

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología

ETIOLOGÍA Y CONTROL, *IN VITRO* CON *Trichoderma harzianum* DE LA
PUDRICIÓN RADICULAR DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) EN EL
VALLE DE LOCUMBA, PROVINCIA JORGE BASADRE.

TESIS

Presentada por:

Bach. Alejandra Stefanie Jara Almonte Girón

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis N° 249

**TITULO PROFESIONAL DE:
BIOLOGO MICROBIOLOGO**

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con Resolución de Facultad N° 8095-2015-FACI-UNJBG ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis:

“ETIOLOGÍA Y CONTROL, *IN VITRO* CON *Trichoderma harzianum* DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) EN EL VALLE DE LOCUMBA, PROVINCIA JORGE BASADRE”; el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE: Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras

SECRETARIO: Dr. César Cevallos Columbus

VOCAL: MSc. Ángela Choque Miranda

Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día jueves 07 de Mayo del 2015.

Presentado por la señorita Bachiller **ALEJANDRA STEFANIE JARA ALMONTE GIRÓN**, de la Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología.

El jurado calificador, en forma secreta e individual se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado:

APROBADO por **UNANIMIDAD** con 03 votos a favor y promedio de **BUENO**.

Para ratificar lo detallado firman:


.....
Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Presidente


.....
MSc. Ángela Choque Miranda
Vocal.


.....
Dr. César Cevallos Columbus
Secretario

A mis padres con todo mi cariño y mi amor:

***Ellos hicieron todo en la vida para que yo
pudiera lograr mis sueños, me han dado
todo lo que soy como persona, mis valores,
mis principios, mi carácter, mi empeño, mi
perseverancia, mi coraje.***

***A ustedes por siempre mi corazón y mi
agradecimiento.***

***Y a ti que fuiste luz y fuerza en mi vida por el
apoyo incondicional y la fe en mí.***

Loannes Carolus.

***Veni, vidi, vici.
(Julio César)***

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Profesora y hoy amiga Mblga. Liduvina Sulca Quispe por su dedicación, paciencia y constante apoyo como Asesora de esta Tesis.

A todas las personas involucradas en el desarrollo de este trabajo, desde la concepción de la idea principal, trabajo de campo, trabajo de gabinete y hasta el último momento de la presentación, me mostraron su apoyo incondicional y el empuje que sólo da un amigo de verdad.

A mi tía Charo, que nunca deja de preocuparse por mí y siempre impulsa lo mejor que puedo llegar a ser. Te quiero como a una madre.

A mis mejores amigos que con su alegría, su comprensión y apoyo hicieron que el paso por este viaje de realización personal y profesional sea inolvidable.

Ayer, hoy y siempre tienen mi cariño, apoyo y agradecimiento.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del Problema	3
1.2 Hipótesis	5
II. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo General	6
2.2 Objetivos específicos	6
III. MARCO TEÓRICO	7
3.1. Control biológico	7
3.1.1. Introducción	7
3.1.2. Definición	8
3.1.3. Mecanismo de acción de antagonistas microbianos	10
3.1.3.1. Antagonismo	11
3.1.3.2. Antibiosis	12
3.1.3.3. Competencia	12
3.1.3.4. Fungistasis	13
3.1.3.5. Resistencia sistémica adquirida	13
3.1.3.6. Micoparasitismo	14

3.1.4. Microorganismo controlador biológico	
de enfermedades	15
3.1.4.1. <i>Trichoderma</i> sp.	15
3.1.4.2. Fisiología de <i>Trichoderma harzianum</i> (Rifai).	20
3.1.4.3. Mecanismos de acción de <i>T. harzianum</i> .	26
3.1.4.4. Importancia del micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> en el control biológico.	31
3.1.4.5. Antagonismo o capacidad antagónica.	33
3.2. Cultivo de cebolla	35
3.2.1. Morfología de la cebolla	36
3.2.2. Exigencias agroclimáticas del cultivo	37
3.2.3. Enfermedades del cultivo de la cebolla	39
3.2.4. Pudrición radicular en cebolla	43
3.2.4.1. Agentes causales de la pudrición radicular en cebolla	44
3.2.4.2. Síntomas de la enfermedad	52
3.2.4.3. Ciclo de la enfermedad	53
3.2.4.4. Manejo y control de la enfermedad	55
3.2.5. El cultivo de la cebolla en el valle de Locumba	56
3.2.6. Antecedentes	61

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	70
4.1. Material experimental	70
4.1.1 Material de Laboratorio	70
4.1.2 Otros	71
4.1.3 Equipos	71
4.1.4 Reactivos de laboratorio	72
4.2 Ubicación y delimitación del Área de estudio	72
4.2.1 Población	73
4.2.2 Muestra	73
4.3. Diseño de Investigación	73
4.4. Metodología	74
4.4.1. Procesamiento de la muestra	74
4.4.1.1. Toma de muestra	74
4.4.1.2. Siembra en medio de cultivo	75
4.4.1.3. Cámara húmeda	75
4.4.1.4. Purificación del Hongo	76
4.4.2. Identificación de los Hongos	76
4.4.3. Prueba de Patogenicidad de Koch	77
4.5. Prueba de Antagonismo	78
4.5.1. Evaluación de antagonismo mediante el Método del Cultivo Dual	78

4.5.2. Evaluación de Antagonismo por micoparasitismo.	80
4.5.3. Variables	81
4.5.4. Análisis estadístico	82
V. RESULTADOS	83
5.1 Aislamiento e identificación de hongos patógenos del Cultivo de Cebolla.	83
5.2. Prueba de Antagonismo mediante el Método del Cultivo Dual	86
5.2.1. Análisis Estadístico para muestras relacionadas	89
5.2.2. Prueba de t para muestras relacionadas	90
5.3 Capacidad antagónica por micoparasitismo de hongos patógenos del Cultivo de Cebolla	92
VI. DISCUSIÓN	94
VII. CONCLUSIONES	103
VIII. RECOMENDACIONES	104
IX. BIBLIOGRAFIA	105
X. ANEXOS	117

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Escala para evaluación de la capacidad antagónica	35
Cuadro 2: Operacionalización de variables	81
Cuadro 3: Incidencia de hongos patógenos aislados	84
Cuadro 4: Asociación de Hongos patógenos aislados	85
Cuadro 5: Porcentaje de inhibición por <i>T. harzianum</i> sobre agentes etiológicos.	86
Cuadro 6: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Pyrenochaeta terrestris</i> .	87
Cuadro 7: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	87
Cuadro 8: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium solani</i>	88
Cuadro 9: Análisis estadístico para muestras relacionadas	89
Cuadro 10: Prueba de T para muestras relacionadas	90
Cuadro 11: Capacidad antagónica por micoparasitismo	92
Cuadro 12: Agentes Etiológicos en muestras de Cebolla	118
Cuadro 13: Asociación de Agente Etiológico en muestras de Cebolla	120

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma</i> sp.	22
Figura 2: Conidióforos de forma piramidal de <i>T. harzianum</i> (Rifai)	26
Figura 3: Incidencia de hongos patógenos aislados.	84
Figura 4: Incidencia de Asociación de hongos patógenos aislados	85
Figura 5: Porcentaje de inhibición de crecimiento	86
Figura 6.- Capacidad antagónica en <i>Pyrenochaeta terrestris</i>	92
Figura 7.- Capacidad antagónica en <i>Fusarium oxysporum</i>	93
Figura 8.- Capacidad antagónica en <i>Fusarium solani</i>	93
Figura 9: Agente etiológico en muestras de cebolla	119
Figura 10: Agente etiológico en muestras de cebolla	120
Figura 11: Asociaciones de hongos en muestras de cebolla	122
Figura 12: Asociaciones de hongos en muestras de cebolla	122
Figura 13: Toma de Muestra	123
Figura 14: Muestreo en campo	123
Figura 15: Sintomatología parte aérea	124
Figura 16: Sintomatología en raíces.	124
Figura 17: Trabajo en laboratorio.	125

Figura 18: Aislamiento de <i>Pyrenochaeta terrestris</i>	125
Figura 19: Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	126
Figura 20: Aislamiento de <i>Fusarium solani</i> .	126

RESUMEN

El cultivo de cebolla en el Valle de Locumba es una de las principales actividades económicas de la Provincia Jorge Basadre, este cultivo viene presentado en los últimos años serios problemas fitosanitarios entre ellos de pudrición radical. Esta situación que ha impactado en la economía de los productores de la región, obligándolos a implementar métodos de control fitosanitario poco efectivos y con consecuencias al medio ambiente. En la actualidad existe una tendencia al uso del Control Biológico, donde se reconoce la potencialidad de *Trichoderma*, con resultados positivos como antagonista sobre hongos fitopatógenos del suelo.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la etiología y el control, *in vitro*, con *Trichoderma harzianum* sobre los agentes etiológico causantes de la pudrición radicular en el cultivo de *Allium cepa* L.(cebolla) El antagonismo se evaluó por el método del cultivo dual, confrontando a los agentes etiológicos aislados *Pyrenochaeta terrestris*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* con el antagonista *Trichoderma harzianum*, obteniendo como resultado un porcentaje de inhibición de crecimiento de 74,83% sobre *Pyrenochaeta terrestris*, 52,38% sobre *Fusarium oxysporum* y de 49.33 % en el caso de *Fusarium solani*.

I. INTRODUCCION

La producción de cebolla en el Perú ha ido incrementándose de manera significativa en los últimos diez años. Es un producto agroexportable al que se le debe dar mayor impulso tecnológico y productivo. La adaptabilidad de las variedades a las condiciones ambientales locales es un factor muy importante para el éxito en su producción.

El problema fitosanitario más importante del cultivo de cebolla es la pudrición radical, misma que es producida por hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Pyrenochaeta terrestris* (Sumners, 1996; Montes-Belmont *et al.*, 2003) y *Pythium spp.* (Vincelli y Lorbeer, 1990). El establecimiento de estos patógenos en las raíces de cebolla, puede ser por penetración directa o por aberturas naturales y heridas, produciendo síntomas como amarillamiento en el follaje, marchitez y muerte de la planta, a consecuencia de la pudrición radical que se manifiesta como coloración café a rojiza. (Montes-Belmont *et al.*, 2003).

En el valle de Locumba, de la Región Tacna, el cultivo de cebolla presenta serios problemas de pudrición radical, causados

por *Pyrenochaeta terrestris*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Esta situación ha impactado en la economía de los productores de la región, obligándolos a cambiar de parcelas cada 2 años y abrir nuevos campos de cultivo con las consecuencias que esta práctica ocasiona al medio ambiente al utilizar fuertemente fungicidas, es así que el monocultivo y el manejo fitosanitario para el control de las enfermedades de raíz ha ocasionado que el problema se presente continuamente produciendo muchas pérdidas (Pulido-Herrera *et al.*, 2008).

En su mayoría, estas enfermedades afectan a la cebolla durante las distintas fases de desarrollo del cultivo en campo, reduciendo de forma significativa la producción y la calidad del producto cosechado. Por otro lado, son también importantes las pérdidas debidas a enfermedades en post-cosecha, que ocurren durante la fase de almacenamiento. (Awuah y Lorbeer, 1988)

La Raíz Rosada de la cebolla se ha asociado como causante de pérdidas importantes de producción de cebolla sólo en áreas de clima tropical o subtropical. No obstante, en muchos casos el efecto negativo de los ataques de *P. terrestris* sobre la producción no ha podido ser diferenciado del producido por otros patógenos del suelo (Mohamed–Ali *et al.*, 1984).

En la actualidad el uso de *Trichoderma harzianum* ha sido estudiado mundialmente por sus excelentes características como biocontrolador de hongos del suelo y reconocido como agente de control biológico contra enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Harman, 2006).

Su empleo se justifica por las relaciones antagonistas que establece fundamentalmente, con los hongos fitopatógenos que viven en el suelo, además de la influencia que ejerce sobre el crecimiento vegetativo de algunas plantas de importancia económica (Windham et al., 1986, Andreú et al., 1992).

1.1 Formulación del Problema

Allium cepa L (cebolla), es una de las hortalizas más importantes y más cultivada en el Perú, en la Región Tacna y tiene gran trascendencia en el Valle de Locumba siendo una de las principales actividades económicas de la Provincia Jorge Basadre. La situación y perspectiva del cultivo de cebolla en la actualidad es creciente, gracias a los precios altos del mercado actual. Sin embargo, entre los factores que pueden ocasionar bajos

rendimientos en este cultivo destacan la incidencia de enfermedades.

El problema fitosanitario más importante del cultivo de cebolla es la pudrición radical, misma que es producida por hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Pyrenochaeta terrestris* (Sumners, 1996; Montes-Belmont *et al.*, 2003) y *Pythium spp.* (Vincelli y Lorbeer, 1990).

El combate químico para el problema fitosanitario utilizado por los productores no funciona en su totalidad; al no ser posible una adecuada cobertura de los sitios de infección como las raíces y bases del bulbo y ninguno de los fungicidas aplicados hasta el momento es eficaz en disminuir la densidad del inóculo; además, el manejo químico provoca la presencia de residuos en las zonas comestibles y contaminación ambiental debido a las altas dosis utilizadas.

El uso de *Trichoderma harzianum* como biocontrolador de enfermedades fungosas, es hoy día una práctica generalizada en la agricultura mundial, este microorganismo interacciona de diferentes

modos: compitiendo por los nutrientes, generando metabolitos secundarios con efecto antibiótico o parasitando directamente a los organismos fitopatógenos; además mejoran el crecimiento de las plantas y generan resistencia inducida en éstas frente a situaciones de estrés.

Estos efectos beneficiosos justifican su uso como alternativa real a los fungicidas químicos; es por ello, que en busca de una solución a la necesidad de aplicar un control a las enfermedades del cultivo de cebolla se plante la siguiente interrogante:

¿Cuál es la capacidad antagónica, in vitro, de *Trichoderma harzianum* sobre el agente etiológico causante de pudrición radicular en el cultivo *Allium cepa* L.(cebolla). ?

1.2 Hipótesis

De acuerdo al problema planteado es que se presenta a continuación la siguiente hipótesis:

***Trichoderma harzianum* ejerce actividad antagónica, in vitro, sobre el agente etiológico causante de la pudrición radicular en el cultivo de *Allium cepa* L.(cebolla).**

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la etiología y control *in vitro*, de *Trichoderma harzianum* sobre el agente causante de la pudrición radicular en el cultivo *Allium cepa L.*(Cebolla) en el valle de Locumba Provincia Jorge Basadre.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- Aislar e identificar el agente etiológico de la pudrición radicular en el cultivo de cebolla (*Allium cepa L.*) del valle de Locumba, Provincia Jorge Basadre.
- Demostrar la patogenicidad del agente etiológico aislado del cultivo de cebolla (*Allium cepa L.*) con pudrición radicular.
- Determinar la actividad antagónica *in vitro*, de *Trichoderma harzianum* sobre el agente causante de la pudrición radicular en el cultivo de *Allium cepa L.*(cebolla) .

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Control biológico

3.1.1. Introducción

En los últimos años el control biológico de plagas y enfermedades en la agricultura ha adquirido gran importancia frente a los problemas fitosanitarios ocurridos por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos en la agricultura, lo cual ha traído como consecuencia severos problemas de contaminación al medio ambiente y ha generado la resistencia de plagas y enfermedades, así como la presencia de nuevas especies de microorganismos fitopatógenos con un grado de afectación más virulento (Bravo *et al.*, 2006).

