sido mayores, posiblemente se hubiesen presentado mayores diferencias entre los tratamientos evaluados.

8 CONCLUSIONES

La cepa antagonista aislada de suelo cultivado con cebolla, se identificó a nivel morfológico y molecular como *Trichoderma harzianum*.

El hongo *T. harzianum* mostró una tasa de crecimiento acelerado en cultivo *in vitro*, con gran capacidad antagónica ante *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfii* al inhibir no solo el crecimiento micelial, sino también el número de esclerocios y parasitar gran porcentaje de sus estructuras.

Tanto *in vitro* como *in vivo* *S. rolfii* fue el patógeno que mostró mayor agresividad; sin embargo, *T. harzianum* presentó un buen efecto antagónico, siendo más evidente el efecto ejercido en cultivo *in vitro*. Por su parte, *S. cepivorum* en cultivo *in vitro* presentó un crecimiento micelial y una producción de esclerocios ineficiente, al ser fácilmente inhibido por el antagonista.

Las pruebas *in vitro* confirman varios posibles mecanismos del efecto antagónico utilizado por *T. harzianum* ante los agentes causales de la pudrición de la cebolla; ellos son la competencia por nutrientes y por espacio, la antibiosis y el micoparasitismo. Este último fue el que más sobresalió al destruir completamente el micelio de ambos patógenos.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A., Gaviola, J.C. y Galmarini, C. (1993). Producción de semilla de cebolla /Acosta A. *et al.* 1ª ed. La consulta: Asociación Cooperadora EEA La Consulta, 1993. (Manual de Producción de Semillas Hortícolas; fasc. 3/Crnko J. Ed.).
- Adams, P.B. (1979). A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil. *Plant Disease Reporter*. 63: 349-351 pp.
- Adams, P.B. (1987). Effects of soil temperature, moisture and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum* and *Sporidesmium sclerotiorum*. *Plant Dis.* 71: 170-174 pp.
- Agrios, G.N. (1999). Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. 838 p.
- AIMCRA (1998). Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 1997-1998. Siembra de Otoño de 1996 Zona Sur. Valladolid, España.
- AIMCRA (2006). Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 2005-2006. Siembra de Otoño de 2004 Zona Sur. Valladolid, España.
- Albuquerque, M.E.H y Albuquerque, M.E.A. (2009). Factores que determinan el desarrollo de la “Raíz Rosada” de la Cebolla causada por *Pirenochaeta terrestres*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. Vitoria de Santo Antão, Pernambuco. Vols. 5-6: 264-298 pp.
- Aljaro, U.A., Monardes, M.H., Urbina, Z.C., Martin, B.A. y Muñoz, R.E. (2009). Manual del Cultivo del Ajo (*Allium sativum* L.) y Cebolla (*Allium cepa* L.). Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- Alvarado, L.S., Ulacio, O.D., Sanabria, C.M.E. y Jiménez, T.M. (2011). Compatibilidad *in vitro* de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Sclerotium cepivorum* Berk. *Bol. Centro Invest. Biol.* 45(3): 217-236 pp.
- American Phytopathological Society (APS). (1995). Compendium of onion and garlic diseases. H.F. Schwartz, and S.K. Mohan (eds.). APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA. 54 p.

- Anke, H., Kinn, J., Borgquist, K.E. y Sterner, O. (1991). Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. Isolation and characterization of the new lipophilic coprogen derivative palmitoyl coprogen. *Biometals*. 4(3): 157-165 pp.
- Aparicio, B.J.A. (2010). Cambios bioquímicos inducidos en cebolla por la inoculación de *Trichoderma harzianum* y su relación con el control de *Sclerotium rolfsii*. Tesis de Maestría. Centro de desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.
- Argüello, E., Yossen, V., Lucini, E. y Conles, M. (2009). Efecto del extracto de puerro (*Allium porrum* L.) sobre la sobrevivencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*. *Agriscientia*. 26(1): 23-27 pp.
- Arias, C.E.L. y Piñeros, E.P.A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de Los Paramos de Guasca y Cruz Verde. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.
- Arias, R.O.U. y Duarte, R.C.A. (2006). Determinación de las dosis efectivas del biopreparado *Trichoderma (koningii y harzianum)* sobre *Sclerotium rolfsii* causante del mal del talluelo en chile dulce (*Capsicum annum*) en época lluviosa. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador. San Salvador.
- Arnold, R.W.G. (1986). Lista de hongos fitopatógenos de Cuba. Revisada y ampliada. Edit. Cient. Técnica. Ciudad de La Habana, Cuba. 206 p.
- Arzate, V.J., Michel, A.A.C., Domínguez, M.V.M. y Santos, E.O.A. (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24 (2): 98-104 pp.
- Aycaya, Q.G. (2012). Influencia de la biofertilización con *Azotobacterchroococcum* en la producción y calidad de la cebolla rozada (*Allium cepa* L.) en el valle de Locumba. Tesis de licenciatura: Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-TACNA. Tacna, Perú.

