



Universidad Nacional del Comahue

Facultad de Ciencias Agrarias

**BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, PATÓGENO DE SUELO EN
CEBOLLA CON AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Trichoderma* DE LA REGIÓN
PATAGONIA NORTE**

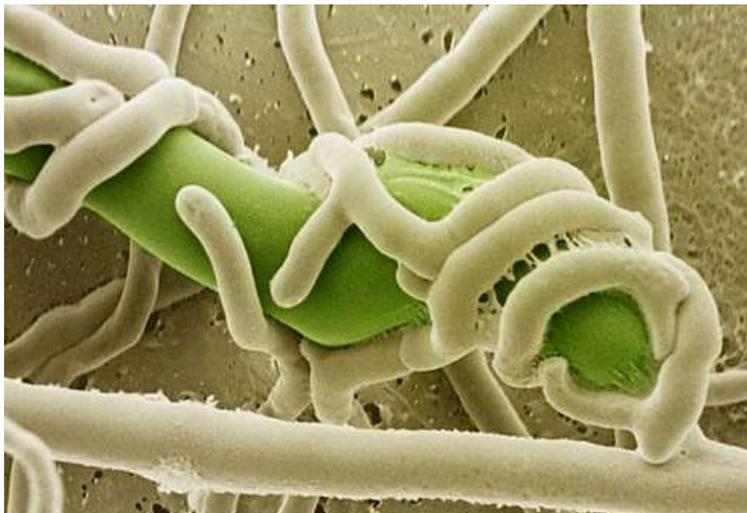
**Trabajo de Tesis para optar al Título de Magister en Ciencias Agrarias y
Biotecnología**

Ingeniera Agrónoma Sanchez Aixa Daihana

Directora: Dra. Sosa María Cristina.

Codirectora: Ing Agr. (Mg. Sc.) Reybet Graciela

Asesor estadístico: Ing Agr. (Mg. Sc.) Gimenez Gustavo



2015

A la luz de mis ojos

Samara Ludmila.

Agradecimientos

A la comisión de la Maestría en Ciencias Agrarias y Biotecnología, junto con las gestiones del Ing. Agr. Juan José Ferragut y del Dr. Sergio Bramardi, que sin ellos esta maestría no hubiese sido posible.

A los directivos del Instituto de Biotecnología Agropecuaria del Comahue, por poner a mi disposición los recursos materiales y humanos.

A mi directora, Dra. María Cristina Sosa por su paciencia y horas de enseñanza afectuosa e incondicional. Y por su gran capacidad de transmitir sus conocimientos y experiencia.

Al Ing. Agr. (Mg. Sc) Gustavo Gimenez por su incondicional ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A la Dra. Viviana Barrera, por sus incontables horas de ayuda tanto on line como en vivo, siempre con su buena predisposición y humildad.

A mi compañera de laboratorio Dra. María Cecilia Lutz por siempre tener una palabra de aliento y acompañarme en la realización de varios ensayos.

A mis compañeros del IBAC y compañeros del departamento de Biología Aplicada de la Facultad de Ciencias Agrarias, por siempre estar dispuestos a colaborar con alguna duda que surgía en la realización de algún ensayo o metodología.

A mis amigos por escucharme y contenerme en todos mis estados de ánimo durante la realización de esta tesis y en el proceso de escritura y defensa.

A mi familia: abuelos, tías, hermanas, sobrinas y en especial a mi mamá y Rolo por su incondicional afecto y paciencia en todo este proceso.

Infinitas Gracias!!!

Aíxa

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
SOMMAIRE	5
Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
1. Producción del cultivo de cebolla	9
1.1. Zonas y volúmenes de producción.....	9
1.2. Ciclo de cultivo de los principales cultivares	10
1.3. Acondicionamiento y almacenamiento de bulbos.....	10
2. Principales problemas sanitarios.....	12
2.1. Enfermedades de importancia.....	12
2.2. Mal de almácigos y podredumbre basal por <i>Fusarium</i>	13
2.2.1. Ciclo de la enfermedad	14
3. El género <i>Fusarium</i>	15
3.1. Importancia	15
3.2. Características culturales y morfológicas.....	15
3.3. Condiciones predisponentes.....	16
4. Manejo de la enfermedad.....	16
4.1. Uso de desinfectantes de suelo	17
4.2. Uso de fungicidas	18
4.3. Métodos de control no químicos	18
4.4. Control biológico	19
5. Interacciones en la rizósfera	19
5.1. Competencia en la rizosfera.....	20
6. El género <i>Trichoderma</i>	21
Hipótesis.....	22
Capítulo II. <i>Fusarium oxysporum</i> : AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN POR PATOGENICIDAD	23
INTRODUCCIÓN	25
1. Importancia de la enfermedad y etiología.....	25
2. Hipótesis y objetivos	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Aislamiento del patógeno	28
1.1. Zona de muestreo	28
1.2. Estrategia de aislamiento	28

2. Caracterización de los aislamientos de <i>Fusarium</i> por virulencia	30
2.1. Análisis estadístico	30
3. Producción de inóculo en medio líquido.....	30
3.1. Análisis estadístico	31
4. Identificación a nivel de especie	31
4.1. Identificación morfológica.....	31
4.2. Identificación molecular.....	31
4.2.1. Extracción de ADN.....	31
4.2.2. Amplificación.....	32
4.3. Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
1. Aislamiento del patógeno	34
2. Caracterización y selección de cepas patógenas	34
3. Producción de inóculo en medio líquido.....	36
4. Identificación a nivel de especie	37
DISCUSION.....	40
CONCLUSIONES	42
Capítulo III. <i>Trichoderma</i> : AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	43
INTRODUCCIÓN	45
1. Control biológico	45
2. El género <i>Trichoderma</i>	45
2.1 Generalidades	45
2.2 Sistemática del género	46
2.3 <i>Trichoderma</i> y su potencial como biocontroladora	46
2.4. Casos especiales	47
3. Hipótesis y objetivos	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1- Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	49
1.1. Zonas de muestreo.....	49
1.2. Estrategia de aislamiento	49
2. Identificación molecular de los aislamientos de <i>Trichoderma</i>	51
2.1. Extracción de ADN.....	51
2.2. Cuantificación.....	51
2.3. Amplificación.....	51
2.4. Secuenciación.....	52
2.5. Análisis de homología.....	52

2.6. Análisis de Filogenia	52
3. Caracterización de aislamientos de <i>Trichoderma</i>	53
3.1. Caracterización cultural.....	53
3.2. Crecimiento y tolerancia a diferentes temperaturas.....	53
3.3. Características fisiológicas no deseadas del antagonista.....	53
RESULTADOS	54
1. Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	54
2. Identificación de los aislamientos de <i>Trichoderma</i>	54
2.1. Identificación molecular	54
2.2. Análisis de homología.....	57
2.3. Análisis de Filogenia	57
3. Caracterización de aislamientos de <i>Trichoderma</i>	59
3.1. Morfológica y cultural	59
3.2. Crecimiento y tolerancia a diferentes temperaturas.....	59
3.3. Características fisiológicas no deseadas del antagonista.....	61
DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES	64
Capítulo IV. BIOCONTROL DE <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> CON EL USO DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE <i>Trichoderma</i> spp.....	65
INTRODUCCIÓN.....	67
1. Control biológico. Generalidades.....	67
2. El género <i>Trichoderma</i> como potencial biocontrolador	67
2.1. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	68
2.1.1. Competencia	68
2.1.1. Antibiosis.....	69
2.1.3. Micoparasitismo.....	69
2.1.4. Resistencia inducida.....	70
MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1. Cultivos de hongos	71
2. Evaluación de la capacidad antagónica in vitro.	71
2.1. Cultivos duales.	71
2.2. Cultivos enfrentados.	72
2.3. Análisis estadístico	73
3. Evaluación del biocontrol.....	73
3.1. Preparación de suspensiones de hongos patógenos y antagonistas.....	73
3.2. Tratamientos	73

3.3. Eficacia de biocontrol de los aislamientos	73
3.3.1. Experimento de aplicación en etapa de almácigo	73
3.3.1.1. Evaluación	74
3.3.1.2. Análisis estadístico	74
3.3.2. Experimento de aplicación al momento del transplante	74
3.3.2.1. Evaluación	75
3.3.2.2. Análisis estadístico	75
4. Caracterización de los mecanismos de acción	75
4.1. Micoparasitismo	75
4.2. Competencia por hierro	76
4.3. Competencia por nutrientes entre el antagonista y el patógeno	77
4.3.1. Soluciones	77
4.3.2. Tratamientos	77
4.4. Antibiosis y producción de sustancias extracelulares	77
RESULTADOS	79
1. Evaluación de la capacidad antagónica in vitro.	79
1.1. Cultivos duales	79
1.2. Cultivos enfrentados	81
2. Evaluación del biocontrol de los aislamientos seleccionados in vivo	82
2.1. Ensayo en macetas. Aplicación en etapa de almácigo	82
2.2. Eficacia de biocontrol al momento del transplante	85
3. Caracterización de los mecanismos de acción	87
3.1. Micoparasitismo	87
3.2. Competencia por hierro. Formación de sideróforos	87
3.3. Competencia por carbono y nitrógeno	90
3.4. Producción de sustancias extracelulares	94
DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES	97
CONCLUSIONES FINALES	99
ANEXOS	103
ANEXO I	104
ANEXO II	105
BIBLIOGRAFÍA	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.	Especies identificadas de <i>Fusarium</i> spp. en cebolla, en el mundo y en Argentina	25
Tabla 2.2.	Origen y patogenicidad de los aislamientos de <i>Fusarium</i>	35
Tabla 2.3.	Producción de inóculo del aislamiento de <i>Fusarium</i> en medio líquido	36
Tabla 2.4.	Identificación, origen y patogenicidad de los aislamientos nativos de <i>Fusarium</i> spp	38
Tabla 3.1.	Distribución porcentual de aislamientos de <i>Trichoderma</i> por lugar y origen	54
Tabla 3.2.	Identificación de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	56
Tabla 3.3.	Características culturales de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en APD	60
Tabla 4.1.	Efecto de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la inhibición <i>In vitro</i> del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	80
Tabla 4.2.	Evaluación del biocontrol de los aislamientos seleccionados <i>in vivo</i> . En macetas, aplicación en etapa de almácigo	84
Tabla 4.3.	Eficacia del biocontrol al momento del transplante	86
Tabla 4.4.	Evaluación de metabolitos secundarios producidos por <i>Trichoderma</i> spp.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Distribución del cultivo de cebolla en Argentina. Principales provincias productoras. Escala de superficie en hectáreas. Fuente: SINAVIMO 2014	9
Figura 1.2.	Ciclo de enfermedad <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>cepae</i> . Adaptado de Agrios 2005	15
Figura 1.3.	A. Estructuras infectivas de <i>Fusarium oxysporum</i> . De izquierda a derecha microconidios, macroconidios, clamidospora y micelio tabicado típico. Tomada de Agrios 2005. B. Colonia crecida en Agar Papa Dextrosa (APD).	16
Figura 1.4.	Interacciones entre <i>Trichoderma</i> spp. y patógenos en la rizósfera. Esquema adaptado de Druzhinina <i>et al.</i> , 2011.	21
Figura 2.1.	Mapa de la zona de muestreo en Patagonia Norte	28
Figura 2.2.	Esquema representativo del método de aislamiento completo de <i>Fusarium</i> (A) de rizoplano, rizosfera y bulbo; (B) de suelo.	29
Figura 2.3.	Esquema de la estructura del espaciador del transcrito interno (ITS). Fuente: Western Pennsylvania Mushroom Club	33
Figura 2.4.	A. Medio de cultivo líquido luego del período de incubación. B. Resultado de la sedimentación luego del centrifugado.	36
Figura 2.5.	Análisis de coordenadas principales de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp	39
Figura 3.1.	Mapa de la zona de muestreo en Patagonia Norte	49
Figura 3.2.	Esquema representativo del método de aislamiento completo de <i>Trichoderma</i>	50
Figura 3.3.	Esquema de la estructura del gen <i>tef1</i> que codifica para el factor de elongación de la transcripción. Fuente: Martínez de la parte, 2010	52
Figura 3.4.	Colonias de <i>Trichoderma</i> en medio Rosa de Bengala de Martin	54
Figura 3.5.	A-C: <i>Trichoderma harzianum</i> s.l; D-E: <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ; F: <i>Trichoderma atroviride</i> ; G: <i>Trichoderma gamsii</i> ; H-I: <i>Trichoderma citrinoviride</i> .	55
Figura 3.6.	Árbol obtenido por análisis de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen <i>tef1</i> . Los valores de “bootstrap” del análisis de parsimonia se muestran arriba de las líneas.	58
Figura 4.1.	Esquema representativo de un cultivo dual. F: aislamiento de <i>Fusarium</i> sp. T: aislamiento de <i>Trichoderma</i> sp. dm: diámetro menor de la colonia del patógeno. dM: diámetro mayor.	72
Figura 4.2.	Esquema representativo de un cultivo enfrentado	72
Figura 4.3.	Cultivos duales de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> y <i>Trichoderma</i> spp en medios con diferente concentración de cloruro de hierro.	76
Figura 4.4.	Cultivos duales. A. detalle del aislamiento T21 que produjo un alto porcentaje de inhibición. B. detalle de aislamiento que produjo uno de los menores valores de inhibición. T: <i>Trichoderma</i> spp y F: <i>Fusarium oxysporum</i> .	79
Figura 4.5.	Análisis de contraste de medias entre los aislamientos nativos preseleccionados y comerciales de <i>Trichoderma</i>	81
Figura 4.6.	Análisis de componentes principales del ensayo en macetas.	82
Figura 4.7.	A. Detalle de una plántula con presencia de <i>Trichoderma harzianum</i> (T21) en la zona radicular. B. cuello de una plántula de Cebolla infectada con <i>Fusarium oxysporum</i> (F4)	83
Figura 4.8.	Resultado de la siembra de trozos de raíz desinfectada en una placa de Petri con APD, en la que se observa el crecimiento del patógeno (izquierda) y del antagonista.	85
Figura 4.9.	Resultado negativo de micoparasitismo. En el centro de la placa de Petri colonizada por <i>Fusarium oxysporum</i> se observa el disco de APD con micelio de <i>Trichoderma</i> spp.	87
Figura 4.10	Evaluación de competencia por hierro entre aislamientos nativos de <i>Trichoderma</i> spp. y	

	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>cepae</i> . T.harz: <i>T. harzianum</i> s.l.; T. long: <i>T. longibrachiatum</i>	89
Figura 4.11	Competencia por nutrientes entre <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> (T21)	90
Figura 4.12	Porcentaje de germinación de conidios de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>cepae</i> . en presencia de distintas concentraciones de glucosa y aislamientos nativos de <i>Trichoderma</i> spp	91
Figura 4.13	Porcentaje de germinación de conidios de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>cepae</i> . en presencia de distintos aislamientos nativos de <i>Trichoderma</i> spp, a distintas concentraciones de sacarosa	92
Figura 4.14	Porcentaje de germinación de conidios de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>cepae</i> . En presencia de distintos aislamientos nativos de <i>Trichoderma</i> spp, en ADE con dos fuentes nitrogenadas	93
Figura 4.15	Detalle de un macroconidio (Ma) de <i>Fusarium oxysporum</i> sin germinar (Izquierda) y de uno germinado (derecha). Tg: Tubo germinativo.	94

RESUMEN

En Argentina se estima que la producción nacional de cebolla ocupa el tercer lugar, luego del poroto y la papa y alcanza las 450.000 toneladas anuales. Las principales zonas productivas son la región Norte (Santiago del Estero), las provincias de Mendoza y San Juan constituyen la región Oeste, y la región Sur, principal zona productora y exportadora, que comprende los valles irrigados del sur de la provincia de Buenos Aires y norte de la Patagonia así como parte de la zona pampeana. El destino de la producción es tanto para el mercado interno como externo, con Brasil y la Comunidad Europea como principales compradores. El cultivar "Valcatorce INTA", del tipo Valenciana, domina ampliamente la producción en todo el país. Las enfermedades que afectan al cultivo son el principal factor limitante para la producción y comercialización, la podredumbre basal de la cebolla causada principalmente por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* se considera la enfermedad clave del cultivo. De las variedades disponibles en el país, la más utilizada resulta ser sensible a esta enfermedad. A corto plazo, es decir en el mismo año de producción, reduce los rendimientos, afecta el valor comercial y aumenta los costos de producción por el uso de fungicidas. A largo plazo, se suma la pérdida de la productividad por acumulación del inóculo del patógeno en el suelo a causa de la repetición de cultivos de cebolla, y el incremento de enfermedades de postcosecha, que complican la comercialización.

Entre los métodos de control para hongos del suelo, tal es el caso de *Fusarium*, una de las técnicas más utilizadas, y con muy buenos resultados, ha sido la desinfección de suelos con Bromuro de Metilo. El mismo se encuentra prohibido, a nivel mundial y en nuestro país, por el daño que generan sus emisiones gaseosas a la capa de ozono. Entre los métodos alternativos al uso de compuestos químicos, se puede nombrar al control biológico con uso de microorganismos antagonistas. Entre los hongos más utilizados se destacan especies del género *Trichoderma*, que se caracterizan por ser hongos filamentosos, oportunistas, simbioses no patogénicos de plantas y que pueden funcionar como antagonistas de muchos patógenos de plantas, protegiéndolas de enfermedades. Poseen numerosos mecanismos de acción, entre ellos la competencia por espacio y nutrientes, la producción de metabolitos secundarios (antibiosis), el micoparasitismo y la resistencia inducida a las plantas.

Dada la importancia de encontrar alternativas de manejo a la enfermedad, en este estudio regional, se planteó la obtención, identificación y caracterización cultural y fisiológica de 50 aislamientos nativos de *Trichoderma* sp. y su comparación con tres cepas comerciales, como potenciales antagonistas de aislamientos regionales de *Fusarium* sp.

De cultivos comerciales de cebolla de dos zonas importantes de producción (Alto Valle de Río Negro y Neuquén y Valle Inferior del Río Negro), se obtuvieron aislamientos nativos del antagonista y del patógeno. Se identificaron los aislamientos de *Trichoderma* (n=50), por secuenciación parcial del gen TEF-1 α como *T. harzianum* (22), *T. longibrachiatum* (16), *T. citrinoviride* (2), *T. atroviride* (1) *T. gamsii* (1) y *Trichoderma* sp (8). Por otro lado, por secuenciación del gen ITS y micromorfología, se identificaron como *F. oxysporum* f.sp. *cepae* a los aislamientos nativos más virulentos causales de la enfermedad.

La capacidad antagónica de *Trichoderma* se evaluó *in vitro* frente a dos de los aislamientos más agresivos de *F. oxysporum* en cultivos duales, cultivos enfrentados y crecimiento a diferentes temperaturas. Se destacaron seis aislamientos nativos de *Trichoderma* por mayores porcentajes

de inhibición del crecimiento del patógeno, mayor velocidad de crecimiento a 21°C y crecimiento negativo a 37°C. En invernadero, se evaluó la aplicación de estos 6 aislamientos para controlar la infección de *F. oxysporum* f.sp. *cepae* en los plantines de cebolla en los momentos de siembra y trasplante. En el primer caso, se destacó *T. harzianum* s.l. (T21) por colonizar las raíces de las plántulas de cebolla y presentar los mayores valores de disminución de la enfermedad (24,3%). Al momento del trasplante, los valores de infección por el patógeno en ausencia de *Trichoderma* llegaron al 30%, mientras que en presencia del antagonista el porcentaje de infección disminuyó a valores cercanos al 15%. Además, el aislamiento nativo de *T. harzianum* s.l. (T21), se destacó por su efecto en el aumento del 40% en el peso fresco de las plantas. Por otro lado, el tratamiento inoculado con el aislamiento comercial "TC3" (*Trichoderma atroviride*), obtuvo un aumento importante en el peso fresco (43%) y largo de raíces.

Se estudiaron los posibles mecanismos de acción de los antagonistas seleccionados. La prueba de uso de micoparasitismo como forma de control de patógenos dio negativa, por lo cual, no es uno de los mecanismos utilizados por estos aislamientos. Se observó una clara competencia por hierro, principalmente por el aislamiento *T. harzianum* s.l. (T21); y por fuentes carbonadas, no así cuando se evaluaron distintas fuentes nitrogenadas. Es por esto que se concluye que el mecanismo más utilizado durante el antagonismo es la competencia por espacio y nutrientes.

Si bien se requieren de nuevas evaluaciones a campo, se demostró la capacidad de aislamientos nativos para controlar esta enfermedad en el cultivo de cebolla.

ABSTRACT

It is estimated that onion production in Argentina occupies the third place after beans and potatoes and reaches an amount of 450,000 tons per year. The major productive areas are the north region (province of Santiago del Estero), the provinces of Mendoza and San Juan in the West region, and the South region, which is the main producer and exporter and comprises the irrigated valleys to the south of the Province of Buenos Aires, and North Patagonia as well as part of the Pampean region. The produce is commercialized in both internal and external markets, being Brasil and the European Community the principal buyers. "Valcatorce INTA" cultivar, a "Valencian" onion type, widely dominates production throughout the country. The diseases affecting this crop are the main limiting factor for production and commercialization. Onion basal rot caused mainly by *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae* is considered the most important disease of this crop. Of all the varieties available in the country, the one that is most widely used is susceptible to this disease. In the short-term, (in the same production year) the disease reduces yield, affects the market value of the produce, and increases costs of production due to the use of fungicides. In the long-term there is a loss of productivity due to the presence of the inoculum in the soil owing to onion monoculture and an increase in postharvest diseases which complicates commercialization.

Among the methods used to control soil fungi (as is the case with *Fusarium*) one of the most widely used and more efficient techniques has been soil disinfection with Methyl Bromide. The use of this product is forbidden around the world and in our country, due to the damage caused by its gaseous emissions to the ozone layer. Biological control with the use of antagonist microorganisms is one of the alternative approaches to the use of chemical compounds. Among the most commonly used fungi are species of genus *Trichoderma*, characterized by being filamentous, opportunistic, avirulent plant symbionts that are capable of acting as antagonists to many plant pathogens, protecting them from diseases. They have several mechanisms of action, including competition for space and nutrients, the production of secondary metabolites (antibiosis), mycoparasitism and induced resistance to plants.

Considering the importance of finding alternatives for the management of this disease, this regional study was conducted in order to achieve the identification and the cultural and physiological characterization of 50 native isolates of *Trichoderma* sp. from the region, and also a comparison of three commercial strains as potential antagonists of regional isolates of *Fusarium* sp.

Native isolates of the antagonist and the pathogen were obtained from commercial onion crops produced in two important areas (Alto Valle of Río Negro and Neuquén and Valle Inferior of Río Negro). *Trichoderma* isolates (n=50) were identified by partial sequencing of the gene TEF-1 α as *T. harzianum* (22), *T. longibrachiatum* (16), *T. citrinoviride* (2), *T. atroviride* (1) *T. gamsii* (1) and *Trichoderma* sp (8). On the other hand, *F. oxysporum* f.sp *cepae* were identified by sequencing the gene ITS and micromorphology as the most pathogenic isolates causing the disease.

Antagonistic capacity was evaluated *in vitro* against two of the most aggressive isolates of *F. oxysporum* in dual and confronting cultures and the growing capacity was evaluated at different temperatures. Six native isolates of *Trichoderma* were found remarkable because of greater percentages of inhibition of pathogen growth, higher growing rate at 21 °C and negative growth

at 37°C. In the greenhouse, the application of these six isolates to control infection of *F.oxysporum* f.sp *cepae* on onion seedlings was evaluated at planting and transplantation. In the first case, it was found that *T.harzianum* s.l. (T21) stood out for colonizing onion seedling roots and showing the greatest values as regards disease reduction (24.3%). At the time of transplantation, the values of pathogen infection in the absence of *Trichoderma* reached 30%, whereas in the presence of the antagonist the percentage of infection decreased to values close to 15%. In addition, it was found that the native isolate of *T.harzianum* s.l. (T21) had as effect a 40% increase of fresh weight of the plants. On the other hand, the treatment inoculated with the commercial isolate "TC3" (*Trichoderma atroviride*), produced an important increase in fresh weight (43%) and root length.

The possible mechanisms of action of the selected antagonists were studied. The test evaluating the use of mycoparasitism as a form of pathogen control gave a negative result, and therefore this is not a mechanism used for these isolates. While a clear competence for iron was observed, especially by the isolate *T.harzianum* s.l. (T21), and for carbonaceous sources, this was not the case when various nitrogen sources were evaluated. This is the reason why it is concluded that the most widely used mechanism during antagonism is competition for space and nutrients.

Even though new field evaluations are required, the capacity of native isolates to control the disease in onion crops was demonstrated.

SOMMAIRE

En Argentine, s'estime que la production nationale d'oignon occupe le troisième rang, après les haricots et les pommes de terre, et arrive à 450 000 tonnes par an. La principale zone de récolte c'est le sud de la province de Buenos Aires et la partie nord de la Patagonie et de la Pampa ; dans le nord du pays, aux provinces de Mendoza, San Juan et Santiago del Estero la production est mineure.

Le sort de la production est pour les marchés nationaux et étrangers, avec le Brésil et la Communauté européenne comme les grands acheteurs. Les maladies qui affectent la culture sont le principal facteur limitant pour la production et commercialisation; la pourriture basale de l'oignon causée principalement par *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* est considéré comme la maladie clé de culture. Sur les variétés disponibles dans le pays, la "Valcatorce INTA", du type Valenciana, qui domine largement la production est d'être sensible à cette maladie. Dans le court terme, c'est à dire dans la même année de production, réduit les rendements, affecte la valeur commerciale et augmente les coûts de production par l'utilisation de fongicides. À long terme, ajoute la perte de productivité due à l'accumulation de l'inoculum dans le sol en raison de la répétition des cultures d'oignons, et l'augmentation de maladies post-récolte qui complique la commercialisation.

Entre des méthodes de lutte utilisées contre les champignons du sol, comme dans le cas de *Fusarium*, une des techniques plus employées, et avec de très bons résultats, c'est la désinfection du sol au bromure de méthyle; le même est interdite dans le monde et dans notre pays, pour les dommages qu'ils génèrent leurs émissions de gaz à la couche d'ozone. Des méthodes alternatives incluant l'utilisation de produits chimiques et la lutte biologique en utilisant des microorganismes antagonistes. Chez les champignons les plus communs sont des espèces du genre *Trichoderma*, sont caractérisés comme filamenteuse, opportunistes, symbiotes avirulentes de plantes et qui peuvent fonctionner comme antagonistes de nombreux pathogènes protégeant ainsi les plantes. Ils ont de nombreux mécanismes d'action, y compris la concurrence pour l'espace et les nutriments, la production de métabolites secondaires (antibiose), mycoparasitisme et la résistance induite aux plantes.

Compte tenu l'importance de trouver des alternatives pour la gestion de la maladie, dans cette étude régionale, soulevé la identification culturelle et la caractérisation physiologique de 50 *Trichoderma* indigène, et sa comparaison avec trois lignées commerciales, comme antagonistes potentiels isolats de *Fusarium* régionale.

Avec culture de rente oignon de deux grandes zones de production (Alto Valle de Río Negro y Neuquén y Valle Inferior del Río Negro), ont été obtenus isolats du antagoniste et pathogène indigène. Les isolats de *Trichoderma* ont été identifiés (n=50), par séquençage partiel du gène TEF-1 α comme *T. harzianum* (22), *T. longibrachiatum* (16), *T. citrinoviride* (2), *T. atroviride* (1) *T. gamsii* (1) et *Trichoderma* sp (8). En outre, par séquençage du gène et sa micromorphologie, ont été identifiés comme *F. oxysporum* f.sp *cepae* comme le principal agent causal de la maladie.

La capacité antagoniste a été évaluée in vitro à l'encontre de deux isolats les plus agressifs du *F. oxysporum*, en cultures double et opposés et la capacité de croissance à différentes températures a été également évaluée. Six isolats indigène du *Trichoderma* ont été soulignés, pour un pourcentage plus élevé d'inhibition de la croissance de l'agent pathogène, une croissance plus rapide à 21 ° C et croissance négatif a moins de 37 C °. Dans la serre, l'application de ces six isolats ont été évalués pour la prévention des infections du *F. oxysporum* f.sp *cepae* dans les semis d'oignons en période de semis et la transplantation. Dans le premier cas, a été mis en évidence *T. harzianum* s.l. (T21) pour coloniser les racines de plants d'oignons et

présenter les valeurs plus grande de diminution la maladie (24,3%). Au moment de la transplantation, les valeurs de l'infection par l'agent pathogène en l'absence de *Trichoderma* ont atteint 30%, tandis qu'en présence de l'antagoniste le taux d'infection a diminué à des valeurs proches de 15%. En outre, l'isolat natif de *T. harzianum* s.l. (T21), a été noté pour son effet sur l'augmentation de poids frais de plantes de 40%. En outre, le traitement inoculé avec "TC3" (*Trichoderma atroviride*) commerciale isolé, obtenu des résultats élevés sur le poids frais (43%) et plus la longueur des racines a augmenté.

Les mécanismes possibles de l'action d'antagonistes sélectionnés ont été étudiés. L'utilisation de mycoparasitisme en tant que témoin de pathogènes était négative, par conséquent, n'est pas l'un des mécanismes utilisés par ces isolats. Alors que clairement une compétition pour le fer a été observée, principalement par le isolé *T. harzianum* s.l. (T21), et les sources carbonées, pas lorsque différentes sources azoté ont été évalués. C'est pourquoi il est conclu que le mécanisme le plus couramment utilisé pour antagonisme est la concurrence pour l'espace et les nutriments.