La mayoría de los microorganismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o naturales que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico. En los últimos años el empleo de bacterias y hongos antagonistas de enfermedades agrícolas ha cobrado una singular importancia, debido a que no sólo actúan contra un grupo determinado de microorganismos fitopatógenos (como

lo hacen los plaguicidas químicos), sino que se están utilizando para un grupo muy amplio de microorganismos fitopatógenos (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

Aunque el control biológico no pretende reemplazar completamente los sistemas de control químico, puede ser utilizado junto con otros tipos de técnicas como parte de un sistema integrado de control. No hay que olvidar que el control biológico tiene unas propiedades y requerimientos muy distintos de los métodos de control tradicionales, y ha de ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y con las estrategias de producción existentes actualmente. El control biológico depende de un funcionamiento efectivo del microorganismo antagonista apropiado para cada ecosistema particular planta-patógeno (Pérez, 2004).

3.1.2. Definición

Pérez (2004), define el control biológico como la utilización de microorganismos naturales o modificados, para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos beneficiosos para

las plantas. Los microorganismos antagonistas comprenden cualquier organismo que interfiere en la supervivencia o desarrollo de los microorganismos fitopatógenos.

El control biológico se lleva a cabo a través de microorganismos antagonistas, también llamados agentes de control biológico (ACBs), estos suelen encontrarse de forma natural en el suelo, y conllevan efectos beneficiosos para los cultivos. Sin embargo, el uso intensivo de los suelos agrícolas suele provocar un descenso en las poblaciones de los mismos, disminuyéndose por tanto su efecto beneficioso para los cultivos. Entre los microorganismos antagonistas del suelo encontramos aislados de géneros de hongos tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Gliocladium*, así como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Suárez-Estrella y col., 2007).

Estos microorganismos interactúan con los patógenos de plantas de diferentes modos: compitiendo por los nutrientes, generando metabolitos secundarios con efecto antibiótico o parasitando directamente a los organismos fitopatógenos. Además, mejoran el crecimiento de las plantas y generan

resistencia inducida en éstas frente a situaciones de estrés. Estos efectos beneficiosos justifican su uso como alternativas reales a los fungicidas químicos. (Alabouvette y col., 2006)

3.1.3. Mecanismo de acción de antagonistas microbianos.

Varios tipos de microorganismos (hongos, bacterias y virus) se han descrito como agentes de control biológico de enfermedades en cultivos. Prácticamente todas las plagas y enfermedades son afectadas en alguna medida por organismos antagonistas. En muchos casos estos entes biológicos representan el factor más importante en la regulación de las poblaciones de microorganismos fitopatógenos en la naturaleza (Pérez, 2004; Ezziyyani *et al.*, 2006; Mondino y Vero, 2006).

En la naturaleza existe una continua interacción entre los microorganismos fitopatógenos y sus antagonistas, de forma tal que ellos ayudan a la regulación natural de las enfermedades. En condiciones naturales los microorganismos están en una proporción dinámica en la superficie de las

plantas. No es fácil establecer con precisión los mecanismos que actúan en las interacciones entre los microorganismos antagonistas y los microorganismos fitopatógenos sobre la planta. En general los antagonistas tienen varios modos de acción y la combinación de estos es importante para poder elegir un antagonista ideal. Si estos poseen diversos modos de acción, se reducen los riesgos de que los microorganismos fitopatógenos adquieran resistencia, lo cual se logra mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción. Así, se han descrito varios mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción para controlar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Ezziyyani *et al.*, 2006).

3.1.3.1. Antagonismo

Es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Pérez, 2004).

3.1.3.2. Antibiosis

Michel-Aceves (2001) y Pérez (2004) definen a la antibiosis como un proceso de interacción entre organismos en el cual uno o más metabolitos son excretados (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas) por un organismo y tienen efecto dañino sobre uno o más organismos, normalmente actúan en bajas concentraciones. Además, los antibióticos y otros productos tóxicos que son volátiles (como el cianuro de hidrógeno), son capaces de afectar el crecimiento de las células de los microorganismos fitopatógenos.

3.1.3.3. Competencia

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren para su funcionamiento del mismo alimento. El consumo de uno reduce la cantidad disponible del otro; al final se impone uno de ellos. La competencia por nutrientes y espacio dentro de su nicho ecológico se realiza en la superficie de la

hoja, es el principal mecanismo involucrado en el control de bacterias fitopatógenas; en el caso de hongos es variable. La competencia es un modo de acción indirecto (Michel-Aceves, 2001; Mondino y Vero, 2006).

3.1.3.4. Fungistasis

Consiste en imponer condiciones de inactividad especialmente para las esporas de hongos por limitación en los nutrientes (Pérez, 2004).

3.1.3.5. Resistencia sistémica adquirida

Consiste en una o varias moléculas (no necesariamente antagonistas de fitopatógenos) con la capacidad de inducir autodefensas en las plantas frente a la acción del cualquier microorganismo fitopatógeno. Existen dos tipos de resistencia: la constitutiva, propia de la planta y que se expresa en cualquier momento, y la inducida, expresada solo ante determinados estímulos. Las interacciones planta-patógeno son de dos tipos: compatible, cuando ocurre

la enfermedad, e incompatible, cuando la planta resiste. De ahí se sustenta la teoría del gen para el gen. (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

3.1.3.6. Micoparasitismo

Es la acción antagónica entre dos hongos, el uno (hiperparásito) parasita al otro (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante. Un antagonista puede utilizar a un hongo como fuente de alimento. Basado en el micoparasitismo se dividen en dos grupos: biotrópicos, tienen un rango restringido de hospedantes, y necrotrópicos, matan a la célula antes o después de la invasión, excretan sustancias tóxicas y utilizan sus nutrientes (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004).

3.1.4. Microorganismo controlador biológico de enfermedades

3.1.4.1. *Trichoderma* sp.

Clasificación taxonómica

Familia:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Sub phylum:	Pezyzomycotina
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	Trichoderma
Espécie:	harzianum
Nombre científico	<i>Trichoderma harzianum</i>

(FAO, 2008)

Varias investigaciones han demostrado que el control biológico a través del uso de hongos benéficos como *Trichoderma* es una alternativa potencial respecto al uso de fungicidas o fumigantes en la agricultura (Paredes-Escalante *et al.*, 2009). En vista que esta especie se puede encontrar en diferentes materiales

orgánicos y suelos, están adaptados a diferentes condiciones ambientales lo que facilita su amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas y templadas y otras templadas y frías. Estos hongos son ampliamente conocidos por su producción de toxinas y antibióticos. (Seaby, 1996).

Actualmente se conoce más de 30 especies de género *Trichoderma* siendo las más desarrolladas: *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. virens*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. aureoviride*, *T. atroviride*, *T. reesei*, *T. pseudokoningii*, *T. polysporum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, *T. lignorum*, *T. spirale* y *T. album* (Cruz, 2007; Cobos, 2010).

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos aislados del suelo que se reproducen asexualmente. Además, es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio facultativo, con una pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento. De conidióforo hialino muy ramificado no verticilado,

fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Michel-Aceves, 2001).

Estos hongos compiten bien en la rizósfera de la planta, como endófitos, siendo capaces de colonizar completamente la superficie radicular. (Cruz, 2007)

Además, penetran en el tejido de la raíz, normalmente hasta la primera o segunda capa de células, y sólo en los espacios intercelulares (Brotman y col., 2010).

Todas estas características hacen de este hongo uno de los principales agentes controladores biológicos utilizados en agricultura. Cerca del 50% de los agentes controladores biológicos fúngicos del mercado pertenecen al género *Trichoderma* (Whipps y Lumsden, 2001).

Los mecanismos de acción antagonista con que actúa frente a los hongos fitopatógenos son: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Infante *et al.*, 2009).

Ezziyyani *et al.* (2004) manifiestan que *T. harzianum* controla a *Phytophthora capsici*, agente causal de la podredumbre de pimiento, aumentando los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3-glucanasa (lisis enzimática), ejerciendo una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el microorganismo fitopatógeno (micoparasitismo), lo cual juega un rol importante en la reducción y destrucción del microorganismo fitopatógeno. Además, los géneros de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* han demostrado efectividad al reducir *in vitro* hasta un 65% las enfermedades causadas por *Alternaria solani* Sorauer y *Phytophthora infestans* Mont de Bary en tomate. También se ha demostrado que las especies del género *Trichoderma* tienen una

amplia gama de hospedantes, y dentro de ellos se encuentran los hongos fitopatógenos, tales como: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp, *Paracercospora fijiensis*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger* y *Pythium* sp., *Alternaria* sp., entre otros (Michel-Aceves *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2009).

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo

versátil y resistencia a inhibidores microbianos. No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizósfera de la planta. El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Infante *et al.*, 2009).

3.1.4.2. Fisiología de *Trichoderma harzianum* (Rifai).

Se le puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos, están adaptados a diferentes condiciones ambientales lo que facilita su amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas y templadas y otras templadas y frías. Estos hongos son ampliamente conocidos por su producción de toxinas y antibióticos. Se encuentran diferentes especies y cepas de *T. harzianum* (Rifai), en el cultivo de hongos comestibles, algunas son inofensivas y

otras muy dañinas, por lo que su relación antagónica con los hongos cultivados todavía no está completamente conocida y varía entre especies y cepas (Seaby, 1996).

T. harzianum (Rifai), invade rápidamente el sustrato y obstaculiza el crecimiento del micelio de *Pleurotus* spp., mediante la producción de toxinas y antibióticos, al tiempo que ocasiona un descenso del nivel de pH hasta valores de 4-5, que son más favorables para su desarrollo. Inicialmente se puede observar en el sustrato un moho de color blanco que vira a verde, adquiriendo posteriormente color gris verde-azulado debido a la abundante producción de conidios. Los propágulos (conidios, clamidósporas o fragmentos de micelio) pueden ser esparcidos por corrientes de aire, aerosoles, insectos, ácaros, herramientas, ropas, etc. (Seaby, 1996).

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa.

El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio. (Aceves et al 2009)

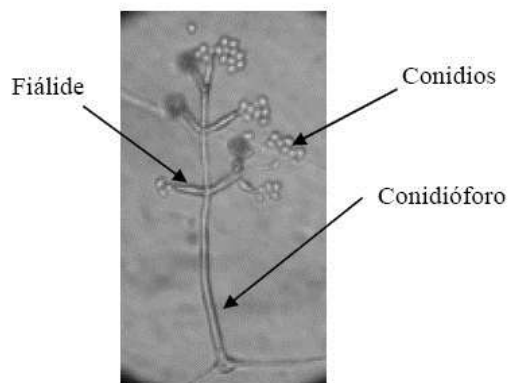


FIGURA 1. Conidios y conidióforos de *Trichoderma* sp./
Trichoderma sp. conidia and conidiophores. (400 x).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidósporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidósporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo. (Aceves *et al* 2009)

No obstante, las clamidósporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30°C). Debido a esto se dice, que las especies de *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidósporas y conidios. (Aceves *et al* 2009)

En el estadio temprano de *T. harzianum* (Rifai), el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación.

Las colonias de *T. harzianum* (Rifai), crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación

en medio de cultivo agar de dextrosa y papa (PDA) a 25°C. Las especies de este género generalmente prefieren un pH ácido de 4.5 - 5 y, además se desarrolla en áreas con un excesivo contenido de humedad y un estancamiento del bióxido de carbono en la atmósfera. Varios factores genéticos asexuales como la recombinación parasexual, mutación y otros procesos contribuyen a la variación entre los núcleos en un solo organismo. Así, los hongos son altamente adaptables y evolucionan rápidamente. Hay una gran diversidad en genotipos y fenotipos de cepas silvestres (Rifai, 1969; Pandey y Tewari, 1990).

El ciclo de vida de *T. harzianum* (Rifai), inicia cuando el organismo crece y se ramifica como una hifa fúngica típica que mide de 5-10 μ de diámetro. La esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3-5 μ de diámetro son liberadas en un gran número. También se forman clamidósporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más

clamidósporas se pueden fusionar. (Seaby, 1987; Seaby, 1996; y Doyle, 1991).

El tamaño del conidióforo es de 62,5-69 x 3-4,7 μm . Los conidióforos son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4 μm ., con verticilos terminales de hasta 4 conidios de un tamaño aproximado de 3,8-4 x 3,1-3,7 μm , con forma citriforme y subglobosos.

Sus clamidósporas son intercalares y formadas por el micelio sumergido, subglobosas, de pared dentada, color verde suave y un tamaño de 12,5-10 μm . (Bissett, 1991; Hoog, 2000).

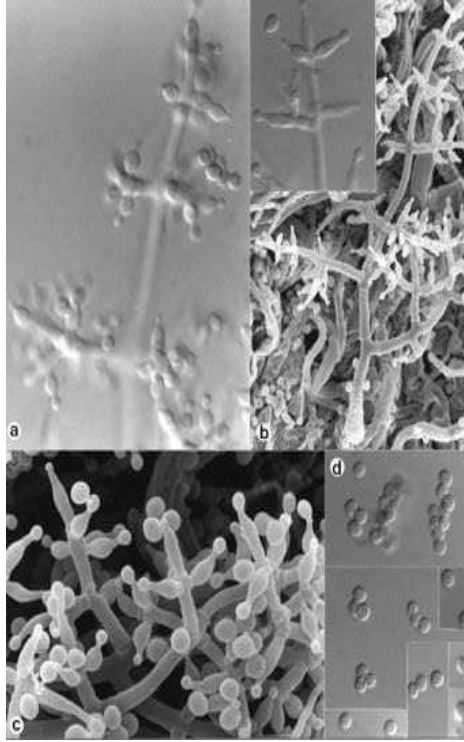


Figura 2. Descripción: *T. harzianum* (Rifai);
a, b. conidióforos de forma piramidal; c, d. fiálides y
conidios. Resolución. a, d. x1600; b. x1300; c. x3300.

3.1.4.3. Mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum*

a. Principales mecanismos de acción *T. harzianum*

Los modos de acción de estos hongos antagonistas pueden resumirse en mecanismos directos, que engloban el micoparasitismo, la antibiosis y la competición y los indirectos son: la estimulación del

crecimiento y la inducción de resistencia vegetal a estrés biótico y abiótico. Todos estos mecanismos pueden darse de forma simultánea en un mismo aislado, no siendo excluyentes ninguno de ellos. De la eficacia de cada uno de ellos o de su combinación dependerá el éxito en la supresión de la enfermedad del aislado. (Verma y col., 2007).

a. Mecanismos directos

Micoparasitismo

El ataque directo a los fitopatógenos producido por los aislados de *T. harzianum*, basado principalmente en la secreción de enzimas hidrolíticas, es uno de los principales mecanismos de acción de estos hongos. (Verma y col., 2007).

Antibiosis

T. harzianum es capaz de segregar una gran cantidad de compuestos antimicrobianos capaces de afectar a los fitopatógenos. Estos metabolitos secundarios, que pueden ser tanto volátiles como no volátiles, pueden

actuar mediante contacto directo con los patógenos o mediante contacto a distancia (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Su producción puede depender del medio en el que se encuentren, así como de las condiciones y edad del cultivo. Según su estructura podemos distinguir dos tipos de metabolitos secundarios: los metabolitos de bajo peso molecular, no polares, que incluyen compuestos aromáticos, pironas, butenólidos y metabolitos derivados del isocianato, que pueden difundir en el agua y actuar a cierta distancia, y los metabolitos de alto peso molecular, denominados peptaiboles, con características anfipáticas, que pueden alterar la permeabilidad de las membranas lipídicas de las células del patógeno (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998) .