- Aycock, R. (1966). Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin No. 174.
- Ayers, W.A. y Adams, P.B. (1981). *Sporidesmium sclerotiorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. *Phytopathology*. 71(1): 90-93 pp.
- Baker, K.F. y Cook, R.J. (1974). Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman and Company. San Francisco (E.U.A.). 433 pp.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (1999). Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. Second printing. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Bateman, D.F. y Beer, S.V. (1965). Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 55: 204-211 pp.
- Bautista, I. t Acevedo, R. (1994). Antagonismo *in vitro* de 16 aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium cepivorum*. *Fitopatología Venezolana*. 6: 42-68 pp.
- Bell, D.K., Wells, H.D. y Markham, C.R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72: 379-382 pp.
- Benhamou, N. y Chet, I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultraestructural and Cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*. 86(4): 405-416 pp.
- Bensoain, X. (2005). Control biológico de *Pyrenochaeta lycopersici* y *Phytophthora nicotianae* en tomates bajo invernadero. Facultad de Ciencias Agronomicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. Consultado en línea el día 28 de octubre de 2013. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/13.html
- Bennett, H.L. y Barry, B.H. (1987). Illustrated genera of imperfect fungi. 4a ed. Macmillan Publishing Company. New York, U.S.A. 218 p.

- Beute, M.K. y Rodríguez-Kabana, R. (1981). Effects of soil moisture temperature and field environment on survival of *S. rolfsii* in Alabama and North Carolina. *Phytopathology*. 71 (12): 1293-1296 pp.
- Bolaños, H.A. (2001). Introducción a la olericultura. 1 Reimpresión de la 1 ed. Universidad Estatal a Distancia San José, Costa Rica, 2001. 281-301 pp.
- Calvo, A.J.A., Rivera, C.G., Orozco, C.S. y Orozco, R.R. (2012). Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*. 23 (2): 225-231 pp.
- Carlier, J., Mourichon, X., González-De-Leon, D., Zapater, M.F. y Lebrun, M.H. (1994). DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology*. 84 (7): 751-756 pp.
- Castillo, H. (1999). Aspectos eco fisiológicos del cultivo del cebolla. En: Cultivo de la cebolla. Tapia, M. eds. Santiago, Universidad de Chile. 19-24 pp.
- Chérif, M. y Benhamou, N. (1990). Cytichemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. radialis-lycopersici. *Phytopathology*. 80: 1406-1414 pp.
- Chet, I. y Benhamou, S.H. (1998). Mycoparasitism and lectin enzymes. In: Harman, G.E. and Kubice, C.P. (Eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis Ltd., London, U.K. 153-152 pp.
- Chet, I. y Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*. 48: 37-43 pp.
- Cholango, M.L.P. (2009). Selección de cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro*, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Tesis Licenciatura. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolqui, Checa, Ecuador.
- Choudary, K.A., Reddy, K.R.N. y Reddy, M.S. (2007). Antifungal activity and genetic variability of *Trichoderma harzianum* isolates. *J Mycol Pl Pathol*. 37(2): 1-6 pp.
- Clarkson, J.P., Mead, A., Payne, T. y Whipps, J.M. (2004). Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology*. 53: 353-362 pp.