Alors que nécessiter de nouvelles évaluations sur le terrain, la capacité des isolats indigène ont été montrés pour contrôler cette maladie dans la culture d'oignons.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

GENERAL



1. Producción del cultivo de cebolla

1.1. Zonas y volúmenes de producción

En Argentina, la producción de cebolla ocupa el tercer lugar en la producción de hortalizas, luego del poroto y la papa. Se estima que la superficie total cultivada en el país es de 15.000 a 24.000 hectáreas, lo que representa una producción aproximada de 450.000 toneladas. La superficie destinada al cultivo incluye cebollas destinadas al consumo en fresco y a la industria (Curcio, 2007; Poggi, 2011). La producción comercial se concentra en tres regiones principales, bien definidas. La región Norte del país comprende, en primer lugar a Santiago del Estero, con unas 3.000 ha de cebolla de día corto, cuyo destino es el mercado nacional. Las provincias de Mendoza y San Juan constituyen la región Oeste, con un total de aproximadamente 7.000 ha de cebolla de día corto y de día intermedio-largo (Kiehr & Delhey, 2007). La región Sur, principal zona productora y exportadora (FunBaPa, 2014) (Fig. 1.1), comprende los valles irrigados del sur de la provincia de Buenos Aires y norte de la Patagonia así como parte de la zona pampeana. El cultivar "Valcatorce INTA", del tipo Valenciana, domina ampliamente la producción (Kiehr & Delhey, 2007). Su destino es tanto el mercado interno como el externo, con Brasil y la Comunidad Europea como principales clientes. En esta zona el volumen exportado en 2013 llegó a 217.519 toneladas (FunBaPa, 2014).

Distribución del cultivo de Cebolla en la Argentina (has)
Principales provincias productoras

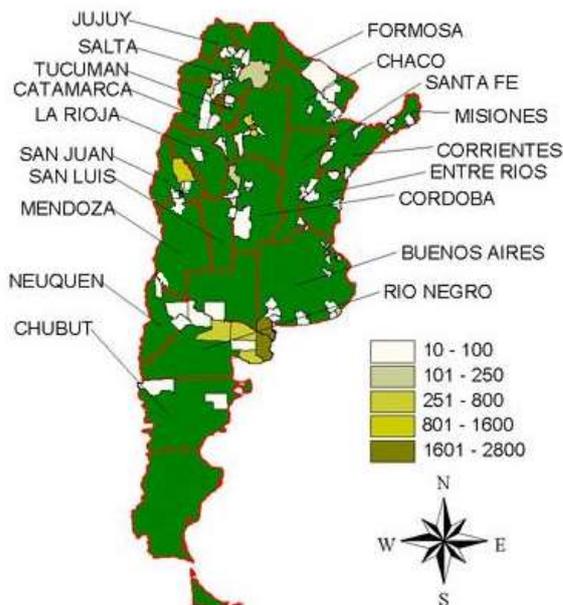


Fig 1.1. Distribución del cultivo de cebolla en Argentina. Principales provincias productoras. Escala de superficie en hectáreas. Fuente: SINAVIMO 2014.

1.2. Ciclo de cultivo de los principales cultivares

“Valcatorce INTA” es un cultivar tardío o semitardío de día largo, con un ciclo de 200 días en el sistema de producción con siembra directa (de agosto a enero-febrero); y un ciclo de 270 días cuando se siembra en almácigo. En el Alto Valle se inicia el almácigo en julio para transplantar en octubre y en Valle Inferior a fines de junio y transplante en septiembre. Finalizando el ciclo con la cosecha en enero - febrero (Acosta, *et al.*, 1993). En cuanto a los requerimientos del cultivo, el principal factor es el largo de los días ya que la bulbificación es inducida por los días largos (Galmarini, 1997). Cuanto mayor es el fotoperíodo, más temprano cesa el crecimiento de las hojas y antes alcanza el bulbo su madurez fisiológica. Por otra parte, riegos frecuentes y abundantes cerca del período de bulbificación retrasan este proceso (Galmarini, 1997).

1.3. Acondicionamiento y almacenamiento de bulbos

Uno de los objetivos de la producción de cebolla es la exportación de los bulbos con cualidades comerciales, para ello es necesario un período de conservación. La buena conservación de los bulbos depende de la calidad del material genético original, del manejo en el cultivo, de la manipulación de los bulbos en cosecha, del secado y de las condiciones de almacenamiento (Zaccari, 2007).

El proceso de secado de las cebollas tiene como objetivo reducir la humedad de las catáfilas externas, el cuello y las raíces. Esto permite reducir las pérdidas de agua del bulbo durante el almacenamiento siendo una barrera física para daños mecánicos y patológicos (Zaccari, 2007; SINAVIMO, 2014).

En Argentina, el secado de la cebolla se efectúa directamente en el campo. El tiempo requerido en esta etapa dependerá de las condiciones climáticas del lugar (temperatura, viento y humedad). A temperaturas de 25 a 27°C y 60-70 % de humedad relativa, se demora 10 a 15 días. El proceso se lleva a cabo sin eliminar el follaje y puede cumplirse totalmente en el surco o parcialmente en él y completarse durante el almacenaje (González, *et. al.*, 2000; Zaccari, 2007; SINAVIMO, 2014).

Una vez finalizada esta etapa, se logra el cierre del cuello de la planta, momento en el que se obtiene la máxima calidad posible, a partir de entonces debe mantenerse la misma hasta que el producto llegue al consumidor final.

Normalmente la cebolla tiene un período variable de almacenamiento, posibilitando un aprovisionamiento regular al mercado. El potencial de conservación depende, entre otros factores de la variedad y las condiciones climáticas, de suelo y manejo del cultivo. Es así como

un exceso de lluvia o riego y de fertilización nitrogenada en la etapa final del cultivo, reducen la dormición de los bulbos.

En la Argentina se almacena la cebolla directamente a campo, en pilas, los bulbos se colocan hacia el interior de las mismas y la parte aérea hacia afuera cubriéndolos. Si es necesario, en la parte superior se coloca algún material impermeable para proteger al producto de la lluvia. Estas pilas pueden tener diversas dimensiones y formas, pero un requisito indispensable es que provean una adecuada ventilación para evitar la excesiva acumulación de humedad y eliminar el calor que se genera por la respiración de los bulbos (Zaccari, 2007; SINAVIMO, 2014).

Las condiciones adecuadas para una óptima conservación son: Temperatura de 0 a 5 °C y humedad relativa 65 a 70%. De esta manera se puede llegar a una duración en la conservación de 3 a 4 meses (cebollas de día corto) y 6 a 8 meses (cebollas de día largo).

Según SINAVIMO, 2014, el proceso de embalaje cumple las siguientes etapas:

Descorado: Es el proceso de corte de hojas y raíces, que puede ser realizado en forma manual o mecánica.

Cepillado: elimina las catáfilas sueltas y los restos de raíces, remueve la tierra adherida y otorga brillo.

Calibrado: separación de los bulbos en rangos de tamaño.

Selección: generalmente la selección resulta de tres categorías de producto: el descarte, que está constituido por aquellas unidades que no son aptas para consumo por problemas sanitarios, bulbos rotos, lacerados o todo defecto grave que las descalifique comercialmente. La categoría comercial, generalmente destinada al mercado interno, está compuesta por bulbos con problemas de calidad aparente, generalmente relacionados con la forma y las catáfilas externas, y algunos problemas sanitarios que no comprometen la conservación o capacidad alimenticia.

La categoría elegido ó seleccionado según las distintas nomenclaturas internacionales, que es destinada a exportación, sus especificaciones y las tolerancias a distintos defectos están establecidos por las normas reglamentarias, tanto del país de origen como del de destino (SINAVIMO, 2014)

Empaque: se produce a granel y el contenido está definido por el peso neto de cada uno de los envases. El más común es la bolsa de red, con peso de 20 a 25 kg. Dependiendo del tipo y exigencias del mercado de destino.

Para exportación se coloca dentro del envase una fracción mayor de peso que la estipulada en el rótulo, para compensar las pérdidas debidas fundamentalmente a la deshidratación de los bulbos durante el traslado ya que no se conservan en condiciones controladas (Galmarini, 1997).

2. Principales problemas sanitarios

Los problemas fitosanitarios, si bien son importantes en casos puntuales, pueden ser solucionados con un adecuado manejo del cultivo, cosecha y condiciones de almacenamiento (Galmarini, 1997). Entre los problemas más comunes dentro de las plagas se encuentran los trips (*Thrips tabaci*), moscas de la semilla y de la cebolla (*Delia platura*, *Delia antiqua*) y nematodos (*Ditylenchus dipsaci*, *Meloidogyne incognita*) (Lanati, 1997). Mientras que en enfermedades, pueden nombrarse a la carbonilla, podredumbres y bacteriosis (Galmarini, 1997).

2.1. Enfermedades de importancia

Según Kiehr & Delhey (2007), las enfermedades son el principal factor limitante para la producción y comercialización de este cultivo. A corto plazo, es decir en el mismo año de producción, reducen los rendimientos, afectan el valor comercial y aumentan los costos de producción. A largo plazo se suman otros problemas quizás más graves: la pérdida de la productividad por acumulación de ciertos patógenos en el suelo a causa de la repetición de cultivos de cebolla en el mismo terreno, así como el incremento de determinadas enfermedades de postcosecha, lo que dificulta la comercialización.

Más de una docena de enfermedades han sido identificadas en la última década y media. Afortunadamente y hasta el momento, sólo algunas de ellas producen un serio impacto: “mildiú de la cebolla” (*Peronospora destructor*), “raíz rosada” (*Phoma terrestris*), “podredumbre basal” y “mal de los almácigos” (*Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*), “carbonilla” (*Aspergillus niger*) y la podredumbre bacteriana “pico de agua” (ocasionada por varias especies de bacterias).

El mildiú puede llegar a destruir el follaje y así reducir enormemente los rendimientos, pero sólo adquiere importancia en temporadas muy húmedas. Con un adecuado manejo y control químico mediante fungicidas preventivos y curativos, la enfermedad puede ser controlada (Kiehr & Delhey, 2007).

La podredumbre “pico de agua” hasta hace algunos años atrás, no era problemática y sólo se presentaba en años lluviosos, pero en estos últimos años ha sido causa frecuente de pérdidas. Ocasiona podredumbres acuosas en almacenaje que avanzan del cuello a la base y se ve favorecida por excesos de agua en el cultivo, ya sea por lluvia o riegos (Baffoni, P. INTA Ascasubi. *Com. Pers*).

Las tres enfermedades restantes se presentan todos los años y son mucho más difíciles de controlar; por ello se las considera enfermedades claves para la producción y comercialización de cebolla. Las enfermedades “raíz rosada” y “podredumbre basal” son causadas por hongos del suelo que infectan a las plantas durante el cultivo, aunque la podredumbre basal se presenta

además como enfermedad de postcosecha, ya que el hongo invade los bulbos y causa una pudrición característica que avanza desde el disco basal (Kiehr & Delhey, 2007).

2.2. Mal de almácigos y podredumbre basal por *Fusarium*

El “mal de almácigos” y la “podredumbre basal” por *Fusarium* se convierten en enfermedades de gran importancia para los productores y exportadores, ya que causan muerte de plántulas, disminuyen los rendimientos y además pueden aparecer durante el almacenamiento y la cadena de comercialización, ocasionando el rechazo del producto (Galmarini, 1997; Kiehr & Delhey, 2007; Taylor *et al.*, 2013). El cultivar dominante "Valcatorce" es uno de los materiales más susceptibles en los ensayos varietales (Kiehr & Delhey, 2007).

En Argentina, al igual que en diferentes regiones del mundo, el agente causal más importante de la “podredumbre basal” es *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*; aunque recientemente, *F. proliferatum* ha sido citado también como causal de podredumbre en cebolla (Valdez & Marini, 2005; Du Toit & Inglis, 2008).

La podredumbre basal o pudrición del disco basal es una enfermedad de raíz y bulbo que se presenta en zonas templadas y subtropicales. Se manifiesta al inicio del ciclo vegetativo, durante el desarrollo del cultivo o en el almacenamiento de la cebolla (Rodríguez Molina, 2001).

En almácigos, las semillas al germinar se cubren de un moho blanquecino y se pudren. En el estado de plántulas, las raíces se tornan oscuras, se desintegran y mueren. Los plantines presentan hojas amarillentas, detienen su crecimiento, se marchitan y también mueren.

La infección a campo se inicia en la parte basal del bulbo donde penetra y se extiende a las raíces y catáfilas produciendo la muerte de raíces. Los síntomas que se observan en la parte aérea de la planta son amarillamiento y marchitez del follaje, con las hojas amarillentas que van muriendo a partir del extremo. Al examinar el bulbo, se observa un micelio blanco en la base del disco y al realizar cortes transversales se aprecia una pudrición húmeda, parduzca que avanza a partir del disco hacia el interior del bulbo (Kiehr, *et al.*, 1996).

El inadecuado manejo del riego con abundante cantidad de agua o las rotaciones con cultivos susceptibles, favorecen la enfermedad que se puede manifestar durante el ciclo del cultivo (Gatica y Oriolani, 1997).

En postcosecha, la escasa ventilación y la alta humedad relativa de almacenamiento, favorece el desarrollo de la podredumbre a partir del inóculo adquirido en el campo que se introduce en el bulbo (Kiehr, *et al.*, 1996). Si el período de conservación es prolongado, la atmósfera interna sufre variaciones debido a la respiración y transpiración de los bulbos y se produce un

incremento lento, pero gradual y sostenido en el tiempo, de patógenos entre los que se encuentra *F. oxysporum* (Pellejero, *et al.*, 2004).

2.2.1. Ciclo de la enfermedad

El patógeno sobrevive en los restos vegetales infectados, en el suelo como micelio y en todas sus formas de esporas (clamidosporas, macro y microconidios); en regiones templadas, habitualmente sobrevive como clamidosporas. Se propaga a través de distancias cortas por medio de agua y maquinaria agrícola contaminada y a largas distancias principalmente en plantines infectados o en el sustrato en que crecieron. Por lo general, una vez que el suelo se infecta con *Fusarium*, se torna irreversible. Cuando plantas sanas crecen en suelos contaminados, el tubo germinativo de las esporas o micelio penetra las puntas de las raíces o entra en las raíces a través de heridas (Agrios, 2005). Generalmente el crecimiento del cultivo es afectado cuando las temperaturas del suelo superan 25 °C. Sin embargo, las pérdidas de raíces comienzan a temperaturas inferiores (Valdez, *et al.*, 2004). El micelio avanza a través de la corteza de la raíz intercelularmente, hasta que llega al xilema. Permanece exclusivamente en los vasos y se moviliza a través de ellos, sobre todo hacia la canopia de la planta. En los vasos, produce microconidios, que son llevados hacia arriba en el flujo de savia. Éstos, germinan en el punto donde se detiene su movimiento, el micelio penetra en la pared superior del vaso y forma más microconidios en el siguiente vaso. El micelio también puede avanzar lateralmente a los vasos adyacentes. Una combinación de vasos obstruidos por micelio, esporas, polisacáridos, gomas, y tilidosis, junto con una destrucción de los vasos adyacentes por la proliferación del patógeno a las células del parénquima, es la responsable del desequilibrio de la economía de agua en la planta infectada (Agrios, 2005). Cuando las hojas transpiran más agua que lo que puedan llegar a absorber las raíces, los estomas se cierran, las hojas se marchitan y finalmente mueren, seguido de la muerte del resto de la planta. Posteriormente el hongo invade todos los tejidos de la planta extensivamente, alcanza la superficie de la planta muerta, y esporula profusamente. Las esporas pueden ser difundidas a nuevas plantas o áreas por viento o agua (Figura 1.2).

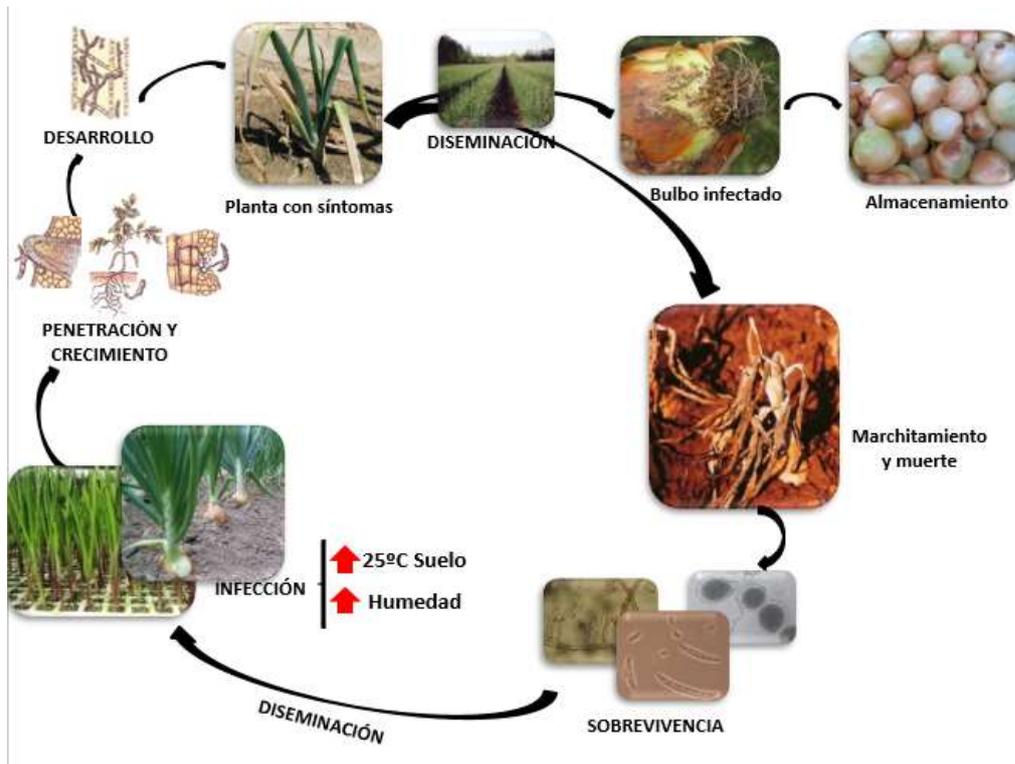


Fig 1.2. Ciclo de enfermedad *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. Adaptado de Agrios 2005.

3. El género *Fusarium*

3.1. Importancia

Fusarium es uno de los hongos fitopatógenos que causa mayores daños a diversas especies de plantas cultivadas, ocasionando distintos tipos de sintomatología, tales como manchas en las hojas, podredumbre de raíces y de la base del tallo, muerte descendente, pudrición de frutos y marchitamientos (Agrios, 2005).

Una de las especies más importantes del género es *Fusarium oxysporum* debido a las pérdidas económicas que causa en diferentes cultivos comerciales. Se ubica entre las más abundantes, cosmopolitas y complejas, dado que tiene más de 100 formas especiales caracterizadas por su alta especificidad en las plantas hospedantes que afecta (Gordon & Martyn, 1997).

3.2. Características culturales y morfológicas

Las colonias crecidas *in vitro* de *F. oxysporum* presentan variabilidad dependiendo de la cepa; en general, el micelio aéreo es blanco al principio y el medio cambia de color a distintos tonos que van desde el violeta al morado oscuro (Figura 1.3). Los microconidios tienen forma oval elipsoides, son mono o bicelulares y se forman en fíalides cortas no ramificadas, no en cadena, sino agrupados en falsos capítulos. Los macroconidios son fusiformes, a menudo tienen una

célula basal pedicelada, se forman al principio en fiálides individuales y luego en esporoquios (Snyder & Hans, 1940; Smith, *et al.*, 1992).

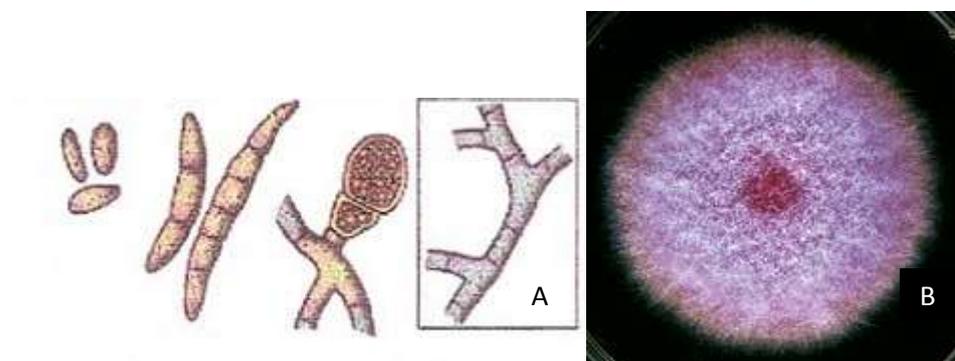


Fig 1.3. A. Estructuras infectivas de *Fusarium oxysporum*. De izquierda a derecha: microconidios, macroconidios, clamidospora y micelio tabicado típico. Tomada de Agrios 2005. **B.** Colonia crecida en Agar Papa Dextrosa (APD).

3.3. Condiciones predisponentes

Entre las condiciones predisponentes para el patógeno, la temperatura es el factor más importante. Se ha demostrado que la temperatura óptima para esporulación de *F. oxysporum* es de 30° C, pudiendo tener un comportamiento saprofítico muy vigoroso a temperaturas entre 10 y 30° C (Abawi & Lorbeer, 1972). Es capaz de crecer y esporular sobre un amplio rango de valores de pH. Este patógeno persiste en el suelo, en forma de conidios o clamidosporas, en restos de cosecha, descarte o semillas contaminadas y se disemina por herramientas de trabajo, suelo y agua de riego (Martínez *et al.*, 1995).

Las clamidosporas poseen paredes gruesas, de color oscuro y se originan en hifas o conidios y su producción es abundante en tejidos infectados en estados avanzados de la enfermedad (Martínez *et al.*, 1995). Son muy resistentes y pueden permanecer en forma inactiva durante varios años y germinar al disponer de nutrientes, por ejemplo, en la proximidad de partes jóvenes de raíces. La clamidospora germina, penetra a través de las raicillas generando una nueva infección (Smith *et al.*, 1992).

4. Manejo de la enfermedad

Para conservar la productividad de la zona y consolidar su presencia en los mercados, la organización del control de las enfermedades es una tarea imprescindible. Es de primordial importancia que el manejo sanitario del cultivo tenga una base racional para economizar los recursos y no comprometer el potencial productivo del sistema (Kiehr & Delhey, 2007).

Las principales formas de manejo de la enfermedad incluyen el uso de desinfectantes de suelo, control químico mediante el uso de fungicidas, controles no químicos y control biológico, entre otros.

4.1. Uso de desinfectantes de suelo

El uso del bromuro de metilo (BrMe) tuvo una gran preponderancia como método de desinfección de suelo, por lo que podría decirse que existe una alta dependencia de este producto. El BrMe es un biocida que se destaca por su amplio espectro de acción, así como por su alta efectividad en cuanto a penetración y difusión en el suelo. Sin embargo, no se retiene en su totalidad en el mismo, sino que del 50 al 95 % pasa en forma de emisiones gaseosas a la estratósfera (Thomas, 1996). Existe evidencia científica de que el cloro y el bromo de productos químicos sintetizados por el hombre, en particular los clorofluocarbonados (CFCs), halones, y el BrMe, entre otros, afectan la capa de ozono estratosférico. Cada molécula de cloro de un CFC, destruye 100.000 moléculas de ozono. Sin embargo el BrMe resulta 50 veces más destructivo que los cloros de CFC (Giuffre *et al.*, 2000).

El BrMe proveniente de actividades humanas representa la fuente más grande de emisión de bromuro a la atmósfera y dentro de ellas, las aplicaciones en la agricultura son las que más emiten. En Argentina, se encuentra prohibido su uso para desinfecciones de suelo, debido a que es la acción en la que se libera la mayor cantidad de gases tóxicos para el humano y la capa de ozono (SENASA, 2006).

Debido a los daños que ocasiona, desde 1994 se han conducido una gran cantidad de investigaciones para desarrollar tecnologías que puedan reemplazar su aplicación con alternativas igualmente eficientes e inocuas (Bello *et al.*, 1998; Rose & Parquer, 2003).

Se han estudiado diferentes alternativas físicas y químicas evaluando aspectos relacionados con la efectividad en el control de plagas y malezas (Tello, 1999), así como aspectos que hacen a la nutrición de los cultivos (Giuffre *et al.*, 2000; Alconada & Zembo, 2000).

Los esfuerzos para encontrar alternativas de reemplazo, están centrados en el desarrollo de sistemas de manejo integrado de plagas (MIP). La alternativa que se proponga debe tener eficacia similar, no impactar sobre el medio ambiente, ser económica y socialmente viable. Estas características hasta ahora no han sido exigidas a ningún otro pesticida (Bello *et al.*, 1997).

4.2. Uso de fungicidas

El control químico es una herramienta eficaz para el manejo de enfermedades foliares, pero no lo es con aquellas que se desarrollan en el suelo, ni con las de postcosecha. Frecuentemente se presentan dificultades en las técnicas de aplicación, económicas por los costos, ecológicas por los efectos colaterales sobre otros componentes del ecosistema, y comerciales por la renuencia a la aceptación de bulbos provenientes de lotes tratados con agroquímicos (Kiehr & Delhey, 2007).

En Argentina, se encuentran registrados para su uso en cebolla, únicamente tres principios activos que pertenecen al grupo químico benzimidazoles: benomil, tiabendazol y carbendazim (SENASA, 2014). El modo de acción de éstos, es alterar el desarrollo del tubo germinativo, la multiplicación celular e inhibir el desarrollo del micelio de *Fusarium*, por lo que disminuye la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, este grupo químico se clasifica como de alto riesgo en la inducción de resistencia en patógenos (FRAC, 2009). Esto significa, que en muchas ocasiones debido a su uso continuo en el tiempo, no se observa control de la enfermedad. Esta situación se ha registrado en la región del Valle Medio e Inferior de Río Negro, y ha llevado al abandono de su uso por parte de los productores de cebolla (Baffoni, *com. pers.*).

4.3. Métodos de control no químicos

Entre los métodos de control generales para hongos del suelo, alternativos al uso de compuestos químicos, se mencionan (i) métodos de desinfección de suelo: la solarización, que utiliza la energía solar en el control de los patógenos habitantes del suelo; los cultivos sobre sustratos; el vapor de agua y la biofumigación; (ii) uso de variedades resistentes a plagas y enfermedades; y (iii) el control biológico mediante el uso de microorganismos (Bello *et al.*, 1999).

La solarización por sí sola, no suele ser lo suficientemente drástica como para eliminar completamente el inóculo del suelo; no obstante, en combinación con pequeñas adiciones de fumigantes se mejora su eficacia (Cebolla *et al.*, 1993). En las regiones con alta nubosidad, puede combinarse la solarización con la adición de materia orgánica que desprende gases con efecto biocida, que se generan por la descomposición microbiológica de la materia orgánica. Esta acción reduce el tiempo requerido de la solarización de 6-8 semanas a 2-3 semanas (Giuffrè *et al.*, 2000)

La combinación de la solarización y fumigantes como metan sodio a dosis muy reducidas (100 ml/m²) es una práctica bastante frecuente en España y también ha resultado eficaz en Israel con resultados equiparables a los del BrMe (Bolívar, 1999).

Desde el año 1998, en nuestra región se han realizado estudios sobre métodos de desinfección de suelo alternativos al BrMe, de bajo impacto ambiental, tales como la solarización. Los resultados obtenidos demuestran que es factible disminuir la población de hongos causantes del mal de los almácigos (Bucki *et al.*, 1999) y aumentar el rendimiento y la calidad en cebolla mediante solarización (Reybet *et al.*, 2002).

Otros estudios realizados implican la utilización de la biofumigación como método alternativo en el control de *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae*. En experiencias locales se comprobó el efecto del repollo (*Brassica oleracea var capitata*) como biofumigante sobre la reducción de la población de *Fusarium oxysporum* aislado desde cebolla hasta en un 83%, en el suelo (Iriarte, 2010).

4.4. Control biológico

El control biológico en su sentido amplio se define como la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Baker & Cook, 1974).

El uso del control biológico (biocontrol) de patógenos de plantas ha ido en aumento, convirtiéndose en un componente esencial del manejo de enfermedades. La excesiva dependencia de los plaguicidas químicos, los sistemas agrícolas no sustentables, las pobres selecciones de sitio de siembra y recursos monetarios limitantes son ejemplos de los problemas agrícolas que enfrentan los productores (Monte, 2001), y el biocontrol ofrece una alternativa a estos problemas recurrentes en la agricultura.

Se conoce que muchos hongos y otros microorganismos son capaces de controlar varios patógenos de plantas. Estos agentes de biocontrol son particularmente atractivos porque son capaces de proteger y colonizar varias porciones de plantas que particularmente son inaccesibles a los tratamientos agrícolas convencionales (Harman, 1992).

5. Interacciones en la rizósfera

Muchos patógenos de suelo, como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* spp, etc, se desarrollan bien y son causa de muchas enfermedades en plantas en algunos suelos, denominados **suelos conductivos**, mientras que éstos causan menos desarrollo de enfermedades en otros suelos, conocidos como **suelos supresivos** (Agrios, 2005).

Los mecanismos por los cuales los suelos denominados supresivos inhiben el desarrollo de distintos patógenos no siempre son claros, pero pueden tanto involucrar factores bióticos como

abióticos y pueden variar con el patógeno. En muchos casos, la presencia en dichos suelos, de uno o varios microorganismos antagonistas al patógeno serían los responsables de ello. Los antagonistas, a través de la producción de antibióticos, enzimas líticas, competencia por nutrientes, parasitismo directo, no permiten que el patógeno llegue a poblaciones lo suficientemente altas como para causar una enfermedad que sobrepase el umbral de daño económico (Agrios, 2005).

Numerosos tipos de microorganismos antagonistas se han encontrado en suelos supresivos; los más comúnmente encontrados son especies de los géneros de hongos *Trichoderma*, *Penicillium*, y *Sporidesmium*, o de bacterias del género *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*. El agregado de suelo supresivo a suelos conductivos puede reducir el desarrollo de la enfermedad por la introducción de microorganismos antagonistas al patógeno.