Competencia por espacio y nutrientes

Los aislados de *T. harzianum* se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, que les confiere mayor capacidad a la hora de colonizar un espacio. De este modo, compiten directamente por los

mismos nichos que algunos hongos fitopatógenos (Sivan y Chet, 1989). La colonización de los sitios de unión de estos patógenos en la planta por *T. harzianum* permite reducir la enfermedad. Además, su carácter saprofítico les permite utilizar un amplio rango de sustratos, compitiendo directamente por los nutrientes presentes en el medio (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

b. Mecanismos indirectos

Estimulación del crecimiento

Otro de los mecanismos antagonistas producidos por *T. harzianum* se basa en la promoción del crecimiento de la planta (Bailey y Lumsden, 1998). Diversos aislados de esta especie estimulan el crecimiento vegetal hasta un 300%, debido a que son capaces de sintetizar determinados compuestos con carácter hormonal. (Brotman y col., 2010). Estos aislados producen además diferentes ácidos orgánicos que disminuyen el pH, solubilizando el fósforo del medio, así como otros nutrientes, mejorando el desarrollo de la planta. Además,

las enzimas hidrolíticas producidos por estos hongos movilizan la materia orgánica del medio, mejorando igualmente la absorción de compuestos más simples por parte de la planta, y en definitiva su estado nutricional (Verma y col., 2007).

Inducción de resistencia

Numerosos autores han revelado que las asociaciones de *T. harzianum* con la planta, así como algunos de los compuestos producidos por el hongo, favorecen la inducción de mecanismos de resistencia en la planta. La presencia del hongo y los elicitores que produce son capaces de activar mecanismos de defensa en plantas (Bailey y Lumsden, 1998), reprogramando la expresión de diferentes genes de la planta y activando diferentes rutas enzimáticas (Shoresh y col., 2010). Esta inducción de los mecanismos acelera la respuesta frente al ataque de un patógeno o un insecto, mejorando de este modo la resistencia de la planta. Una respuesta más rápida frente a un ataque disminuirá el impacto de la enfermedad o el daño producido. (Verma y col., 2007)

3.1.4.4. Importancia del micoparasitismo de *T. harzianum* en el control biológico

Uno de los principales modos de acción de *T. harzianum* relacionado directamente con el control biológico de fitopatógenos se basa en su capacidad de parasitar otros hongos (Chet y col., 1998). Este mecanismo puede actuar junto a fenómenos de antibiosis y competencia. Las hifas de *T. harzianum* son capaces de detectar la presencia de un posible huésped en el medio, mediante la detección de moléculas liberadas por el posible huésped debido a la acción de las enzimas líticas producidas por *T. harzianum*. Mediante quimiotropismo, *T. harzianum* es capaz de crecer hasta el hospedador, reconociéndolo mediante lectinas específicas; además de ello mediante la formación de ovillos y apresorios, atraviesa la pared celular del hongo patógeno y permite que las hifas de *Trichoderma* penetren en el huésped (Brotman y col., 2010). Este fenómeno está ligado a la síntesis de una gran batería de enzimas líticas que degradan la pared del patógeno. Entre estas enzimas

destacan las quitinasas, las glucanasas y las proteasas (Viterbo y col., 2002). La combinación de estas hidrolasas es capaz de lisar completamente la pared celular del hospedador, compuesta principalmente por quitina, un polímero formado por *N*-acetil-glucosamina unida mediante enlace β -1,4, o de celulosa en el caso de los oomicetos. Además, también encontramos en la pared fibras de β -glucano, polisacárido lineal de residuos de glucosa unidos por enlace β -1,3 con ramificaciones con enlace β -1,6. Todos estos compuestos están inmersos a su vez en una matriz proteica. El sistema hidrolítico encargado de lisar esta estructura ha sido profundamente estudiado en algunas especies de *Trichoderma*. De este modo, para *T. harzianum*, se han descrito hasta cinco quitinasas (CHIT42, CHIT33, CHIT37, CHIT52, y CHIT40) y dos *N*-acetil-glucosaminidasas (EXC1 y EXC2); cuatro β -1,3-glucanasas (BGN13.1, GLUC78, GLU36 y LAM1.3) y tres β -1,6-glucanasas (BGN16.1, BGN16.2, y BGN16.3); y tres proteasas (PRB1, PAPA, y PRA) (Rincón y col., 2008).

3.1.4.5. Antagonismo o capacidad antagónica

El antagonismo o capacidad antagónica es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Se comprueba de distintas formas, principalmente midiendo el grado de micoparasitismo de cada antagonista.

Evaluación de Capacidad Antagónica de *Trichoderma harzianum* en Prueba Dual

Para evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* frente a un fitopatógeno se realiza la medición del crecimiento radial del patógeno como testigo y del antagonista cada 24 horas durante 15 días o hasta que llene la placa el testigo.

El cálculo del Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR), que mide el antagonismo de los microorganismos evaluados. Este se obtiene a partir del

crecimiento de cada patógeno en cultivo dual, junto con sus respectivos testigos, empleando la fórmula utilizada por Suárez et al. (2008):

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \cdot 100$$

Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).

Ezzyyani et ál (2004) propone la escala de capacidad antagónica de acuerdo con el grado de micoparasitismo basado en una escala de 0 a 4: en la cual 0 representa ningún tipo de micoparasitismo por no observar la invasión de la superficie de la colonia del patógeno y 4 es 100% de micoparasitismo con la invasión total de la superficie de la colonia del patógeno incluso con esporulación sobre ella. Se evalúa en un microscopio binocular con un aumento de 40x.

Cuadro 1 .- Escala para evaluación de la capacidad antagónica Ezzyyyani et ál (2004)

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Fuente: Ezzyyyani et ál (2004)

3.2. Cultivo de cebolla

Allium cepa L., cebolla, pertenece a la familia Liliaceae. Es originaria de Asia Central. Se trata de un cultivo muy extendido por todo el mundo, pues hay gran número de cultivares con distinta adaptación a las diferencias de climatología que influyen en su vegetación.

La superficie total plantada de cebolla en el mundo asciende a más de 2 millones de hectáreas, produciéndose 32.5 millones de toneladas. (Barrera, C. 2005)

El cultivo de cebolla tiene mucha importancia, ya que genera una gran cantidad de empleos en las zonas rurales. (Barrera, C. 2005)

Presenta propiedades medicinales, entre las más importantes se citan las diuréticas, pectorales, circulatorias, antiinflamatorias, laxantes y sedantes; además, se menciona como tratamiento para la varicela y la gripe (Artigas, 1983).

3.2.1. Morfología de la cebolla

- Raíz: el sistema radicular es muy fibroso y ramificado, las raíces primarias y/o verdaderas mueren temprano. Alcanzan una profundidad de 25 cm en sentido vertical y 15 cm en sentido lateral. (Acosta ,1993).
- Tallo: es muy rudimentario y pequeño, ya que solo alcanza unos cuantos milímetros de longitud; realmente se le llama falso tallo al conjunto de hojas que forman el punto apical. (Valadez A., 1998).
- Hojas: son de colores verdes cenizos, tubulares y huecos, son sésiles y están constituidas por la vaina y el limbo. (Maroto, 1994).

- Bulbo: está formado por hojas modificadas llamadas escamas, cuyo tamaño, diámetro y desarrollo dependen específicamente del fotoperiodo. (Valadez, A. 1998).
- Inflorescencia: es una umbela simple que se forma al final del vástago o tallo floral; el número de tallos florales puede ser de 1 a 20 o hasta más por planta, y alcanzan una longitud de 1,5 m. (Acosta ,1993).
- Flor: son blanquecinas y violáceas, poseen dos o tres brácteas y seis estambres; el ovario es trilocular, con dos óvulos en cada lóculo. Formado por dos semillas en cada lóculo. El fruto es una cápsula globular. (Acosta, 1993).
- Semilla: es de color negro, anguloso, aplastado y rugoso, un gramo contiene aproximadamente 250 semillas; el tamaño de la semilla es de 3 a 4 mm de largo por 1 a 2 mm de ancho y 0,5 mm de espesor. (Maroto, 1994)

3.2.2. Exigencias agroclimáticas del cultivo

Es un cultivo de crecimiento rápido, con un ciclo vegetativo de 4 meses. Se adapta a regiones con temperaturas que oscilan entre 10 y 20 °C, favorables para la bulbificación, no obstante

algunas variedades requieren temperaturas entre los 25 y 30 °C (Gómez, 2002).

La cebolla es una planta típica de transplante, el semillero se hace generalmente a cielo abierto y se requiere alrededor de 200 m² de éste para sembrar una hectárea. El transplante se realiza cuando las plantas tienen entre 10 y 15 cm de altura. En las zonas altas, se realiza aproximadamente 2 meses después de la siembra. En la zona media y baja las plantas crecen un poco más rápido, realizándose el transplante entre los 40 y 50 días después de la siembra (Bolaños, 2001).

Previo al establecimiento del cultivo, se prepara el terreno con una anticipación de 2 meses, antes del transplante. Se recomienda suelos franco arenosos con alto contenido de materia orgánica, bien drenados y con un pH de 5,5 a 6,5 (Bolaños, 2001; Gómez, 2002), al respecto Casseres (1984) menciona que son preferibles los suelos con pH entre 6 y 6,8.

En las siembras que se hacen durante la estación lluviosa o con riego por aspersión, el transplante se hace en eras, en el caso de las siembras veraneras se hace en bateas. Las

distancias más comunes para la siembra son de 10 cm entre plantas y de 25 a 30 cm entre líneas (Bolaños, 2001).

El potasio y el nitrógeno son los elementos que requiere en mayor cantidad y entre los elementos menores, sobresale el hierro y el manganeso, además, se sabe que la cebolla es una de las hortalizas que consumen más azufre (Bornemisza, 1990; Bolaños, 2001).

Entre las prácticas de manejo más comunes se encuentra el combate de malezas, ya sea de forma manual o con la aplicación de herbicidas como el oxifluorfen y el linurex (Bolaños, 2001).

3.2.3. Enfermedades del cultivo de la cebolla

La severidad de la enfermedad se utiliza como el criterio principal para evaluar algunas enfermedades, en tanto que para otras lo es la “incidencia” de la enfermedad. La severidad de la enfermedad se define como la cantidad de tejido de la planta afectada por los organismos causantes de la

enfermedad y se expresa como porcentaje de la cantidad total de ese tejido. La incidencia de la enfermedad se define como el número de unidades afectadas, y se consideran generalmente plantas enteras. (Angelfire, 2010)

Las enfermedades más importantes en los bulbos y raíces son: Botrytis sp., Fusarium oxysporum, Pyrenochaeta terrestris, Fusarium solani y el nematodo Ditylenchus dipsaci. (Angelfire, 2010)

De acuerdo a Angelfire (2010), las plagas y enfermedades que afectan al cultivo de la cebolla desde el almácigo hasta su cosecha son las siguientes:

Las enfermedades en los bulbos y raíces son: *Botrytis sp., Fusarium oxysporum, Pyrenochaeta terrestris, Fusarium solani* y el nematodo *Ditylenchus dipsaci*.

A nivel de follaje es el mildiú veloso de la cebolla (Peronospora destructor) seguido de la mancha purpura (Alternaria porri). (Angelfire, 2010)

En la etapa de almácigo, es frecuente encontrar problemas de mosca de la cebolla (Delia antiqua), que producen pérdidas considerables de plantas. La mosca adulta coloca sus huevos en las plantas jóvenes, cerca del suelo. Las larvas nacen y comienzan a comer la planta abriéndose paso. (Angelfire, 2010)

Otras tres enfermedades importantes en la postcosecha de cebollas, en particular cuando se producen con fines de exportación, son *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger* y *Helminthosporium alli*, las cuales son causa de rechazo en mercados extranjeros. (Angelfire, 2010)

Vademécum Agrícola, (2008) manifiesta que las principales enfermedades que atacan a la cebolla son:

Antracnosis (*Collectotrichum spp*) que presentan manchas circulares u ovaladas de color café oscuro o negro en las hojas, en cuya área central se distinguen anillos concéntricos. Botritis (*Botrytis squamosa*), manchas de color blanco-amarillo que se manifiestan por toda la hoja. Cuando el ataque es severo se produce necrosis foliar. Ocurre en condiciones de humedad. Se suele emplear la lucha química para combatirlo.

Alternaria (Alternaria porri). La enfermedad causa manchas blancas y hundidas, cuyo centro posteriormente se torna rojizo. Ataca las hojas, pedúnculos florales y bulbos. Las infecciones de esta enfermedad están asociadas con lesiones causadas por *Botrytis sp.* En cultivares susceptibles, las lesiones son de consistencia acuosa, rodeadas por un borde amarillento en el que posteriormente se desarrollan las fructificaciones del hongo, similares a puntos oscuros, luego la zona central de la lesión se torna rojiza y en condiciones favorables para la enfermedades, las lesiones coalescen y las hojas se doblan con facilidad. Su diseminación ocurre en condiciones de alta humedad y precipitación. Este hongo puede sobrevivir largo tiempo en residuos de cosecha. Para el combate se debe desinfectar la semilla, rotar con cultivos no susceptibles y mejorar el drenaje de la plantación. (Vademecum Agrícola, 2008).

Mildiu (*Peronospora destructor*). Áreas ovales o cilíndricas se desarrollan en las hojas y cabezas florales infectadas. Estas áreas son de color verde-amarillo pálido a café. Los síntomas aparecen generalmente primero en las hojas viejas. Cuando el

clima esta húmedo y la temperatura es baja, las hojas infectadas se cubren de masas de esporas de color gris a violeta. Las hojas se tuercen, se caen y mueren. El tejido muerto de las hojas es rápidamente colonizado por manchas púrpura, que son de color más oscuro y cubren al mildiu lanoso. El Mildiu casi nunca mata a la planta de cebolla, pero el desarrollo del bulbo se reduce. Los tejidos del bulbo, en especial los del cuello pueden ponerse esponjosos y el bulbo puede perder sus cualidades de almacenamiento. Esta enfermedad es una de las más destructivas en las cebollas para producción de semillas alrededor del mundo (Vademecum Agrícola, 2008).

3.2.4. Pudrición radicular en cebolla

Dentro de los principales problemas patológicos del cultivo de cebolla se encuentra la pudrición rosada de las raíces, causada por el hongo del suelo *Pyrenochaeta terrestris*, el cual ha sido reportado en el cultivo de ajo también. Cuando la enfermedad es moderada, se presenta una secazón de las puntas, tornándose de color amarillo-blanco o amarillo rojizo.

Es importante su detección temprana para tomar medidas oportunas de control y evitar pérdidas. (Angelfire, 2010)

(Pulido et al.,2008) demuestra la pudrición radicular causada por los hongos *Fusarium oxysporum* y *Pyrenochaeta terrestris* es la enfermedad más importante que afecta al cultivo de cebolla en Baja California, principal estado productor; donde se reportan incidencias del 80%, que repercuten en la calidad y producción de esta hortaliza.

3.2.4.1. Agentes causales de la pudrición radicular en cebolla

Pyrenochaeta terrestris Es un hongo fitopatógeno se encuentra en todo el mundo. Está adaptado a climas templados y tropicales debido a su capacidad para sobrevivir bien en suelos de distintos tipos, temperaturas y grados de acidez. No obstante, para desarrollar sus hifas este hongo necesita temperaturas relativamente altas del suelo.