- Cobos, C.G.M. (2010). Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de sigatoka negra (*Paracercospora fijiensis* M.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio. Informe Técnico del Proyecto de Investigación. Departamento de Ciencias de la Vida. Escuela Politécnica del Ejército. Santo Domingo.
- Coley-Smith, J.R. (1990). White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathology*. 39: 214-222 pp.
- Coley-Smith, J.R. y Cooke, R.C. (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol* 9: 65-92 pp.
- Coley-Smith, J.R. y King, J.E. (1969). The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Ann. Appl. Biol.* 64: 289-301 pp.
- Coley-Smith, J.R., Mitchel, C.M. y Sansford. (1990). Long-Term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology*. 39(1): 58-69 pp.
- Colnago, P., González, P., Noguez, M., Bentancur, O. y Galvan, G.A. (2012). Evaluación de la respuesta a *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. en el germoplasma local de la cebolla en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*. 16(1): 33-44 pp.
- Cook, R. y Baker, K. (1989). The nature of practice of biological control of plant pathogens. Second Edition. U.S.A. 539 p.
- Cook, R.J. (1979). Antagonism and biological control: concluding remarks. In: *Soilborne plant pathogens*. Schippers, B. y Gams, W. (eds.). New York, Academic Press. 653-657 pp.
- Corbaz, R. (1994). Possibilities for the control of *Allium* White rot (*Sclerotium cepivorum*) with ergosterol biosynthesis inhibitors (EBI) fungicides. Entwistle AR and JM Melero-Vara (eds). *Proc. Fifth Intnatl. Workshop on Allium White Rot*, 1994. Córdoba, Spain. Session 5. 81-85 pp.
- Corporación Colombiana Internacional (CCI). Plan Hortícola Nacional (PHN) (No tiene año checar con el Maestro)

- Correa, A., Roquebert, M.F. y Bettucci, L. (1996). Trichorzianins activity on micelial growth of *Sclerotium cepivorum* under laboratory conditions *in vitro*. *Criptogamie Mycol.* 17 (2): 123-128 pp.
- Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z.R., Minaré, B.L., Pádua, R.R. y Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad.* 11(1): 3-9 pp.
- Couch, B.C. y Kohn, L.M. (2000). Clonal Spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. *Phytopathology.* 90(5): 514-521 pp.
- Crowe, F., Mohan, S.K. y Schwartz, H.F. (1995). Other Botrytis diseases. In: *Compendium of onion and garlic diseases.* Ed. Schwartz, H.F. and Mohan, S.K. 1995. APS Press. 18 p.
- Crowe, F.J. (1995). White rot. In: *Compendium of onion and garlic diseases.* Eds. H.F. Schwartz y S.K. Mohan. Minnesota, APS Press. 14-16 pp.
- Crowe, F.J., Hall, D.H., Greathead, A.S. y Baghott. (1980). Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology.* 70: 64-69 pp.
- Cruz, T.A., Rivero, G.D., Martinez, C.B. y Infante, D. (2010). Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo *Sarocladium oryzae* Sawada. Congreso científico del Inca, XVII, San José de las Lajas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana.
- Dal Bello, G.M., Mónaco, C.I. Y Chávez, A.R. (1997). Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 131-134 pp.
- Danielson, R. y Davey, C. (1973). Now nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology and Biochemistry.* 5(5): 495-504 pp. Resumen.
- Danielson, R.M. y Davey, C.B. (1973). Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biology and biochemistry.* 5: 505-515 pp.

- Davies, J.M.L. (1994). Chemical control of Allium White rot: a review. Entwistle AR and JM Melero-Vara (eds). Proc. Fifth Intnatl. Workshop on *Allium* White Rot, 1994. Córdoba, Spain. Session 5. 73-80 pp.
- Delgadillo, S.F., Zavaleta, M.E., Osada, K.S., Arévalo, V.A., González, H.V.A., Nieto, A.D. y Torres, P.I. (2002). Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). Rev. Fototec. Mex. 25 (4): 349-354 pp.
- Elad, Y., Chet, I. y Katan, J. (1980). *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 70(2): 119-121 pp.
- El-Katatny, M.H., Gudelj, M., Robra, K-H., Elnaghy, M.A. y Gübitz, G.M. (2011). Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 137-143 pp.
- Entwistle, A.R. (1990). *Allium* white rot and its control. Soil use and management. 6: 201-209 pp.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A. y Barakate, M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off diseases in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 1503-1509 pp.
- Esler, G. y Coley-Smith, J.R. (1983). Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathology. 33: 13-22 pp.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M.E., Ahmed, S. y Candela, M.E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Anales de Biología. 26: 35-45 pp.
- Falconí, C. (1997). El control biológico de plagas y enfermedades. Primera edición. Quito. Ecuador. 200 p.
- Farias, H.R.E. (2005). Evaluación de tres cepas nativas del hongo *Trichoderma* spp. como controlador biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en Remolacha (*Beta vulgaris*

var. *Saccharifera*) bajo condiciones de invernadero. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca, Talca, Chile.