5.1. Competencia en la rizosfera

La rizosfera es una estrecha región de suelo que está directamente influenciada por las secreciones de raíces y los microorganismos asociados. La competencia en la rizosfera, es una medida de la capacidad de un microorganismo para colonizar este nicho ecológico. Agentes de control biológico eficaces son organismos componentes de la rizosfera que tienen la capacidad fisiológica y genética de proliferar a lo largo de la raíz mientras se desarrolla. La competencia en la rizósfera entre antagonista y patógeno se da principalmente por fuentes de carbón, hierro y nitrógeno, lo que resulta en el control biológico de patógenos del suelo (Scher *et al.*, 1984). Esta habilidad los distingue de organismos capaces de colonizar sólo puntos específicos a lo largo de la raíz (Harman, 1992).

Las especies de *Trichoderma* son algunos de los pocos agentes de biocontrol que son capaces de competir en la rizosfera (Harman, 1992). La afinidad de las especies de este género por la rizosfera puede ser explicada por dos de sus preferencias nutricionales. En primer lugar, las raíces del 92% de las plantas terrestres son colonizadas por hongos micorrícicos que pueden ser consumidas por distintas cepas de *Trichoderma* (Datnoff *et al.*, 1995; Nemeč *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1999). Segundo, las raíces de las plantas, y especialmente las puntas de las raíces, están cubiertas por una cápsula similar a un gel (denominada mucigel) compuesta por polisacáridos altamente hidratados tales como pectinas y hemicelulosas que son secretadas por las células más externas de la raíz (Figura 1.4). Estos componentes son fácilmente degradables por las hemicelulasas de las especies de *Trichoderma*. Los monosacáridos y disacáridos excretados por las raíces de las plantas en la rizosfera proveen una importante fuente carbonada para estos microorganismos (Nehls *et al.*, 2010). Como los genomas de varias especies de *Trichoderma*

contiene genes que codifican invertasas intracelulares, la sacarosa puede ser tomada también como fuente carbonada (Druzhinina *et al.*, 2011).

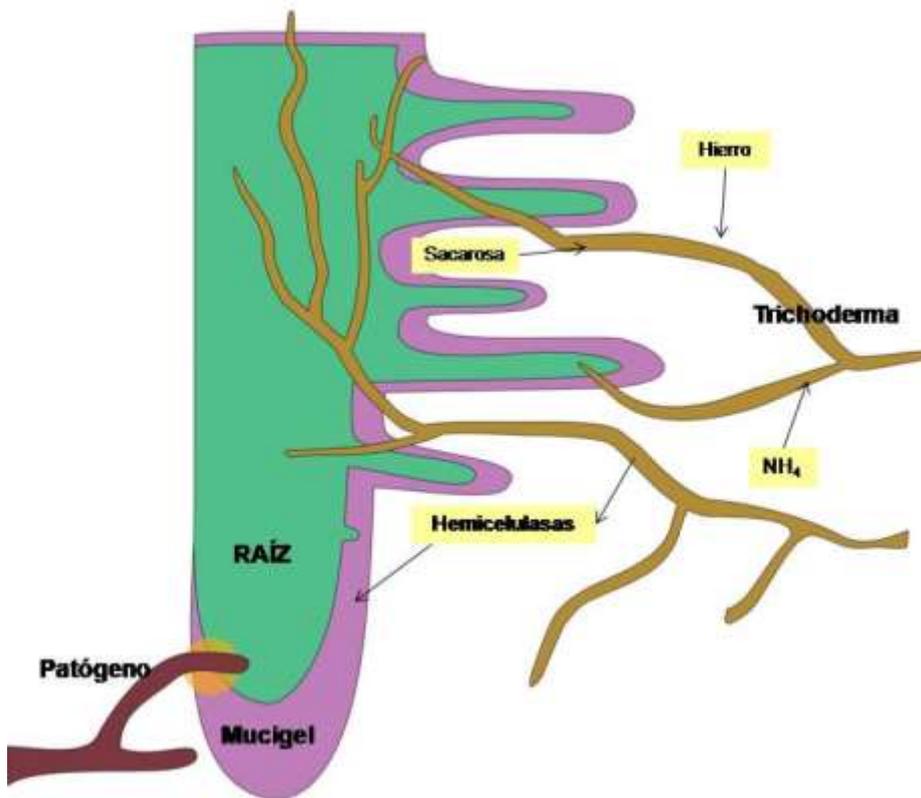


Fig 1.4. Interacciones entre *Trichoderma* spp. y patógenos en la rizósfera. Esquema adaptado de Druzhinina *et al.*, 2011.

6. El género *Trichoderma*

Las habilidades antifúngicas de *Trichoderma* son conocidas desde 1930, y ha habido desde entonces grandes esfuerzos para utilizarlos en el control de enfermedades (Samuels, 1996).

Las especies del género *Trichoderma* son hongos filamentosos, oportunistas, simbioses no patogénicas de plantas que pueden funcionar como antagonistas de muchos patógenos de plantas, protegiéndolas de enfermedades (Samuels, 2004). Hasta ahora, las especies de *Trichoderma* spp. han sido las más estudiadas como agentes de control biológico (ACB) y comercializados como biopesticidas, biofertilizantes y enmiendas (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004). Dependiendo del sustrato utilizado, el uso de *Trichoderma* en la agricultura provee numerosas ventajas: (I) colonización de la rizósfera como ACB dado que posee un rápido establecimiento entre las comunidades microbianas estables de la rizósfera; (II) control de la microflora patógena por el uso de una variedad de mecanismos—competencia, entre otros—; (III) mejoramiento de la resistencia de la planta y (IV) estimulación del crecimiento radicular (Harman *et al.*, 2004).

Muchas son las cepas de *Trichoderma* identificadas con potencial para aplicaciones en control biológico en distintos cultivos, entre ellas *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viridae*, *T. hamatum*, *T. roseum* y *T. koningii*, las cuales han sido documentadas como micoparásitas y antagonistas de patógenos de suelo en numerosos trabajos (Lumsden & Locke, 1989; Smith *et al.*, 1990; Datnoff *et al.*, 1995; Grondona *et al.*, 1998; Alonso Reyes *et al.*, 2002; González Rodríguez *et al.*, 2005; Guigón Lopez *et al.*, 2010). *T. harzianum* es la especie más frecuentemente aislada en la mayoría de las muestras en todo el mundo (Druzhinina *et al.*, 2010). Se la caracteriza por ser el principio activo en varias formulaciones comerciales debido a su exitosa habilidad antagónica frente a otros hongos patogénicos.

Se ha reportado el control de *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. en soja, poroto, papa y algodón (Lumsden & Locke, 1989); *Sclerotium rolfsii* en tomate (Alonso Reyes *et al.*, 2002); *Sclerotium cepivorum* en ajo y cebolla (Ozbay & Newman, 2004); *Phytophthora parasitica*, *P. capsicii* y *P. infestans* en pimiento y papa (Smith *et al.*, 1990); *P. cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en palta (Ozbay & Newman, 2004); *Fusarium oxysporum* en tomate y cebolla (Datnoff *et al.*, 1995); entre otros (González Rodríguez *et al.*, 2005; Pankhurst, 2005; Guigón Lopez *et al.*, 2010).

Las especies de *Trichoderma* utilizan numerosos mecanismos en el ataque a otros hongos y crecimiento radicular de las plantas. Los más destacados incluyen: competencia por espacio y nutrientes (Bailey & Lumsden, 1998; Benítez *et al.*, 2004), producción de metabolitos secundarios (antibiosis) (Bailey & Lumsden, 1998; Ozbay & Newman, 2004), micoparasitismo y resistencia inducida a las plantas (Harman, 2001).

Dado que no existen antecedentes de aislamiento y selección de especies nativas del género *Trichoderma* en la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén ni del Valle Inferior de Río Negro, se plantea la búsqueda de aislamientos nativos de la rizósfera de cebolla con potencial antagónico frente a especies nativas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*.

Hipótesis

1- Aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos de los suelos de la región, adaptados a las condiciones de cultivo, naturalmente antagonistas de hongos patógenos de suelo en cebolla, y seleccionados por su eficacia e inocuidad, resultan óptimos para alcanzar el biocontrol de aislamientos nativos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*.

2- Los aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. seleccionados resultan antagonistas más efectivos que los biofungicidas comerciales a base de este género, en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*.

Capítulo II

Fusarium oxysporum:

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN POR PATOGENICIDAD



INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la enfermedad y etiología

Las áreas productoras de cebolla se hallan en las provincias de Buenos Aires, Mendoza, Santiago del Estero y San Juan. También se produce en Córdoba, Salta y Río Negro, pero con volúmenes menos significativos (Curcio, 2007). La principal zona productora y exportadora es la zona norte de la región protegida patagónica que incluye el Valle Bonaerense del Río Colorado con un volumen exportado de 217.519 toneladas en 2013 (FunBaPa, 2014).

Los problemas sanitarios tales como las enfermedades fúngicas causadas por patógenos de suelo afectan la calidad del producto. Las mismas se pueden originar en el almácigo y trasladar a la etapa de cultivo o en almacenamiento, cuando las condiciones ambientales son predisponentes para su desarrollo (Kiehr & Delhey, 2007).

El “mal de almácigos” y la “Podredumbre basal por *Fusarium*” son las principales enfermedades causadas por patógenos del suelo. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* es la especie más importante como causal de la enfermedad a campo en Argentina así como en diferentes regiones del mundo; mientras que *F. proliferatum* ha sido citado también como causal de podredumbre pero desde semilla (Du Toit & Inglis, 2008; Stankovic *et al.*, 2007; Valdez *et al.*, 2011) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Especies identificadas de *Fusarium* spp. en cebolla, en el mundo y en Argentina

Especie identificada	Ubicación	Origen	Cita
<i>F. proliferatum</i>	Bulbo. Cv Cometa F1	Washington	du Toit & Inglis. 2003
<i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. equisetum</i>	Planta- Bulbo	Serbia	Stankovic <i>et al.</i> , 2003
<i>F. oxysporum</i> y <i>F. proliferatum</i>	Planta establecida	Bs.As	Kiehr & Delhey. 2007
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Bulbo	Nuevo Mexico	Saxena & Cramer. 2009
<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. redolens</i> , <i>F. proliferatum</i>	Bulbo. Cv Texas Early Grano	Turquía	Bayraktar & Dólar. 2010
<i>F. proliferatum</i>	Semilla	Mendoza	Valdez <i>et al.</i> , 2011
<i>F. oxysporum</i>	Planta establecida	San Juan	Botta & Valdez. 2012

La podredumbre basal se considera enfermedad clave del cultivo, ya que incide económicamente en la producción y ocasiona el deterioro en los suelos por el incremento en la concentración del inóculo del hongo año tras año (Kiehr & Delhey, 2007). La enfermedad en ocasiones se origina en el almácigo y se traslada al cultivo; y en otras, se produce en el cultivo y

se manifiesta en los bulbos durante la postcosecha y la comercialización. Es decir que, además de reducir los rendimientos, afecta la calidad y apariencia de los bulbos, disminuyendo su valor comercial (Lacy & Roberts, 1982; Kiehr et al., 1996).

En San Juan y Mendoza, *F. solani* se ha aislado desde cultivos de cebolla pero aparentemente, es una especie saprófita que cobra importancia en el momento de postcosecha (Valdez et al., 2004, Valdez, 2013). Por otra parte, la especie *F. proliferatum* tiene un papel predominante sobre la germinación de las semillas ya que se transporta con ellas. Mientras que *F. oxysporum*, cobra importancia en el cultivo de cebolla (Valdez et al., 2004; 2011). Se demostró que, la mayor patogenicidad en aislamientos de este género se correlaciona con aislamientos obtenidos en zonas sobreexplotadas con el cultivo (Valdez et al., 2004).

Entre las especies, se destaca *F. oxysporum* que causa daños en raíz y bulbo y se presenta en zonas templadas y subtropicales. Se ha demostrado que este patógeno puede tener un comportamiento saprofítico muy vigoroso entre 10 y 30° C, pudiendo esporular sobre un amplio rango de valores de pH. El exceso de agua de riego (Nelson et al., 1983) y la falta de rotaciones favorecen la manifestación de la enfermedad en el cultivo (Valdez et al., 2004).

En plántulas, la infección es a nivel de la radícula, ocasionando la muerte de la plántula antes y después de la emergencia. El patógeno penetra al disco basal a través de heridas en las raíces y ocasiona una necrosis del sistema vascular. En la parte aérea se observa amarillamiento, seguido de muerte de las hojas basales y finalmente de toda la planta (Abawi & Lorbeer, 1972).

En suelos donde la carga de inóculo es alta, *F. oxysporum* penetra al bulbo de cebolla y se mantiene en los vasos xilemáticos como clamidosporas o microconidios (Lacy & Roberts, 1982). El patógeno sobrevive, en regiones templadas, en los restos vegetales infectados en el suelo como clamidosporas. Se propaga por medio de agua y maquinaria agrícola contaminada y a largas distancias principalmente en trasplantes infectados o en el suelo utilizado con ellos (Khier et al., 1996; Agrios, 2005). Generalmente el crecimiento del cultivo no es afectado hasta que las temperaturas del suelo no superan los 25 °C. Sin embargo, las pérdidas de raíces comienzan a temperaturas inferiores (Valdez et al., 2011).

En Mendoza, se han identificado a *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani* y *F. verticilloides* en aislamientos obtenidos de bulbos con síntomas y semillas de cebolla (Valdez, 2013), mientras que en las zonas productoras de cebolla de Río Negro y Neuquén (Patagonia Norte), no se han realizado muestreos en los cultivos con enfermedad de “podredumbre basal” tendientes a la determinación de las especies de *Fusarium* involucradas y su caracterización a nivel de patogenicidad.

2. Hipótesis y objetivos

Dada la problemática de esta enfermedad en el cultivo de cebolla y su importancia en la comercialización y exportación, en este capítulo se planteó la siguiente hipótesis:

En la región de Rio Negro y Neuquén la principal especie causal del “mal de almácigos” y “podredumbre basal” es *F. oxysporum*, cuya virulencia se relaciona con el origen geográfico y del aislamiento.

Para ello se plantean los siguientes objetivos:

- Aislar e identificar a nivel de especie aislamientos de *Fusarium* representativos de cultivos en producción en zonas cebolleras de la región
- Caracterizar los aislamientos de *Fusarium* spp. por virulencia en cebolla
- Comparar medios de cultivo para optimizar la producción de inóculo de *Fusarium*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento del patógeno

1.1. Zona de muestreo

Durante los meses de febrero a mayo del año 2012 se realizó un muestreo selectivo a campo en dos zonas productivas de cebolla de importancia en la región (Figura 2.1): Alto Valle (localidades de Centenario, Plottier, San Patricio del Chañar) y Valle Inferior (Viedma y Patagones) y en dos momentos del cultivo: a) durante el ciclo de cultivo desde plantas con síntomas de marchitez y amarillamiento de hojas y b) en postcosecha desde bulbos con síntomas. En lotes con antecedentes de la enfermedad, se tomaron muestras de plantas adultas con sintomatología típica incluido el sistema radicular y el suelo donde crecieron las mismas.

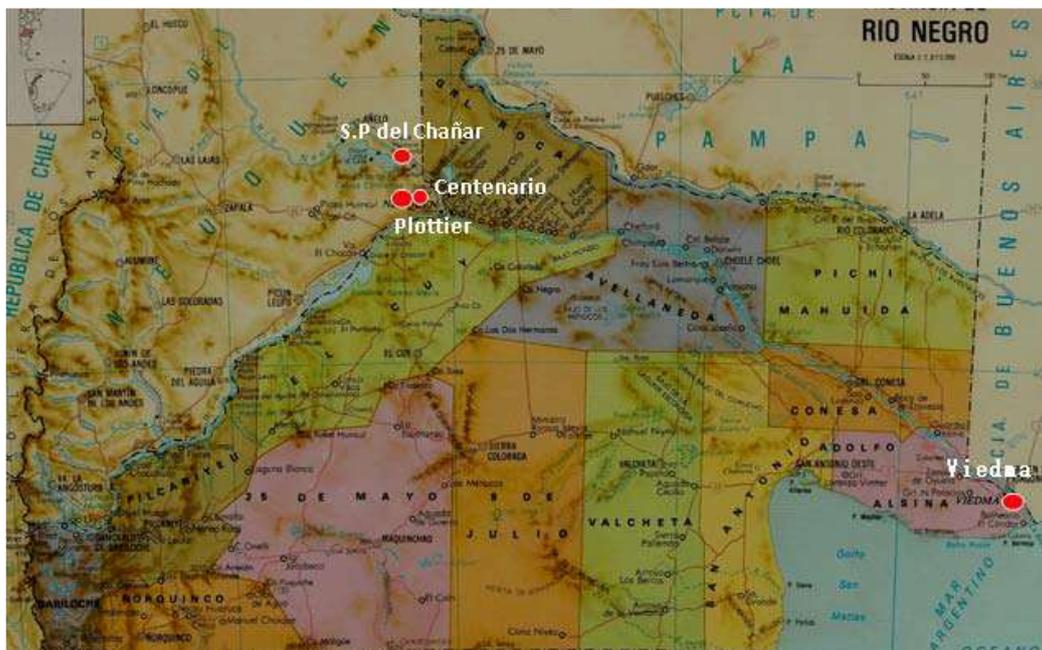


Fig 2.1. Mapa de la zona de muestreo en Patagonia Norte

1.2. Estrategia de aislamiento

En el laboratorio, los aislamientos de *Fusarium* se realizaron desde plantas, rizósfera (suelo inmediato a las raíces, influenciado por ellas y que queda adherido a las mismas) y del rizoplaneo (microorganismos adheridos a las raíces), mediante distintos procedimientos:

- A) Rizósfera: Siembra directa de las raíces de cebollas sin desinfectar;
- B) Raíz: Siembra directa de raíces de cebolla desinfectadas (30 segundos en alcohol etílico (70%, V/V) seguido de 30 segundos en Hipoclorito de Sodio (2%, V/V));

C) Rizoplano: Siembra de una alícuota de 100 uL del agua de lavado de raíces sanas, obtenida luego de agitación por 10 min en un agitador magnético;

D) Suelo: Siembra de 1 mL de una suspensión de suelo diluido (1×10^{-3}) en agua destilada. El suelo correspondía a la muestra tomada en el lugar en el que estaba el bulbo/planta elegida.

E) Bulbo: Siembra de tres segmentos del disco basal de bulbos de cebolla desinfectados (30 segundos en alcohol etílico (70%, V/V) seguido de 30 segundos en Hipoclorito de Sodio (2%, V/V)).

Cada una de estas siembras se realizó por duplicado en placas de Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa natural (APDN) acidificado con ácido láctico al 25%. Las placas fueron colocadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 a 72 horas; luego se repicaron los aislamientos en placas con medio de cultivo APDN. Posteriormente se efectuaron cultivos monospóricos de cada aislamiento, siguiendo metodología de Leslie & Summerell, 2006 y Aquino Martínez *et al.*, 2008 (Figura 2.2). Estos aislamientos se conservaron como discos de micelio (siete días) en tubos de 2mL con agua destilada estéril (ADE) a 5°C .

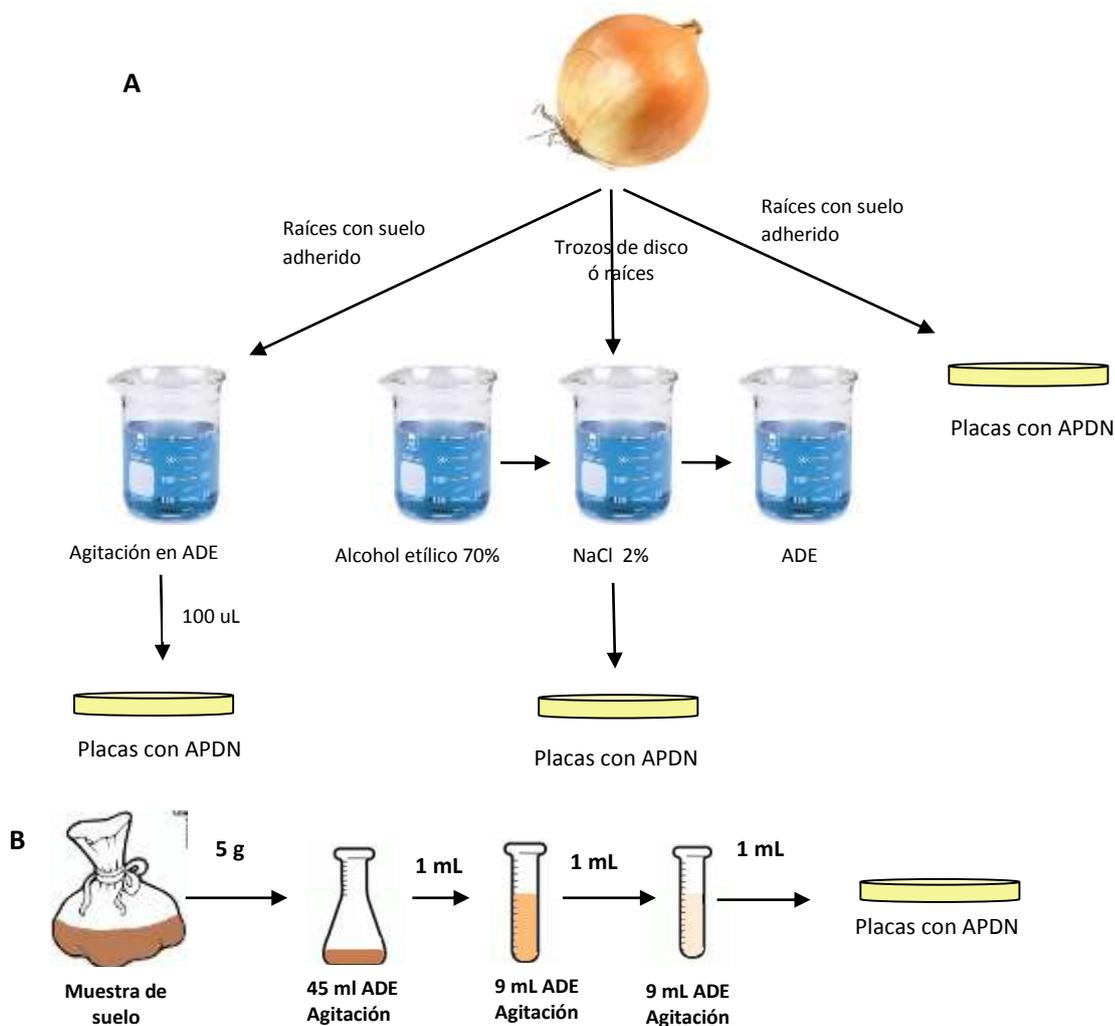


Fig 2.2. Esquema representativo del método de aislamiento completo de *Fusarium* (A) de rizoplano, rizosfera y bulbo; (B) de suelo. APDN: Agar papa dextrosa natural.

2. Caracterización de los aislamientos de *Fusarium* por virulencia

La virulencia de cada aislamiento se determinó en pruebas de patogenicidad por la capacidad de lograr infección en semillas y plántulas de cebolla a 25°C. Para ello se empleó la metodología de Valdez *et al.*, 2004.

En recipientes de aluminio de 125 mL de capacidad con 100 gramos de arena, se depositaron 25 semillas que se cubrieron con 16 gramos de arena, esto se repitió 4 veces para cada aislamiento, llegando a un total de 100 semillas por tratamiento. Los recipientes, la arena y las semillas utilizados fueron previamente esterilizados. Luego, se inoculó con 12,5 mL de una suspensión ajustada a 1.10^5 conidios/mL con el objetivo de llevar la dosis a 1.10^4 conidios/gr de arena. Se incorporó al ensayo un testigo regado únicamente con agua destilada estéril. Las macetas se colocaron en condiciones de fotoperiodo (8 horas de luz-16 de oscuridad), en una cámara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Las evaluaciones de patogenicidad se realizaron a los 7 y 14 días después de la inoculación; para lo cual se registró el número de semillas germinadas y de plántulas afectadas.

Se elaboró una escala cualitativa con los niveles de virulencia como porcentaje de plántulas muertas al finalizar el ensayo: muy virulento (97-100%); medianamente virulento (90-94%); virulento (76-89%); poco virulento (47-75%); muy poco virulento (32-46%); no virulento (0-25%).

2.1. Análisis estadístico

Los datos del ensayo de patogenicidad fueron procesados mediante un análisis estadístico de diferencia de medias utilizando el test LSD (Fisher), con el programa estadístico Statistica 7.1 (StatSoft, 2005).

3. Producción de inóculo en medio líquido

Con el objetivo de optimizar la producción de inóculo para estudios de biocontrol a escala de maceta, se estudió la producción de conidios en medios líquidos. Se seleccionó un aislamiento patogénico (inciso 2), que se inoculó mediante discos de colonias en APDN de 5 días de edad en cuatro medios de cultivo selectivos de *Fusarium* (Booth, 1971), cuya composición se presenta en el Anexo I:

- 1-. Bilay's (modificado por Joffe)
- 2-. Amstrong
- 3-. Park (1961)
- 4-. Sibán & Chet (1989)

Las condiciones de crecimiento de los cultivos fueron las mismas en todos los casos. Los cultivos se llevaron a agitación durante 96 horas a 120 rpm y 25°C de temperatura. Luego se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con agua destilada estéril (ADE) para eliminar restos de medio de cultivo. Se resuspendió el pellet con ADE para llegar al volumen final de 1mL. El recuento de conidios se efectuó mediante el uso de la cámara de Neubauer al microscopio óptico (Olympus, modelo CX21).

Para comprobar que el conteo de células realizado en la cámara de Neubauer correspondía a células vivas, se realizaron diluciones y siembra de 100 uL de alícuota de la dilución de 10^{-4} por barrido de superficie de en medio APD. La incubación de las placas se realizó a 25°C por 72 horas. Se realizó el conteo de colonias como unidades formadoras de colonia (UFC).

La agresividad de los aislamientos cultivados en medio líquido fue comprobada utilizando las suspensiones de conidios de cada condición de cultivo mediante la realización de un ensayo de patogenicidad según metodología descrita previamente (inciso 2).

3.1. *Análisis estadístico*

Este ensayo se evaluó con un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones por tratamientos. Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante el test de diferencia de medias LSD-Fisher.

4. **Identificación a nivel de especie**

4.1. *Identificación morfológica*

Todos los aislamientos de *Fusarium* se hicieron crecer en microcultivos (Riddell, 1950); y luego se procedió a la identificación en base a métodos morfológicos y moleculares. Cultivos con 7 días de edad crecidos en APD a 25°C se observaron al microscopio óptico (Olympus, modelo CX21). (Singh *et al.*, 1991). La identificación se basó en el estudio de la micromorfología de las esporulaciones. Entre las principales características se describieron la disposición de los conidios (en cadena o en falsas cabezas) y la presencia o ausencia de polifiálides siguiendo los criterios de la clave de Samson *et al.*, (2000).

4.2. *Identificación molecular*

4.2.1. *Extracción de ADN*

Para la identificación molecular, se procedió a extraer el ADN siguiendo la metodología de Leslie & Summerell (2006). Para ello, se llenaron tubos eppendorf con micelio pulverizado (congelación rápida a -80°C y posterior molienda en mortero de porcelana estéril) cubriendo el

fondo cónico hasta la acotadura. Luego, bajo campana extractora de gases, se agregó a cada tubo 700 μL de buffer CTAB al 2% y 15 μL de beta mercaptoetanol, se agitaron suavemente durante 2 minutos aproximadamente y se incubaron en baño termostático a 65 °C durante 15 minutos, invirtiendo 2 o 3 veces cada 5 minutos.

Cumplidos los 15 minutos, se agregaron 400 μL de una solución de cloroformo : isoamilalcohol (24:1 V/V) a cada tubo y se agitaron suavemente. Se llevaron a centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos.

Con micropipeta se extrajeron 500 μL de la fase sobrenadante acuosa, en dos tandas de 250 μL sin tocar la fase orgánica, y se transfirieron a un tubo limpio y estéril con 500 μL de isopropanol. Los tubos fueron invertidos varias veces para permitir la precipitación del ADN. Luego de esto, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Para permitir un mejor secado del pellet de ADN se invirtieron los tubos sobre papel absorbente limpio y se dejaron secar por 4-5 minutos. Se lavaron con 500 μL de etanol 70%, y agitaron suavemente a mano para despegar el pellet de las paredes del tubo.

Finalmente, se repitió el paso de secado y se re-suspendieron los pellets en 100 μL de agua pura. Los tubos fueron mantenidos en heladera a 4 °C o freezer a -20 °C.

4.2.2. Amplificación

Se amplificó el sector ITS de cada aislamiento, utilizando los primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Figura 2.3). De la muestra de ADN resuspendido en 100 μL de agua pura, se tomaron 2 μL y se llevaron a un volumen final de 25 μL de la mezcla de reacción, utilizando el programa descrito por White *et al.*, 1990. Estos productos de amplificación luego fueron purificados con el kit de purificación Exostar.

La secuenciación se realizó en la unidad de genómica del INTA Castelar. La secuencia del sector amplificado se comparó con las secuencias publicadas en el Gen Bank mediante un análisis BLAST, con el fin de identificar las especies.

Con el fin de verificar la cantidad y calidad del ADN extraído y purificado se procedió a realizar una lectura de absorbancia a A260/A280 con un microespectrofotómetro (Pharmacia Biotech GeenKuant RNA-DNA Calculator) (Puerta Bula & Ureña Pinzón, 2005).