Parasita raíces de numerosas especies del género *Allium*, como ajo, cebolla y puerro; además coloniza raíces de numerosas plantas, como maíz, tomate, soja, cereales, cucurbitáceas, como saprofito o patógeno de debilidad. (Berra Lertxundi, D , 2002)

Pertenece a la Subdivisión Deuteromycotina, Clase Coelomycetes, Orden Sphaeropsidales (Sutton, 1980) se caracteriza por formar picnidios globosos a subglobosos marrón oscuro a negros, inmersos y posteriormente irrumpentes, ostiolados, papilados a ligeramente rostrados, de 120 a 450 μm de diámetro ligeramente a marcadamente setosos en su madurez que se desarrollan aislados o agregados. Las setas son de coloración marrón claro a oscuro, con 1 a 5 septas, de 8 a 120 μm de largo, formadas en número variable y dispuesto generalmente alrededor del ostíolo, aunque pueden formarse sobre todo el picnidio. La pared de los picnidios está formada por varias capas de células, una capa externa de células de pared gruesa y pigmentada, y una capa interna de

células pseudoparenquimáticas que revisten toda la cavidad interna del picnidio. Las células conidiógenas son enteroblásticas, filídicas, hialinas, simples, obpiriformes, y emergen de la capa mas interna de células pseudoparenquimáticas que recubren la cavidad del picnidio. Las conidias son unicelulares, hialinas, ovoides a alantoides, bigutuladas en cada uno de sus extremos redondeados, y de 3,7 – 5,8 x 1,8 – 2,4 μm . El micelio es septado, hialino, gutulado y de 1,0 a 4,5 μm . Los picnidios pueden formarse en raíces de plantas severamente afectadas al final del ciclo vegetativo del cultivo, así como en una gran variedad de medios de cultivo artificiales. (Sumner, 1995)

En cultivo la colonia es de aspecto pulverulento aterciopelado plano de coloración concéntrica en el centro violeta oscuro con tonalidades en fucsia y el borde de color rosa pálido. (Sumner, 1995)

El ataque a los huéspedes tiene como síntoma más característico las raíces toman un color entre rosa

pálido y amarillo-marrón. Las raíces invadidas pasan de su color natural al rosa claro, rosa oscuro, rojo, y finalmente púrpura, marrón o negro, a medida que avanza la enfermedad. Las raíces enfermas se marchitan, se vuelven frágiles y finalmente mueren. Aunque las plantas intentan compensar la pérdida de unas raíces produciendo otras, por desgracia estas nuevas raíces también se infectan y mueren. Este patógeno no infecta la base de los bulbos de cebolla, sin embargo es frecuente ver raíces rosadas junto con un ataque a la base del bulbo por otro patógeno, *Fusarium oxysporum*. (Berra Lertxundi, D , 2002)

Las plantas infectadas crecen más despacio, sus hojas que mueren desde la punta a la base, y producen bulbos pequeños. Además las hojas, debilitados, a menudo se infectan con otros patógenos oportunistas como *Alternaria porri*, que produce manchas purpúreas. Se producen pérdidas importantes de rendimiento cuando coincide tiempo cálido y seco a la vez que se infectan las raíces temprano en la temporada de cultivo, en esta

situación las raíces debilitadas no pueden absorber toda el agua que demanda el resto de la planta. (Berra Lertxundi, D , 2002)

Fusarium oxysporum La enfermedad se caracteriza por la aparición unilateral de los síntomas de marchitamiento, acompañada del amarillamiento parcial de las hojas y el doblamiento hacia el lado de la planta enferma, a causa de la interferencia en el crecimiento.

Es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988). Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa- dextrosa agar (PDA) a 25°C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio

aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias (Booth, 1970) y una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias.

El hongo produce tres clases de esporas:

- Microconidias: Esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen 5- 12 μm de largo por 2.5- 3.5 μm de ancho (Nelson, 1981).
- Macroconidias: Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46 μm de largo por 3.0 a 4.5 μm de ancho (Nelson, 1981).

- Clamidosporas: Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares, terminales o intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15 μm de diámetro (Nelson, 1981). Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes (Garret, 1977).

Fusarium solani Es un hongo cosmopolita.

En cultivo es bastante estable, aunque puede sufrir algunas mutaciones hacia formas con micelio aéreo abundante, sin esporodoquias y sin color. En el medio APD el crecimiento es rápido: 30 mm en una semana. La colonia presenta un aspecto liso y algodonoso de color blanco grisáceo, crema, ocre o rosa púrpura. Generalmente el reverso no es coloreado o es de color crema pálido. (Bosland, 1988).

Las microconidias son abundantes y ovoides. Pueden tener un tabique. Su tamaño oscila entre 8-16 x 2-4,5

μm y son producidas en monofiálides alargadas y finas que suelen medir 40-80 x 2,5-3 μm . Las monofiálides nacen lateralmente de la hifa y a veces son ramificadas. Hacia la punta se afilan y presentan collaretes poco definidos. Las macroconidias, cuyo tamaño aproximado es de 28-65 x 4-6 μm , se observan en menor cantidad que las microconidias y nacen de conidióforos cortos y ramificados que frecuentemente forman esporodocias, que son las que producen el color crema, azul o azul-verdoso, pero nunca naranja. (Bosland, 1988).

Presentan entre tres y cinco tabiques y tienen forma de media luna, con la superficie ventral y dorsal paralelas en la mayor parte de su longitud. La célula apical es corta y redondeada y la célula basal redondeada o claramente con forma de pie. Las clamidosporas son frecuentes, con una pared lisa o rugosa. Se observan aisladas o en parejas, terminales o intercalares y tienen un tamaño de 6-10 μm de diámetro. (Monzón y Rodríguez 2005)

3.2.4.2 Síntomas de la enfermedad

Esta enfermedad se reconoce al observar las raíces de un color rosa oscuro o marrón. Las raíces infectadas se colapsan y posteriormente se tornan de color café rojizo y mueren. El efecto en la parte aérea son hojas necróticas y bajo desarrollo de las plantas. (INTA. 2008)

En contraste, las raíces sanas son de colores blancos, y cilíndricas. Una de las características de campo es que al sacar el bulbo se rompe fácilmente. Las plantas con ataque severo del patógeno son achaparradas, presentan un alto grado de raíces infectadas, se desprenden fácilmente del suelo y no producen calidad de bulbos. Cuando la enfermedad es moderada, se presenta una secazón de las puntas, tornándose de color amarillo-blanco o amarillo rojizo. Esta enfermedad se empieza a observar al inicio de formación de bulbos. Al principio, este patógeno aparece en manchones en el campo donde el suelo

es más pobre (falta de materia orgánica) o más seco.
(INTA. 2008)

3.2.4.3. Ciclo de la enfermedad

El hongo *Pyrenochaeta terrestris* es considerado un habitante natural del suelo, en el cual puede sobrevivir y multiplicarse indefinidamente. Es considerado un parasito débil que ataca a las raíces de plantas que están en estrés o que han sido dañadas previamente (p.ej. ataque de nemátodos). (Cárdenas L. , 2008)

La infección de las hifas se produce más vigorosamente cuando el suelo está relativamente caliente, entre a 24° y 28°. Las hifas invaden los tejidos epidérmicos y corticales de las raíces de las plantas liberando enzimas que descomponen esos tejidos. El hongo produce cuerpos negros diminutos, casi globulares (picnidios) en las células huésped epidérmicas y corticales. La enfermedad la facilitan y la agravan otros patógenos fúngicos que atacan la

planta primero y debilitan las raíces, por lo que es más fácil para *P. terrestris* invadirlas. (Cárdenas L., 2008)

En ausencia de plantas huéspedes, se presume que este patógeno pasa el invierno en forma de microesclerocios en el suelo, sobreviviendo así durante muchos años. Estas estructuras del hongo sirven también inóculo primario. La importancia de la etapa en picnidios no se ha investigado a fondo y no se le ha descubierto aún fase sexual. (Cárdenas L. , 2008)

Las mayores pérdidas en rendimiento se han observado con altas temperaturas y condiciones de suelos pobres. La diseminación del hongo es por bulbos infectados, por movimiento de suelo, maquinaria y por riego (INTA, 2008).

3.2.4.4. Manejo y control de la enfermedad

- Rotación de cultivos.

Es recomendable rotar con cultivos diferentes completamente, entre los cuales se sugiere zanahoria, lechuga, apio, y remolacha. Por el contrario, cereales, zacates, rábano y espinacas no son recomendables, dado que el patógeno puede infectar sus raíces.

Fertilización adecuada, humedad y control de plagas para promover un crecimiento vigoroso, ya que una planta sana tolera la enfermedad produciendo raíces abundantes. (INTA, 2008).

- Variedades resistentes:

Las compañías productoras de semilla obtienen materiales con tolerancia o resistencia, lo cual es indicado en la etiqueta. (INTA, 2008).

- Control biológico:

Aplicación de materia orgánica y organismos antagónicos al hongo como *Trichoderma spp.* La fumigación del suelo no es económicamente factible, y el uso de fungicidas debe ser estudiado. (INTA. 2008)

3.2.5. El cultivo de la cebolla en el valle de Locumba

- **Ubicación del terreno**

En el valle Locumba se cultiva la cebolla a mediana escala, la producción de este cultivo por los productores locales ocupa mediana tecnología, el riego es a gravedad; las zonas productoras se encuentran a una altitud de 559 m.s.n.m.

En los anexos de Chipe, Sagollo, Chaucalana y Piñapa concentran las mayores áreas de producción de cebolla y los anexos de Sitana y Aurora tienen áreas más pequeñas de cultivo. (MPJB, 2012)

- **Época de siembra**

La siembra de almácigos empieza en los meses de julio a septiembre, pero algunos productores realizan la siembra hasta el mes de noviembre, pero la siembra tardía de la cebolla puede conllevar en algunas ocasiones a tener problemas en la formación del bulbo por tener pocas horas luz durante los meses de abril a mayo. (MPJB, 2012)

- **Semilla**

La semilla que emplean es por lo general producida por algunos agricultores que se dedican al cultivo de la cebolla para la extracción de semilla, entonces la semilla se obtiene de la campaña anterior. En el departamento de Tacna es común la denominación que obtiene esta semilla como “Semilla de cebolla colorada de Ilabaya”, por lo cual la semilla no es certificada. (MPJB, 2012)

Se utiliza desde 3 a 4 kilogramos de semilla por hectárea, la semilla para la siembra es desinfectada con un fungicida para prevenir el problema de *Fusarium oxysporum*; algunos fungicidas utilizados son Rhizolex – T, Vitavax o Vitaflo.

Es muy importante el conocimiento de los agricultores de la zona por el grado de pureza de la semilla, de la no presencia de semillas que no correspondan a la cebolla, pues existe una semilla muy parecida que corresponde a una maleza (MPJB, 2012).

- **Preparación del terreno**

En los agricultores de la zona se observa una práctica agronómica inadecuada en la rotación de cultivos en un lugar de siembra, los productores del lugar realizan la preparación, retirando los restos de la campaña anterior solo en el momento previo a la utilización de la maquinaria agrícola, entonces no existe la adecuada solarización del terreno para la desinfección del suelo de agentes patógenos como hongos y algunas plagas que llevan a elevar el costo de producción por problemas subsecuentes durante el desarrollo del cultivo de la cebolla. (MPJB, 2012)

- **Almácigo**

En la conducción de los almácigos se observa que los agricultores, instalan estos a poca distancia del terreno definitivo, y tienen dimensiones de 6 m. x 1,5 m. aproximadamente, presentan regulares condiciones de fertilidad. Durante el período de crecimiento en almácigo se nota la inadecuada fertilización de las plántulas de cebolla, que a la vez produce plántulas de características heterogéneas en cuanto a grosor de tallo. No se somete a estrés hídrico porque puede provocar la obtención de plántulas con un bulbo pequeño “coqueadas”, al extraer del almácigo. (MPJB, 2012)

- **Trasplante**

El trasplante a campo definitivo se realiza en el suelo húmedo, en terrenos regados del día anterior. Se marca en el costado de surcos confeccionados a 30 cm., cada planta a 10 cm. de distancia una de otra, de tal forma que en un surco hay dos hileras de cebolla. A los 15 días de plantada la cebolla aplican un enraizante. (MPJB, 2012)

- **Control Fitosanitario**

El control fitosanitario en los almácigos se realiza semanalmente, y principalmente se orienta hacia el control de larvas de gusanos cortadores de tierra y thrips, y en hongos que causan la muerte radicular. (MPJB, 2012)

En el campo definitivo las aplicaciones se realizan generalmente a cada 15 días entre aplicaciones, se basa en el control de thrips durante el desarrollo del cultivo y larvas de gusano de tierra en menor grado. (MPJB, 2012)

En enfermedades se presenta desde un inicio el problema con “mildiú” y durante el inicio del desarrollo del bulbo “Botrytis”, “raíz rosada”, “Fusarium” y “Alternaria”, los agricultores tienen presente el control de estas enfermedades, pero carecen de información de manera preventiva para su control (MPJB, 2012).

3.2.6. Antecedentes

a. **ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma harzianum* Rifai SOBRE *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* EN MARACUYÁ (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) DEL MUNICIPIO ZONA BANANERA COLOMBIANA**

Fusarium oxysporum Schlecht f. sp *passiflorae* causa la marchitez del maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*), afectando su rendimiento. En la búsqueda de alternativas para su control se realizó la presente investigación con el objetivo de determinar la capacidad antagónica de 6 aislamientos de *Trichoderma harzianum* sobre dicho patógeno.

Se evaluaron 3 aislamientos comerciales (TCC-001, TCC-005 y TCC-006) y 3 aislamientos nativos de suelo cultivado con palma de aceite en el Centro de Investigación Caribia de Corpoica (TCN-009, TCN-010, TCN-014). Se hizo la prueba *in vitro* empleando la técnica

de cultivo dual en platos Petri con Agar Sabouraud. Se evaluó competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), por 10 días a 28 °C. Se estableció un diseño completamente aleatorio, con 13 tratamientos y 3 repeticiones. Todos los aislamientos de *T. harzianum* superaron en crecimiento a *F. oxysporum* con radios de 7,42 cm en cultivo dual. Mientras que el patógeno mostró un radio de 1,99 cm. TCN-009 y TCC-006 expresaron los mejores radios al crecer 4 veces más rápido que *F. oxysporum* y reducir 3 veces menos el RCP con respecto al testigo, sin diferencias significativas entre estos tratamientos ($P=0,0001$); además, produjeron el mayor PICR a los 10 días con valores de 64,61 y 65,91%, respectivamente. No hubo diferencias significativas al comparar los aislamientos comerciales y nativos; sin embargo, por la naturaleza autóctona TCN-009, resulta ser a nivel *in vitro*, el aislamiento más promisorio en el biocontrol de *F. oxysporum* por hallarse en condiciones agroclimáticas similares en la Zona Bananera Colombiana.

b. USO DE *Trichoderma* sp. PARA EL BIOCONTROL DE LA PUDRICIÓN RADICULAR EN CEBOLLA

La cebolla *Allium cepa* (L.) es un cultivo de importancia económica para el estado de Baja California. Recientemente es afectado por la enfermedad conocida como pudrición radicular causada por los hongos *Fusarium oxysporum* y *Pyrenochaeta terrestris*. El efecto antagónico de *Trichoderma* sp. cepa nativa ThVT1 sobre el crecimiento de los hongos *Fusarium oxysporum* cepa 72 y *Pyrenochaeta terrestris* cepa 16 fue evaluado *in vitro* e *in vivo* y directamente en semilla de cebolla var. Kristal. La cepa de *Trichoderma* presentó porcentajes de inhibición en un 70% para *F. oxysporum* y un 58.3% para *P. terrestris* en pruebas duales *in vitro*, asimismo, presentó capacidad antagónica de tipo hiperparasítica, colonizando toda la superficie del medio y reduciendo la colonia del patógeno. En condiciones *in vivo* se observó que las plantas de cebolla presentaron menor número de sitios de infección, inducción del crecimiento de raíces e incremento del peso seco con respecto a los tratamientos inoculados por separado con *F. oxysporum*, *P. terrestris* y testigo. No se

encontró que *Trichoderma* favoreciera la germinación de las semillas; sin embargo, promovió el incremento en el peso seco de las plántulas.

c. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá.