- Fernández-Larrea, V.O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Fomento de productos fitosanitarios no sintético. Manejo Integrado de Plangas. (Costa Rica) No. 62. 96-100 pp.
- Flores, M.H.E., Montes, B.R., Rogel, H.M.A. y Martínez, R.M.E. (2008). Diversidad genética de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en México. Revista Mexicana de Fitopatología. 26 (1): 7-14 pp.
- Flores, Y., Mujica, Y. y Rondón, A. (2006). Evaluación *in vitro* de tres controladores del hongo *Sclerotium rolfsii*. Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales 2007. 166: 141-149 pp.
- Folgueras, M.M., Herrera, I.L., Rodríguez, M.S. y Rojas, M.X. (2008). Antibiosis *in vitro* entre el antagonista *Trichoderma* spp. y organismos patógenos causantes de pudriciones radicales en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Centro Agrícola. 35(2): 51-53 pp.
- Fundación Produce Querétaro (2003). Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Trasferencia de Tecnología en el Estado de Querétaro. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro.
- Galmarini, C. R. (1997). Características botánicas y fisiológicas. En: Manual del cultivo de la cebolla. Galmarini, C. R. (Ed). INTA Centro Regional Cuyo, Santiago de Chile. 18-22 pp.
- Ganesan, S., Ganesh, K.R. y Sekar, R. (2007). Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using *Rhizobium* and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). Turk J. Agric For. 31: 103-108 pp.
- García, R., Riera, R., Zambrano, C. y Gutierrez, L. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. Fitosanidad. 10 (2): 115-121 pp.
- Garren, K.H. (1961). Control of *Sclerotium rolfsii* through cultural practices. Phytopathology. 51: 120-124 pp.
- Ghisalberti, E.L. y Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology Biochemistry. 23(11): 1011-1020 pp.

- Golman, G.H., Haynes, C. y German, G.E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. TIBTECH. 12: 478-482 PP.
- González, A., Labrín, N., Barrientos, V. y Alezones, J. (2008). Primer reporte de *Sclerotium rolfsii* como agente causal de la pudrición del tallo y la mazorca del maíz en portuguesa, Venezuela. Fotopatol. Venez. 21 (1): 23-26 pp.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., arias, Y., González, N. y Miranda, I. (2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II expresión de actividad glucanasa. Rev. Protección Vegetal. 26 (1): 23-29 pp.
- González, R.M., Castellanos, G.L., Ramos, F.M. y Pérez, G.G. (2008). Efecto antagonico “*in vitro*” de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre agentes patógenos de semillas y suelo en el cultivo de fríjol. Centro Agrícola. 35 (1): 5-10 pp.
- González, R.M., Castellanos, G.L., Ramos, F.M. y Pérez, G.G. (2005). Efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del fríjol. Fitosanidad. 9(1): 37-41 pp.
- Granados, M.M. (2005). Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. Agronomía Costarricense. 29(2): 143-156 pp.
- Granados, M.M. y Wang, A. (2008). Efecto de biocontroladores aislados en fincas productoras de cebolla sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*). Agronomía Costarricense. 32 (1): 9-17 pp.
- Granados, M.M.M. (2004). Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Tesis Maestría. Sistema de Estudios de Posgrados. Universidad de Costa Rica. Ciudad universitaria “Rodrigo Facio”, Costa Rica.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. y Olivar, R. (2012). Evaluación *in vitro* de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 32: 44-49 pp.

- Hagan, A.C. y Olive, J.W. (1999). Assessment of new fungicides for the control of southern blight on Aucuba. *Journal of Environmental Horticulture*. 17: 73-75 pp.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. y Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*. 68: 980-985 pp.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. y Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*. 86(9): 980-985
- Harman, G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*. 84(4): 377-393 pp.
- Herrera, L. (2004). Los hongos fitopatógenos del suelo de Cuba. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- Hjeljord, L. y Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biocontrol: an overview. In C.P. 135-151 pp.
- Hovius, M.H.Y. y McDonald, M.R. (2002). Management of *Allium* white rot [*Sclerotium cepivorum*] in onions on organic soil with soilapplied diallyl disulfide and di-*N*-propyl disulfide. *Can. J. Plant Pathol.* 24: 281–286 pp.
- Hoyos, C.L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I. y Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*. 26 (3): 451-458 pp.
- Hunger, S.A., McLean, K.L., Eady, C.C. y Stewart, A. (2002). Seedling infection assay for resistance to *Sclerotium cepivorum* in *allium* species. *New Zealand Plant Protection*. 55: 193-196 PP.
- Inbar, J. y Chet, I. (1997). Lectins and biocontrol. *Critical reviews in biotechnology*. 17: 1-20 pp.
- Infante, D., Martínez, D., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos patógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24(1): 14-21 pp.