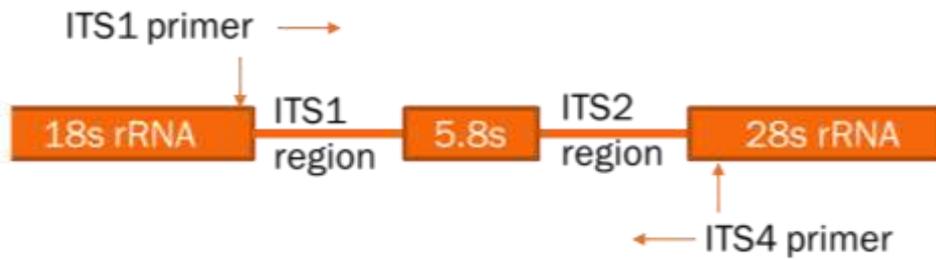


Fig 2.3. Esquema de la estructura del espaciador del transcritto interno (ITS). Fuente: Western Pennsylvania Mushroom Club (<http://wpamushroomclub.org/wp/wp-content/uploads/2014/01/PCR.png>)

4.3. Análisis estadístico

Con el fin de seleccionar los aislamientos con la mayor virulencia, representativos de la especie más frecuentemente aislada y con distinto origen geográfico, se realizó un análisis de coordenadas principales. “Patogenicidad” se trabajó con la discretización de Escofier como variable suplementaria continua. Para este análisis se utilizó el programa estadístico R (R Core Team, 2015); con el uso del paquete FactoMineR (Husson *et al.*, 2015) para el análisis. Y para realizar el gráfico final se utilizó el paquete ggplot2 (Wickham, 2009).

RESULTADOS

1. Aislamiento del patógeno

De los muestreos realizados entre los meses de febrero a mayo se obtuvieron un número total de 21 aislamientos de diferente origen: bulbo de cebolla, raíces, rizosfera y rizoplano, pertenecientes a las dos zonas de muestreo. El número de aislamientos de la zona de Alto Valle de Río Negro y Neuquén de las localidades de El Chañar, Centenario y Plottier fue 12 y 9 el número de aislamientos de Valle inferior de las localidades de Viedma- Patagones (Tabla 2.2).

2. Caracterización y selección de cepas patógenas

En el ensayo de patogenicidad de cada una de los aislamientos sobre semillas y plántulas de cebolla, se obtuvieron diferentes niveles de virulencia (Tabla 2.2). Los 6 aislamientos más virulentos, que causaron 100% de la enfermedad en las plántulas se seleccionaron para los ensayos de biocontrol. Las plántulas presentaron signos de un moho blanquecino en el cuello, y síntomas correspondientes a muerte de raíces con posterior desintegración, a los 14 días de la inoculación.

Si se considera la distribución de los aislamientos en cuanto a origen y patogenicidad, en la región del Alto Valle se obtuvo el mayor número de aislamientos correspondientes a todos los orígenes (bulbo-raíces-rizoplano y rizosfera), aunque predominaron los procedentes de bulbo correspondientes en un alto porcentaje a aislamientos muy agresivos (28,6% produjeron entre un 94 a 100% de infección). En relación con los aislamientos originarios de Valle Inferior, sólo se obtuvieron de bulbo y de raíz y el 14,3% resultaron ser muy agresivos.

Tabla 2.2. Origen y patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium*

Origen		Número de aislamientos (%) según nivel de virulencia												
Procedencia	Ubicación	V+++ ⁽¹⁾	Inc ⁽²⁾	V++	Inc	V+	Inc	V	Inc	V-	Inc	V--	Inc	% Total
Alto Valle	Bulbo	2 (9,5) ⁽³⁾	100 f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,5
	Rizoplano	1 (4,8)	100 f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,8
	Raiz	1 (4,8)	100 f	1 (4,8)	94 ef	-	-	2 (9,5)	80 cde	3 (14,3)	b	1 (4,8)	15,25 a	38,2
	Rizosfera	-	-	1 (4,8)	95,5 ef	-	-	-	-	-	-	-	-	4,8
	Subtotal	4 (19,1)	2 (9,5)	2 (9,5)	-	2 (9,5)	3 (14,3)	1 (4,8)	44	57,2				
Valle Inferior	Bulbo	1 (4,8)	100 f	-	-	-	-	1 (4,8)	72,75 c	-	-	-	-	9,5
	Rizoplano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Raiz	1 (4,8)	97,5 f	1 (4,8)	95,25 ef	1 (4,8)	90 def	2 (9,5)	87 cdef	2 (9,5)	b	-	-	33,4
	Rizosfera	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Subtotal	2 (9,5)	1 (4,8)	1 (4,8)	46	3 (14,3)	2 (9,5)	-	42,9					
% TOTAL AV+VI		28,6	14,3	4,8	23,8	23,8	4,8	100,0						

1. Niveles de virulencia: V+++ : 97-100% Infección; V++ : 90-94; V+ : 76-89; V : 45-75; V- : 32-46; V-- : 0 15,25

2. Inc: Incidencia como % de plántulas infectadas y muertas/total de semillas

3. Distribución porcentual de la cantidad de aislamientos obtenidos con esa característica.

Letras iguales no presentan diferencias significativas entre los porcentajes de patogenicidad según Fisher $\alpha=0,05$

3. Producción de inóculo en medio líquido

La producción de conidios de *Fusarium* en los distintos medios líquidos fue evaluada a los 4 días. De la evaluación del rendimiento por recuento de conidios en cámara de Neubauer al microscopio, se observó que en el medio Siban & Chet se produjo $5,6 \cdot 10^6$ conidios. mL^{-1} pero con una alta producción de micelio; mientras que en el medio Bilay's, se produjo la mayor concentración de conidios ($1,5 \cdot 10^7$ conidios. mL^{-1}) sin producción de micelio (Figura 2.4).

En el ensayo de siembra en placa para el conteo de células viables (Unidades Formadoras de Colonias, a las 72h) de cada condición de cultivo, se encontró que el 100% fueron células vivas; es decir que la viabilidad de los conidios se mantuvo (Tabla 2.3). Además, ninguno de los medios evaluados modificó la patogenicidad de los aislamientos procedentes de los cultivos en medio líquido, que se evaluó como porcentaje de mortandad de plántulas (datos no mostrados).

Tabla 2.3. Producción de inóculo del aislamiento de *Fusarium* en medio líquido

Medios	Concentración (conidios/ml) ⁽¹⁾	Formación	
		de micelio	Células viables ⁽²⁾
Bilay's	$1,5 \cdot 10^7$ a	No	$2,7 \cdot 10^7$
Amstrong	$6,28 \cdot 10^6$ b	No	$2,2 \cdot 10^7$
Park	$8,6 \cdot 10^6$ ab	No	$2 \cdot 10^7$
Siban & Chet	$5,6 \cdot 10^6$ b	Si	$2,3 \cdot 10^7$

(1) Conteo de conidios en cámara de Neubauer luego de 96h de incubación a 120rpm.

(2) Conteo de UFC a las 72hs de incubación en APD.

Letras iguales no presentan diferencias significativas según (Test TSD-Fisher, $\alpha=0,05$)

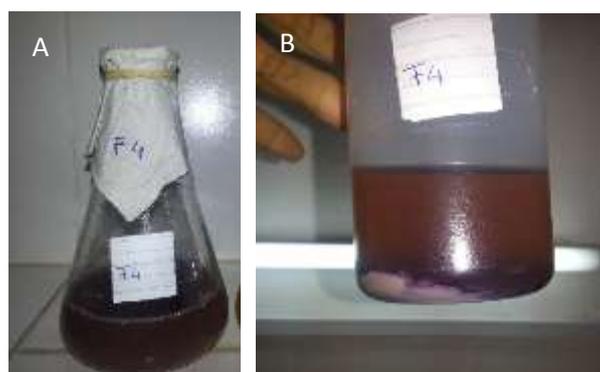


Fig 2.4. A. Medio de cultivo líquido luego del período de incubación. B. Resultado de la sedimentación luego del centrifugado.

4. Identificación a nivel de especie

La identificación de los aislamientos de *Fusarium* seleccionados por su nivel de virulencia se realizó en el Laboratorio de Semillas del INTA La Consulta de Mendoza (Tabla 2.4). Mediante el estudio de cultivos del patógeno, por métodos convencionales (culturales y microscópicos), se observaron las siguientes características, que respondieron a la especie *Fusarium oxysporum*: microconidios con hasta dos septos o no septados, en fiálides laterales y simples, ó sobre fiálides en conidióforos ramificados, cortos, abundantes en falsas cabezas, variables en forma y tamaño. Los macroconidios crecieron también sobre fiálides ramificadas en conidióforos ó en esporodoquios, fusiformes, más o menos curvos, en ambas puntas poseen una célula basal pedicelada, usualmente poseen tres septos, y miden entre (20) 27-46 (50) μm de largo x 3-4,5 (5) μm de ancho. Las clamidosporas se forman a partir de hifas o de conidios, son hialinas, de pared lisa ó rugosa, (sub) globosa, 5-15 μm de diámetro, terminales ó intercalares, en cadenas, en pares o solitarias.

La identificación fue corroborada por secuenciación de fragmento del gen amplificado ITS ADNr (ITS1-ITS4). Los fragmentos amplificados tuvieron un tamaño variable de entre 200 y más de 400 pares de bases.

De los 15 aislamientos de menor virulencia, 13 se identificaron como *F. oxysporum*, mientras que sólo dos no lograron identificarse a nivel de especie mediante métodos moleculares, pero microscópicamente presentaron características similares a esta misma especie. Aquellos aislamientos que presentaron un valor de virulencia superior al 50% de muerte en plántulas y los que fueron aislamientos desde bulbo, fueron identificadas como *Fusarium oxysporum* f.sp *cepa*e. Los demás aislamientos, fueron identificados únicamente como *Fusarium oxysporum*.

Tabla 2.4. Identificación, origen y patogenicidad de los aislamientos nativos de *Fusarium* spp.

Aislamiento	Identificación	Origen geográfico	Zona de aislamiento	Patogenicidad (%) ⁽¹⁾
1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Bulbo	41,7
2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Bulbo	100,0
3	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Rizosfera	100,0
4	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Bulbo	100,0
5	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Raíz desinfectada	94,4
6	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Raíz desinfectada	97,7
7	<i>F. oxysporum</i>	Alto Valle	Raíz desinfectada	26,4
8	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Valle Inferior	Raíz desinfectada	76,0
9	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Valle Inferior	Raíz desinfectada	95,5
10	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Valle Inferior	Bulbo	100,0
11	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Valle Inferior	Bulbo	89,3
12	<i>F. oxysporum</i>	Valle Inferior	Raíz desinfectada	44,1
14	<i>Fusarium</i> sp	Valle Inferior	Raíz desinfectada	46,1
15	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Valle Inferior	Raíz desinfectada	100,0
16	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Valle Inferior	Raíz desinfectada	90,0
17	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Valle Inferior	Raíz desinfectada	87,5
18	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Raíz desinfectada	72,8
20	<i>Fusarium</i> sp	Alto Valle	Raíz desinfectada	38,0
21	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Raíz desinfectada	80,7
22	<i>F. oxysporum</i>	Alto Valle	Raíz desinfectada	38,6
23	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Alto Valle	Rizosfera	95,4

(1) Patogenicidad medida en porcentaje de plántulas y semillas muertas sobre un total de 100 en sustrato estéril inoculado con *Fusarium oxysporum*

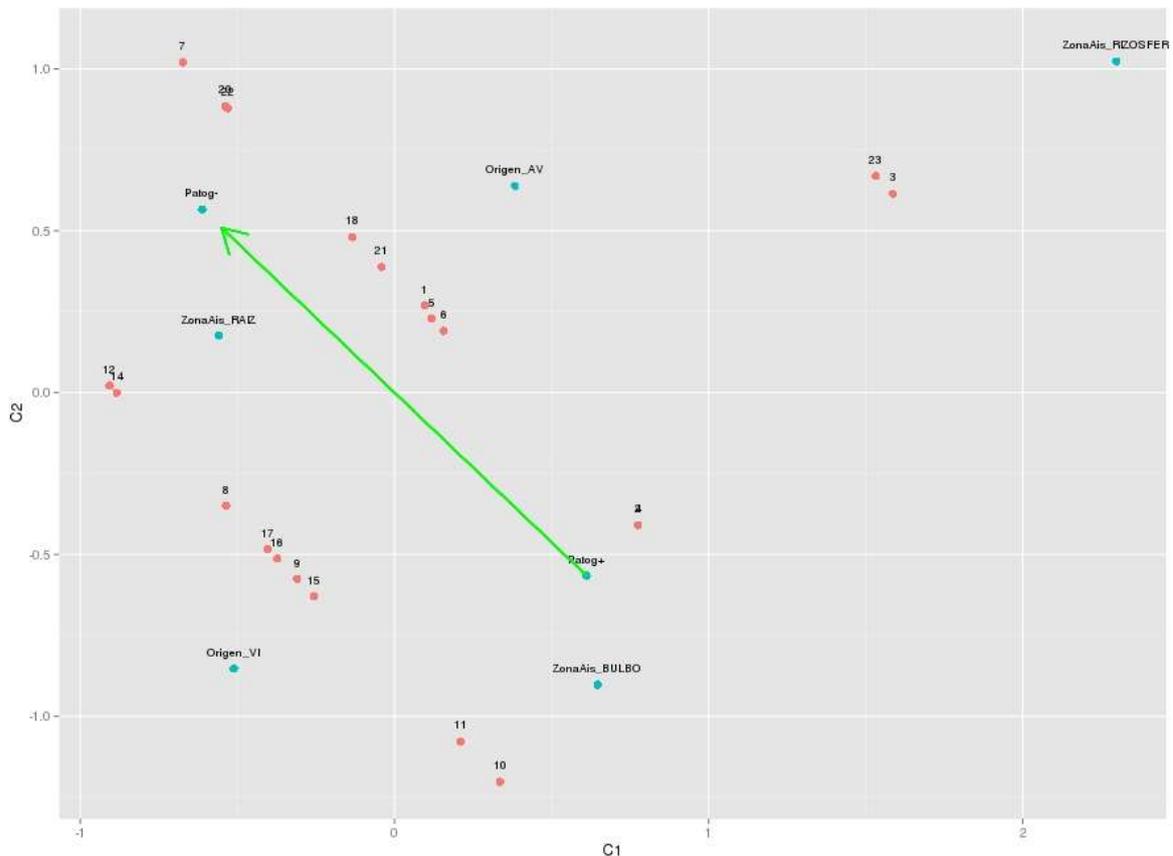


Fig 2.5. Análisis de coordenadas principales de los aislamientos de *Fusarium* spp. Los números equivalen al número de la nomenclatura de cada aislamiento, es así que el número 1 representa al aislamiento de *Fusarium* 1.

En el análisis de coordenadas principales (Figura 2.5), se observa el gradiente que señala la virulencia de los aislamientos. En función del mismo, se pueden distinguir tres grupos de mayor patogenicidad: F2 y F4; F3 y F23; F10 y F11. Los aislamientos F2 y F4 se separan del resto por su origen geográfico, estos pertenecen a la zona del Alto Valle y el resto a Valle Inferior. Los aislamientos F3 y F23 fueron aislados de la rizosfera, mientras que los demás desde bulbos de cebolla. Por lo anteriormente expuesto se seleccionaron los aislamientos F4 y F10, uno de cada zona de origen, aislados desde bulbo y con alta virulencia en plántulas.

Estos dos aislamientos muy virulentos del patógeno fueron otorgados a la colección LJC de INTA La Consulta, Mendoza, e identificados como LJC 10463 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* F4) y LJC 10466 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* F10).

DISCUSION

En este trabajo se realizó un muestreo en dos sitios de producción de cebolla de Río Negro y Neuquén, y se estableció la etiología de la podredumbre basal en cebolla. En 16 de los 21 aislamientos totales que se obtuvieron de plantas durante el ciclo de cultivo, se identificó a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Si bien el género *Fusarium* suele presentar variabilidad a nivel especie específica, el método de identificación convencional utilizado en función de los caracteres culturales y morfológicos permitió identificar a más del 75% de los aislamientos, lo que fue corroborado con métodos moleculares. Tanto Booth (1971) como Nelson *et al.* (1983), señalan que el desarrollo específico de síntomas en cebolla (*Allium cepa*) y no en otros hospedantes es propio de la forma especial *cepae*. Por lo tanto, debido a las características y a los resultados obtenidos el agente causal de la pudrición basal de bulbos de cebolla es *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* en nuestra región.

Caligiore Gei *et al.* (2014) y Salvalaggio & Ridao (2013) encuentran como principal causa de esta enfermedad a *F. oxysporum* y *F. proliferatum* en los cultivos de Mendoza y San Juan. Sin embargo, Valdez *et al.*, (2011) reportan además que *Fusarium proliferatum* es patógeno asociado a la semilla y *F. solani*, saprófito de suelo, tiene un rol importante en la podredumbre de bulbo en poscosecha. Kiehr & Delhey (2007) sostienen que tanto *F. oxysporum* como *F. proliferatum* son la principal causa de la enfermedad a campo en el sur de Buenos Aires. Además de estas especies, en el mundo, se citan a *F. acuminatum*, *F. equisetum* y *F. redolens* (Stankovic, 2003; Bayraktar & Dólar, 2010) especies que en Argentina no han sido descritas como patógenos de cebolla.

Nelson *et al.*, (1983) indican que las distintas formas especiales de *Fusarium oxysporum* se encuentran distribuidas bajo diferentes condiciones de suelo y clima, constituyendo la especie un problema importante en zonas donde las temperaturas fluctúan entre 18 y 25 °C, condiciones que concuerdan con las zonas muestreadas. Esto explicaría la presencia y amplia distribución de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* en todas las zonas de estudio. Otro factor adicional que favorece la alta incidencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* en los suelos de estas dos zonas, es el monocultivo de cebolla, práctica cultural que incrementa constantemente las poblaciones de patógenos habitantes del suelo (Kiehr & Delhey, 2007).

Por otro lado, en este estudio se evaluó la virulencia de cada aislamiento sobre plántulas de cebolla. Se observó una alta variabilidad de los aislamientos en la respuesta de virulencia. En las dos regiones muestreadas se encontraron aislamientos que variaron desde poco virulentos a muy virulentos, siendo la región del Alto Valle la que obtuvo más representantes del mayor nivel de virulencia. Independiente de la región de origen, los aislamientos con mayor porcentaje de

plántulas muertas (90-100%) se obtuvieron de bulbos. Estos resultados coinciden con Ghanbarzadeh *et al* (2014), quienes reportaron a *F. oxysporum* como especie altamente virulenta, responsable de mal de almácigos y podredumbre de bulbos.

Por otra parte, se logró encontrar un medio de cultivo líquido efectivo para producir una alta concentración de inóculo, de una forma rápida y efectiva. A diferencia de lo utilizado por autores tales como Wanjiru *et al.*, (2002); quienes utilizan distintas variedades de granos estériles e inoculados con el patógeno para cumplir este mismo objetivo. La utilización de medio líquido tiene como principal ventaja que el inóculo se obtiene en pocos días, a diferencia de las demás metodologías que necesitan incubarse por períodos más prolongados (Gray, 1996).

CONCLUSIONES

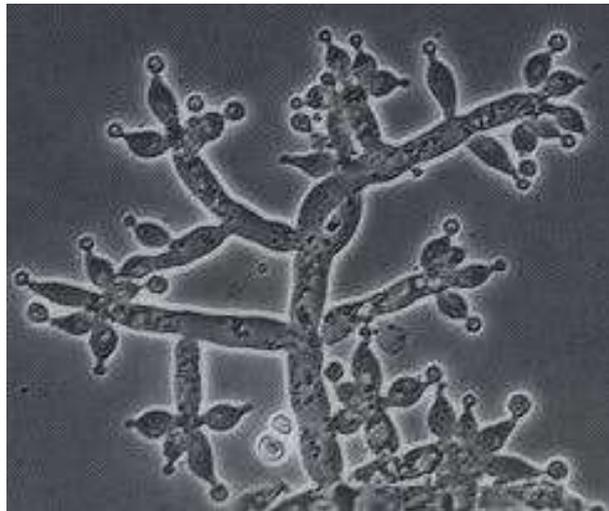
El 75% de los aislamientos se identificaron como *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. Esta especie es la causa de la “podredumbre basal por *Fusarium*” en cebolla en la zona productiva del Alto Valle de Río Negro y Neuquén y del Valle Inferior de Río Negro.

En las pruebas de patogenicidad, el 43% de los aislamientos resultaron de alta virulencia, ya que obtuvieron valores de mortalidad de semillas y plantines entre el 90 y 100 %, independientemente del origen.

La metodología para obtener altas concentraciones de conidios de *Fusarium* se ajustó en medio líquido, lo cual es importante para realizar ensayos a escala de maceta o campo de manera rápida y eficaz.

Capítulo III

Trichoderma: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Control biológico

El control biológico de patógenos basado en la utilización de microorganismos antagonistas, ha recibido especial atención en los últimos treinta años y se presenta como una estrategia promisorio de control alternativa al uso de fungicidas de síntesis química. La introducción del biocontrol en el manejo integrado de enfermedades de un cultivo es la forma de explotar sus posibilidades (Wilson & Wisniewski, 1989).

El biocontrol de patógenos de suelo puede incluir la incorporación del microorganismo antagonista al suelo para reducir los niveles del patógeno o el tratamiento a la semilla para protegerla contra las infecciones. Los agentes de control biológico (ACB) promisorios incluyen hongos antagonistas del género *Trichoderma*, que actúan como reguladores naturales en el suelo e impiden el desarrollo de hongos patógenos (Coşkuntuna & Özer, 2008).

El control o prevención de algunas enfermedades de plantas por hongos micoparásitos, como son las especies del género *Trichoderma*, es una alternativa atractiva al uso de fungicidas químicos (Cook, 1993) y por lo tanto es un componente importante de la agricultura ecológica moderna en que se plantea el Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Monte, 2001).

Las características antifúngicas de *Trichoderma* se conocen desde 1930, y ha habido desde entonces grandes esfuerzos para utilizar a este hongo en el control de enfermedades (Samuels, 1996). Estos hongos no solo antagonizan con patógenos de plantas (Harman *et al.*, 2004; Benitez *et al.*, 2004), sino que también son un componente de la rizósfera que permite mejorar el crecimiento de plantas con asociaciones endófitas (Bailey & Lumsden, 1998; Druzhinina *et al.*, 2010).

2. El género *Trichoderma*

2.1 Generalidades

Las especies del género *Trichoderma* son hongos oportunistas, simbioses avirulentos de plantas que poseen una función como parásitos y antagonistas de muchos patógenos, protegiéndolas de enfermedades (Howell, 2003).

Comúnmente se aíslan de suelos, madera húmeda, hongos o árboles en bosques, donde se reconocen fácilmente por sus masas de conidios que son generalmente de color verde, y con menos frecuencia blanco o amarillo (Chaverri & Samuels, 2003). También se encuentran en hábitats diversos: por ejemplo, se pueden encontrar en edificios dañados por agua, o como endófitos dentro de troncos de árboles asintomáticos en bosques tropicales (Evans *et al.*, 2003). Además, pueden ser aislados como agentes etiológicos de la infección oportunista en humanos

inmunocomprometidos (Kuhls *et al.*, 1999). El hecho de que muchas especies de *Trichoderma* han mostrado actividad antifúngica y de estimulación de crecimiento en plantas, ha llevado a su explotación como agentes de control biológico; y en este sentido, algunos aislamientos se utilizan en aplicaciones disponibles comercialmente (Chaverri & Samuels, 2003).

2.2 Sistemática del género

Bisset (1984) reconoció cinco secciones en este género: *Trichoderma* sección *Hypocreanum*; *T. secc. Longibrachiatum*; *T. secc. Pachibasium*; *T. secc. Saturnisporium* y *T. secc. Trichoderma* (Chaverri & Samuels, 2003), que se distinguen por diferencias en los patrones de ramificación de los conidióforos, fiálides, y conidios.

La sección *Hypocreanum* se caracteriza por tener las ramas primarias ramificadas una o pocas veces y luego terminan en verticilos largos y fiálides subuladas. El conidióforo posee una ramificación dendrítica, que generalmente incluye ramas secundarias. Pertenecen a esta sección especies tales como *T. pubescens*.

La sección *Longibrachiatum* se caracteriza por poseer fiálides solitarias, rara vez en verticilos y por tener 'fiálides intercalares'. La especie más característica es *T. longibrachiatum*.

La sección *Pachibasium* en su sentido morfológico, hasta ahora contiene anamorfos de la mayoría de las especies descritas como *Hypocrea/Trichoderma*. Kindermann *et al.* (1998), dividió esta sección en dos grupos filogénicos denominados "A" y "B". El grupo A incluye especies, como *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. koningii*, entre otras. Mientras que en el grupo B se encuentran *T. crassum*, *T. fertile*, *T. flavofuscum* y *T. harzianum*, entre otras.

Por último, la sección *Trichoderma* se caracteriza por poseer fiálides en verticilos de 2 o 3. Se denominan en la literatura como 'similares a *Trichoderma*'. Es así que en esta sección se encuentran especies como *T. koningii*, *T. viride*, *T. aureoviride* y *T. atroviride* (Chaverri & Samuels, 2003).

2.3 *Trichoderma* y su potencial como biocontroladora

Muchas especies de *Trichoderma* se han identificado con potencial para aplicaciones en control biológico en distintos cultivos, incluyendo *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viridae*, *T. hamatum*, *T. roseum* y *T. koningii*, las cuales han sido documentadas como micoparásitas y antagonistas de patógenos de suelo; ejemplos de esto son: el control de *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. en soja, poroto, papa y algodón (Lumsden & Locke, 1989); *Sclerotium rolfsii* en tomate (Alonso Reyes *et al.*, 2002); *Sclerotium cepivorum* en ajo y cebolla (Ozbay & Newman, 2004); *Phytophthora parasitica*, *P. capsicii* y *P. infestans* en pimiento y papa (Smith *et al.*, 1990); *P. cinnamomi* y

Rosellinia necatrix en palta (Ozbay & Newman, 2004); y *Fusarium oxysporum* en tomate y cebolla (Datnoff *et al.*, 1995); entre otros.

Trichoderma harzianum es la especie más frecuente de aislar en todo el mundo (Druzhinina *et al.*, 2010). Se la caracteriza por ser el ingrediente activo principal en varias formulaciones comerciales debido a su exitosa habilidad antagónica frente a diferentes especies de hongos incluyendo patogénicas en plantas. *T. harzianum* aplicada como tratamiento a semillas ha mostrado un control preventivo efectivo en muchas enfermedades en condiciones de invernadero (Sharma *et al.*, 2009).

Hasta ahora, las especies de *Trichoderma* spp. han sido los hongos más estudiados como ACB y comercializados como biopesticidas, biofertilizantes y como enmiendas al suelo (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004). Dependiendo del sustrato utilizado, el uso de *Trichoderma* en la agricultura provee numerosas ventajas: (I) colonización de la rizósfera como ACB (“competencia en la rizósfera”) dado que posee un rápido establecimiento entre las comunidades microbianas estables de la rizósfera; (II) control de la microflora patógena y competitiva/deterioradora por el uso de una diversidad de mecanismos; (III) mejoramiento de la salud de la planta y (IV) estimulación del crecimiento radicular (Harman *et al.*, 2004).

2.4. Casos especiales

Unas pocas especies de *Trichoderma* han estado involucradas en varios casos de infecciones invasivas de personas inmunocomprometidas y en reacciones alérgicas, entre las más comunes se destacan, *T. longibrachiatum* y *T. citrinoviride*. Estas dos especies son miembros estrechamente relacionados de la sección Longibrachiatum y son capaces de crecer y esporular a 40 ° C, lo que puede explicar su dominio en entornos clínicos (Samuels, 2006).

3. Hipótesis y objetivos

Dada la importancia en el estudio del género *Trichoderma* como posible controlador biológico de enfermedades, en este capítulo se plantea como hipótesis:

En plantas sanas (asisntomáticas) de cultivos de cebolla de la zona productora de Río Negro y Neuquén, que presentan antecedentes de pérdidas por *Fusarium* sp, existen especies nativas del género *Trichoderma* con potencial biocontrolador del patógeno. Por otra parte, mediante el uso de medios de cultivo selectivo se mejora la estrategia de aislamiento de *Trichoderma* spp.. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos:

- Aislar e identificar hongos nativos del género *Trichoderma*, en cultivos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén y del Valle Inferior de Río Negro.

- Caracterizar morfológica y culturalmente aislamientos nativos de *Trichoderma* spp., y aportar al cepario de la FCA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Aislamiento de *Trichoderma*

1.1. Zonas de muestreo

Con el objetivo de obtener aislamientos de *Trichoderma* representativos de las zonas de producción de cebolla de la Patagonia Norte, se realizó el muestreo a campo en los siguientes sitios de producción: localidades de Centenario, Plottier, San Patricio del Chañar, Viedma y Patagones (Figura 3.1).



Fig 3.1. Mapa de la zona de muestreo en Patagonia Norte

1.2. Estrategia de aislamiento

El antagonista presenta mayor eficacia cuando se aísla del mismo lugar y condiciones en que debe actuar frente al patógeno, y con el propósito de aumentar la presión de selección en el aislamiento, en lotes con antecedentes de la enfermedad se tomaron muestras de plantas de cebolla adultas sanas “asintomáticas”, con el sistema radicular completo y muestras del suelo adyacente.