Cultivos de maracuyá de la región Caribe colombiana presentan problemas de marchitez y el hongo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., está asociado a esta patología. Plantas de maracuyá de la Estación Experimental (E.E Caribia de Corpoica) poseen este problema y por tal razón se determinó el antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* Rifai, frente a *F. solani*, aislado de plantas enfermas de maracuyá (*Passiflora edulis*). Utilizando la técnica de cultivo dual en platos Petri con Agar Sabouraud, se evaluaron competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), empleando un diseño estadístico factorial 2x6x1

con arreglo completamente aleatorio. Se obtuvieron tres aislamientos nativos de *T. harzianum* (TCN-009, TCN-010, TCN-014) de suelo de Palma de Aceite (*Elaeis guineensis*) de la E.E Caribia, y se compararon con tres aislamientos comerciales (TCC-001, TCC-005, TCC-006). TCC-001 y TCN-014, reportaron ser más competentes por nutrientes y espacio, con el mayor radio de crecimiento de 7,50 y 7,32 cm el día 10, comparado a FSM-011 en el cual solo fue de 2,30 cm. Aunque, TCN-014 mostró micoparasitismo grado 4 con ambos aislamientos de *F. solani* y TCC-005 únicamente con FSM-012, el cual fue más susceptible a ser micoparasitado. En cuanto al PICR, los tratamientos con mejores porcentajes de inhibición fueron TA-9, TA-12 y TA-6 con valores de 70,56, 68,52 y 65,32% respectivamente.

El aislamiento del patógeno mayormente inhibido fue FSM-011. Todos estos resultados demuestran que hubo antagonismo *in vitro* al utilizar los aislamientos nativos y comerciales de *T. harzianum* sobre *F. solani*.

d. **Efecto de diferentes aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre el ataque por *Rhizoctonia solani* y el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)**

Se procedió a probar la actividad antagónica contra *R. solani*, y de promoción de crecimiento de las siguientes cepas: *T. koningii* BAFC cult No 2212,2382, *T. viride* BAFC cult No 2243, *Trichoderma* sp. (BAFC cult No 2233) y *T. harzianum* BAFC cult No 2385, 742, 2239 y 2244. Esta última cepa es uno de 10 componentes del producto comercial TRICOKILL, elaborado por Heligenetics S.A. para el control biológico de *R. solani* entre otros patógenos. Se prepararon suspensiones de conidios de cada cepa y se ajustaron a 1.3 conidios ml. Por otro lado se mezcló un inóculo de *R. solani* (BAFC cult No 2248) a base de arroz (consistente de micelio más esclerocios con tierra y cuarzo en una proporción de 3: 10: 10 (PNN). Esta mezcla se fraccionó en bolsitas conteniendo 150 ml de la misma. A cada bolsita se le agregó 3 ml de una suspensión de un antagonista y se dejó a temperatura ambiente durante tres días para dar lugar a la posible interacción entre antagonista y patógeno. Se agregaron 50 g de la mezcla incubada a macetas de 300 ml que contenían 120-125 g de

tierra de jardín con 15-20 plantas de tomate cada una de 20 días de edad. El tomate correspondió a una variedad comercial para uso de almácigos domésticos. Los tratamientos fueron 10 antagonistas potenciales, un control con el patógeno y otro sin hongos inoculados. Se realizaron tres replicas de cada tratamiento. La tierra de las macetas se mantuvo en capacidad de campo y las plantas se incubaron en invernadero a 25-30 OC. Al cabo de una semana de la inoculación, se evaluó el ataque del patógeno en función del porcentaje de plantas sobrevivientes.

e. CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp (EUASCOMYCETES: HYPOCREALES), SU ANTIBIOSIS Y MICOPARASITISMO SOBRE *Fusarium subglutinans* Y *F. oxysporum* (HYPHOMYCETES:HYPHALES)

Se reporta el aislamiento e identificación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos de huertas de mango afectadas con la enfermedad “escoba de bruja” y su actividad micoparasítica, así como también su acción antibiótica por quitinasas, glucanasas y 6-pentyl- α -pyrona sobre

F. oxysporum y *F. subglutinans*. Se colectaron 15 muestras de suelo en el estado de Guerrero y 10 en Colima, de los cuales se aislaron 105 cepas nativas en el 88% de las huertas. Por su efecto antagónico sobre el crecimiento del micelio de ambas especies de *Fusarium*, se seleccionaron 25 cepas de las especies *T. harzianum* (14), *T. longibrachiatum* (3), *T. cf harzianum* (3), *T. koningii* (2), *T. minutisporum* (1), *T. virens* y una no identificada. Las 25 cepas produjeron quitinasas, valores comprendidos entre 0.090 y 2.294 μmol de N-acetilglucosamina; glucanasas, entre 0.903 y 60.612 μmol de glucosa y 6PAP, hasta 2 294 mg excepto la especie *T. minutisporum* que no produjo 6PAP. Las 25 cepas presentaron inhibición en *F. oxysporum* sobre el crecimiento del micelio, en 33 y 35%, en la producción de conidios, 94.5 y 93.6% y sobre el porcentaje de germinación de ufc, 66.3 y 73.0% por actividad antibiótica de quitinasas y glucanasas, respectivamente. En *F. subglutinans* se manifestó inhibición sobre el crecimiento del micelio en 35 y 35%, en la producción de conidios, 86.0 y 84.9% y el porcentaje de germinación de ufc, 73.0 y 63.6% por actividad antibiótica de quitinasas y glucanasas, respectivamente. El 6PAP sólo mostró antibiosis

sobre el crecimiento del micelio y porcentaje de germinación de ufc, en 45.9 y 55.9% sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, respectivamente. Del mismo modo se presentó micoparasitismo, observando enrollamiento y penetración de las hifas de ambas especies de *Fusarium*. Por los resultados obtenidos, las 25 cepas nativas de *Trichoderma* pueden ser consideradas un recurso valioso para su evaluación como agente potencial de control biológico de los fitopatógenos que causan la “escoba de bruja” bajo condiciones de invernadero y campo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material experimental

Se utilizó como material experimental 40 muestras de cebolla roja (*Allium cepa L.*) variedad Ilabaya, en estadio de bulbeo; proveniente del Anexo de Sagollo, Distrito de Locumba, Provincia Jorge Basadre. Como antagonista se utilizó *Trichoderma harzianum* en presentación comercial Tricho D.

4.1.1 Material de Laboratorio

- Placas Petri 15 x 10 mm.
- Vasos de precipitación diferente volumen.
- Beaker diferente volumen.
- Probeta diferente volumen.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas.
- Tijeras.
- Agujas.
- Pinzas.
- Mechero.
- Espátula.

- Pinzas, tijeras.
- Baqueta.
- Laminas Porta objetos.
- Laminas cubre objetos.

4.1.2 Otros

- Cámara fotográfica digital.
- Lápiz y lapiceros.
- Bolsas de polietileno de 4 x10 cm.
- Algodón.
- Lupa.
- Letreros para muestreo.
- Papel kraft.
- Lampa.
- Macetas.
- Lavatorio.
- Computador portatil.

4.1.3 Equipos

- Microscopio.
- Balanza de precisión.

- Estufa.
- Autoclave.
- Estereoscopio.
- Refrigeradora.
- Autoclave

4.1.4 Reactivos de laboratorio

- Agar papa dextrosa (PDA)
- Hipoclorito de sodio 10%.
- Alcohol.
- Agua destilada.
- Solución colorante (Lactofenol + fucsina acida).

4.2 Ubicación y delimitación del Área de estudio:

La presente investigación se llevó a cabo en el valle de Locumba que se encuentra ubicada sobre la margen derecha del río del mismo nombre, en la Provincia de Jorge Basadre, Región Tacna, al Noreste de la ciudad de Tacna, a 93.7 Km., aproximadamente (80 minutos) entre la latitud sur 17°25'00" y longitud oeste 70°30'37", presenta

un clima semicálido a cálido durante el día y con temperaturas templadas por las noches.

4.2.1 Población

La población está conformada por el total de plantas de cebolla del campo de cultivo del sector de Sagollo anexo característico de la producción de cebolla del Distrito de Locumba Provincia Jorge Basadre.

4.2.2 Muestra

La muestra fue de 40 bulbos de cebolla que obtuvieron en base al muestreo aleatorio simple del campo de cultivo de cebolla; el cual consiste en hacer un recorrido en zig-zag a través del campo de cultivo y extraer los especímenes que se encuentran en las esquinas del recorrido.

4.3. Diseño de Investigación

Se empleó un diseño no experimental - descriptivo; dado que no se realiza manipulación de las variables y se basa fundamentalmente en la observación en su contexto natural y la descripción cada una de ellas independientemente con la finalidad de analizarlas con la posterioridad.

4.4. Metodología

4.4.1. Procesamiento de la muestra

4.4.1.1. Toma de muestra

Se tomó la muestra de cebolla en estadio de bulbeo y con síntomas de la enfermedad haciendo el cavado alrededor del bulbo, dándole un perímetro de 5 a 10 cm aproximadamente de radio a cada bulbo, para lograr sacar las raíces sin causarles algún daño. A continuación se realizó el recojo de la muestra con parte de la tierra de alrededor del bulbo protegiendo así las raíces de la desecación.

Se puso cada una de las muestras dentro de una bolsa de papel individual cerrándola herméticamente para evitar la desecación del material. .

Se rotuló la muestra indicando el lugar de muestreo, hora de toma de muestra y particularidad encontrada. Luego de tener rotuladas las muestras se transportarán al Laboratorio manteniéndolas a temperatura ambiente (*Newbiotechnich, Diagnóstico Fitopatológico*).

4.4.1.2. Siembra en medio de cultivo

Las plántulas enfermas se lavaron con agua corriente, seleccionando las raíces con la sintomatología, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% por cinco minutos, luego se lavaron con agua destilada estéril, y el exceso de agua se eliminó con papel absorbente, posteriormente fueron colocados en cápsulas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para su crecimiento (Perdomo, 2007).

4.4.1.3. Cámara húmeda

Las muestras previamente desinfectadas se colocaron en cámara húmeda, colocando en una placa Petri un soporte de vidrio estéril sobre papel absorbente húmedo en el fondo y posteriormente una laminilla portaobjetos donde se colocaron los trozos de raíz, para acelerar la esporulación de los hongos presentes (Perdomo, 2007).

Se mantuvo la humedad con adición de agua estéril y se evaluó diariamente al estereoscopio, para la observación de estructuras fúngicas.

4.4.1.4. Purificación del Hongo

Al desarrollarse el hongo tanto en el medio de cultivo como en cámara húmeda, se procedió a sembrarlo en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubó a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Al crecer las colonias de los hongos se hizo el repique a placas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) para su posterior identificación (Perdomo, 2007).

4.4.2. Identificación de los Hongos

Una vez logrado el cultivo puro se realizará montajes utilizando lactofenol mas fucsina ácida como liquido de montaje para la identificación del agente aislado mediante el examen de las características culturales de la colonia y las características microscópicas en base a las claves de Barnett & Hunter, Ellis (Barnet, H, 1972).

4.4.3. Prueba de Patogenicidad de Koch

Se realizó la Prueba de Patogenicidad de Koch en el laboratorio de Botánica de la Universidad Nacional Jorge Basadre con la finalidad de confirmar la patogenicidad del agente causal aislado de las plantas de cebolla con pudrición radicular. Esto se realizó con 5 repeticiones por agente hallado.

Se utilizó 18 especímenes de cebolla roja de variedad Ilabaya sanos, en estadio de bulbeo, estos fueron recolectados y dispuestos en bolsas con sustrato estéril consistente de tierra de chacra, arena lavada y humus en una proporción de 2:1:1 respectivamente (Perdomo, 2007).

Para la prueba de patogenicidad se utilizó 5 plántulas de cebolla roja de 45 días de edad producidas en sustrato estéril y un testigo. En el caso de los agentes aislados de cebolla solamente pudrición radicular se realizó la inmersión de las raíces de cada planta por 3 minutos en una suspensión de 10^7 conidias/ml y luego se trasplantó a bolsas de 0,5 Kg. con

tierra de chacra, arena lavada y humus estéril una proporción de 2:1:1 respectivamente.

Para el caso de los agentes aislados de cebolla con síntomas de pudrición radicular y decoloración vascular del disco basal, a cada planta de cebolla roja de 45 días de edad, se le hizo cinco punciones a nivel del disco basal y se realizó una inmersión por 3 minutos en una suspensión de 10^7 conidias/ml. Luego se trasplantó a bolsas de 0,5 Kg. con tierra de chacra, arena lavada y humus estéril una proporción de 2:1:1 respectivamente.

En ambos casos se evaluó periódicamente hasta la aparición de síntomas en el follaje y a nivel radicular y finalmente se realizó el reaislamiento de los patógenos hallados.

4.5. Prueba de Antagonismo

4.5.1. Evaluación de antagonismo mediante el Método del Cultivo Dual

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron en el Medio de Cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) colocándose en un

extremo de la placa Petri un disco de agar de 4 mm con micelio del agente causal aislado y en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio de *Trichoderma harzianum* en presentación comercial Tricho D a una distancia de 05 cm. aproximadamente entre ellos. (Howell, 2010) Posteriormente se procedió a la incubación a 25 °C.

Para evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* frente al agente causal de la pudrición radicular se midió el crecimiento radial del patógeno como testigo y del antagonista cada 24 horas hasta que la colonia del testigo llenó toda la superficie de la placa Petri.

Para la evaluación de la capacidad biocontroladora de los microorganismos se empleó el cálculo del Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR), que mide el antagonismo de los microorganismos evaluados, este se obtiene a partir del crecimiento de cada patógeno en cultivo dual, junto con sus respectivos testigos, empleando la fórmula utilizada por Suárez et al. (2008):

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \cdot 100$$

Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).

4.5.2. Evaluación de Antagonismo por micoparasitismo.

El antagonismo o capacidad antagónica se comprueba de distintas formas, principalmente midiendo el grado de micoparasitismo de cada antagonista, el cual se determinó por la escala que proponen Ezzyyyani et ál (2004). La evaluación se realizó en un microscopio binocular con aumento de 40x.

Se clasifica de acuerdo con la escala de 0 a 4 donde 0 representa ningún tipo de micoparasitismo por no observar la invasión de la superficie de la colonia del patógeno por el antagonista y 4 representa el 100% de micoparasitismo con la invasión total de la superficie de la colonia del patógeno incluso con esporulación sobre ella.

Cuadro 1.- Escala para evaluación de la capacidad antagónica

Ezzyyani et ál (2004)

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Fuente: Ezzyyani et ál (2004)

4.5.3. Variables

- **Variable independiente (X):** Capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* en presentación comercial Tricho D.
- **Variable dependiente (Y):** Porcentaje de Inhibición de Crecimiento del patógeno (cm).

Cuadro 2: Operacionalización de variables

VARIABLES	INDICADOR
INDEPENDIENTE (X) Capacidad antagónica de <i>Trichoderma harzianum</i> (Tricho D)	Actividad antagónica de <i>Trichoderma harzianum</i> .
DEPENDIENTE (Y) Porcentaje de Inhibición de Crecimiento del patógeno (cm)	Crecimiento radial de <i>Pyrenochaeta terrestres</i> en Prueba Dual.
	Crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum</i> , en Prueba Dual.
	Crecimiento radial de <i>Fusarium solani</i> en Prueba Dual.