- Jenkins, S.F. y Averre, C.W. (1986). Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. *Plant Disease*. 70 (7): 614-619 pp.
- Jensen, D.F. y Wolfhechel, H. (1995). Biological Control: Benefits and risks. (Series: Plant and Microbial Biotechnology Research. In: Heikki, M.T.H. y Lynch, J.M. (Eds.). The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., to control root rot and damping-off diseases. 177-189 pp.
- Jones, H.A. y Mann, L.K. (1963). Onions and their allies. London. Leonard Hill Books Limited. 286 p.
- Kay, S.J. y Stewart, A. (1994). Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology*. 43: 371-377 pp.
- Kiehr, M., Delhey, R. y Azpilicueta, A. (2012). Smudge and other diseases of onion caused by *Colletotrichum circinans*, in southern Argentina. *Revista Internacional de Botanica experimental*. 81: 161-164 pp.
- Kimati, H., Amorim, L., BergaminFilho, A., Camargo, L.E.A. y Rezende, J.A.M. (1997). Manual de Fitopatología. Deseaças das Plantas Cultivadas. ed. São Paulo: Agronómica Ceres. 1995.1997. 2V. 66 p.
- Knudsen, G. y Bin, L. (1990). Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. *Phytopathology*. 80(8): 724-727 pp.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Meyer, W., Kubicek, C.P. y Borner, T. (1997). Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*. 89: 442-460 pp.
- Lal, R.J., Srivastava, S.N. y Agnihotri, V.P. (1997). Epidemiology and management of Sclerotium root rot of sugar beet: A threatening malady, pp. 161-178. In: Management of threatening Plant Diseases of National Importance. V.P. Agnihotri, A.K. Sarbhoy, D.V. Singh. Malthora Publishing House, New Delhi, India.
- Lewis, J. y Papavizas, G. (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* spp. and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology*. 74: 1240-1244 pp.

- Lewis, J.A. y Papavizas, G.C. (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology*. 74 (10): 1240-1243 pp.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K. y Muthumeenakshi, S. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Molecular Taxonomy of Trichoderma and Gliocladium and their Teleomorphs*. 1: 35-56 pp.
- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*. 28(1): 1-11 pp.
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H. y Cruz, A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp en arroz. *Revista de Protección Vegetal*. 23 (2): 118-125 pp.
- McBath, J. y Adelman, M. (1991). Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. *Phytopathology*. 81(10): 1151 pp. Resumen.
- McLean, K.L. y Stewart, A. (2000). Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 28 (2): 115-122 pp. Publicado en línea: 22 de marzo de 2010. Consultado el día 28 de agosto de 2013. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.2000.9514131>
- McLean, K.L., Swaminathan, J. y Stewart, A. (2001). Increasing soil temperature to reduce sclerotial viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soil. *Soil Biology Biochemistry*. 33 (2): 137-143 pp.
- Melgarejo, A., Meyer, I., Henning, H. y Waller, J. (2010). Guía para el Cultivo de Cebolla en Misiones. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Melgarejo, P., De Cal, A., Larena, I., Sabuquillo, P. y Guijarro, B. (2005). Estrategias para el control biológico de hongos fitopatógenos. En: *Control biológico de plagas y enfermedades. La Sostenibilidad de la Agricultura Mediterránea*. Jacas, J., Caballero, P. y Avilla, J. (eds.). Castelló de la plana: Publicacions de la Universitat Jaume I, D.L. 115-130 pp.

- Metcalf, D.A. y Wilson, C.R. (1999). Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationship of pectinases in the infection process. *Plant Pathology*. 48:445-452 pp.
- Michel, A., Reyes, A., Otero, M., Rebolledo, O. y Lezama, R. (2005). Potencial antagónico de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 284-291 pp.
- Michel, A.A.C. (2001). Cepas nativas de *Trichoderma* spp (Euascomycetes hipocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis Doctoral. Área Biotecnología. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.
- Michel, A.A.C., Otero, S.M.A., Solano, P.L.Y., Ariza, F.R., Barrios, A.A. y Rebolledo, M.A. (2009). Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “Escoba de bruja” del mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27 (1): 18-26 pp.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2002). El Cultivo de la Cebolla Cabezona Blanca. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (PRONATTA). Barranquilla, Colombia.
- Mohan, S.K. y Schwartz, H.F. (2000). Diseases of onion (*Allium cepa* L.). *Common Plant Diseases*. The American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota, USA. 67 p.
- Mónaco, C.I., Rollán, M.C. y Nico, A.I. (1998). Efecto de micoparásitos sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 81-84 pp.
- Montes, B.R., Nava, J.R.A. y Flores, M.H.E. (2003). Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 300-304 pp.
- Moreno, B. y Acevedo, R. (2002). Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 115-119 pp.