En el laboratorio, el aislamiento de cepas de *Trichoderma* desde plantas, se realizó de la rizósfera (suelo inmediato a las raíces, influenciado por ellas y que queda adherido a las mismas) y del rizoplano (microorganismos adheridos a las raíces), mediante cuatro formas distintas de siembra:

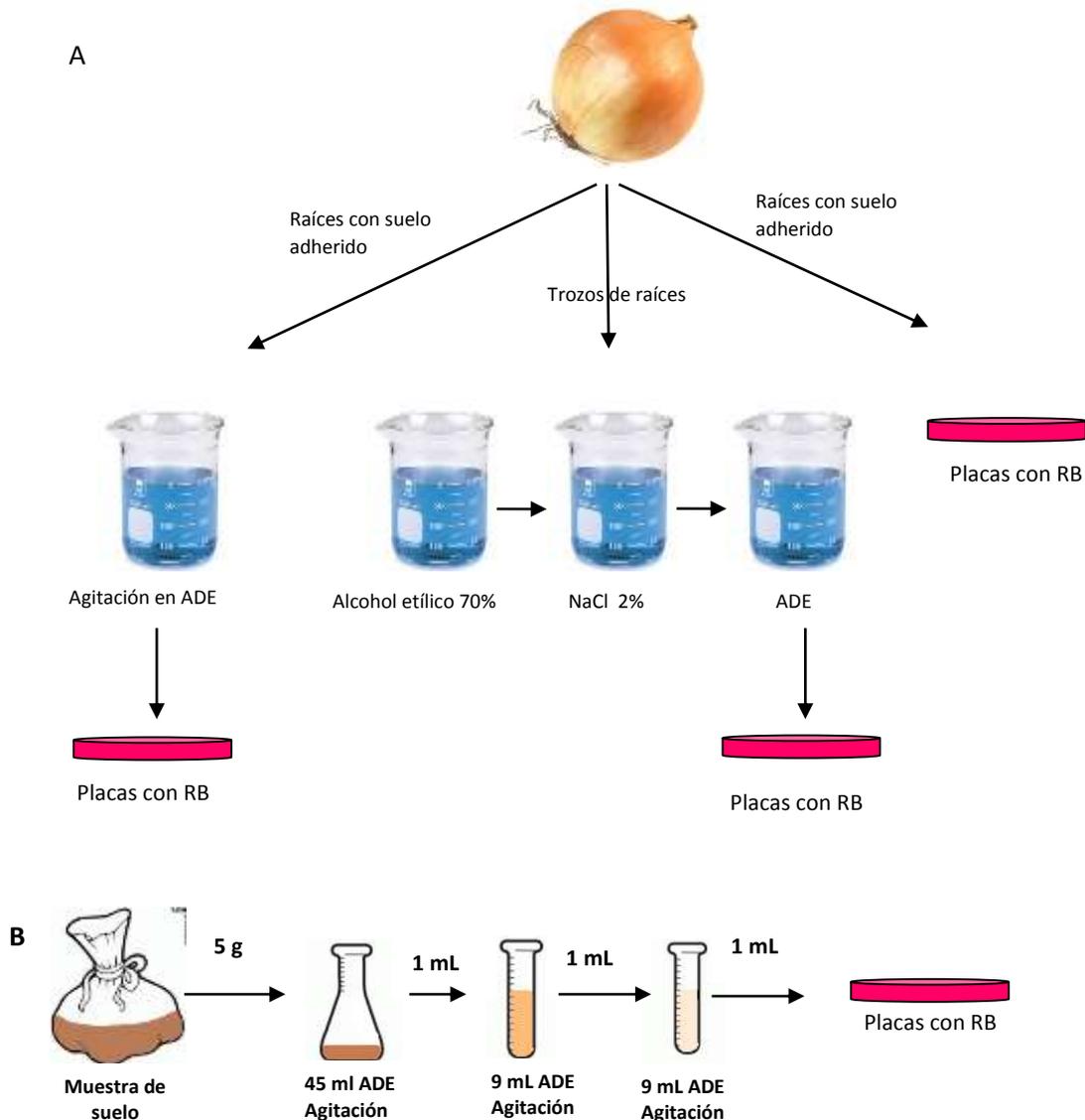
A) Siembra directa de las raíces sanas de cebollas sin desinfectar;

B) Siembra directa de raíces sanas de cebolla desinfectadas (30 segundos en alcohol al 70%, seguido de 30 segundos en Hipoclorito de Sodio)

C) Siembra de una alícuota de 1 ml del lavado con agua destilada de raíces sanas obtenida por agitación.

D) Siembra de 1 mL de una solución de una dilución de 1×10^{-3} de agua destilada con suelo tomado del lugar en el que estaba el bulbo elegido.

Cada una de estas siembras se realizó por duplicado en las placas de Petri en medio de cultivo selectivo rosa de bengala de Martin para *Trichoderma* (Dhingra & Sinclair 1985). Las mismas fueron colocadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 a 72 horas y luego se repicaron los aislamientos en placas con medio de cultivo agar papa dextrosa (APD, Britania) (Figura 3.2). Se obtuvieron cultivos monospóricos para cada aislamiento utilizando la técnica de Hansen & Smith (1932).



2. Identificación molecular de los aislamientos de *Trichoderma*

2.1. Extracción de ADN

Con el objetivo de identificar las especies aisladas, se procedió a la identificación molecular en el Laboratorio IMYZA de INTA Castelar por secuenciación del gen Tef 1- α , mediante la utilización del protocolo de Dellaporta (1983). Para la obtención de los pellets de ADN, de los aislamientos obtenidos, se tomó una porción de micelio y se transfirió a placas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo Caldo Papa Dextrosa (CPD). Los cultivos fueron incubados por 72 hs a 25°C con 12 horas de luz blanca fluorescente.

Las colonias formadas en el medio se extrajeron después de 72 h y se eliminó el excedente de agua con un papel secante estéril. Cada colonia se colocó en un tubo de eppendorf de 1,5 mL al cual se le agregó 700 μ L de buffer de extracción (contenido del buffer en Anexo II). Los tubos fueron llevados al freezer a -80°C durante 10 minutos, se retiraron y se procedió a macerar el micelio con un émbolo plástico hasta pulverizarlo. Se llevaron a incubación por 10 minutos a 65°C y posteriormente se les agregó 250 μ L de acetato de potasio (ACOK). Se los dispuso en hielo por 20 minutos, para luego centrifugar por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C en microcentrífuga. Se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se transfirieron a otro tubo estéril con 500 μ L de isopropanol. Nuevamente, se centrifugó durante 15 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con 250 μ L de etanol 70% (ETOH). Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente, y se dejó secar al aire. A estos pellets de ADN se les agregó 100 μ L de buffer Tris-acetato EDTA (TAE) por 12 horas para resuspender el contenido del mismo.

2.2. Cuantificación

La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio de: a- una electroforesis en gel de agarosa 0,8%; donde se sembraron las muestras: 5 μ L de ADN con 3 μ L de marcador de corrida, en el gel sumergido en buffer TAE 1X. Se dejó correr el gel durante 30 minutos con un voltaje constante de 90 V. Se retiró la cama de la cuba y se tiñó con bromuro de etidio para ser revelado en un transiluminador de luz UV; b- con espectrofotómetro (Nanodrop, Thermoscientífic) a 280 nm de longitud de onda colocando 1 μ L de producto en la cubeta (Samuels *et al* 2011).

2.3. Amplificación

Una porción del gen (TEF-1 α) (Figura 3.3) que codifica al factor de elongación de la traducción de proteínas fue amplificado usando los primers EF728 M 5'- CAT YGA GAA GTT CGA GAA GG y EF2 5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT. La mezcla de reacción en tubos de 0.2 mL para la PCR

contenían 10 µL del Master Mix de New England Bio Labs, (Taq Polimerasa, dNTP y el buffer), además a cada tubo se le agregó 1 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de cada “primer” y 7 µL de agua bi-distilada. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador. El programa usado fue el descrito por Samuels & Ismaiel (2009).

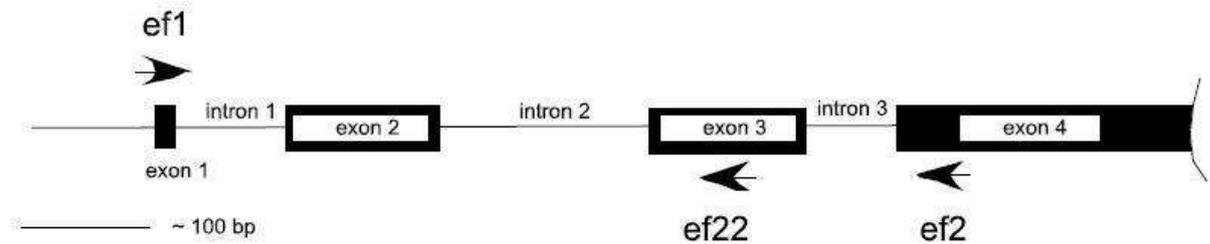


Fig 3.3. Esquema de la estructura del gen *tef1* que codifica para el factor de elongación de la transcripción. Fuente: Martínez de la parte, 2010.

2.4. Secuenciación

Los productos de PCR se prepararon para la secuenciación, purificándolos con kit de purificación (Qiagen). La reacción de secuenciación se realizó con el kit BigDye™ Terminator v 3.1 (Applied Biosystems) basado en el método de Sanger. Los productos de reacción fueron purificados con etanol y corridos con el “Genetic Analyzer” 3130xl en el instituto de Biología Molecular (INTA Castelar, Argentina).

2.5. Análisis de homología

El análisis de similitud u homología entre las secuencias obtenidas para cada aislamiento y las publicadas en la bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) se hizo por análisis de BLAST (Zhang *et al.*, 2000).

2.6. Análisis de Filogenia

Con los aislamientos obtenidos se realizó un análisis de filogenia, con el objetivo de observar la ordenación o relación entre las secuencias de los aislamientos y las cepas de referencia. Las secuencias obtenidas para el gen *tef1* fueron alineadas usando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004) con el programa Jalview 2.8.0 b1 (Waterhouse *et al.*, 2009). Utilizando el programa Mega versión 5 (Tamura *et al.*, 2011) se realizó el árbol de filogenia utilizando el modelo de máxima parsimonia.

3. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma*

3.1. Caracterización cultural

Las características culturales tales como el aspecto de la colonia (coloración y anillos), el odor y la formación de pústulas, entre otras; aportan información valiosa para la identificación a nivel de especie de *Trichoderma*. Debido a ello, los diferentes aislamientos de *Trichoderma* se caracterizaron por morfología siguiendo la metodología recomendada por Samuels (2004). Se utilizó el medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) para observar el aspecto de la colonia, y velocidad de crecimiento (Samuels, 2004). Se utilizaron tres repeticiones por aislamiento. Las placas se incubaron a 25°C con fotoperiodo de 12 h de luz fluorescente blanca. La observación se realizó a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra.

3.2. Crecimiento y tolerancia a diferentes temperaturas

Se evaluó la velocidad de crecimiento a 5, 15, 25 y 35 °C cada 24 horas, de los distintos aislamientos en placas de Petri con APD. Para cada aislamiento se utilizaron tres repeticiones. Se evaluaron además otros parámetros como la coloración del cultivo, producción de odor y/o pigmentos difusibles al medio, y el tiempo y temperatura de aparición los conidios siguiendo la metodología de Samuels *et al.* (2006).

3.3. Características fisiológicas no deseadas del antagonista

Se evaluó la capacidad de los aislamientos de crecer a la temperatura corporal humana; característica no deseable en un antagonista. Cada aislamiento se cultivó mediante la siembra de discos de 3 mm de agar con micelio en medio de cultivo APD, con tres repeticiones. Se los incubó a 37 °C de temperatura y se registró el crecimiento de la colonia en mm a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra.

RESULTADOS

1. Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron 50 aislamientos de *Trichoderma* que se incorporaron al cepario de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, correspondientes a las distintas localidades muestreadas de la Patagonia Norte (Tabla 3.1, Figura 3.4). El número de aislamientos fue variable según el origen. No se obtuvo ningún aislamiento de *Trichoderma* a partir de las raíces desinfectadas. El mayor número de aislamientos provino de la rizósfera (suelo de zona de influencia de las raíces) y el rizoplano (suelo adherido a las raíces).

Tabla 3.1. Distribución porcentual de aislamientos de *Trichoderma* spp. por lugar y origen.

Procedencia	Total Aislamientos (%) ¹	Origen ²			
		A	B	C	D
Valle Inferior (Viedma-Patagones)	22 (43)	15 (68)	0	4 (18)	3 (14)
Alto Valle- El Chañar	7 (14)	2 (29)	0	0	5 (71)
Alto Valle- Centenario	21 (42)	4 (18)	0	0	18 (82)
Total	50 (100)	21 (42)	0	4 (18)	25 (50)

1. Número y porcentaje de aislamientos según método.

2. A) Raíces sanas de cebollas sin desinfectar, B) Raíces sanas de cebolla desinfectadas, C) Agua de lavado de raíces sanas D) Dilución de 1×10^{-3} de agua destilada con suelo de rizósfera.

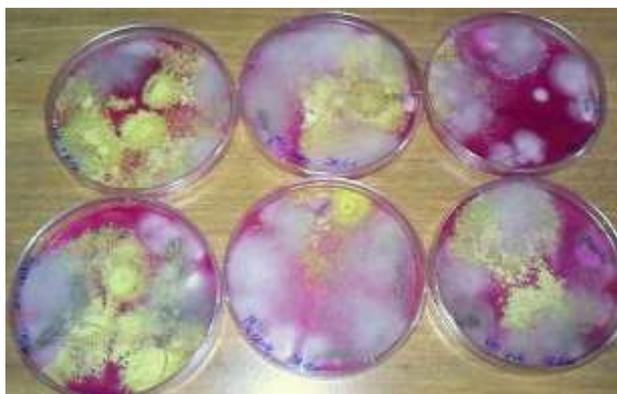


Fig 3.4. Colonias de *Trichoderma* en medio Rosa de Bengala de Martin

2. Identificación de los aislamientos de *Trichoderma*

2.1. Identificación molecular

Se identificaron a nivel de especie 45 de los 50 de los aislamientos totales. Las especies identificadas por secuenciación del sector TEF 1- α del ADN y posterior comparación con la base de datos del GenBank, correspondieron a *Trichoderma harzianum sensu lato* (22) (Figura 3.5, A y B), *T. longibrachiatum* (20) (Figura 3.5, C y D), *T. atroviride* (1) (Figura 3.5, E), *T. gamsii* (1) (Figura 3.5, F) y *T. citrinoviride* (1) (Figura 3.5, G) (Tabla 3.2).

Los restantes aislamientos no fueron identificados debido al poco peso molecular al momento de la secuenciación de ADN y por lo tanto, no se pudo lograr coincidencias al comparar con secuencias del GenBank.

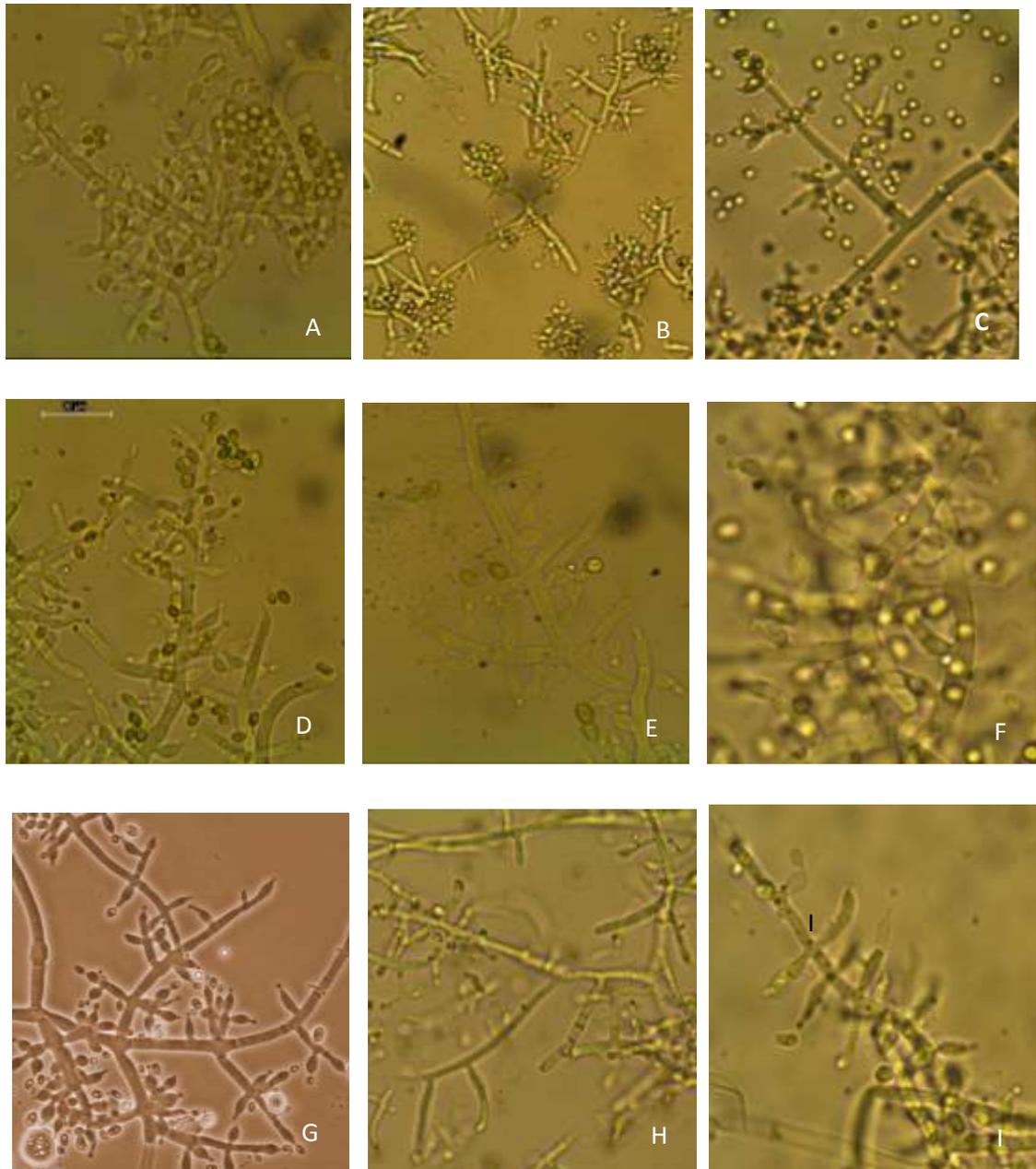


Fig 3.5. A-C: *Trichoderma harzianum* s.l.; D-E: *Trichoderma longibrachiatum*; F: *Trichoderma atroviride*; G: *Trichoderma gamsii*; H-I: *Trichoderma citrinoviride*.

Tabla 3.2. Identificación de aislamientos de *Trichoderma* spp.

Aislamiento	Origen		Pares de Bases	Identificación	% Homología	Cepa de
	Órgano	Lugar				Referencia
T20	Rizoplano	Valle Inferior	480	<i>T.harzianum s.l.*</i>	97	<i>H. lixii</i> NC3206
T21	Rizoplano	Valle Inferior	533	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> NC3206
T22	Rizoplano	Valle Inferior	538	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> NC3206
T23	Rizosfera	Valle Inferior	530	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> GJS 99-5
T24	Rizosfera	Valle Inferior	528	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> GJS 99-5
T25	Rizosfera	Valle Inferior	478	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> AF348100.1
T26	Rizosfera	Valle Inferior	528	<i>T.harzianum s.l.</i>	100	<i>H. lixii</i> Sz 1303
T27	Rizosfera	Valle Inferior	530	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> SH3204
T28	Rizosfera	Valle Inferior	479	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> GJS 404-71
T29	Rizoplano	Valle Inferior	470	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> GJS 404-71
T30	Rizoplano	Valle Inferior	529	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> GJS 99-5
T31	Rhizosfera	Valle Inferior	NO IDENTIFICADA			
T32	Rizosfera	Valle Inferior	529	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> T22
T33	Rizosfera	Valle Inferior	529	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> GJS 99-5
T34	Rizosfera	Valle Inferior	507	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>T. longibrachiatum</i> CIB T13
T35	Rizosfera	Valle Inferior	530	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> SH3204
T36	Rizosfera	Valle Inferior	531	<i>T.harzianum s.l.</i>	98	<i>H. lixii</i> SH3204
T37	Rizosfera	Valle Inferior	525	<i>T.harzianum s.l.</i>	99	<i>H. lixii</i> SH3204
T38	Rizosfera	Alto Valle	527	<i>T.harzianum s.l.</i>	96	<i>H. lixii</i> NC3206
T39	Rizosfera	Valle Inferior	532	<i>T.harzianum s.l.</i>	96	<i>H. lixii</i> SH3204
T40	Suelo	Valle Inferior	530	<i>T.harzianum s.l.</i>	100	<i>H. lixii</i> GJS 99-5
T41	Suelo	Valle Inferior	526	<i>T.harzianum s.l.</i>	100	<i>H. lixii</i> GJS 99-5
T43	Suelo	Alto Valle	540	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>H. orientalis</i> G.J.S 91-157
T44	Suelo	Alto Valle	541	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>H. orientalis</i> G.J.S 91-157
T45	Suelo	Alto Valle	539	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>T. longibrachiatum</i> Th032
T46	Suelo	Alto Valle	542	<i>T. atroviride</i>	98	<i>T. atroviride</i> PT1
T47	Suelo	Alto Valle	508	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>T. longibrachiatum</i> GJS 01-121
T48	Suelo	Alto Valle	528	<i>T.harzianum</i>	99	<i>H. lixii</i> GJS 99-5
T49	Suelo	Alto Valle	532	<i>T.harzianum</i>	99	<i>H. lixii</i> Sz 1303
T50	Rizosfera	Alto Valle	552	<i>T. gamsii</i>	99	<i>T. gamsii</i> TU Graz 10TSM1
T51	Rizosfera	Alto Valle	448	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>T.longibrachiatum</i> GJS 01-121
T52	Rizosfera	Alto Valle	515	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>T. longibrachiatum</i> CIB T13
T53	Rizosfera	Alto Valle	517	<i>T. longibrachiatum</i>	98	<i>T. longibrachiatum</i> CBS 816.68
T54	Rhizosfera	Alto Valle	274	<i>T.longibrachiatum</i>	100	<i>T.longibrachiatum</i> GJS 01-121
T55	Suelo	Alto Valle	220	<i>T.longibrachiatum</i>	99	<i>T.longibrachiatum</i> GJS 01-121
T56	Suelo	Alto Valle	NO IDENTIFICADA			
T57	Suelo	Alto Valle	502	<i>T.longibrachiatum</i>	98	<i>T.longibrachiatum</i> SzMC Thg
T58	Suelo	Alto Valle	513	<i>T. longibrachiatum</i>	99	<i>T.longibrachiatum</i> CIB T13
T59	Suelo	Alto Valle	506	<i>T. longibrachiatum</i>	99	<i>T.longibrachiatum</i> GJS 01-121
T60	Suelo	Alto Valle	NO IDENTIFICADA			
T61	Suelo	Alto Valle	505	<i>T. longibrachiatum</i>	95	<i>T.longibrachiatum</i> GJS 01-121
T62	Suelo	Alto Valle	189	<i>T. citrinoviride</i>	98	<i>T. citrinoviride</i> NBRC 4847
T63	Suelo	Alto Valle	510	<i>T. longibrachiatum</i>	98	<i>T. longibrachiatum</i> CBS 816.68
T64	Suelo	Alto Valle	512	<i>T. longibrachiatum</i>	99	<i>T. longibrachiatum</i> CIB T13
T65	Suelo	Alto Valle	NO IDENTIFICADA			
T66	Suelo	Alto Valle	504	<i>T. longibrachiatum</i>	99	<i>T.longibrachiatum</i> GJS 01-121
T67	Suelo	Alto Valle	511	<i>T. longibrachiatum</i>	99	<i>T. longibrachiatum</i> CIB T13
T68	Suelo	Alto Valle	512	<i>T. longibrachiatum</i>	99	<i>T. longibrachiatum</i> CIB T13
T69	Suelo	Alto Valle	NO IDENTIFICADA			
T70	Suelo	Alto Valle	510	<i>T. longibrachiatum</i>	97	<i>T. longibrachiatum</i> CIB T13

**T.harzianum s.l* se refiere a “*Sensu lato*” que denomina a una especie en sentido amplio

2.2. Análisis de homología

Mediante el análisis BLAST se obtuvieron homologías entre los aislamientos nativos de *Trichoderma* y las cepas de referencia de la base de datos del Gen Bank que se mantuvieron en un rango del 95 – 100% de homología (Tabla 3.2).

2.3. Análisis de Filogenia

De las especies aisladas e identificadas se encontraron representantes de sólo tres de las secciones descritas para el género *Trichoderma*, los cuales se describen a continuación:

En la figura 3.6 se muestra el árbol generado por máxima parsimonia, se pueden observar dos grupos bien diferenciados, los cuales se denominaron clado 1 y 2. En el clado 1 se observa perfectamente cómo se agruparon los aislamientos identificados como *T. longibrachiatum* junto con sus cepas de referencia. Cabe destacar que el aislamiento T62 (*T. citrinoviride*) se encuentra en el mismo clado que *T. longibrachiatum* dado que son especies similares.

Por otra parte, en el clado 2, se encuentran los aislamientos pertenecientes a las secciones *Trichoderma* y *Pachibasium* B. Éste, a su vez se divide en dos subclados, cada uno perteneciente a una sección perfectamente agrupada con sus cepas de referencia.

Sobre cada línea se observan los valores “Bootstrap”, los mismos miden indirectamente la robustez del árbol. Los nodos con un valor alto de bootstrap tienen, una probabilidad alta de ser correctos mientras que los que tienen un valor bajo podrían haberse generado simplemente por azar.

Cabe destacar que cada cepa se unió a su cepa de referencia con valores “Bootstrap” mayores al 50%, los menores fueron descartados, por ejemplo, la cepa T46 (*T. atroviride*) se unió a su cepa de referencia con un valor bootstrap del 100%.

3. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma*

3.1. Morfológica y cultural

Los 50 aislamientos de *Trichoderma* se caracterizaron por morfología en APD, este medio permitió observar el aspecto de la colonia y formación de anillos, odor, tiempo de aparición de conidios y la velocidad de crecimiento medida en mm a las 72 horas (Ridgwayr, 1912; Samuels, 2004) (Tabla 3).

3.2. Crecimiento y tolerancia a diferentes temperaturas

Ninguno de los aislamientos de *Trichoderma* logró crecer en APD a 5 °C de temperatura; sin embargo, a 15°C tuvieron un crecimiento positivo pero menor al observado a las demás temperaturas ya que no lograron superar los 65 mm de diámetro a las 72 horas.

Además, se observó un menor diámetro de crecimiento en las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* provenientes del Valle Inferior; dado que muy pocos lograron superar los 50 mm después de 72 horas de la siembra (Tabla 3.3); mientras los aislamientos del Alto Valle en su mayoría alcanzaron y superaron ese crecimiento a los 15, 25 y 35 °C. Los aislamientos T29 y T40 del Valle Inferior y T44 del Alto Valle no crecieron a temperaturas inferiores a 25°C (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Características culturales de los aislamientos de *Trichoderma* spp. en APD

Aislamientos	Velocidad de crecimiento ^A	Conidios		Colonia						
		Cantidad ^B	Tiempo ^C	Temperatura					Anillos	
				5	15	25	35	37	Número	Ancho
<i>T. harzianum</i> s.l. (T20)	Rápido	Abundantes	72	0	35	74+	85+	85 ^D	2	Angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T21)	Lento	Pocos	72	0	10	66+	38	38	1	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T22)	Rápido	Pocos	72	0	32	85+	36	36	2	Angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T23)	Lento	Pocos	72	0	18	56+	0	0	2	Anchos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T24)	Medio	Pocos	72	0	28	63+	28+	30	2	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T25)	Medio	Pocos	72	0	29	67+	53	53	2	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T26)	Rápido	Pocos	48	0	28	84+	46+	46	2	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T27)	Rápido	Pocos	48	0	40	82+	41+	41	2	Angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T28)	Rápido	Pocos	48	0	24	81+	31	30	1	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T29)	Medio	Pocos	48	0	0	63+	62	60	1	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T30)	Rápido	Pocos	48	0	43	75+	48+	48	1	Muy angostos
<i>T. sp</i> (T31)	Medio	Pocos	48	0	48	64+	50+	50	2	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T32)	Rápido	Pocos	48	0	48	74+	69	69	2	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T33)	Rápido	No forma		0	39	85	0	0		No forma
<i>T. longibrachiatum</i> (T34)	Rápido	Abundantes	48	0	46	85+	79	79	2	Anchos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T35)	Rápido	Pocos	48	0	45	85+	63	65	2	Anchos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T36)	Rápido	Abundantes	48	0	39	85+	67+	67	2	Angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T37)	Rápido	Pocos	72	0	23	85+	70	70	2	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T38)	Rápido	Pocos	72	0	32	73+	61	61	2	Muy angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T39)	Rápido	Pocos	72	0	24	81+	65+	65	2	Angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T40)	Medio	Pocos	72	0	46	69+	63	63	3	Angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T41)	Lento	Pocos	72	0	51	68+	63	65	2	Muy angostos
<i>T. longibrachiatum</i> (T43)	Medio	Abundantes	48	0	0	68+	85+	85	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T44)	Rápido	Abundantes	48	0	41+	71+	0	0	2	Angostos
<i>T. longibrachiatum</i> (T45)	Rápido	Abundantes	48	0	45	80+	85+	85	3	Anchos
<i>T. atroviride</i> (T46)	Rápido	Abundantes	48	0	40	82+	85+	85	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T47)	Medio	Pocos	72	0	25	71+	59	60	2	Angostos
<i>T. harzianum</i> s.l. (T48)	Lento	No forma		0	25	13	46	46		No forma
<i>T. harzianum</i> s.l. (T49)	Lento	Abundantes	48	0	46	42+	0	0	2	Angostos
<i>T. gamsii</i> (T50)	Rápido	No forma		0	48	85+	0	0		No forma
<i>T. longibrachiatum</i> (T51)	Rápido	Pocos	48	0	54	85+	72+	70	2	Angostos
<i>T. longibrachiatum</i> (T52)	Rápido	Abundantes	48	0	53	82+	69+	69	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T53)	Rápido	Pocos	48	0	67+	85+	50+	50	2	Angostos
<i>T. longibrachiatum</i> (T54)	Rápido	Abundantes	48	0	59	85+	85+	85	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T55)	Rápido	Abundantes	72	0	49	85+	67+	67	2	Angostos
<i>T. sp</i> (T56)	Rápido	Abundantes	48	0	47	82+	78+	78	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T57)	Rápido	Abundantes	48	0	45	85+	81+	81	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T58)	Rápido	Abundantes	48	0	47+	85+	80	80	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T59)	Rápido	Abundantes	48	0	49	84+	77	77	3	Anchos
<i>T. sp</i> (T60)	Rápido	Pocos	48	0	51	72+	81	81	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T61)	Rápido	Pocos	48	0	59	80+	78	78	2	Anchos
<i>T. citrinoviride</i> (T62)	Rápido	Abundantes	48	0	57	80+	85	85	2	Angostos
<i>T. longibrachiatum</i> (T63)	Rápido	Pocos	48	0	56	82+	79	80	2	Angostos
<i>T. longibrachiatum</i> (T64)	Rápido	Abundantes	48	0	46	85+	85	85	2	Anchos
<i>T. sp</i> (T65)	Rápido	Abundantes	48	0	50	85+	83+	83	2	Angostos
<i>T. longibrachiatum</i> (T66)	Rápido	Muy abundantes	48	0	53	69+	85+	85	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T67)	Medio	Pocos	48	0	62	70+	81	81	2	Medios
<i>T. longibrachiatum</i> (T68)	Medio	Abundantes	48	0	58	80+	0	0	1	Anchos
<i>T. sp</i> (T69)	Rápido	Abundantes	48	0	58	80+	84	84	2	Anchos
<i>T. longibrachiatum</i> (T70)	Rápido	Abundantes	48	0	51+	82+	85	85	2	Anchos

^AVelocidad de crecimiento: rápido: diámetro mayor a 80mm en 72 hs; medio: diámetro entre 60 y 75 mm; Lento: diámetro menor a 60mm. ^BCantidad: Poco: entre 1 y 10² conidios.mL⁻¹; Abundantes: 10⁴ a 10⁶ conidios.mL⁻¹; Muy abundante: 10⁷ o más conidios.mL⁻¹. ^CTiempo: tiempo de aparición de conidios en horas. ^DTemperatura: diámetro de colonia medido en mm luego de 72hs de crecimiento a cada temperatura; el signo + representa formación de conidios.