Fuente: Elaboración propia

4.5.4. Análisis estadístico

Se realizó el análisis descriptivo de las variables y la prueba de T Student de muestras relacionadas para las comparaciones de medias entre grupos, utilizando el programa estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) Versión 19.0

V. RESULTADOS

5.1 Aislamiento e identificación de agente etiológico del Cultivo de Cebolla

En el presente trabajo se identificó como agente etiológico causante de la pudrición radicular del cultivo de cebolla identificado como *Pyrenochaeta terrestres* asociado a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.

De igual modo se logró aislar además a 14 especies diferentes del genero *Fusarium* como resultado de los análisis realizados.

En cuanto a la incidencia de los hongos patógenos en la totalidad de las muestras se obtuvo en mayor número a *Pyrenochaeta terrestris* con 38 aislados, seguida por *Fusarium* sp. con un total de 33, así como la presencia de *Fusarium oxysporum* en 22 oportunidades, de igual modo se aisló la especie *Fusarium solani* en número de 9 y finalmente la presencia de *Rhizoctonia solani* en 1 oportunidad.

Cuadro 3. Incidencia de hongos patógenos aislados

Hongos Patógenos aislados	Nro. de Incidencias
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	38
<i>Fusarium oxysporum</i>	22
<i>Fusarium solani</i>	9
<i>Fusarium spp.</i>	33
<i>Rhizoctonia solani</i>	1

Fuente: Elaboración propia

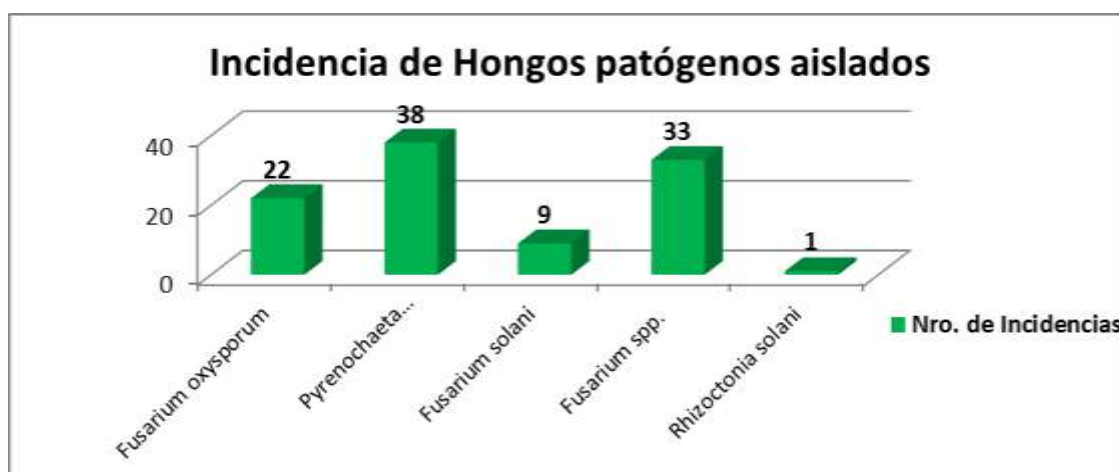


Figura 3: Incidencia de hongos patógenos aislados.

Fuente: Elaboración propia

De lo observado en cuanto a los aislamientos de los hongos patógenos, se obtuvo también las asociaciones de hongos encontradas determinándose de la siguiente manera:

Cuadro 4. Asociación de Hongos patógenos aislados

Asociación de Hongos Patógenos aislados	Nro. de Incidencias
<i>Asociación P. terrestris y F. solani</i>	6
<i>Asociación P. terrestris y Fusarium spp.</i>	15

Fuente: Elaboración propia

El Cuadro N° 4 muestra que el mayor número de incidencias en asociación de hongos patógenos se obtuvo entre *Pyrenochaeta terrestris* y *Fusarium* sp. con 15 incidencias seguido de la asociación *Pyrenochaeta terrestris* y *Fusarium solani* en número de 6 tal como se muestra en la figura 4:

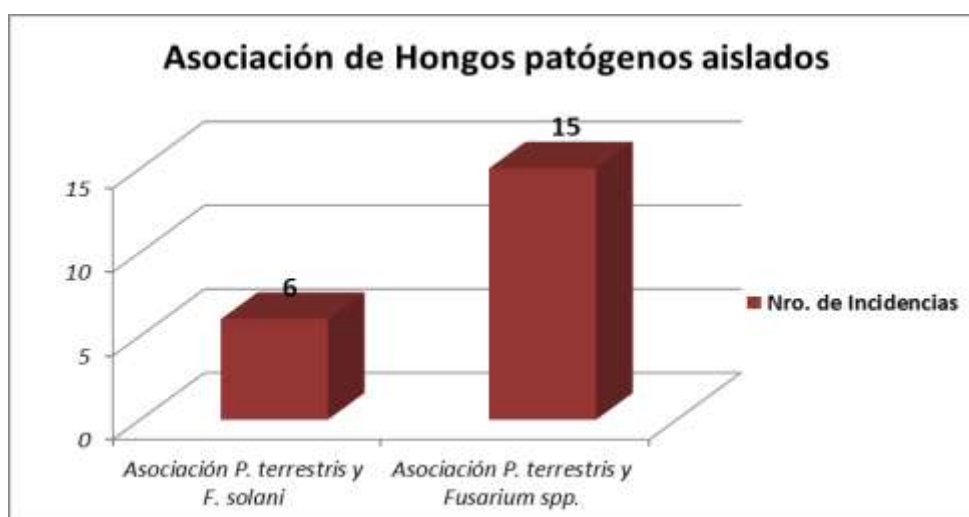


Figura 4: Incidencia de Asociación de hongos patógenos aislados.

Fuente: Elaboración propia

5.2. Prueba de Antagonismo mediante el Método del Cultivo Dual

Se obtuvo como resultado en base al Porcentaje de inhibición por *Trichoderma harzianum* lo siguientes valores:

Cuadro 5: Porcentaje de inhibición por *Trichoderma harzianum* sobre agente etiológico y asociados.

Agente etiológico y asociados	Porcentaje de inhibición
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	74,83%
<i>Fusarium oxysporum</i>	52,38%
<i>Fusarium solani</i>	49.33 %

Fuente: Elaboración propia

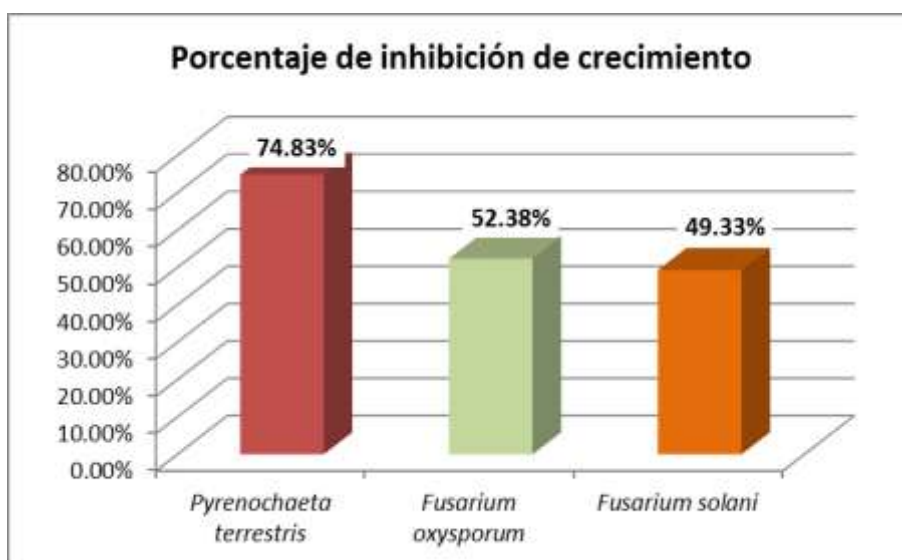


Figura 5: Porcentaje de inhibición de crecimiento.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 6: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Pyrenochaeta terrestris*

Varianza	Desviación estándar	Media	Comportamiento		Rango
			Minino	Máximo	
1,016	1,008	74,83	73,73	74,82	2,46

Fuente: Elaboración propia

La media general del porcentaje de inhibición de crecimiento en la prueba de antagonismo de *Pyrenochaeta terrestris* fue de 74,83 %. El valor de la desviación estándar indica que en promedio las observaciones individuales se desvían en 1,008, siendo su varianza de 1,016; asimismo se observa que la máxima fue de 74,82% y la mínima 73,73% y un rango de 2,46.

Cuadro 7: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium oxysporum*

Varianza	Desviación estándar	Media	Comportamiento		Rango
			Minino	Máximo	
3,77	1,94	52,38	48,97	54,99	6,019

Fuente: Elaboración propia

La media general del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium oxysporum* fue de 52,38%. El valor de la desviación estándar indica que en promedio las observaciones individuales se desvían 1,94; siendo su varianza de 3,77, asimismo se observa que la máxima fue de 54,99% y la mínima 48,97% y un rango de 6,019.

Cuadro 8: Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium solani*

Varianza	Desviación estándar	Media	Comportamiento		Rango
			Minino	Máximo	
5,99	2,44	49,32	46,35	52,43	6,08

Fuente: Elaboración propia

La media general del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium solani* fue de 49,32%. El valor de la desviación estándar, indica que en promedio las observaciones individuales se desvían 2,447; siendo su varianza de 5,99 , asimismo se observa que la máxima fue de 52,43% y la mínima 46,35 % y un rango de 6,08 respectivamente.

5.2.1. Análisis Estadístico para muestras relacionadas

Cuadro 9: Análisis Estadístico para muestras relacionadas

Muestras relacionadas	Media del PIC	N muestras	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1 <i>Pyrenochaeta terrestris</i>	74,83	7	1,008	,47
<i>Fusarium oxysporum</i>	52,38	7	1,94	,80
Par 2 <i>Pyrenochaeta terrestris</i>	74,83	7	1,008	,47
<i>Fusarium solani</i>	49,32	7	2,447	1,09
Par 3 <i>Fusarium oxysporum</i>	52,38	7	1,94	,80
<i>Fusarium solani</i>	49,32	7	2,447	1,09

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N° 9 para la prueba de t de muestras relacionada se observa los promedios de inhibición de crecimiento, donde el mayor porcentaje lo obtiene *Pyrenochaeta terrestris* con 74,83 % seguido de *Fusarium oxysporum* 52,38% y *Fusarium solani* con 49,32% respectivamente.

5.2.2. Prueba de t para muestras relacionadas

Ho: No existen diferencias estadísticas en porcentaje de inhibición entre grupos

H1: Existen diferencias estadísticas en porcentaje de inhibición entre grupos

α : 0.05

Cuadro 10: Prueba de t Student para muestras relacionadas

Muestras relacionadas	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Des. típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 <i>P. terrestris</i> - <i>Fusarium oxysporum</i>	22,45	3,06	1,02	20,79	25,50	22,63	6	,000
Par 2 <i>P. terrestris</i> - <i>Fusarium solani</i>	25,51	2,64	1,18	22,13	28,71	21,46	6	,000
Par 3 <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Fusarium solani</i>	3,06	3,29	1,47	-,009	8,172	2,77	6	,050

Fuente: Elaboración propia

De la prueba de t de muestras relacionadas se puede determinar lo siguiente:

Se observa que existe diferencias significativas en el porcentaje de Inhibición de crecimiento entre *Pyrenochaeta. terrestris* que reporta 74.83% y *Fusarium oxysporum* 52.38% ; esto con un nivel de confianza del 95%.

Existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de crecimiento entre *Pyrenochaeta. terrestris* que reporta 74.83% y *Fusarium solani* con 49.33% ; esto con un nivel de confianza del 95%.

Se observa que existe diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de crecimiento entre *Fusarium oxysporum* que reporta 52.38% y *Fusarium solani* con 49.33% ; esto con un nivel de confianza del 95%

De acuerdo a estos resultados, se evidenció que el porcentaje de inhibición de crecimiento obtenido en todos los tratamientos fue positivo, por lo tanto se acepta la hipótesis alterna con un 95% de confiabilidad.

5.3 Capacidad antagónica por micoparasitismo de hongos patógenos del Cultivo de Cebolla

Se clasificó de acuerdo con el grado basado en una escala de 0 a 4 de Ezzyyani et ál (2004) dando como resultado en todos los casos 4, lo que indica 100% de micoparasitismo con invasión total de superficie de la colonia del patógeno con esporulación sobre ella.

Cuadro 11: Capacidad antagónica por micoparasitismo.

Hongo patógeno	Grado de Capacidad Antagónica por micoparasitismo
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	4
<i>Fusarium oxysporum</i>	4
<i>Fusarium solani</i>	4

Fuente: Elaboración propia

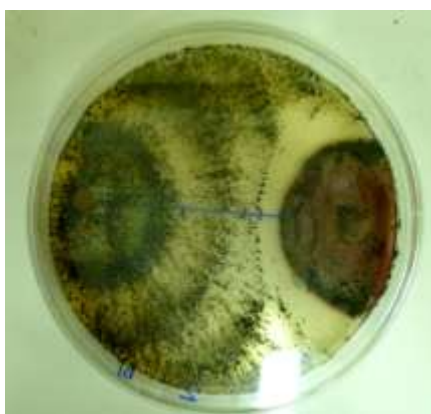


Figura 7.- Capacidad antagónica sobre *Pyrenochaeta terrestris*.

Referencia: Elaborada por el autor.

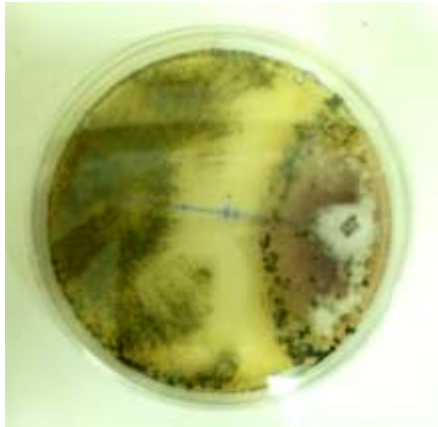


Figura 8.- Capacidad antagonística sobre *Fusarium oxysporum*

Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 9.- Capacidad antagonística sobre *Fusarium solani*.

Referencia: Elaborada por el autor.

VI. DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue determinar la etiología y control *in vitro*, con *Trichoderma harzianum* sobre el agente etiológico causante de la pudrición radicular en el cultivo de *Allium cepa* L.(cebolla) en el valle de Locumba, Provincia Jorge Basadre. De los resultados obtenidos se reporta como agentes etiológicos a los hongos fitopatógenos *Pyrenochaeta terrestris*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.

Cervantes y Días (2010) en su estudio de biocontrol de la pudrición radicular concuerda con los resultados obtenidos, *Pyrenochaeta terrestris* y *Fusarium oxysporum* a los cuales realiza pruebas de biocontrol con *Trichoderma harzianum* logrando una alta acción antagónica *in vitro* e *in vivo* considerando que aislamientos nativos de *Trichoderma* en suelos sembrados con cebolla serían agentes promisorios en el control biológico de la pudrición radicular en el cultivo de cebolla ocasionada por *F. oxysporum* y *P. terrestris*.

Cárdenas (2003) aisló el agente causal de la Raíz Rosada (RR) de la cebolla, identificándose como *P. terrestris*.

El antagonismo de *Trichoderma harzianum* en presentación comercial Tricho D se evaluó por el método del cultivo dual, confrontando a los agentes etiológicos aislados *Pyrenochaeta terrestris*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* con el antagonista *Trichoderma harzianum*, obteniendo como resultado un porcentaje de inhibición de crecimiento de 74,83% sobre *Pyrenochaeta terrestris*, 52,38% sobre *Fusarium oxysporum* y de 49.33 % en el caso de *Fusarium solani*.