- Nico, I., Mónaco, I. Del Bello, G. y Alippi, H. (2005). Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II Micoflora asociada y antagonismo *in vitro* de los aislados más frecuentes. RIA. 34(1): 29-44 pp.
- Nida, R., Smeltekop, H., Almanza, J.C. y Loza, M.M. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. Journal of the Selva Andina Research Society. 2(1): 43-52 pp.
- Noja, I.A. y Medina, T.L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. Salus. 15 (3): 8-18 pp.
- Noyd, K.R. (2000). Mycology Reference Cards. APS Press. St Paul, Minnesota. U.S.A. 8 Cards.
- Obregón, M. (2001). Evaluación *in vitro* del poder antagonico de *Trichoderma harzianum* Rifai con respecto al hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berkeley causante de la enfermedad “Torbo en Cebolla”, En: XLVII Reunión anual del PCCMCA. (Resúmenes). San José, Costa Rica. 19 p.
- Oliveira, V.L., Bellei, M.M., Menezes-Sobrinho, J. y Ferreira, F.A. (1982). Ação antagonica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium* sobre *Sclerotium cepivorum*, causador da podridão branca do alho. Fitop. Bras. 7 (3): 531 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) (2013). Consultado en línea el día 27 de julio de 2013. Disponible en <http://faostat.fao.org/>
- Otadoh, J.A., Okoth, S.A., Ochanda, J. y Kahindi, J.P. (2011). Assesment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* F. sp. Phaseoli Tropical and Subtropical Agroecosystems. 13 (1): 99-107 pp.
- Páez, O. (2006). Uso Agrícola de *Trichoderma*. Consultado el primero de marzo de 2008. Disponible en <http://www.soilfertility.com/Trichoderma/espagnol/index.html>
- Papavizas, G.C. (1985). *Trichoderma* y *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of phytopathol. 23: 23-54 pp.
- Pérez, C.N. (2004). Manejo ecológico de plagas. CEDAR: La Habana, Cuba. 296 p.

- Pérez, M.L. (2002). Current Know distribution of white rot *Sclerotium cepivorum*Berk. in Mexico. Resumen de ponencia de la 7th. International Workshop on *Allium* White Rot. Harris Ranch, California, EUA.
- Pérez, M.L., Salinas, G.J. y Redondo, J.E. (1994). Main diseases on *Allium* species in Mexico with emphasis on White rot (*Sclerotium cepivorum*Berk.) In: A.R. Entwistle and J.L. Melero-Vara, eds. Proceeding of the fifth international workshop on *Allium* white rot. Cordoba, Spain. 6-11 pp.
- Pérez, M.L., Villalpando, M.J.J., Castañeda, C.C. y Ramírez, M.R. (2009). Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a Los Fungicidas Comúnmente Usados para su Combate. Revista Mexicana de Fitopatología. 27 (1): 11-17 pp.
- Pérez, N. (2004). Manejo ecológico de plagas. CEDAR: La Habana, Cuba. 296 pp.
- Pinto, C.M.F., Maffia, L.A., Barger, R.D., Mizubuti, E.S.G. y Casali, V.W.D. (1998). Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. Plant disease. 82(10): 1142-1146 pp.
- Pinzón, R.H. (2004). La cebolla de rama (*Alliumfistulosum*) y su cultivo. Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias. Tibaitata, Mosquera, Colombia.
- Pinzón, R.H. (2009). Los cultivos de cebolla y ajo en Colombia: Estado del Arte y perspectivas. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 3(1): 45-55 pp.
- Ponce, G.I.A. (2002). Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la capacidad biocontroladora de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinérea* en frutilla. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Universidad de Talca. Talca.
- Ponce, H.V., García, E.R., Rodriguez, G.M.P. y Zavaleta, M.E. (2008). Analisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inculo del patógeno. Agrocienia. 42(1): 71-83 pp.
- pp.
- Punja, Z.K. (1985). The Biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual review of phytopathology. 23: 97-127 pp.