3.3. Características fisiológicas no deseadas del antagonista

De los 50 aislamientos evaluados, 16 tuvieron un crecimiento entre 80 y 85mm en 72 horas (Tabla 3.3). Dado que ésta es una característica no deseada, ya que indicaría que podrían ser patógenos humanos, se realizó un segundo ensayo complementario, en el que estos aislamientos se cultivaron a $40^{\circ}\text{C} \pm 2$. De esta segunda prueba, resultaron positivos 14 aislamientos, los cuales fueron descartados para los ensayos de antagonismo *in vitro* e *in vivo* (Barrera Viviana, comun. pers.).

DISCUSIÓN

En esta tesis, la estrategia de búsqueda y aislamiento de antagonistas se basó en el uso combinado de plantas asintomáticas en cultivos de cebolla con antecedentes de enfermedad y de medios de cultivo selectivos para *Trichoderma* spp. El aislamiento es un paso fundamental en el proceso de encontrar un buen biocontrolador, autores como Chet & Baker, 1981; Smith *et al.*, 1990; Chambers & Scott, 1995; y Srivastava *et al.*, 2011, entre otros, coinciden en que la mejor estrategia de aislamiento es la utilización de suelos supresivos, donde el patógeno que causa la enfermedad está presente, pero la enfermedad no se produce. Otros autores (Roiger & Jeffers, 1991; McLeod *et al.*, 1995) aseguran que puede haber excepciones a esta regla, tal es así, que Cook (1985) declaró que "los antagonistas están donde se los encuentra". El uso de medios selectivos con antibióticos y fungicidas a partir de suelos con cultivos de manzano, identificados como supresivos para *Phytophthora* spp. (patógeno de suelo) permitió aumentar el hallazgo de especies de *Trichoderma* (Smith *et al.*, 1990). El medio selectivo con Rosa de Bengala ha sido propuesto para optimizar el aislamiento de *Trichoderma* spp. desde suelos agrícolas (Khang *et al.*, 2013; Kubicek & Harman, 1998; Vargas Gil *et al.*, 2009). En este trabajo el uso del medio selectivo rosa de bengala de Martin, para el aislamiento de *Trichoderma* desde suelo y raíces de plantas asintomáticas, permitió llegar a un número total de 50 aislamientos nativos. En experimentos previos, mediante el uso de medios de cultivo generales, el aislamiento del antagonista se dificultó dado que muchos de los hongos que habitualmente conviven en este sustrato tienen una alta velocidad de crecimiento.

Durante el desarrollo del presente capítulo y de acuerdo con la metodología de Samuels (2004) se han identificado cinco especies distintas del género *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. gamsii*, *T. atroviride* y *T. citrinoviride* en la zona de Alto Valle y Valle inferior de Río Negro. Mediante el uso de técnicas moleculares, filogenéticas y morfológicas de reconocimiento (Barrera, 2012), se determinó que las cinco especies del género están distribuidas en tres de las cinco secciones propuestas por Bisset (1984); las cuales, se agruparon con alta probabilidad a sus cepas de referencia.

Trichoderma harzianum s.l., fue la especie encontrada en mayor abundancia en este estudio, lo cual se corresponde a su carácter de cosmopolita, es decir que se encuentra en una gran variedad de sustratos. Esta especie se conoce por su eficacia en el biocontrol de hongos patógenos de plantas, especialmente las enfermedades transmitidas por el suelo. Además, se ha informado que *T. harzianum s.l.* puede tener una actividad potencial en la mejora de crecimiento de las plantas y resistencia a patógenos de plantas (Chaverri & Samuels, 2003).

Las especies *T. longibrachiatum*, y *T. citrinoviride*, son habitantes de suelo y tejidos herbáceos y se caracterizan por su capacidad de crecer y esporular a temperaturas superiores a 35°C. En este estudio, *T. longibrachiatum* fue la segunda especie más frecuente en el total de aislamientos; sin embargo, su potencial capacidad de parasitar humanos inmunodeprimidos hace que resulte una especie poco atractiva para futuras evaluaciones en control biológico (Kredics *et al.*, 2003; Santillan Salas *et al.*, 2011; Samuels *et al.*, 2014).

Entre las otras especies, *T. atroviride* es una especie habitante común de suelos, citada como buena controladora de patógenos de suelo, de ubicación cosmopolita y *T. gamsii*, habitante común de suelos agrícolas encontrada en Estados Unidos, Australia e Italia, y rara vez aislada como endófito (Samuels *et al.*, 2014).

El género *Trichoderma* es ampliamente considerado como completamente benigno, la mayoría de las especies y las actividades de las especies de *Trichoderma* son beneficiosas por las enzimas que producen, para el crecimiento de la planta y en el control biológico de enfermedades de las plantas; sin embargo, se debe evaluar seriamente la seguridad en el uso de *T. longibrachiatum*. Los resultados de las tasas de crecimiento obtenidas *in vitro* para las 5 especies filogenéticas corresponden a las informadas por Chaverri & Samuels (2003) y Samuels *et al.*, (2006, 2012). En los estudios antes citados, se ha podido determinar que la temperatura óptima de crecimiento en APD está comprendida en el rango de 25 a 35°C (con excepciones a 20°C). Con respecto a *T. harzianum*, especie cosmopolita (Chaverri & Samuels, 2003; Barrera, 2012; Samuels *et al.*, 2012) y dependiente del clima (Barrera, 2012) a través de los resultados obtenidos en este estudio en que todos los aislamientos fueron obtenidos de la zona de Valle Inferior se podría establecer que esta especie es característica de climas templados, ya que esta zona productora posee un clima de este tipo y con menor amplitud térmica que el Alto Valle, al estar influenciada por el mar.

En el caso de *T. citrinoviride*, si bien se la identifica molecularmente con un 98% de homología, en el estudio de filogenia se separa de la cepa de referencia; por lo cual, se debería realizar un estudio más exhaustivo para su identificación, utilizando marcadores moleculares o secuenciando alguna otra zona del genoma de esta especie que se encuentre bien conservada tal como el gen *rpb2* (subunidad 2 de la polimerasa) (Barrera V. Com.pers).

El potencial en la capacidad de biocontrol de los aislamientos de *Trichoderma* sp. obtenidos frente a *Fusarium oxysporum* será indagado en esta tesis.

CONCLUSIONES

La estrategia de selección que combina el uso de plantas asintomáticas de cebolla en un cultivo con presencia de la enfermedad “podredumbre basal por *Fusarium*”, y de medio selectivo rosa de bengala de Martin, permitió obtener un elevado número de aislamientos de *Trichoderma*.

Del total de los aislamientos de *Trichoderma* (cincuenta), sólo se identificaron cinco especies del género: *T. harzianum s.l.*, *T. longibrachiatum*, *T. gamsii*, *T. citrinoviride* y *T. atroviride*.

Casi la totalidad de aislamientos de *Trichoderma harzianum s.l.* se aislaron de suelos del Valle Inferior de Río Negro, mientras que *T. longibrachiatum* predomina en el Alto Valle de Río Negro. *T. harzianum s.l.* fue la especie más frecuentemente aislada ya que representó casi el 50% del total de aislamientos.

La asociación entre la predominancia de cada especie y la zona de muestreo se explicaría por las diferencias de temperaturas.

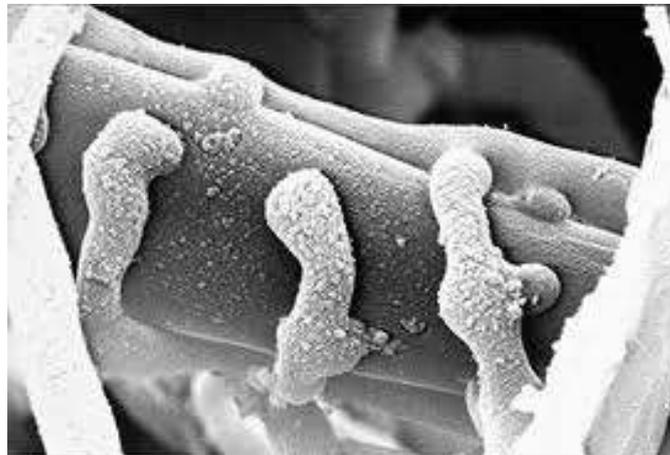
Capítulo IV

BIOCONTROL DE

Fusarium oxysporum f.sp. *cepae*

CON EL USO DE AISLAMIENTOS NATIVOS

DE *Trichoderma* spp.



1. Control biológico. Generalidades

Se define como control biológico a la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, y que sucede de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Baker & Cook, 1974).

El biocontrol de patógenos de plantas ha ido en aumento, convirtiéndose en un componente esencial del manejo de enfermedades. La excesiva dependencia de los plaguicidas químicos en sistemas agrícolas no sustentables, selecciones de sitio inadecuados y escasez de recursos son ejemplos de problemas agrícolas que enfrentan los productores (Monte, 2001). El biocontrol aparece como una alternativa amigable para su aplicación frente a los problemas sanitarios recurrentes en la agricultura. Muchos hongos y otros microorganismos son capaces de controlar varios patógenos de plantas. Estos agentes de biocontrol son particularmente atractivos porque tienen capacidad de proteger y colonizar varias porciones de plantas que particularmente son inaccesibles a los tratamientos agrícolas convencionales (Harman, 1992).

2. El género *Trichoderma* como potencial biocontrolador

Trichoderma spp. es un género de hongo filamentoso que se ha demostrado que proporciona un alto nivel de control biológico de microorganismos fitopatógenos del suelo. Cinco especies de *Trichoderma* se conocen como las más importantes biocontroladoras, ellas son: *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. konigii*, *T. polysporum*, y *T. viride*. Sin embargo, rasgos deseables y esenciales para la capacidad de biocontrol se atribuyen a cepas específicas y no a la especie en particular (Ozbay & Newman, 2004).

La rizósfera es una estrecha región de suelo que está directamente influenciada por las secreciones de raíces y la actividad de los microorganismos del suelo asociados (Agrios, 2005). De este modo, es uno de los nichos ecológicos comunes para *Trichoderma* spp. dado que puede colonizar estos exudados. La competencia en la rizósfera es una medida de la capacidad que posee un microorganismo habitante del suelo para colonizarla; es así que la búsqueda de agentes de control biológico se focaliza hacia estos organismos específicos, componentes de la rizósfera, que tienen la capacidad fisiológica y genética de proliferar a lo largo de la raíz mientras se desarrollan (Harman, 1992). Entre sus principales características se encuentran la capacidad de competencia por fuentes de carbono, hierro y nitrógeno, lo que resulta en el control biológico

de patógenos del suelo (Scher *et al.*, 1984). Esta habilidad los distingue de organismos capaces de colonizar sólo puntos específicos a lo largo de la raíz (Harman, 1992).

Se ha demostrado que las especies de *Trichoderma* tienen capacidad de competir en la rizósfera. La afinidad del género por la misma puede ser explicada por dos de sus preferencias nutricionales. En primer lugar, el 92% de las raíces de las plantas son colonizadas por hongos micorrizicos que *Trichoderma* puede micoparasitar (Datnoff *et al.*, 1995; Nemeček *et al.*, 1996). Algunos estudios sugieren un sinergismo entre dos tipos de hongos, otros han observado que *Trichoderma* ataca las micorrizas arbusculares y suprime su colonización en las raíces de las plantas (Green *et al.*, 1999). En segundo lugar, las raíces de las plantas, y especialmente las puntas de las raíces, están cubiertas por una cápsula similar a un gel (denominada mucigel) compuesta por polisacáridos altamente hidratados tales como pectinas y hemicelulosas que son secretadas por las células más externas de la raíz. Estos componentes son fácilmente degradables por las hemicelulasas de las especies de *Trichoderma*. Los monosacáridos y disacáridos excretados por las raíces de las plantas en la rizósfera proveen de una importante fuente carbonada para micorrizas (Nehls *et al.*, 2010), y la sacarosa tiene un rol similar para el establecimiento de *T. virens* en la rizosfera (Vargas *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que los genomas de varias especies de *Trichoderma* contiene genes que codifican invertasas intracelulares, por lo cual son capaces de asimilar los monosacáridos obtenidos de la ruptura de la sacarosa (Druzinina *et al.*, 2011).

Las especies de *Trichoderma* utilizan numerosos mecanismos en el ataque a otros hongos y en la colonización del sistema radicular de las plantas. Los más destacados incluyen:

2.1. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

2.1.1. Competencia

La competencia es uno de los mecanismos de la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenicos. Las especies de este género son generalmente consideradas como competidoras agresivas (Samuels, 1996). Muy a menudo, son especies que poseen un rápido crecimiento y rápida colonización del sustrato, limitando el crecimiento de hongos patógenos como es el caso de *Fusarium* spp. (Papavizas, 1985). La competencia en la rizosfera para los agentes de control biológico es importante como mecanismo, especialmente en agentes aplicados como tratamientos en la semilla, donde la protección contra los patógenos es crítica (Harman, 1992). Un agente de biocontrol no puede competir por espacio y nutrientes si no es capaz de crecer en la rizosfera, lo que es importante para el control de enfermedades de la raíz (Howell, 2003). Las especies de *Trichoderma* agregadas al suelo o aplicadas como

tratamientos de semillas, crecen rápidamente a lo largo de la raíz, acompañando su crecimiento en las plantas tratadas (Ahmad & Baker, 1987; Harman, 2000; Howell, 2003).

Tratamientos al suelo con esporas de *T. harzianum* suprimieron infecciones de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* y *F. oxysporum* f.sp. *melonis*. La competencia fue uno de los mecanismos propuestos, aunque no ha demostrado ser la principal actividad (Howell, 2003).

2.1.1. Antibiosis

Muchos aislamientos de *Trichoderma* producen antibióticos volátiles y no volátiles (Dennis & Webster, 1971). Howell & Stipanovic (1983) aislaron y describieron un antibiótico denominado gliovimn de *Gliocladium virens* que fue fuertemente inhibidor de *Pythium ultimum* y de especies de *Phytophthora*. Sivan *et al.* (1984) reportaron que el crecimiento de *Trichoderma*, antagonista de *Pythium aphanidermatum*, produce compuestos inhibitorios *in vitro*. Liftshitz *et al.* (1986) demostraron que el control de especies de *Pythium* en arvejas por una cepa de *T. harzianum* y otra de *T. koningii* no fue debida a la temprana competencia o al micoparasitismo, sino a la producción de un factor tóxico producido por el organismo biocontrolador en la espermósfera que inhibió el crecimiento del patógeno. La literatura demuestra que *Trichoderma* spp. secreta un número de antibióticos antifúngicos incluyendo pyrones, isocianatos, péptidos, peptábolos y trichotenos (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991). Sin embargo, aún falta correlacionar la antibiosis *in vitro* producida por *Trichoderma*, con lo que ocurre en la naturaleza.

2.1.3. Micoparasitismo

Se denomina micoparasitismo a la capacidad de un organismo de degradar y asimilar a otros hongos (Mondino & Vero, 2006), este es otro mecanismo involucrado en la actividad antagónica de especies del género *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos. Ha sido reportado el modo de interacción de las hifas y el parasitismo de este antagonista contra muchos hongos patógenos del suelo (Elad *et al.*, 1983). *Trichoderma* crece típicamente hacia la hifa de otro hongo, se enrolla sobre ella en una reacción mediada por lectinas, y degrada las paredes celulares del hongo objetivo por la secreción de diferentes enzimas líticas. Este proceso limita el crecimiento y actividad de hongos patogénicos (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991). Los ataques de *Trichoderma* a la hifa del huésped son mediante enrollamiento, ganchos y cuerpos similares a apresorios, que le permiten penetrar la célula del huésped secretando enzimas líticas. La interacción es específica, *Trichoderma* reconoce señales del hongo huésped, desencadenando el enrollamiento y penetración (Sivan & Chet, 1989). Las enzimas han sido reportadas mayoritariamente en aislamientos de *T. harzianum* (Harman, 2001).

2.1.4. Resistencia inducida

Cepas específicas del género *Trichoderma* colonizan y penetran los tejidos radiculares de las plantas e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en ellas, considerado como parte de la respuesta de defensa de la planta, que concluye en una resistencia sistémica inducida en la planta completa (Bailey & Lumsden, 1998).

El uso de formulados biológicos comerciales presenta algunos inconvenientes con su persistencia en el suelo, debido por un lado a las características genéticas de las cepas y por el otro, a las condiciones del medio ambiente, dado que son agentes introducidos a nuevos agroecosistemas (Aquino Martínez *et al.*, 2008). Por otra parte, se tiene conocimiento que el éxito del control biológico radica en obtener y utilizar microorganismos que sean aislados en los lugares nativos donde se presenta la enfermedad, ya que para controlar a un patógeno se debe considerar la variabilidad del aislamiento del antagonista en términos de su adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas (Harman, 2006).

En este capítulo se plantea como hipótesis:

Los aislamientos nativos del género *Trichoderma* obtenidos de suelos de cultivos de cebolla, seleccionados por su capacidad biocontroladora frente a *Fusarium oxysporum* mediante ensayos *in vitro*, tendrán mejor eficacia que los aislamientos comerciales.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos:

- Seleccionar aislamientos de *Trichoderma* spp. en base a diferentes criterios (representación de especies, velocidad de crecimiento, antagonismo *in vitro* frente a *Fusarium oxysporum*) para su uso en ensayos de biocontrol.
- Caracterizar los mecanismos antagónicos *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp contra *Fusarium* sp.
- Evaluar el efecto de biocontrol de los aislamientos nativos seleccionados y comerciales sobre los patógenos nativos a escala de maceta e invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos de hongos

Los hongos patógenos y antagonistas obtenidos según metodología descrita en Cap II y III, se hicieron crecer en APD, a partir de los cultivos conservados en heladera en tubos de 2 mL con agua destilada estéril (ADE). Para los ensayos, los aislamientos de *Trichoderma* se obtuvieron desde cultivos en APD a 22±1°C con fotoperiodo de 12 h de luz-oscuridad, de 5 días de edad; mientras que los aislamientos de *F. oxysporum* f.sp *cepae* de cultivos en APD a 25±1°C en oscuridad y 10 días de edad.

2. Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro*.

Los aislamientos de *Trichoderma*, con crecimiento negativo a 37°C, se evaluaron mediante pruebas de antagonismo *in vitro* frente al aislamiento de *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae* LIC 10463 seleccionado por su mayor virulencia (cap II).

2.1. Cultivos duales.

La capacidad de inhibición de crecimiento de la colonia del patógeno por producción de sustancias difusibles o competencia, se evaluó mediante el método de cultivos duales (Fernández Barbosa & Suárez Meza, 2009). En placas de Petri con 15 mL de APD se sembró un disco de 3mm con micelio del patógeno y en el extremo opuesto un disco con el antagonista. En todos los casos, se realizaron 3 repeticiones, siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Las placas se incubaron a 25±1°C, con fotoperíodo de 12 horas de luz-oscuridad (Figura 4.1). Placas con sólo el disco de patógeno y sólo el antagonista se utilizaron como testigos. A las 72 h se midieron el diámetro mayor y menor de la colonia del patógeno y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno, comparado el radio menor, inhibido por el antagonista, con el mayor (Guigón-López *et al.*, 2010).

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Diámetro mayor} - \text{Diámetro menor}}{\text{Diámetro mayor}} \right) \times 100$$

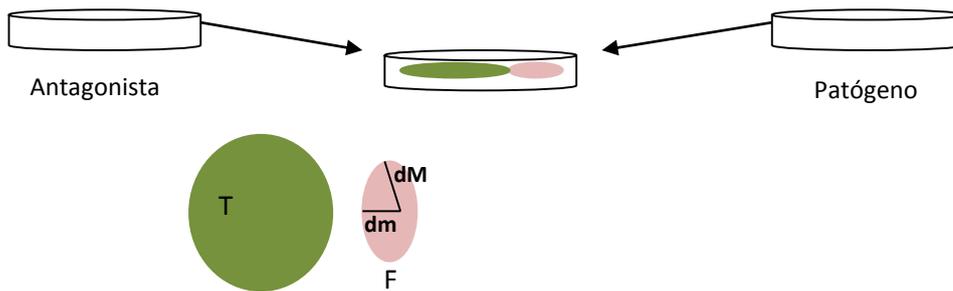


Fig 4.1. Esquema representativo de un cultivo dual. F: aislamiento de *Fusarium* sp. T: aislamiento de *Trichoderma* sp. dm: diámetro menor de la colonia del patógeno. dM: diámetro mayor.

2.2. Cultivos enfrentados.

El experimento de producción de compuestos volátiles por parte del antagonista, que pudieran inhibir el crecimiento del patógeno, fue llevado a cabo de acuerdo al método de placas enfrentadas establecido por Lillbro *et al.* (2005). En el centro de una placa de Petri con APD se sembró un disco de 3mm con micelio del patógeno, procedimiento que se repitió con el antagonista, las dos placas se enfrentaron y sellaron. Luego se llevaron a incubación a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodo de 12 horas de luz-oscuridad (Figura 4.2). Se realizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento; como testigo se utilizaron placas de Petri con el patógeno enfrentadas a placas con APD sin el antagonista. A las 96 horas se midieron los diámetros de crecimiento de la colonia del patógeno en cada tratamiento y del testigo. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Diámetro testigo} - \text{Diámetro tratamiento}}{\text{Diámetro testigo}} \right) \times 100$$

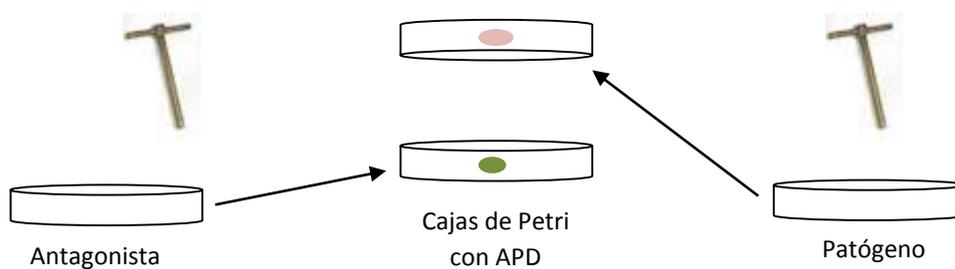


Fig 4.2. Esquema representativo de un cultivo enfrentado

2.3. Análisis estadístico

Dado el carácter cuantitativo de las variables respuestas de ambos experimentos, se procedió a utilizar un análisis de diferencia de medias LSD (Fisher) con el uso del programa estadístico Statistica 7.1 (StatSoft, 2005).

3. Evaluación del biocontrol

Los aislamientos antagonistas seleccionados por poseer mayor velocidad de crecimiento (cap III) y mayores porcentajes de inhibición del crecimiento del patógeno -en cultivos duales y enfrentados-, fueron evaluados en su capacidad de biocontrol frente a dos de los aislamientos más agresivos del patógeno, representativos de cada zona muestreada de cebolla (Alto Valle y Valle Inferior), *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* LJC 10463 y LJC 10466, respectivamente.

3.1. Preparación de suspensiones de hongos patógenos y antagonistas

Las suspensiones conidiales se obtuvieron por raspado de la superficie de la colonia con escalpelo estéril, resuspensión en agua estéril y filtración a través de malla de tela estéril para eliminar restos de micelio. Las suspensiones fueron ajustadas a diferentes concentraciones de acuerdo a cada experimento, por recuento directo con cámara de Neubauer al microscopio óptico (Olympus, modelo CX21).

3.2. Tratamientos

En los experimentos de evaluación de la capacidad de biocontrol se utilizaron 6 aislamientos nativos de *Trichoderma* (*T. harzianum* s.l T21, T30, T32, *T. longibrachiatum* T47, T53 y T61), 2 formulados comerciales: TC2: *Trichoderma* sp, Laboratorios San Pablo (i.a: *T. viride*, Cepa SP-T/05-14) y TC3: formulado comercial combinado de *Trichoderma* y micorriza, TiFi, laboratorios Bioaggil (i.a: *T. atroviride* Cepa 898G con *Glomus* sp –TC3-) frente a los dos aislamientos del patógeno.

3.3. Eficacia de biocontrol de los aislamientos

3.3.1. Experimento de aplicación en etapa de almácigo

El bioensayo se realizó en bandejas plásticas de 72 alvéolos con suelo estéril, inoculado con 1 mL de suspensión del patógeno a una concentración de 10^3 conidios.mL⁻¹ 24 horas antes de la siembra de semillas de cebolla. En las semillas desinfectadas superficialmente se aplicó el antagonista por inmersión en agitación durante 1h con una suspensión (10^4 conidios.mL⁻¹).

Luego se procedió a la siembra de las mismas, y 24 horas después, se aplicó nuevamente el antagonista en forma de riego, para llegar a una concentración de 10^8 (conidios.mL⁻¹); según metodología adaptada de Datnoff *et al.* (1995). Las bandejas se mantuvieron en invernadero por 60 días y se regaron por aspersion según requerimientos de las plantas. Los testigos fueron: a- semillas sembradas en suelo sin inocular y sin tratar (testigo sano) y b- semillas sin tratar en suelo inoculado con el patógeno (testigo enfermo). Se usaron 12 alvéolos por tratamiento con 3 repeticiones=36 alvéolos por tratamiento, utilizando un diseño completamente aleatorizado.

3.3.1.1. Evaluación

A los 30 días se evaluó el porcentaje de germinación del total de semillas sembradas. Al finalizar el ensayo (60 días), se determinaron las siguientes variables: largo de hoja y raíz de cada plántula y peso fresco total de cada tratamiento, porcentaje de germinación final; y porcentaje de infección de raíces y de colonización por *Trichoderma* mediante observación del sistema radicular bajo microscopio estereoscópico (Leica, modelo EZ4), con el fin de visualizar si poseían algún tipo de daño en la raíz que evidenciara el ingreso de *Fusarium* en la misma, según lo descrito por Nemeč *et al.*, (1996).

3.3.1.2. Análisis estadístico

Dado el carácter multivariado de la variable respuesta en la capacidad antagonista de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum* se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con fines descriptivos y de selección de los aislamientos más promisorios para un estudio en macetas, utilizando el programa Statistica 7.1 (StatSoft, 2005).

3.3.2. Experimento de aplicación al momento del transplante

Con el fin de evaluar el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* en un momento crítico del ciclo del cultivo, tal como es el transplante a campo, se evaluaron los mismos tratamientos que en el experimento descrito previamente, siguiendo la metodología de Granados & Wang (2008) y Aquino Martínez *et al.* (2008). En este bioensayo, se procedió a evaluar sólo el aislamiento del patógeno que fue más difícil de controlar en el ensayo de germinación, es decir, el aislamiento nativo de la zona del Alto Valle de Río Negro (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* LJC 10463- F4). Se realizó en recipientes de polietileno expandido de 18x12x12cm con sustrato estéril que contenía 85% de Turba y 15% de Perlita (Vinalea *et al.*, 2008). En este sustrato se realizó la inoculación mediante riego con 10 mL de suspensión del patógeno en una concentración de 10^3 conidios/mL. Inmediatamente se incorporaron 10 mL de una solución calibrada del antagonista a 10^8 conidios/ml (Aquino Martínez *et al.*, 2008). Luego de esto, se transplantaron 10 plantines producidos en condiciones controladas, de 60 días de edad, por maceta. Se

realizaron tres repeticiones por tratamiento. En este experimento se utilizaron como testigos a cada uno de los antagonistas solos, el patógeno sin antagonista (testigo enfermo) y agua destilada estéril sin patógeno ni antagonista (testigo total).

Los recipientes se mantuvieron durante 60 días en invernadero bajo cubierta y se regaron con agua en función de las necesidades del cultivo.

3.3.2.1. Evaluación

A los 60 días se procedió a la evaluación de las siguientes variables: largo de raíces y hojas (cm), peso fresco (g) de cada planta y peso seco (g) de cada tratamiento.

El peso seco se realizó colocando el material vegetal entre papeles de diarios en estufa de secado a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ por 96 hs (DALVO, modelo DHR).