Ghrisalberti y Sivacithamparam (1991) reconoce que la habilidad de *Trichoderma* spp. para reducir los daños en enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, está relacionada a su fuerte capacidad competitiva, al fenómeno de antibiosis, por la producción de enzimas líticas, metabolitos secundarios y al micoparasitismo.

Cervantes y Días (2010) en su estudio de biocontrol de la pudrición radicular en cebolla reporta que el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Pyrenochaeta terrestris* a las 96 h fue de 37% y luego se incrementó a 58 % a los 7 días de confrontación.

Asimismo presentó una capacidad antagónica de tipo hiperparasítica, ya que el género *Trichoderma* colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno (clase 1) de acuerdo con la clasificación de

Bell y colaboradores (1982). De igual modo observó que la cepa de *Trichoderma* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* a partir de las 72 h de exposición en un 37 % hasta un 70% a las 168 h de exposición; corroborando los resultados obtenidos en el presente estudio.

Cárdenas (2003) aisló el agente causal de la Raíz Rosada (RR) de la cebolla, identificándose como *P. terrestres*. Evaluó el efecto de 28 fungicidas comerciales sobre el crecimiento del micelio del hongo en estudio en una prueba *in vitro*, considerándose productos de contacto, sistémicos y compuestos los cuales inhibieron en un 100 % el desarrollo del micelio. Estos fungicidas fueron seleccionados para evaluar su efectividad como preventivos de la RR, utilizados como desinfectantes de semillas, se encontró que todos fueron eficientes excepto Folicur y Tilt los cuales inhibieron la germinación de semilla.

Un estudio de Hernández et al., (2006), realizando evaluaciones *in vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Anana comosus* (L.) Merr.) determinaron que el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) de la colonia *Fusarium subglutinans* con *T. harzianum* fue de un 48%.

Velázquez (2006), encontró una eficiente inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum* (98,8%) y *C. gloeosporioides* (100%) frente a *T. harzianum*. También se ha evaluado el uso de este antagonista frente a otros patógenos del cultivo de mango, incluyendo *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum*, agentes causales de la “escoba de bruja”, obteniéndose un PIC de 42,02 y 62,9%, respectivamente (Michel et al., 2001). En pruebas de enfrentamiento entre *F. oxysporum*, causante de la marchitez en tomate (Jiménez, 2004), con cepas de *Trichoderma sp.* observó que fue capaz de inhibir el crecimiento entre 29 y 49% (PIC) y la esporulación (PIE) entre 60 y 78%, mostrando alta capacidad antagónica corroborando lo encontrado en la presente investigación. Algunos investigadores señalan que usando mezclas de organismos con diferentes modos de acción o combinación de agentes de control biológico posiblemente puedan mejorar el espectro de actividad, lo que podría permitir el control de varios fitopatógenos, ya que la mayoría de los agentes de control biológico se han aplicado para controlar una determinada enfermedad (Yuen et al., 1985)

Fernández (2009) describe el comportamiento de los cultivos duales de *Trichoderma harzianum* y *F. oxysporum* con la reducción del crecimiento de *F. oxysporum* en el décimo día, entre sus 2 cepas comerciales con el

mayor porcentaje de PICR con un 65,91%, seguido por 64,61% sin diferencias significativas entre los tratamientos. De acuerdo a los niveles de significación ($P=0,0001$) entre los resultados obtenidos en la prueba de Duncan, se pudieron categorizar los antagonistas según el grado de inhibición en tres grupos, TCN-009 y TCC-006 en grado alto (60-65%), TCN-014 y TCC-005 en grado medio (57-59%) y TCN-010 con TCC-001 en grado bajo (54 y 56%), todos presentaron un PICR superior al 50%. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio con un Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) para *Fusarium oxysporum* de 52,38 %.

Estos resultados evidencian lo encontrado por Guedez, et al (2012) en su investigación titulada: Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate; sugirió que, con los aislamientos autóctonos de *T. harzianum*, es probable llegar a un control eficaz de los hongos patógenos *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum* en el cultivo de tomate, cuando se aplica de forma preventiva en semilleros y plantaciones definitivas, lo que permite la colonización de la rizósfera por la rapidez de crecimiento del hongo, impidiendo que proliferen poblaciones elevadas de hongos patógenos cerca de las plantas, siendo

más eficiente cuando el antagonista se encuentra adaptado a las condiciones del medio ambiente.

Goldman et al., (1994) reporta inhibición *in vitro* de la germinación de conidios y elongación de la hifa en *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Fusarium gramineum* Corda [W&R,G] por enzimas quitinolíticas y glucanolíticas producidas por *T. harzianum*.

Suarez et al (2008) en su ensayo de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá, realizado en medio de cultivo Agar Sabouraud, reporta los mejores porcentajes de inhibición de las cepas TA-9, TA-12 y TA-6 con valores de 70,56; 68,52 y 65,32% respectivamente demostrando que hubo antagonismo *in vitro* al utilizar los aislamientos nativos y comerciales de *T. harzianum* sobre *F. solani*.

En nuestro estudio se obtuvo para *F. solani* un porcentaje de 49.33 %, la variación de los resultados obtenidos puede deberse al medio de cultivo en que fueron aislados los patógenos siendo en el caso de Suarez et al Agar Sabouroud un medio enriquecido a diferencia del utilizado en este estudio Agar Papa Dextrosa. Esto es corroborado por Worasatit,

Sivasithamparam, Ghisalberti y Rowland, (1994); quien informa que la cantidad de metabolitos producidos por *Trichoderma* como método de biocontrol depende de los nutrientes y no siempre está relacionada con la habilidad para controlar a la enfermedad; sin embargo, Madi, Katan, Katan y Henis (1997) reportan una correlación positiva entre la cantidad de enzimas (quitinasas, glucanasas y otras enzimas) y el porcentaje de micoparasitismo; y por consiguiente la reducción de la enfermedad.

Cubillos (2011) en su ensayo evaluó la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani*, sus resultados evidenciaron que existe una correlación positiva entre el efecto antagónico de *T. harzianum* como biocontrolador superando el 45%.

Al respecto, Mont (2002) , refiere que *T. harzianum* tiene una alta capacidad de competencia por el substrato; como consecuencia de ello, el organismo afectado tiende a entrar en un estado de latencia, que podría ser por deficiencia de nutrientes o la presencia de cierto nivel de sustancias inhibitorias, lo cual impide que siga creciendo; coincidiendo, con los resultados obtenidos en el presente trabajo, como lo demuestra la notable acción inhibitoria que ejerce *T. harzianum* sobre *Pyrenochaeta terrestris* con un porcentaje de inhibición de crecimiento de 74,83%,

52,38% sobre *Fusarium oxysporum* y de 49.33 % en el caso de *Fusarium solani*.

Por otra parte Suarez et al (2008) en su investigación informa que el aislamiento nativo TCN-014, seguido del aislamiento comercial TCC-005 de *Trichoderma harzianum*, resultaron ser los antagonistas con mayores habilidades de micoparasitismo, competencia por espacio e inhibición de crecimiento para el control de los aislamientos patógenos FSM-011 y FSM-012 de *Fusarium solani* de acuerdo con las pruebas *in vitro*, corroborando lo encontrado en la presente investigación

Respecto a la Capacidad antagónica por micoparasitismo de los hongos patógenos del cultivo de cebolla en el presente estudio; se obtiene un grado 4 de la escala de Ezzyyani et ál (2004) que corresponde al 100% de micoparasitismo con invasión total de superficie de la colonia del patógeno y esporulación sobre ella, equivalente al de la clasificación de Bell y colaboradores (1982); esto para los 3 agentes etiológicos.

Cervantes – Díaz (2010) indica que se presentó una capacidad antagónica de tipo hiperparasítica ya que *Trichoderma* colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno (clase 1) de acuerdo

con la clasificación de Bell y colaboradores (1982) en cuanto a *P. terrestris* y *F. oxysporum*.

Sin embargo Fernández (2009) no reporta micoparasitismo para el control biológico del *F. oxysporum* por *Trichoderma harzianum*, lo cual es contradictorio al presente estudio a diferencia de (Zago, 2006) donde resalta el micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre *F. oxysporum* con un grado 4 de la escala de Ezzyyani et ál (2004). Teniendo como diferencia en sus estudios los medios de cultivos para el desarrollo de los hongos.

Suarez et al. (2008) en su estudio de Antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* Rifai sobre *F. solani* destaca que observa micoparasitismo en grado 4 para los aislamiento de *F. solani* en los tratamientos con *T. harzianum* TA-5 y TA-6 similar a los resultados obtenidos en el presente estudio, como se observa en las imágenes obtenidas de la Prueba dual.

VII. CONCLUSIONES

1. El agente etiológico de la pudrición radicular del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) es *Pyrenochaeta terrestris* asociado a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.
2. *Trichoderma harzianum* tuvo control *in vitro* sobre el desarrollo de *Pyrenochaeta terrestris*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*
3. Las tres especies de hongos aislados del cultivo de cebolla con pudrición radicular fueron positivos a la Prueba de patogenicidad.
4. La capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre los hongos patógenos tuvo un porcentaje de inhibición de crecimiento de 74,83% sobre *Pyrenochaeta terrestris*, 52,38%, sobre *Fusarium oxysporum* y de 49,33% en el caso de *Fusarium solani*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar el control de la pudrición radicular del cultivo de cebolla con *Trichoderma harzianum* en campo.
- Realizar pruebas moleculares para la identificación de los hongos causantes de la pudrición radicular de la cebolla.
- Desarrollar la investigación en otras localidades donde se produce cebolla en la Región Tacna.
- Realizar estudios sobre recuento de población fúngica en el suelo del campo de cultivo de cebolla en el Valle de Locumba, Provincia Jorge Basadre.

IX. BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. (1996); Fitopatología, 2da edición. Editorial Limusa; México.

ALTIERI, M.A: C.I. NICHOLS. (1999) Classic biological control in Latin America. Handbook Biological Control Academic Press, San Diego USA.

ALCANTARA, R. (2005) efectividad del uso de *Trichoderma harzianum* en el control de *Phytophthora capsici* Leonian, en aji (*Capsicum Annuum* L. Var Longum sendt) en La Región del Maule.

ANDREU C.M., CUPULL R.S., MAYEA S.S., (1992). Relaciones antagónicas sobre el crecimiento micelial de *Alternaria solani* Soraver, por *Trichoderma spp.* y *Verticillium spp.* Centro Agrícola, 19(2-3):114-116.

ANGELFIRE. 2010. *El cultivo de la cebolla*

ARTIGAS, J. (1983) *La cebolla: valiosa hortaliza como alimento y medicina*. Madrid. EDAF. 85 p.

AWUAH, R.T., y LORBEER, J. W. A (1989) *procedure for isolating Pyrenochaeta terrestris from onion roots. Annals of Applied Biology* 114:205 –208. 1989.

BARRERA, C. 2005. Informe anual 2004: Programa nacional de investigaciones de hortalizas. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA). Lima, Perú. 224 p.

BAILEY BA, Lumsden RD, 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman GE, Kubicek CP (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 185–204.

BAKER KF, (1983). The Nature and Practise of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society. St Paul, innesota, pp. 539.

BERRA Lertxundi, D. (2002). *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz et al. Enfermedad de las raíces rosas. Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales. Ficha 196. MAPA. Madrid.

BISSETT, J. (1991) . A revision of the genus *Trichoderma*. spp., Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357-2372.

BOLAÑOS, A. 2001. Introducción a la olericultura. San José, C.R. EUNED. p. 281- 301.

BOSLAND, P.W. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology* 6: 281-289.1988.

BRAVO Alejandra; Ibarra J.; María Cristina del Rincón Castro; Galindo E.; Patiño M.; Serrano L.; García R.; Pereyra Alférez B.; Andrea Alcázar Pizaña; Luna Olvera H.; Galán Wong L.; Liliana Pardo; Muñoz Garay C.; Isabel Gómez y Soberón M. (2006): *Los microorganismos en el control de insectos y patógenos. Cuernavaca, México. Revista, Latinoamericana de Microbiología.* 48(2). 113 -120 pp.

BROTMAN Y, Kapuganti JG, Viterbo A, 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20:R390– R391.

CÁRDENAS L. (2008) Etiología de la raíz rosada de la cebolla y su control químico

CAMARGO, M., y KIMATI, H (1991) *Influence of media, light and filter paper placement on the sporulation of Pyrenochaeta terrestris. Summa Phytopathologica* 17 (3): 201–206

CASSERES, E. (1984). *Producción de hortalizas*. San José, CR. IICA. p. 238-254.

CERVANTES-DÍAZ, CASTRO A PULIDO-HERRERA, CECEÑA D. (2010) uso de TRICHODERMA sp. para el biocontrol de la pudrición radicular en cebolla México

COBOS 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*. Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniera Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército, Santo Domingo, Ecuador. 99 pp.

COOK R.J. (1979). *Antagonism and biological control: concluding remarks. In: Soilborne plant pathogens*. Schippers, B; Gams, W. (eds). New York, Academic. p. 653-657.

CUNDOM, M.A.; S.M. Mazza de Gaiad; M.A. Mazzati de Castañon; S.A. Gutiérrez de Arriola y M. Coutinho. (2002). *Actividad antagónica in vitro de*

CRUZ C (2007): *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto*. Tesis presentada en opción al Título Académico de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 91 pp.

CHANG YC, Chang YC, Baker R, Kleifeld O, Chet I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 1986; 70:145–148.

CHET I, Benhamou N, Haran S, (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Cook R.

CUBILLOS J. Paez A. (2011) Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado al Complejo “Secadera” en Maracuyá, Bajo Condiciones de Invernadero.

DEACON, J. (1991). *Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-borne pathogens*. *Biocontrol Science Technology* 1: 5 – 20.

EZZIYYANI M.; Consuelo Pérez Sánchez; Ahmed S.; María Emilia Requena y María Emilia Candela (2006): *Control biológico por microorganismos antagonistas*. Murcia, España. Revista, *Horticultura*. 19. 18.

FERNANDEZ C.L., NOVO R.S., (1988). Vida microbiana del suelo. Primera parte. Editorial Pueblo y Educación. 233 pp.

FERNÁNDEZ VALIELA, M.V. (1978). Introducción a la Fitopatología. Volumen III: hongos. Colección Científica del INTA. Buenos aires – Argentina. Pp. 34 -37.

FERNÁNDEZ R, SUÁREZ C. (2009) Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Rev Fac Nal Agr Medellín. 2009; 62:4743-82

FLETCHER, J. T., P. F. White and R. H. Gaze. (1986). Champiñones: control de las enfermedades y plagas. Acribia S.A. Zaragoza, España. 159 pp.

GUÉDEZ C. Cañizalez L, Castillo, C, Olivar R. (2009) Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate

HARMAN, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190-194.

HOOG, G.S.; Guarro, J.; Gene, J. and Figueras, M.J. (2000) , *atlas de hongos clínicos*, 2 a ed. Ed. CBS Utrece y the Netherland 2: 1-1126

KAY S.J., STEWART A. (1994). Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology*

Kookana, R. & Simpson, B. (2000) Pesticide fate in farming systems: Research and monitoring. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 31: 1641 – 1659.

INTA. (2008) (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). Manejo integrado de la cebolla. Argentina

INFANTE Danay; Martínez B.; Noyma González y Yusimy Reyes (2009): Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. La Habana, Cuba. *Revista, Protección Vegetal*. 24(1). 14 - 21 pp

LANE S.D., BOWEN N.J. (2005). Revisiting the use of Iprodione and *Trichoderma* in the integrated management of onion white rot. Archives of Phldytopathology and Plant Protection 133-138. pp

LARGENT L. David. (1973), How to identify mushrooms to genius I: Macroscopic Features. Washington.