- Punja, Z.K. y Grogan, R.G. (1981). Mycelial growth and infection without a food base by eruptive germinating sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 71 (10): 1099-1103 pp.
- Remesal, G.E. (2010). Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. como factor determinante de epidemias podredumbres de raíces. Tesis Doctoral. Instituto de Agricultura Sostenible. Córdoba.
- Remesal, G.E. (2011). Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Como factor determinante de epidemias de podredumbres de raíces. Tesis doctoral. Instituto de Agricultura Sostenible (IAS). Córdoba, España.
- Reyes, Y., Martínez, B. y Infante, D. (2008). Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista Protección Vegetal*. 23(2): 112-117 pp.
- Ria, J.N. y Saxena, V.C. (1975). Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of “white rot” disease. *Plant and Soil*. 43: 509-513 pp.
- Rifai, M. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol, Pap*. 116: 1-56 pp.
- Rodríguez, F.A., Jaime, E.G., Rodríguez, Z.J. y Terry, I.A. (1999). Biocontrol de patologías fúngicas en semilla botánica de la caña de azúcar. *Centro Agrícola*. 26 (2): 5-10 pp.
- Rolfs, P.H. (1893). The tomato and some of its diseases. *Florida Agricultural Experiment Station Technical, Bulletin*. 21: 1-38 pp.
- Rollan, M., Mónaco, C. y Nico, A. (1999). Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfsii*. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg*. 14 (1-2): 33-48 pp.
- Romero, C.S. (1993). Hongos fitopatógenos. L. Tress (ed.). México. Universidad Autónoma de Chapingo. 342 p.
- Rosen, D., Edelman, M., Galun, E. y Danon, D. (1974). Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride*: structural changes in mitochondria and other spore constituents during conidium maturation and germination. *Journal of General Microbiology*. 83: 31-49 pp.

- Rubio, R.G.L., Baltodano, S.F.M., Abanto, C.L.I., Wilson, K.J.H. y Muñoz, R.M.A. (2008). Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. Rebiol. 28(2): 12 p.
- Ruiz, R.A. (2011). Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción de *Trichoderma asperellum*-*Sclerotium rolfsii*. Tesis de Maestría. Centro de desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.
- Saccardo, P.A. (1911). Notae Mycologicae. Ann. Mycol. 9: 249-257 pp.
- Samuels, G.J. (1996). Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research. 100 (8): 923-035 pp.
- Sánchez, P.J.R., Zavaleta, M.E., Mora, A.G. y Pérez M.L. (2002). Pathogenicity of four Mexican isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk. In Three cultivars of garlic (*Allium sativum* L.). Agrociencia. 36(1): 103-113 pp.
- Sandoval, I. y López, M.O. (2000). Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A34 hacia *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del fríjol. Fitosanidad. 4 (3-4): 69-72 pp.
- Santander, P.G.I. (2013). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. para el control de *Phytophthora capsici* Leonian causante de la marchitez del pimentón. Tesis de Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía. Comisión de Estudios de Postgrado. Universidad Central de Venezuela. Maracay.
- Sanz, L. Montero, M., Redondo, J., Llobell, A. y Monte, E. (2005). Expression of an β -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. FEBS Journal. 272: 493-499 pp.
- Sarli, A. (1980). Tratado de horticultura, 2^{da} Edición. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 459 pp.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. y Kubicek, C.P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Applied Environmental. Microbiology. 60: 4364-4370 pp.

- Schuster, A. y Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology. 87: 787-799 pp.
- Schwartz, H.F. y Mohan, S.K. (1996). Compendium of Onion and Garlic Diseases. American Phytopathological Society. APS Press. Saint Paul, Minnesota, USA. 54 p.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2003). Análisis de estacionalidad de la producción y precios en el mercado de los productos hortofrutícolas y frijol.
- Secretaria de Estado de Agricultura (SEA). (2006). Estudio de la cadena agroalimentaria de cebolla en la República Dominicana. República Dominicana.
- Sepúlveda, C.G. (1993). Presencia de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en la primera región de Chile. IDESIA (Chile). 12: 13-17 pp.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (Siap). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Consultado en línea el día 27 de julio de 2013. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/>
- Silva, F., Wanger, O., Menechella, R. y T de Vidal, A.M. (1982). Cultivo de cebolla, análisis de costos y evaluación económica de una hectárea. Fondo Simon Bolívar IICA-OEA. Pedro Luro, Argentina.
- Silveira, N.S.S., Michereffi, S.J., Meneses, M. y Campos-Takaki, G.M. (1995). Potential of *Trichoderma* spp. isolates for the control of *Sclerotium rolfsii* on Beans. Seed Pathology and Microbiology. 6(36): 296 p.
- Singh, R.K. y Dwivedi, R.S. (1991). Ecology and biology of *Sclerotium rolfsii* Sacc. International Journal of Tropical Plant Diseases. 9: 161-171 pp.
- Singh, R.K., Shukla, R.P. y Dwivedi, R.S. (1990). Effects of solar treatment on germination of sclerotia (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) and on other soil mycoflora. Biology and Fertility of Soils. 10 (2): 152-154 pp.
- Sivan, A. y Chet, I. (1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. Phytopathology. 79: 198-203 pp.