Los síntomas y signos en cada planta por tratamiento se observaron utilizando un microscopio estereoscópico (Leica, modelo EZ4). En el caso de síntomas positivos, típicos de la enfermedad, se realizó el aislamiento del patógeno para determinar su presencia. Para ello, se tomó de la zona del disco basal, una porción de tejido al cual se le realizó una desinfección en alcohol etílico 70% (V/V) e hipoclorito de sodio 5% (V/V), y se procedió a sembrar trozos del mismo en placas de Petri con 15 mL de agar papa dextrosa. Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) por 5 días con fotoperiodos de 12 horas de luz - oscuridad.

3.3.2.2. Análisis estadístico

Para la evaluación final de este ensayo se realizaron pruebas de diferencia de medias, mediante el análisis de Tuckey ($\alpha = 0,05$), utilizando el programa Statistica 7.1 (StatSoft, 2005), con el fin de distinguir los aislamientos más promisorios de este bioensayo.

4. Caracterización de los mecanismos de acción

Es necesario conocer los mecanismos por los cuales un microorganismo antagonista ejerce el biocontrol; ya que ello, permite potenciar la acción del biocontrolador sólo o en combinaciones. Para ello, se estudiaron los seis aislamientos nativos con mejor comportamiento *in vitro* y que se evaluaron *in vivo*.

4.1. Micoparasitismo

Para estudiar la capacidad de los aislamientos de micoparasitar al patógeno, se utilizó una placa pre-colonizada con *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae*, sobre la cual se depositó un disco del antagonista cultivado en APD y se llevó a incubación por 25 días a temperatura ambiente, con un fotoperíodo de 12 horas de luz-oscuridad, ó hasta que *Trichoderma* completó el crecimiento

sobre el patógeno. Semanalmente se tomó un disco de micelio de la interacción entre ambos hongos y se sembró en placas con APD, tres repeticiones por tratamiento, por 14 días, con el fin de observar el crecimiento de *Trichoderma* sp y/o *Fusarium*, siguiendo metodología de Bailey *et al.* (2008). En este ensayo se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

4.2. Competencia por hierro

Mediante el uso de cultivos duales (Figura 4.3), se sembraron combinaciones del aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* con cada uno de los 6 aislados nativos de *Trichoderma* spp. a las concentraciones de: 0 (testigo), 10, 100 y 500 mM de Cloruro férrico. El protocolo consistió en la inoculación en cajas de Petri con el medio destinado a la producción de sideróforos (sacarosa 25g/L, sulfato de amonio 4g/L, fosfato dibásico de potasio 3g/L, ácido cítrico 1g/L, sulfato de magnesio 0,08 g/L, sulfato de zinc 0,002 g/L, agar 20g/L). Luego de 48 h de incubación a 25°C, la detección de sideróforos fue evidenciada por la formación de un halo naranja alrededor de la colonia luego de aplicar una solución de perclorato férrico (20 mM cloruro férrico, 0,1 M ácido perclórico) a la placa. La aparición de halos coloreados indica la presencia de sideroforos del tipo hidroxamato (Vero, *et al.*, 2009).

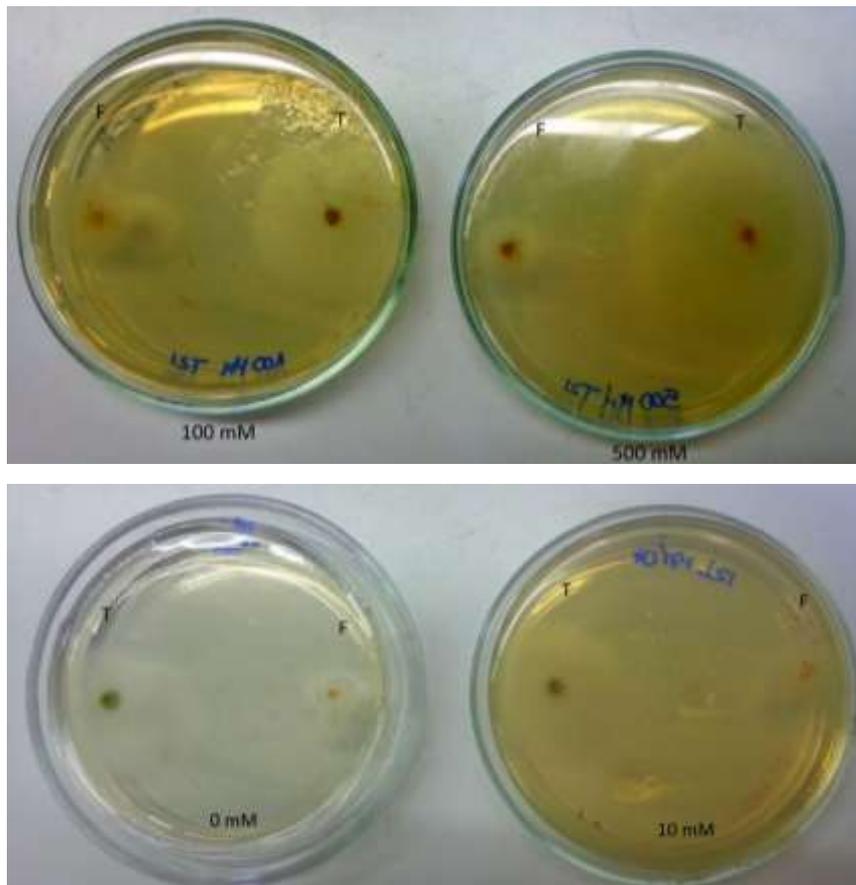


Fig 4.3. Cultivos duales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* y *Trichoderma* spp en medios con diferente concentración de cloruro de hierro.

4.3. Competencia por nutrientes entre el antagonista y el patógeno

Siguiendo metodología adaptada de Sivan & Chet (1989), se planteó un experimento entre patógeno y antagonista en una solución con concentraciones similares de fuentes nitrogenadas y carbonadas a las que se encuentran en los exudados de raíces en la rizósfera. Se utilizó agua destilada estéril (ADE) como medio líquido para esta evaluación, suplementado o no con cada fuente y concentración.

4.3.1. Soluciones

Se prepararon 200 mL de cada solución nutritiva en Erlenmeyer de 250 ml. Para esto, se procedió a pesar cada nutriente y luego de agregarle la cantidad de agua destilada necesaria, se lo llevó a agitación a 120 rpm, por 20 minutos. Una vez finalizado, con una pipeta de 10 mL se procedió a colocar en tubos de ensayo de 15 mL, 5 mL de cada solución. Los cuales fueron llevados a esterilización en autoclave a 121 °C, 1,5 atmósferas de presión, por 20 minutos.

4.3.2. Tratamientos

Los azúcares (fuentes carbonadas) fueron glucosa usada en concentraciones de 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg.mL⁻¹ y sacarosa a 0,1; 0,2 y 0,4 mg.mL⁻¹. Los nitratos usados fueron NH₄Cl y KNO₃ en concentración de 1g.L⁻¹ (Danielson & Davey, 1973). El aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (10⁶ conidios.mL⁻¹ (procedente de Alto Valle) solo y en combinación con cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados (10⁸ conidios.mL⁻¹), fueron agregados en alícuotas de 100 µL a tubos con 5mL de ADE. Luego de 16 horas a 25 °C de los tubos en agitación a 120 rpm, se observaron 100 conidios de *F. oxysporum* por tubo para establecer la germinación o no de los conidios. Se realizaron tres tubos por tratamiento y un diseño completamente aleatorizado.

4.4. Antibiosis y producción de sustancias extracelulares

La capacidad de inhibición del crecimiento de la colonia y de la germinación de conidios del patógeno por producción de metabolitos extracelulares se evaluó para cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados en dos experimentos:

- **Difusibles en agar:** Este ensayo se basó en la inhibición del crecimiento del patógeno causado por metabolitos capaces de difundir en un medio de cultivo sólido. Para ello, cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* fueron inoculados en 100 mL de caldo papa glucosa (CPG) e incubados a 20°C, en agitación continua a 120 rpm por 10 días. Con el fin de purificar el medio de los conidios y el micelio, los cultivos fueron filtrados mediante una gasa estéril y centrifugados

a 5000 rpm por 15 minutos. Alícuotas de 2mL de ese filtrado fueron colocadas en cajas de Petri estériles a las cuales se les agregó 15 mL de APD a 45°C. Luego de que el agar solidificó, discos de micelio del patógeno, obtenidos de colonias con crecimiento activo (7 días), se colocaron en el centro de las cajas de Petri e incubaron a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 días. El crecimiento del patógeno fue evaluado diariamente mediante la medición del diámetro de la colonia. Se realizaron 3 repeticiones para cada aislamiento y un testigo sin el filtrado del antagonista. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento de la colonia según metodología de Küküc & Kivanç (2003).

- **En medio líquido:** El ensayo en medio líquido permitió determinar si la adición de la solución a ensayar inhibía el crecimiento del patógeno. En este caso, los aislamientos se evaluaron con el fin de observar el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios del patógeno por efecto de filtrado de antagonista. El filtrado utilizado fue el mismo que el que se utilizó para el ensayo en placas en el punto anterior. Alícuotas de 1mL de filtrado de cada antagonista se colocaron en 5mL de ADE, a los que se le agregaron 100 μL de una suspensión del patógeno a una concentración de conidios de 10^6 conidios. mL^{-1} . Se realizaron tres repeticiones para cada aislamiento y el testigo sin antagonista, el ensayo se evaluó a las 24 hs mediante la observación de la germinación de 100 conidios del patógeno (Ezziyani *et al.*, 2004).

En ambos ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

RESULTADOS

1. Evaluación de la capacidad antagonica *in vitro*.

Se evaluó la capacidad antagonica *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* nativas frente a *Fusarium oxysporum*.

1.1. Cultivos duales

Se encontraron diferencias significativas en la inhibición producida por los aislamientos de *Trichoderma* spp. *in vitro* (Figura 4.4). Se destacaron 20 de los aislamientos evaluados con porcentajes de inhibición entre el 41,8% y 56,7%; mientras que los demás aislamientos alcanzaron porcentajes entre el 14 y el 39% (Tabla 4.1). Esta inhibición podría deberse a la competencia, al parasitismo o a la producción de sustancias difusibles entre el antagonista y el patógeno.

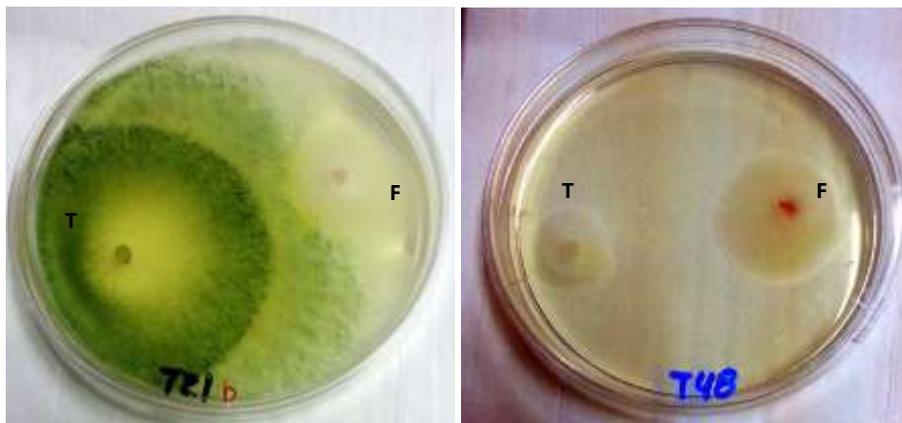


Fig 4.4. Cultivos duales. A. detalle del aislamiento T21 que produjo un alto porcentaje de inhibición. B. detalle de aislamiento que produjo uno de los menores valores de inhibición. T: *Trichoderma* spp y F: *Fusarium oxysporum*.

Tabla 4.1. Efecto de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre la inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*

Aislamientos de <i>Trichoderma</i>	Cultivos Duales		Cultivos Enfrentados	
	Diámetro (mm)	% Inhib	Diámetro (mm)	% Inhib
<i>T. harziaum s.l</i> (T21)	9,3 a-d	53,66	26,3 ab	15,95
<i>T. harziaum s.l</i> (T22)	8,6 ab	45,44	33 c-i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T23)	14 g-j	28,48	26,6 ab	14,89
<i>T. harziaum s.l</i> (T24)	12,3 c-j	36,14	34 e-i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T25)	12,6 d-j	27,24	33 c-i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T26)	11,6 a-i	34,9	31,3 b-h	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T27)	9,6 a-e	44,39	30,6 b-g	2,12
<i>T. harziaum s.l</i> (T28)	9,3 a-d	44,46	32,3 c-i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T29)	13,6 f-j	36,78	36,3 hi	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T30)	8,3 a	46,31	29,6 a-e	5,31
<i>T. harziaum s.l</i> (T31)	9,6 a-e	50,27	31 b-g	1,06
<i>T. harziaum s.l</i> (T32)	9,3 a-d	47,16	29,6 a-e	5,31
<i>T. longibrachiatum</i> (T33)	10,3 a-f	51,51	34 e-i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T29)	9,3 a-d	47,69	37,3 i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T36)	9,3 a-d	49,75	34 e-i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T38)	9 abc	56,67	34 e-i	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T40)	14 g-j	32,3	3,2 d-j	3,19
<i>T. harziaum s.l</i> (T41)	11,3 a-h	43,9	32 c-h	0
<i>T. longibrachiatum</i> (T43)	0	0	34 e-i	0
<i>T. longibrachiatum</i> (T44)	13 e-j	39,23	32 c-h	0
<i>T. longibrachiatum</i> (T47)	11,3 a-h	45	30 a-f	4,25
<i>T. harziaum s.l</i> (T48)	25,5 bcd	25,54	35,3 ghi	0
<i>T. harziaum s.l</i> (T49)	19 k	37,11	33,6 e-i	0
<i>T. gamsii</i> (T50)	11 a-g	46,74	35 f-i	0
<i>T. longibrachiatum</i> (T51)	11,6 a-i	32,2	28 abc	10,63
<i>T. longibrachiatum</i> (T53)	11,3 a-h	45	31 b-g	1,06
<i>T. longibrachiatum</i> (T54)	10,6 a-g	47,36	28,3 a-d	9,04
<i>T. longibrachiatum</i> (T55)	12,3 c-j	41,85	34 e-i	0
<i>T. spp</i> (T56)	12,6 d-j	42,05	33,6 e-i	0
<i>T. longibrachiatum</i> (T57)	15 ij	26,5	31 b-g	1,06
<i>T. longibrachiatum</i> (T59)	12,3 c-j	32,69	31,3 b-h	0
<i>T. longibrachiatum</i> (T61)	12 b-j	44,92	25,3 a	19,14
<i>T. longibrachiatum</i> (T63)	12 b-j	30,9	33,6 e-i	0
<i>T. longibrachiatum</i> (T68)	10,3 a-f	39,07	33,3 d-i	0
TComercial2	14,6 hij	21,84	35 f-i	0
TComercial3	15,3 j	14,93	35 f-i	0

% Inhib -cultivos duales= (diámetro mayor-diámetro menor/diámetro mayor)*100. %Inhib -cultivos enfrentados= (diámetro testigo-diámetro menor/diámetro testigo)*100. Diámetro (mm): diámetro promedio de tres repeticiones de las colonias del patógeno frente al antagonista. Letras iguales no presentan diferencias significativas entre sí, dentro de una misma columna según Fisher $\alpha=0,05$. Los colores indican el valor de inhibición por el cual el aislamiento fue seleccionado.

1.2. Cultivos enfrentados

En los resultados del efecto de los compuestos volátiles producidos por *Trichoderma* sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp *cepae*, se detectaron diferencias significativas entre los aislamientos. El 50% de los aislamientos no produjo ningún nivel de inhibición; mientras que se destacó *T. longibrachiatum* (T61) por el mayor porcentaje de inhibición (19,14%), seguido por aislamientos con valores entre 15% y 4,25% (Tabla 4.1).

Los aislamientos *T. harzianum*: T21, T30 y T32 y *T. longibrachiatum*: T47, T53 y T61, que tuvieron alto porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno en cultivos duales y enfrentados, alta tasa de crecimiento y crecimiento negativo a temperaturas corporales humanas, se seleccionaron para ser utilizados en ensayos en maceta.

Estos mismos, fueron sometidos a un análisis de contraste con los aislamientos comerciales, de las medias de la inhibición producida en el ensayo en cultivos duales. Se puede observar (Fig 4.5) que hay una significativa diferencia entre estos dos grupos, siendo mayor la media en los ensayos *in vitro* de los aislamientos nativos de *Trichoderma* spp.

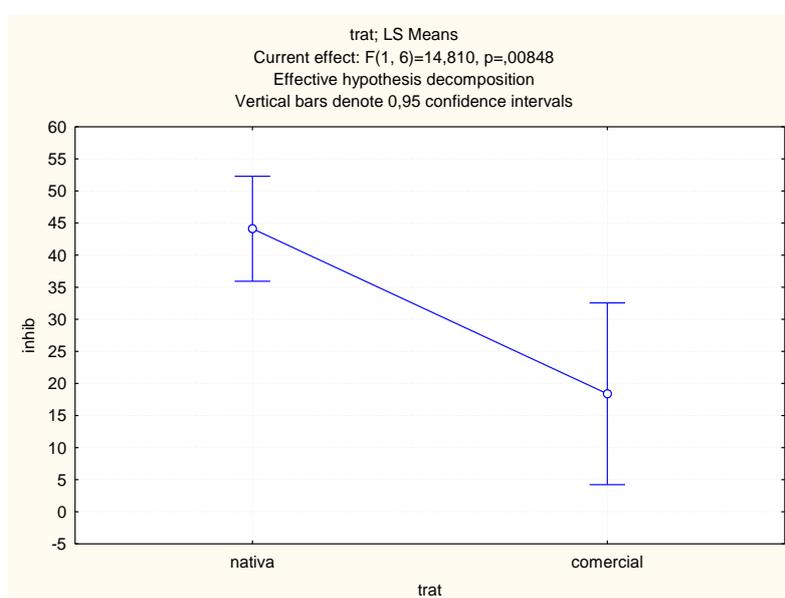


Fig 4.5. Análisis de contraste de medias entre los aislamientos nativos preseleccionados y comerciales de *Trichoderma*

2. Evaluación del biocontrol de los aislamientos seleccionados *in vivo*

2.1. Ensayo en macetas. Aplicación en etapa de almácigo

Para un mismo aislamiento de *Trichoderma* se observó un comportamiento diferente según el aislamiento de *Fusarium* utilizado. En general, los aislamientos de *Trichoderma* lograron controlar con mayor eficiencia al aislamiento de *F. oxysporum* F10 (LJC 10466) originario de Valle Inferior. Los aislamientos nativos de *Trichoderma* T61 y T21 y comercial TC3 frente a este aislamiento de *Fusarium*, fueron los que tuvieron mejor comportamiento. Con ellos se observó mayor porcentaje de semillas de cebolla germinadas y número de plantas sanas, promedio de longitud más alto de raíz y hoja, mayor peso fresco y mayor cantidad de raíces con crecimiento del antagonista (sin presencia del patógeno), esto se observa en la figura 4.6. Con el tratamiento de *T. harzianum* (T21) frente a *F. oxysporum* F4 (LJC10463) originario del Alto Valle, si bien se obtuvo un bajo porcentaje de germinación de semillas de cebolla, prácticamente no se observó muerte de plantas al final del ensayo. Además, presentó el porcentaje más alto de colonización de raíces por parte de *Trichoderma* (Tabla 4.2, Figura 4.7).

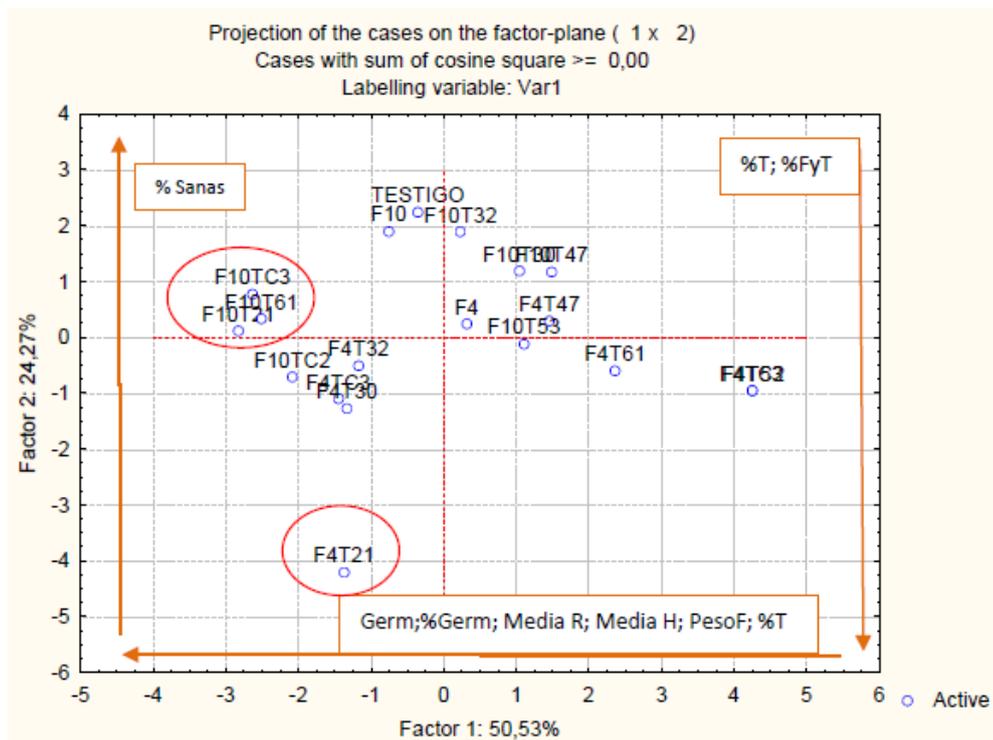


Fig 4.6. Análisis de componentes principales del ensayo en macetas. F10 representa el aislamiento patogénico de *F. oxysporum* LJC 10466 y F4 a LJC10463. %Sanas: representa el porcentaje de plántulas sin síntomas de la enfermedad en el sistema radicular observadas bajo lupa; %T: porcentaje de plántulas con presencia de *Trichoderma* sp en la raíz; %FyT: porcentaje de plantas con presencia de la enfermedad y de *Trichoderma* en el sistema radicular; Germ: cantidad de semillas germinadas; %Germ: porcentaje de plantas sobre el total de semillas sembradas, al final del ensayo; Media R: promedio del largo de raíces; Media H: promedio del largo de hojas; PesoF: peso fresco de cada tratamiento. Cada una de las flechas indica un gradiente, que va en sentido de menor a mayor según corresponda a cada uno. Los recuadros que posee cada uno de ellos son las variables que lo conforman.



Fig 4.7. A. Detalle de una plántula con presencia de *Trichoderma harzianum* (T21) en la zona radicular. B. cuello de una plántula de Cebolla infectada con *Fusarium oxysporum* (F4).

Tabla 4.2. Evaluación del biocontrol de los aislamientos seleccionados *in vivo*. En macetas, aplicación en etapa de almácigo

Tratamiento	% Plantas germinadas	% Plantas enfermas	% Plantas <i>Trichoderma</i>	Largo Raíz	Largo Hoja	Peso Fresco
Testigo sano	52,78	0	0	5,8 ± 2,86	8,95 ± 2,34	1,7
Testigo enfermo (LJC 10463)	30,56	72	0	8,23 ± 4,3	8,28 ± 2,03	1,2
T.comercial (TC2)-LJC10463	0,00	0	0	0	0	0
T.comercial (TC3)-LJC10463	58,33	66	9	5,8 ± 3,53	10,3 ± 1,72	2,1
<i>T.harzianum</i> (T21)-LJC10463	38,89	57	28	6,29 ± 3,06	8,17 ± 2,2	0,8
<i>T.harzianum</i> (T30)-LJC10463	58,33	71	9	6,9 ± 3,25	8,9 ± 2,26	1,9
<i>T.harzianum</i> (T32)-LJC10463	52,78	58	5	7,8 ± 3,5	9 ± 1,63	2
<i>T.longibrachiatum</i> (T47)-LJC10463	8,33	66	0	8,6 ± 3,14	7,6 ± 1,52	0,1
<i>T.longibrachiatum</i> (T53)-LJC10463	0,00	0	0	0	0	0
<i>T.longibrachiatum</i> (T61)-LJC10463	11,11	75	0	2,87 ± 0,68	4,72 ± 3,34	0,2
Testigo enfermo (LJC 10466)	55,56	20	0	6,67 ± 4,21	9,02 ± 1,59	2,3
T.comercial (TC2)-LJC10466	69,44	52	12	6,92 ± 2,67	8,4 ± 2,18	3,1
T.comercial (TC3)-LJC10466	72,22	39	11	7,56 ± 3,39	11,5 ± 2,69	3,9
<i>T.harzianum</i> (T21)-LJC10466	80,56	31	14	7,3 ± 3,42	10,48 ± 1,48	3,3
<i>T.harzianum</i> (T30)-LJC10466	13,89	40	0	8,14 ± 1,43	9,12 ± 2,5	0,4
<i>T.harzianum</i> (T32)-LJC10466	19,44	28	0	10,8 ± 5,45	10,17 ± 1,88	1
<i>T.longibrachiatum</i> (T47)-LJC10466	19,44	28	0	4,21 ± 1,52	7,55 ± 2,3	0,5
<i>T.longibrachiatum</i> (T53)-LJC10466	22,22	75	0	5,3 ± 1,41	8,66 ± 2,6	0,5
<i>T.longibrachiatum</i> (T61)-LJC10466	72,22	38	7,6	7,75 ± 3,13	10,1 ± 1,86	3,7

% Germinación: porcentaje de semillas germinadas, calculado sobre un n=36 (12 semillas por tratamiento con 3 repeticiones=36 semillas por tratamiento). % Plantas vivas: porcentaje evaluado como el número total de plantas vivas al final del ensayo sobre el total de semillas sembradas. % Plantas con raíces afectadas: porcentaje de plantas con síntomas de necrosis radicular evaluada bajo la lupa, sobre el total de plantas vivas. %Plantas con *Trichoderma*: porcentaje de plantas con presencia del antagonista en el sistema radicular, sobre el total observado bajo la lupa. Largo Raíz: promedio del largo de raíz medido en cm. Largo Hoja: promedio del largo de hoja medido en cm. Peso Fresco: peso fresco en gramos, del total de la muestra que sobrevivió al final del ensayo.

2.2. Eficacia de biocontrol al momento del trasplante

Los efectos de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* y su aplicación mediante riego, demostraron promoción del crecimiento radicular y aumento en el vigor de las plántulas, luego de 60 días en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Si bien en los resultados no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, existen notables diferencias si éstos se compararan con los testigos enfermos (inoculados únicamente con el patógeno) y sano (sin inoculación, regado únicamente con ADE).

Las plantas inoculadas con el patógeno y sin el antagonista, tuvieron pérdidas de peso fresco, largo de raíz y hoja que fueron desde el 14 a más del 29% en comparación con el testigo sano. Al evaluar la respuesta de las plantas con aplicación del antagonista sin el patógeno, se observó que todos los aislamientos tuvieron una respuesta positiva. El peso fresco, obtuvo un aumento del 43,52% con el aislamiento comercial "TC3" (*Trichoderma atroviride*), respecto al testigo.

Cuando se evaluó la respuesta de las plantas al tratamiento con aislamientos nativos de *Trichoderma*, con el suelo inoculado con el patógeno, se destacó *Trichoderma harzianum* s.l (T30), ya que generó incrementos en el largo de hoja y aumento del peso fresco (7%) respecto del testigo. Los demás aislamientos, lograron menores porcentajes de incremento de las variables estudiadas o no lograron frenar el avance de *Fusarium oxysporum* (Tabla 4.3).

Los reaislamientos desde muestras de raíces de plantas tratadas confirmaron la presencia de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* spp. (Figura 4.8).

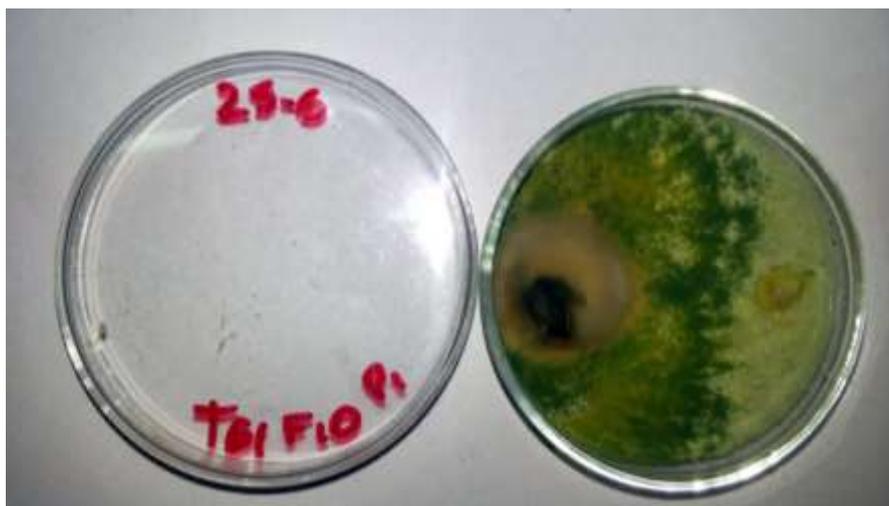


Fig 4.8. Resultado de la siembra de trozos de raíz desinfectada en una placa de Petri con APD, en la que se observa el crecimiento del patógeno (izquierda) y del antagonista (derecha).