NELSON, E. (1991). Handbook of Applied Mycology. Volume 1: Soil and Plants. En Arora, D. K., Rai, B., Mukerji, K. G., Knudsen, G. R. (Eds). Current limits to biological control of fangal phytopathogens (pp: 327-355).

MICHEL ACEVES A. C. (2001): Cepas nativas de *Trichoderma spp* Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis presentada en opción al Título Académico de Doctor en Ciencias: Área Biotecnología. Universidad de Colima, México. 152 pp.

MONDINO, P., Vero, S (2006): Control biológico de patógenos en plantas. Editorial. Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 158 pp.

MONT R. (2002) Manejo integrado de las enfermedades de las plantas. SENASA. Lima-Perú. pp. 50-56.

MONTES-BELMONT, R.; Nava-Juárez, R.; Flores-Moctezuma, H. E. y Mundo-Ocampo, M. (2003). Hongos y nematodos en raíces y bulbos de

cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado de Morelos, México. Rev. Mex. Fitopatol. 21:300-304.

MOHAN, S. K. y SCHWARTZ, H. F. (2000) Diseases of Onion (*Allium cepa* L.). Common Plant Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota,

MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DE JORGE BASADRE (2012) Proyecto Fortalecimiento De Capacidades en la Comercializacion de Ajíes y Cebolla Amarilla en las Localidades De Chipe, Sagollo, Chaucalana, Piñapa, Sitana Y Aurora, Distrito De Locumba, Provincia Jorge Basadre - Tacna

OHAMED-ALI, G. H. ; FREGOON, S. O. y EL-HASSAN, H. S. (1984) Effect of frequency of irrigation and cultivar on the incidence of pink root disease of onions (*Pyrenochaeta terrestris*, Sudan) . Acta. Hortic. 143:427 – 432.

PULIDO-HERRERA, A.; Zavaleta-Mejía, E.; Cervantes-Díaz, L.; Grimaldo-Juárez, O. Y Avilés-Marín, S. M. (2008). Incidencia, severidad e identificación del agente causal de la pudrición radical de la cebolla (*Allium cepa* L.) en el Valle de la Trinidad, Baja California, México. XI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas, Baja California. 201-205 p.

Ryder LS, Harris BD, Soanes DM, Kershaw MJ, Talbot NJ, Thornton CR. (2012) Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a

genetically modified strain of the plant-growthpromoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. *Microbiol.* 2012;158(1):84-97.

RINCÓN AM, CODÓN AC, BENÍTEZ T, (2008). Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. En: Pallás V, Escobar C, Rodríguez Palenzuela P, Marcos JF (eds.), *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid, pp. 345–368.

RODRÍGUEZ (2011) control biológico de *Trichoderma harzianum* sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya*.

ROYSE, D.J. Y S.M. RIES. (1978) The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathol.* 68, 603-607.

SANDOVAL Ileana, López M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseoli* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad.* 2002;4(3-4):69-72.

SEABY, D. A (1996). Investigation of the epidemiology of green mould of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost caused by *Trichoderma harzianum*. Plant Pathology .45 pág

SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL, (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: Harman GE, Kubicek CP (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis Inc., London, pp. 139–191.

SHORESH M, HARMAN GE, MASTOURI F, (2010). Induced Systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology 18:21–434.

SUÁREZ MEZA , Reinel José Fernández Barbosa , Nelson Osvaldo Valero³ , Rocío Margarita Gámez Carrillo , Alberto Rafael Páez (2008) Redondo⁵ Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá.

TODORQUIDEA. (2012). TODORQUIDEA.

<http://www.todorquidea.com/pt/fungicidas/45-trichoderma.html>

VADEMÉCUM AGRÍCOLA. (2008) , 4 ed. Quito, Edifarm. 622

VELÁSQUEZ, L. 2006. Diagnostico y alternativas de control de la antracnosis del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) en el sector monte oscuro del Municipio Tovar. Tesis de grado para optar al título de Magister Scientiarum en Agronomía, Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela Maracay-Venezuela. 85p.

VERMA M, BRAR S, TYAGI RD, SURAMPALLI RY, VALÉRO JR, (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.; Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal 37:1–20.

VITERBO A, RAMOT O, CHERNIN L, CHET I, (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie van Leeuwenhoek 81:549–556

YUEN, G.; M. SCHROTH AND A. MCCAIN. 1985. Reduction of *Fusarium wilt* of Carnation with suppressive and antagonistic bacteria. Plant Disease 69:1071- 1075.

X. ANEXOS

Cuadro 12. Agentes Etiológicos en muestras de Cebolla

Muestra	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Muestra 1	Contaminado				
Muestra 2	Aislado	Aislado	Aislado		
Muestra 3	Aislado			Aislado	
Muestra 4	Aislado	Aislado	Aislado	Aislado	
Muestra 5		Aislado	Aislado		
Muestra 6		Aislado		Aislado	
Muestra 7	Aislado	Aislado			
Muestra 8	Aislado	Aislado			
Muestra 9	Aislado				
Muestra 10	Contaminado				
Muestra 11		Aislado		Aislado	
Muestra 12			Aislado	Aislado	
Muestra 13	Aislado			Aislado	
Muestra 14		Aislado			
Muestra 15		Aislado		Aislado	
Muestra 16		Aislado		Aislado	
Muestra 17		Aislado	Aislado		
Muestra 18		Aislado		Aislado	
Muestra 19		Aislado		Aislado	
Muestra 20	Aislado	Aislado			
Muestra 21		Aislado			
Muestra 22	Aislado	Aislado			
Muestra 23		Aislado			Aislado
Muestra 24	Aislado				
Muestra 25				Aislado	
Muestra 26				Aislado	
Muestra 27	Aislado				
Muestra 28	Contaminado				
Muestra 29	Aislado				
Muestra 30				Aislado	
Muestra 31		Aislado			

Muestra	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Muestra 32				Aislado	
Muestra 33	Aislado				
Muestra 34	Contaminado				
Muestra 35				Aislado	
Muestra 36		Aislado		Aislado	
Muestra 37				Aislado	
Muestra 38				Aislado	
Muestra 39		Aislado	Aislado		
Muestra 40	Contaminado				

Fuente: Elaboración propia

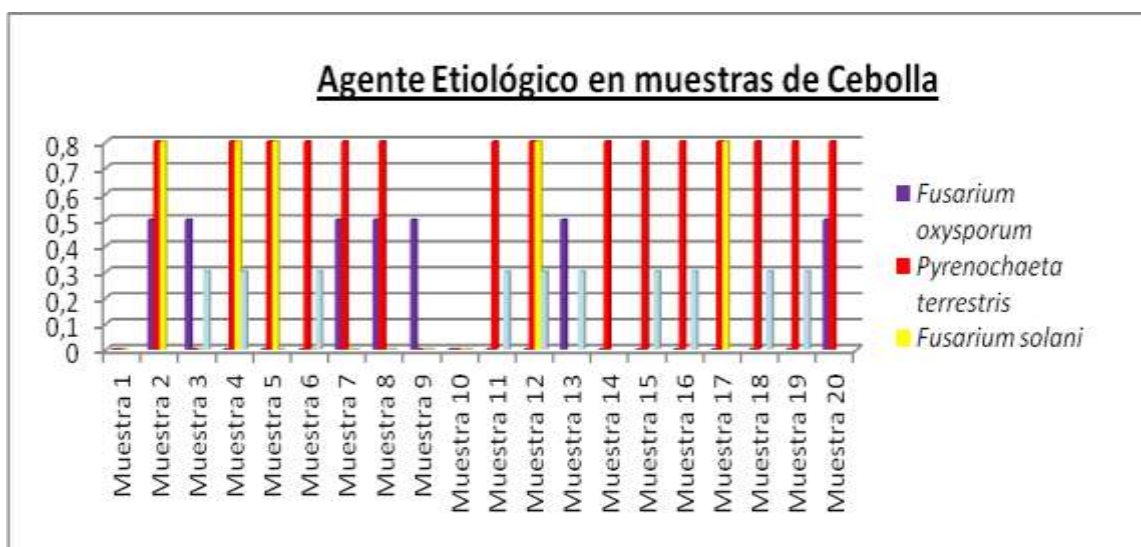


Figura 9: Agente etiológico en muestras de cebolla

Referencia: Elaborada por el autor

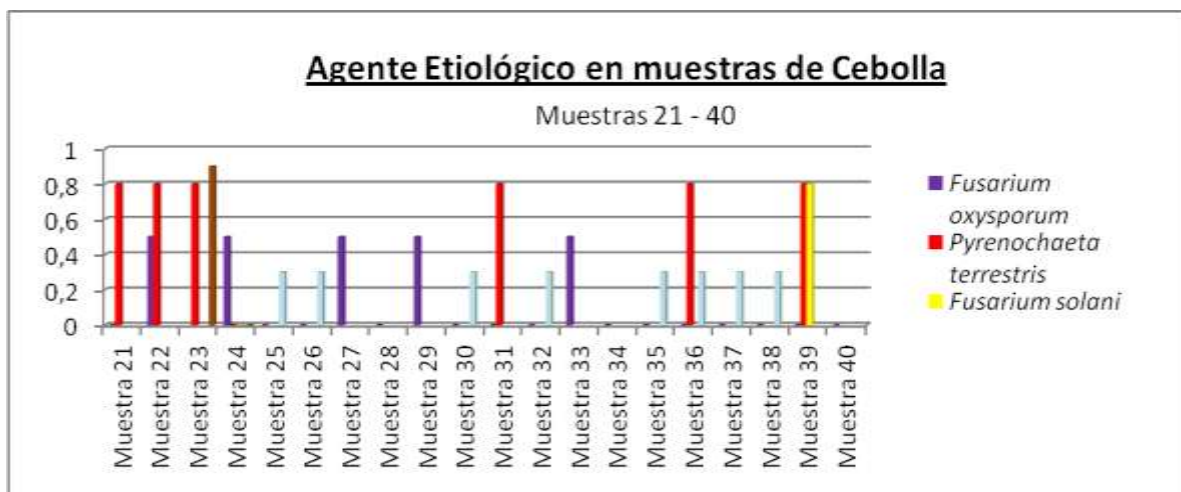


Figura 10: Agente etiológico en muestras de cebolla

Referencia: Elaborada por el autor

Cuadro 13. Asociación de Agente Etiológico en muestras de Cebolla

Muestra	Asociación <i>P. terrestris</i> y <i>F. solani</i>	Asociación <i>P. terrestris</i> y <i>Fusarium</i> sp.
Muestra 1	Aislado	Aislado
Muestra 2		
Muestra 3	Aislado	Aislado
Muestra 4	Aislado	Aislado
Muestra 5		
Muestra 6		Aislado
Muestra 7		Aislado
Muestra 8		
Muestra 9		
Muestra 10		Aislado
Muestra 11	Aislado	Aislado
Muestra 12		
Muestra 13		
Muestra 14		Aislado
Muestra 15		Aislado

Muestra	<i>Asociación P. terrestris y F. solani</i>	<i>Asociación P. terrestris y Fusarium sp.</i>
Muestra 16	Aislado	Aislado
Muestra 17		Aislado
Muestra 18		Aislado
Muestra 19		Aislado
Muestra 20		
Muestra 21		Aislado
Muestra 22		
Muestra 23		
Muestra 24		
Muestra 25		
Muestra 26		
Muestra 27		
Muestra 28		
Muestra 29		
Muestra 30		
Muestra 31		
Muestra 32		
Muestra 33		
Muestra 34		
Muestra 35		Aislado
Muestra 36		
Muestra 37		
Muestra 38	Aislado	
Muestra 39		
Muestra 40		

Fuente: Elaboración propia



Figura 11: Asociaciones de hongos en muestras de cebolla

Referencia: Elaborada por el autor.

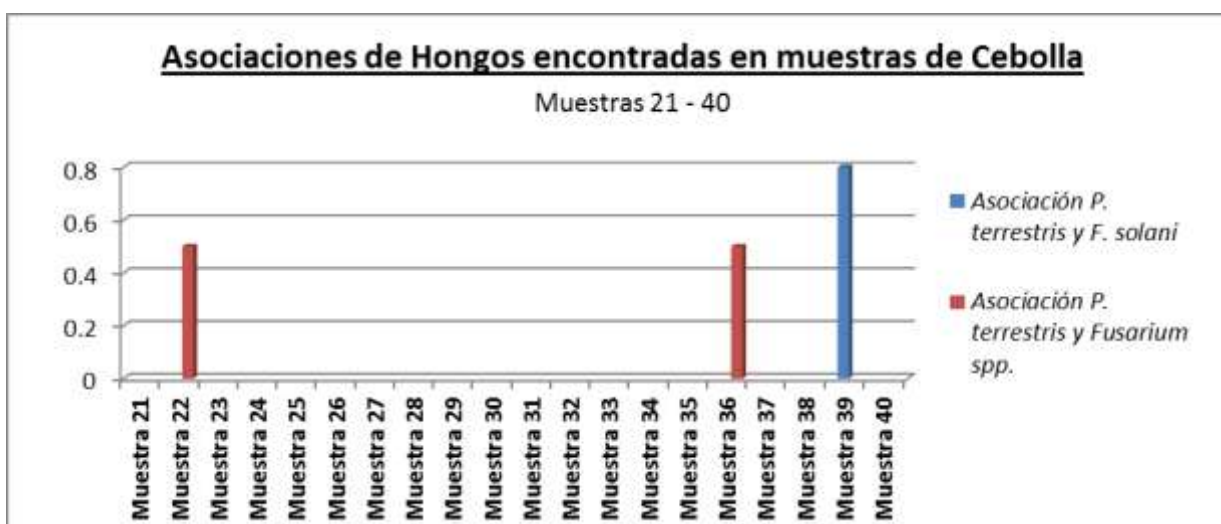


Figura 12: Asociaciones de hongos en muestras de cebolla

Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 13: Toma de Muestra.
Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 14: Muestreo en campo.
Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 15: Sintomatología parte aérea.

Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 16: Sintomatología en raíces.

Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 17: Trabajo en laboratorio.
Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 18: Aislamiento de *Pyrenochaeta terrestres*.
Referencia: Elaborada por el autor.

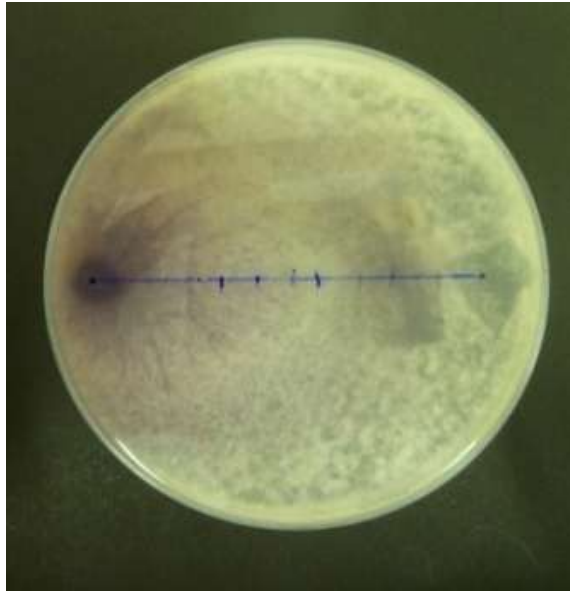



Figura 19: Aislamiento de *Fusarium oxysporum*.
Referencia: Elaborada por el autor.



Figura 20: Aislamiento de *Fusarium solani*.
Referencia: Elaborada por el autor.



Bach. Alejandra Jara Almonte Girón
Tesisista



Mblga. Lidivina Sulca Quispe
Asesora