- Smith, V.L., Campbell, C.L., Jenkins, S.F. y Benson, D.M. (1988). Effects of host density and number of disease foci on epidemics of southern blight of processing carrot. *Phytopathology*. 78 (5): 595-600 pp.
- Sociedad Española de Ciencias Forestales (SECF) (2005). Diccionario Forestal. Ediciones Mundi-Prensa. Editorial Aedos, s.a.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L. y Coronado, M.F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Rev. Fac. Agron. (Luz)*. 16: 509-516 pp.
- Stewart, A. y Fullerton, R.A. (1991). Additional studies on the chemical control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 19 (2): 129-134 pp. Consultado en línea el día 14 de Agosto de 2013. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.1991.10421790>
- Stone, H.E. y Armentrout, V.N. (1985). Production of oxalic acid by *Sclerotium cepivorum* during infection of onion. *Mycologia*. 77 (4): 526-530 pp.
- Suárez, M.C.L., Fernández, B.R.J., Valero, N.O., Gámez, C.R.M. y Páez, R.A.R. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en Maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(2): 35-43 pp.
- Thaning, C. y Gerhardson, B. (2001). Reduced sclerotial soil-longevity by whole-crop amendment and plastic covering. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 108(2): 143-151pp.
- Torres, E., Iannacone, J. y Gómez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia, Campinas*. 67 (1): 169-178 pp.
- Tsigbey, F.K. y Nutsugah, S.K. (1999). *Gliocladium catenulatum* in association with *Sclerotium cepivorum* on onion leaves in Ghana. *Plant Dis*. 83: 198 p.
- Tu, C.C. y Kimbrough, J.W. (1975). Morphology, development and cytochemistry of the hyphae and sclerotia of species in *Rhizoctonia* complex. *Canadian Journal of Botany*. 53 (20): 2282-2296 pp.

- Tye, R.J. y Willets, A.J. (1973). Fungal growth on methanol. *Microbiology*. 77: 1-2 pp.
- Ulacio, D., Jiménez, M.A. y Perdomo, W. (2011). Estrategias de manejo integrado de *Sclerotium cepivorum* Berk. y la pudrición blanca del ajo en Carache, Estado Trujillo, Venezuela. *Bioagro*. 23 (2): 105-114 pp.
- Valle, G.P. (1989). Pudrición blanca del ajo, enfermedad que se extiende en Aguascalientes. Desplegable para productores Núm. 12. Sarh, INIFAP. CIFAP-Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- Vallejo, C.F.A. y Estrada, S.E.I. (2004). Producción de hortalizas de clima cálido. Universidad Nacional de Córdoba. Sede Palmira. 143-182 pp.
- Vares, F., Esteban, J.R. Del Estal, P., Mijares, A. y Vares, L. (1987). Algunas enfermedades y plagas del ajo en la zona productora Castellano-Manchega de la provincia de Cuenca. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. 13(1): 21-52 pp.
- Vijayalakshmi, M., Kavitha, A. y Madhavi, M. (2012). Studies on *Alternariaporri* (Ellis) Ciferri Pathogenic to onion (*Allium cepa* L.). *Scholars Research Library*. 4(1): 1-9 pp.
- Villar, L.A.C., Zavaleta, M.E. y García, E.R. (1990). The effect of incorporation of cruciferous (Brassica) residues on soil-borne pathogens. II. The effect of incorporation of cabbage and broccoli on white rot (*Sclerotium cepivorum*Berk.) of onion under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8(2): 160-165 pp.
- Villegas. (2000). DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology*. 84(7): 751-755 pp.
- Yaqub, F. y Shahzad, S. (2010). Competitive colonization of wheat Straw by *Trichoderma* species and *Sclerotium rolfsii*. *Pak. J. Bot.* 42(3): 1983-1989 pp.
- Zhang, C. Druzhinina, I., Kubick, C.P. y Xu, T. (2005). *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in east Asia, *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 251-257 pp.