Tabla 4.3. Eficacia del biocontrol al momento del trasplante

Tratamiento	Largo de raíz	Largo de hoja	Peso fresco	Peso seco	Diferencia porcentual		
					Raíz	Hoja	Peso Fresco
Testigo sano	15,58	37,45	2,77	2,10	-	-	-
Testigo enfermo (LJC 10463)	10,97	32,09	2,28	1,50	-14,30	-29,56	-17,81
<i>T.harzianum</i> (T21)	11,00	35,13	2,77	2,77	-6,20	-29,42	-0,01
<i>T.harzianum</i> (T30)	14,39	34,95	2,88	3,23	-6,66	-7,64	3,78
<i>T.harzianum</i> (T32)	14,65	34,90	2,91	2,37	-6,78	-5,95	5,15
<i>T.longibrachiatum</i> (T47)	16,25	35,17	3,14	2,77	-6,07	4,28	13,18
<i>T.longibrachiatum</i> (T53)	14,69	33,48	2,49	2,83	-10,58	-5,72	-10,24
<i>T.longibrachiatum</i> (T61)	15,45	33,85	2,66	2,57	-9,61	-0,85	-4,03
T.comercial (TC2)-LJC10463	11,89	35,12	2,51	2,40	-6,23	-23,69	-9,34
T.comercial (TC3)-LJC10463	14,44	38,75	3,98	2,30	3,48	-7,29	43,52
<i>T.harzianum</i> (T21)-LJC10463	10,21	35,64	2,58	2,70	-4,81	-34,47	-7,07
<i>T.harzianum</i> (T30)-LJC10463	15,92	35,47	2,97	2,93	-5,28	2,17	7,00
<i>T.harzianum</i> (T32)-LJC10463	15,05	36,20	2,89	2,77	-3,33	-3,40	4,10
<i>T.longibrachiatum</i> (T47)-LJC10463	15,66	35,21	2,70	3,07	-5,97	0,51	-2,41
<i>T.longibrachiatum</i> (T53)-LJC10463	13,82	33,97	2,39	2,83	-9,29	-11,32	-13,88
<i>T.longibrachiatum</i> (T61)-LJC10463	16,14	35,56	2,82	2,57	-5,05	3,64	1,73

Largo Raíz: promedio del largo de raíz medido en cm. Largo Hoja: promedio del largo de hoja medido en cm. Peso fresco: promedio del peso medido en gramos, de cada planta al final del bioensayo. Peso seco: del total de la muestra en gramos. Diferencia porcentual: diferencia de peso ó largo de hoja o raíz en comparación con el testigo absoluto; el símbolo negativo indica una pérdida en la variable medida.

3. Caracterización de los mecanismos de acción

3.1 Micoparasitismo

Luego de 15 días de incubación de placas de Petri precolonizadas por *F. oxysporum* y con micelio de los distintos aislamientos de *Trichoderma* spp., los potenciales antagonistas no lograron crecer sobre la colonia del patógeno. Esto evidencia que no poseerían el mecanismo de micoparasitismo para el biocontrol, al menos con la metodología utilizada. En preparados microscópicos de la zona de contacto entre el patógeno y antagonista observados al microscopio óptico no se logró ver micelio de *Trichoderma* en ninguno de los casos (Figura 4.9).

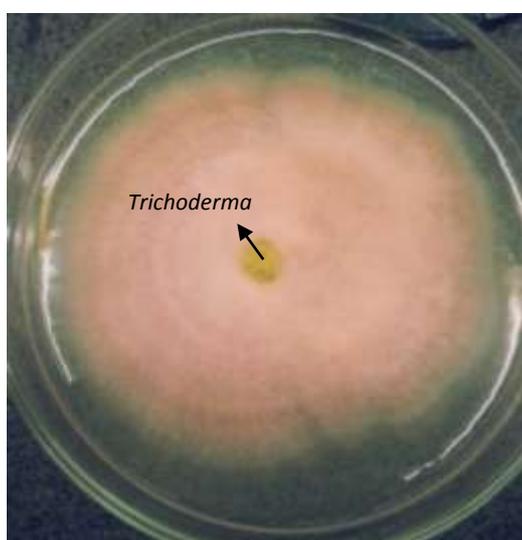


Fig 4.9. Resultado negativo de micoparasitismo. En el centro de la placa de Petri colonizada por *Fusarium oxysporum* se observa el disco de APD con micelio de *Trichoderma* spp.

3.2. Competencia por hierro. Formación de sideróforos

En las placas de Petri, luego del revelado para la detección de formación de sideróforos, no se observó la aparición de un pigmento naranja en ninguno de los aislamientos ni en ninguna de las distintas concentraciones, lo cual indicaría que no hay producción de sideróforos del tipo hidroxamato para los antagonistas y el patógeno.

Se evidenció competencia por hierro en cultivos duales con medios enmendados. Con el aislamiento de *T. harzianum* s.l. (T21), se observó una clara competencia por el nutriente, que se evidenció a través del aumento de diámetro de la colonia del patógeno (disminución del biocontrol) a medida que la concentración del nutriente aumentaba en el medio de cultivo. Con los aislamientos T32 (*T. harzianum*), T47, T53 y T61 (*T. longibrachiatum*), solo se observó

competencia a bajas concentraciones (10; 100 mM) (Figura 4.10), mientras que a 500mM disminuyó el crecimiento del patógeno.

En el caso del aislamiento *Trichoderma harzianum s.l* (T30), la respuesta observada fue inversa, la competencia por hierro disminuyó con el aumento de su concentración (Figura 4.10).

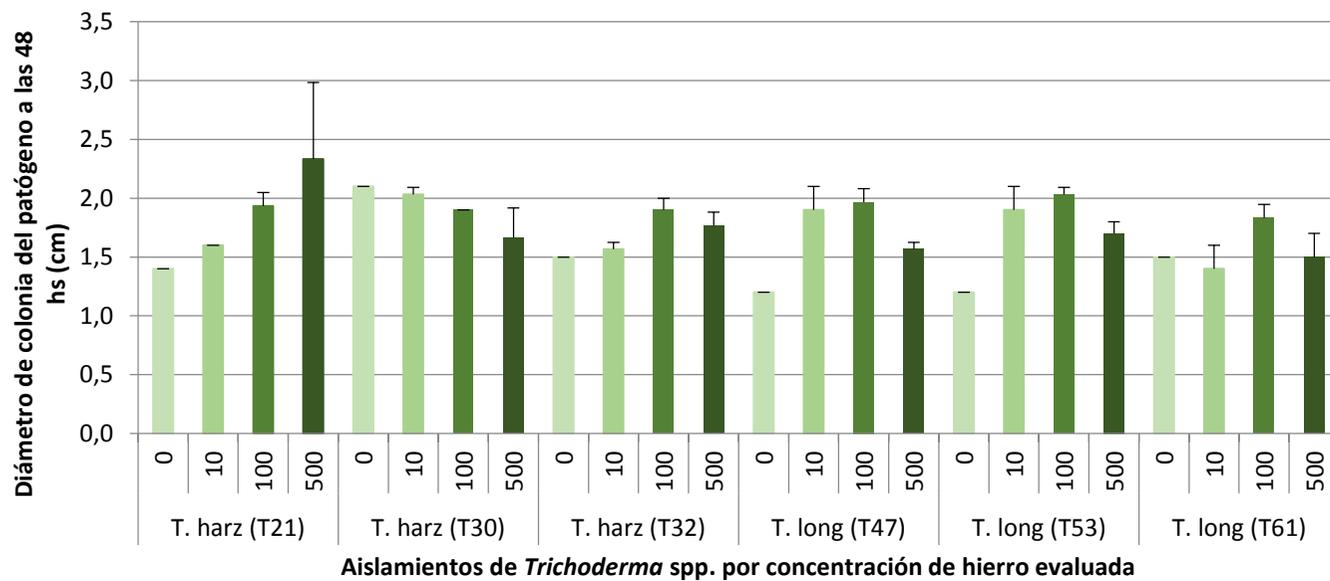


Fig 4.10. Evaluación de competencia por hierro entre aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae*. T.harz: *T. harzianum* s.l.; T. long: *T. longibrachiatum*.

3.3. Competencia por carbono y nitrógeno

Los resultados muestran que el aumento de la concentración de glucosa y sacarosa aumentó la germinación de los conidios del patógeno, lo que sugiere que ambos microorganismos compitieron por estos azúcares, disminuyendo la capacidad como ACB. En el caso específico de sacarosa, en la concentración más alta evaluada (0,4 mg/mL) se evidenció aún más la competencia por este nutriente en exceso, ya que en todos los casos (excepto en presencia del aislamiento T21) aumentó el porcentaje de germinación de *F. oxysporum* (Figura 4.12 y 4.13) (Figura 4.11).

En presencia de fuentes nitrogenadas, sólo existió competencia en la solución con de NO_3 con el aislamiento T30 (*Trichoderma harzianum s.l*) (Fig. 8). Por otra parte, en presencia de amonio, *Fusarium* fue capaz de asimilarlo ya que su porcentaje de germinación en comparación con el testigo agua, aumentó casi el doble. No se llegó a demostrar competencia, ya que disminuyó la germinación de los conidios del patógeno en presencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

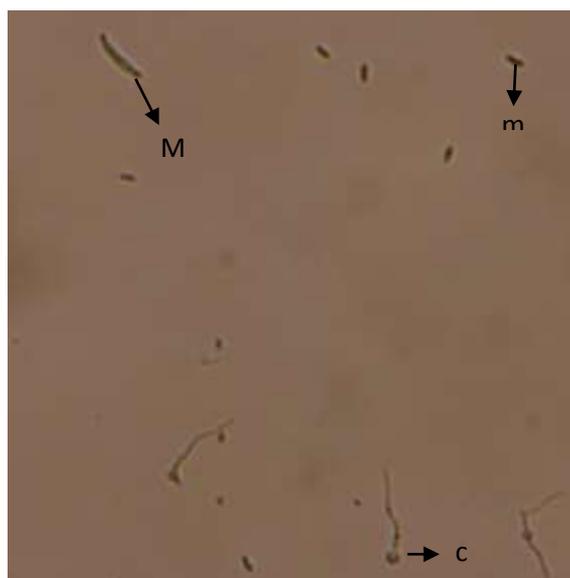


Fig 4.11. Competencia por nutrientes entre *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum* (T21). Detalle de tres clamidosporas de *F. oxysporum* germinadas (c). En la parte superior de la imagen se observan macroconidios (M) y microconidios (m) de esta especie sin germinar.

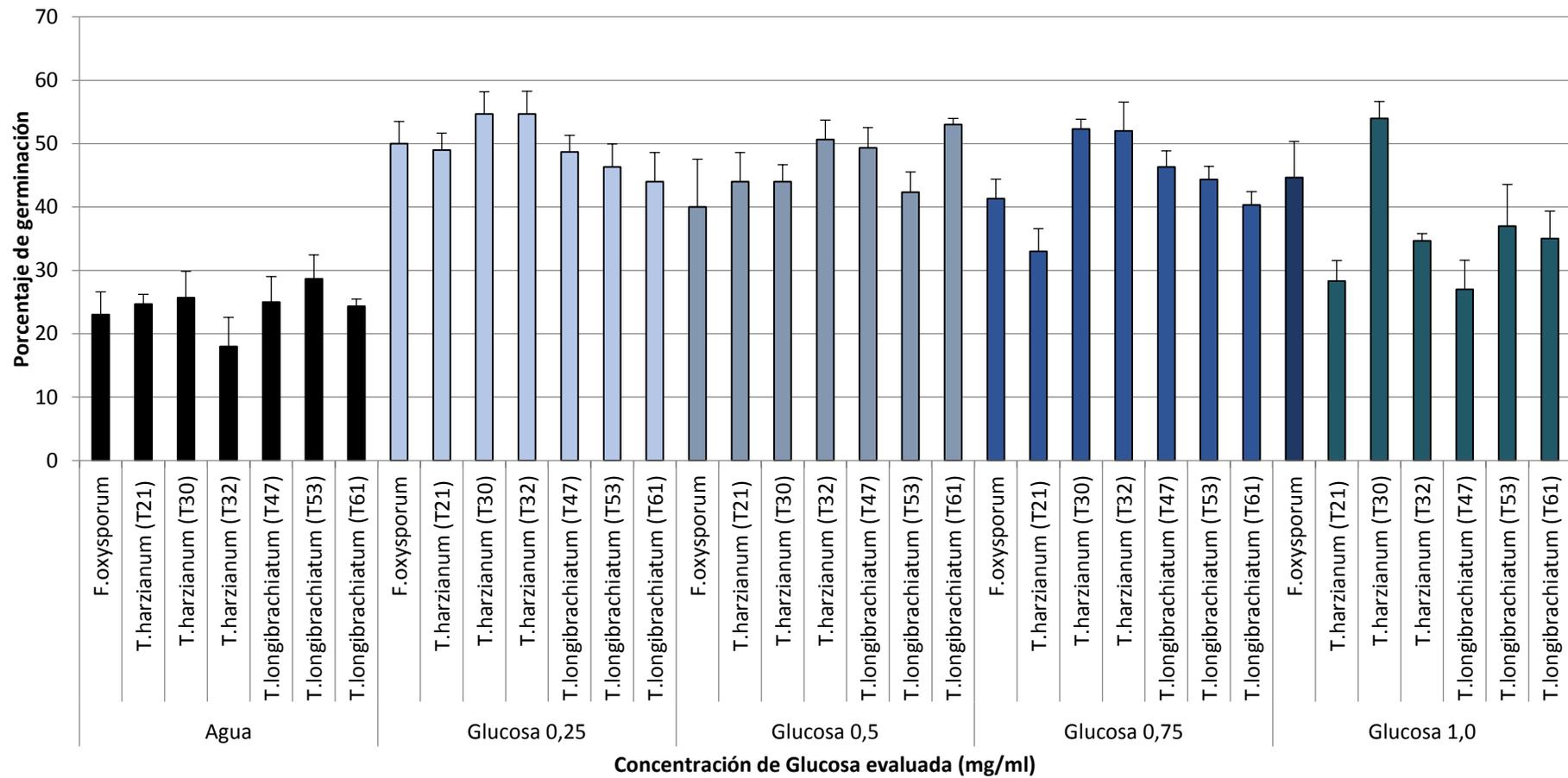


Fig. 4.12. Porcentaje de germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. en presencia de distintas concentraciones de glucosa y aislamientos nativos de *Trichoderma* spp.

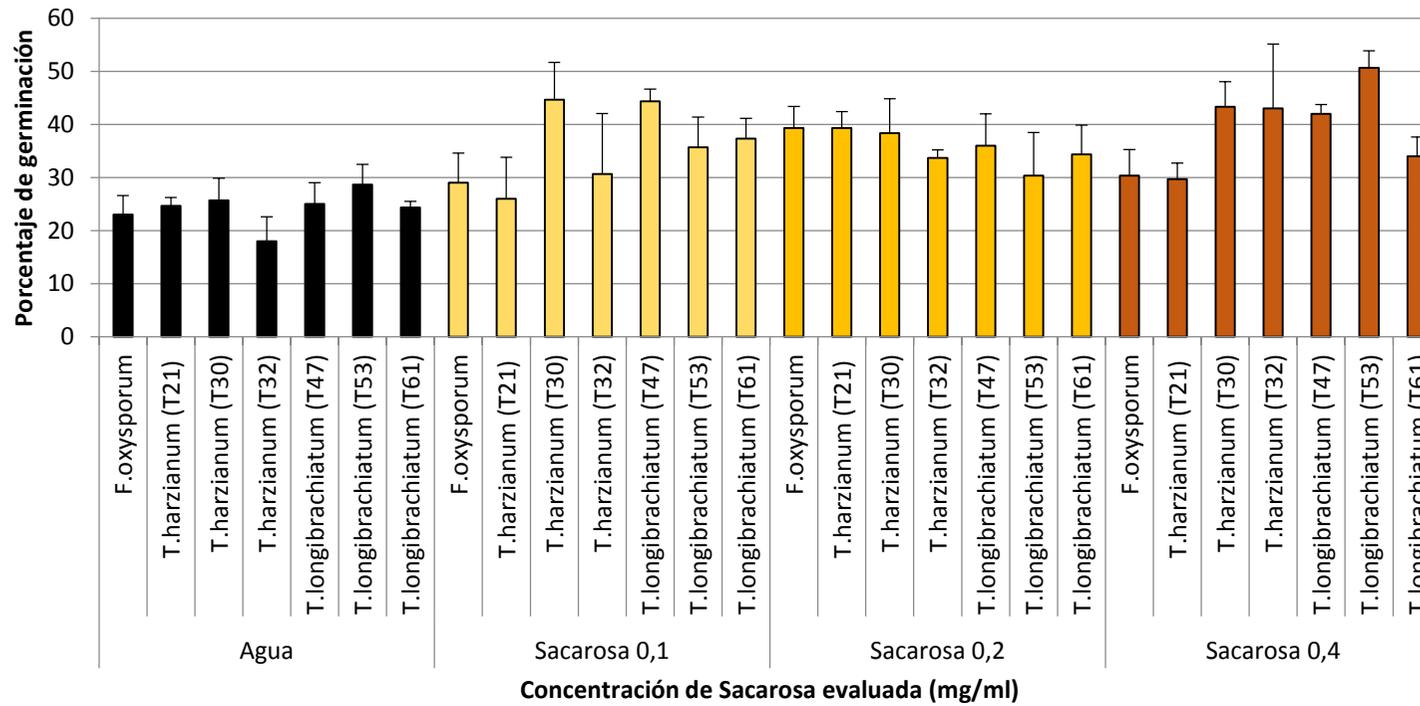


Fig. 4.13. Porcentaje de germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. en presencia de distintos aislamientos nativos de *Trichoderma* spp, a distintas concentraciones de sacarosa.

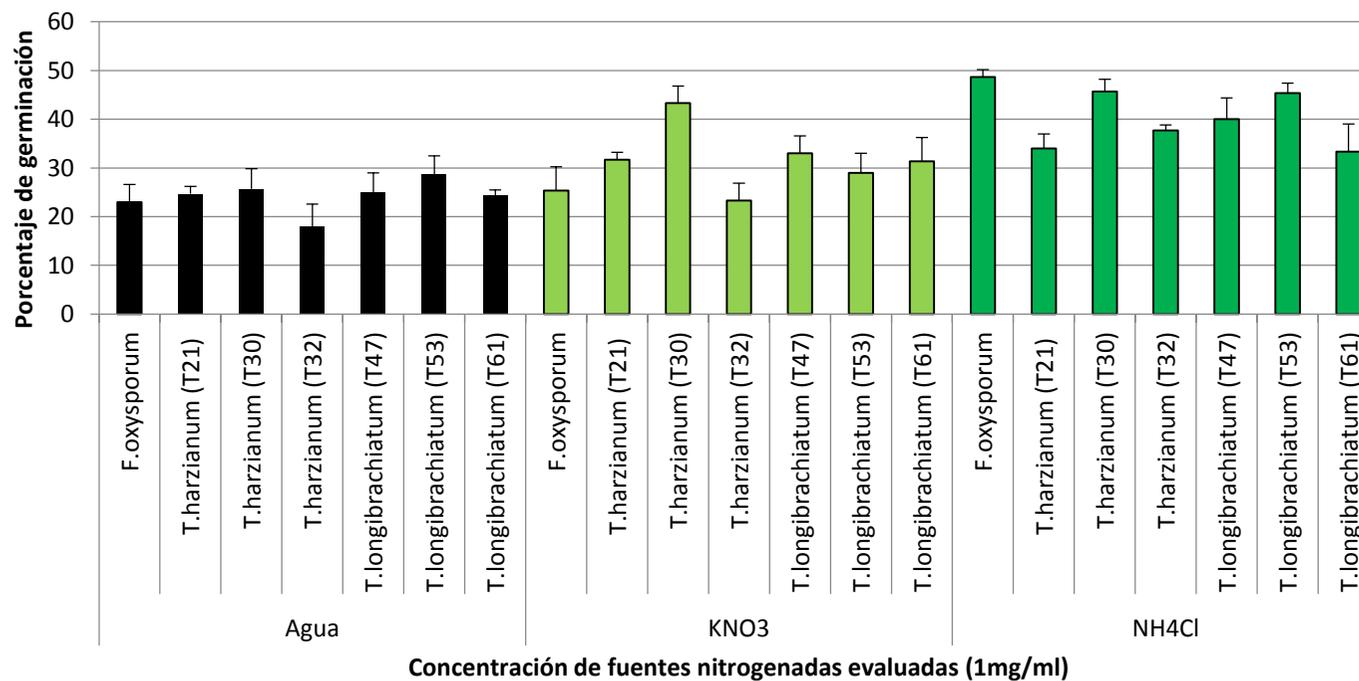


Fig. 4.14. Porcentaje de germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*. en presencia de distintos aislamientos nativos de *Trichoderma* spp, en ADE con dos fuentes nitrogenadas.

3.4. Producción de sustancias extracelulares

Todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados presentaron diferencias significativas respecto al testigo (*Fusarium oxysporum*) en la producción de metabolitos extracelulares-difusibles en agar, que inhibieron el crecimiento del patógeno. Se diferenció estadísticamente el aislamiento *T.harzianum* (T21) llegando a obtener un 56% de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*. Además se observó un marcado halo de inhibición en el aislamiento *T. longibrachiatum* (T53), aunque sólo alcanzó un 17% de inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum* (Tabla 4.3).

Al utilizar el filtrado obtenido del cultivo de cada antagonista y evaluar el efecto sobre el porcentaje de inhibición de la germinación de los macroconidios y clamidosporas del patógeno, se encontró que todos los aislamientos inhibieron en mayor o menor medida la germinación de los mismos. Los aislamientos T47 y T53 se diferenciaron estadísticamente del testigo con valores superiores al 68% de inhibición (Figura 4.15).

Tabla 4.4. Evaluación de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* spp

Aislamiento	Inhibición del Crecimiento (%)	Inhibición de la Germinación (%)
Testigo	0a	0a
<i>T. harzianum</i> (T21)	56 d	19,6 a
<i>T. harzianum</i> (T30)	39 cd	23 a
<i>T. harzianum</i> (T32)	17 ab	60,6 c
<i>T. longibrachiatum</i> (T47)	43,2 cd	68,6 d
<i>T. longibrachiatum</i> (T53)	28,3 c	72,6 d
<i>T. longibrachiatum</i> (T61)	44,6 cd	36 b

Inhibición del crecimiento= (diámetro mayor-diámetro menor/diámetro mayor)*100. Inhibición de la germinación= promedio de tres conteos de 100 conidios cada uno. Letras iguales no presentan diferencias significativas entre sí, dentro de una misma columna según Fisher $\alpha=0,05$



Fig 4.15. Detalle de un macroconidio (Ma) de *Fusarium oxysporum* sin germinar (Izquierda) y de uno germinado (derecha). Tg: Tubo germinativo.

DISCUSIÓN

En esta tesis aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. correspondientes a *T. harzianum* s.l., *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. gamsii* y *T. atroviride* se caracterizaron por la capacidad de biocontrol de *F. oxysporum* f.sp *cepae*, en comparación con aislamientos comerciales: TC2 y TC3. Del total de aislamientos nativos, se destacaron 6, los cuales presentaron un mejor comportamiento antagónico en los ensayos *in vitro* frente al patógeno, y se seleccionaron para los ensayos *in vivo* y estudiar sus posibles mecanismos de acción.

Fusarium es un hongo que puede penetrar la raíz de una plántula recién emergida ya que acompaña a la semilla y germina con ella ó, penetra y afecta desde el disco basal (Valdez, Com. pers). La aplicación de los aislamientos (6) de *Trichoderma* se estudió para impedir la infección de los plantines en los momentos de la siembra y el trasplante de cebolla. De acuerdo a lo que plantean Ezziyyani *et al.*, (2004) cuando el agente biocontrolador se aplica como recubrimiento en las semillas, si la cepa utilizada tiene capacidad como colonizadora, se logra una protección desde el inicio de la germinación. En esta tesis, se evidenció que el aislamiento nativo T21 (*T. harzianum* s.l.), logró obtener un control de *F. oxysporum* cuando se lo utilizó como tratamiento preventivo en la germinación de la semilla, dado que logró obtener más de un 80% de germinación de plántulas y más del 14% de las mismas evidenció un recubrimiento de la raíz por parte del antagonista.

Dobry & Chalutz (1994) mencionan que la competencia se podría entender como la demanda simultánea de los recursos por dos o más poblaciones microbianas en un determinado microambiente. Por lo tanto, para que un antagonista sea efectivo competidor debe reunir las siguientes características: ser capaz de adaptarse mejor que el patógeno al ambiente en donde se dará la competencia, lograr una rápida colonización del sitio de acción, y poseer una alta capacidad de utilizar nutrientes a bajas concentraciones. Se debe tener en cuenta que para que un antagonista sea efectivo competidor el número de células del mismo debe alcanzar un nivel crítico activo antes de la entrada del patógeno. Queda claramente establecido el carácter preventivo y no curativo de este tipo de control. Las cepas de las diferentes especies de este género, han demostrado habilidad para colonizar efectivamente la rizosfera, rizoplano y en algunos casos llegar al interior de las raíces de las plantas, logrando así un efectivo control de patógenos radiculares (Avila Miranda *et al.*, 2006).

La respuesta obtenida de la aplicación de los aislamientos de *Trichoderma* al momento del trasplante, coincide con lo reportado por Cervantes Díaz *et al* (s/a), de que al evaluar la interacción *Fusarium-Trichoderma* el porcentaje de infección disminuye del 30 al 15% en presencia del antagonista. Además, el aislamiento nativo de *T. harzianum* s.l. (T21), que se

destaca en el momento de germinación presentó una muy buena respuesta al momento del trasplante, ya que con la aplicación del mismo en presencia del patógeno, se obtuvo un aumento de más del 40% de peso fresco, en comparación con el testigo. Martínez-Álvarez *et al.*, (2012) y Quiroga- Rojas *et al.*, (2012), concluyen que los aislamientos de *Trichoderma* no logran proteger totalmente a las plántulas, pero disminuyen notablemente la incidencia de la enfermedad al aplicarlas al mismo tiempo que el patógeno; efecto que no ocurre al aplicarse después, con lo cual se evidencia que *Trichoderma* tiene mayor capacidad para colonizar la raíz de la planta.

Respecto a la competencia por nutrientes, el perfil de los aislamientos evaluados coincide con lo reportado por Vero (2009), que observa un aumento de la competencia a medida que la concentración de hierro también se hace mayor. Pero, en concentraciones muy altas (500mM), claramente se evidencia una disminución en el crecimiento de los mismos, lo cual coincide con Lockwood (1977), que ha reportado que a altas concentraciones de hierro se inhibe el crecimiento de hongos dado que el hierro posee un efecto fungistático aún en suelos esterilizados.

La competencia del agente antagónico con el patógeno por un nutriente específico, se evidencia por la reducción de la capacidad de biocontrol del antagonista en presencia de dicho compuesto (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008). En la evaluación de competencia por sustancias carbonadas y nitrógenadas, se observa una similitud a lo informado por Benitez *et al* (2004), que asegura que *T. harzianum* controla a *Fusarium oxysporum* compitiendo tanto por la colonización de la rizosfera, como por nutrientes, existiendo un biocontrol cada vez más eficaz a medida que disminuye la concentración de nutrientes.

El aislamiento T21 (*T. harzianum*) produjo un 56% de inhibición del crecimiento del patógeno en el ensayo de metabolitos difusibles en agar. Estos resultados coinciden con lo reportado por Küçük & Kivanç (2003) quien asegura una inhibición de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia rolfsii* del 100% con un aislamiento nativo de *Trichoderma harzianum*. Y, por otra parte, Bokhari y Perveen (2012), encontraron que *T. harzianum* fue capaz de inhibir a *F. solani* por filtrados de cultivos en un 21,3%. Mientras que T47 y T53 (*T. longibrachiatum*) lograron más del 68% en la inhibición de la germinación de conidios del patógeno por producción de metabolitos secundarios.

CONCLUSIONES

Los aislamientos preseleccionados por su mejor capacidad antagónica *in vitro*, fueron evaluados en ensayos en maceta, en los cuales, se observa que poseen capacidades claras en el control de la enfermedad, pero los valores de disminución de la misma no llegan a ser muy altos. Lo cual demuestra que no necesariamente los microorganismos evaluados *in vitro* poseen el mismo comportamiento al pasar a una evaluación in situ o a escala de invernadero.

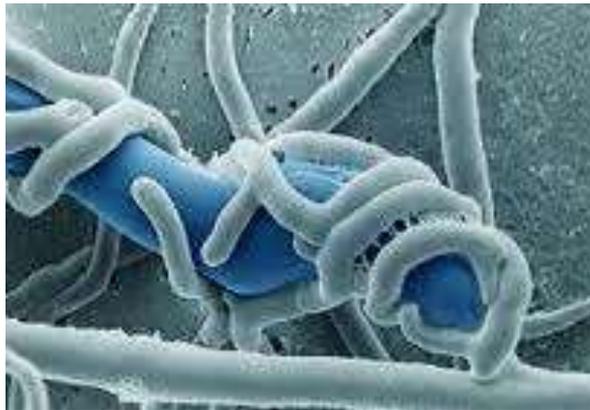
Se obtuvieron aislamientos nativos con mejor comportamiento antagónico para controlar la enfermedad que los aislamientos comerciales. En el caso de la evaluación en la germinación de la semilla y colonización de la raíz, se destaca el aislamiento *Trichoderma harzianum s.l.* (T21), obtenido del rizoplano del cultivo de cebollas sanas (asintomáticas). En la evaluación al momento del transplante, el aislamiento *Trichoderma harzianum s.l.* (T30) es el que obtuvo mejores resultados *in vivo*. Con esto se confirma la capacidad que tiene la especie *Trichoderma harzianum s.l.* en el control de patógenos del suelo, incluyendo a *Fusarium oxysporum f.sp. cepae*.

De los mecanismos evaluados, es posible que los aislamientos de *Trichoderma* con mejor capacidad antagónica *in vivo* (T21 y T30), utilicen competencia por nutrientes y espacio. Dado que obtuvieron valores altos en tasa de crecimiento (75 mm en 72 hs), y poseen una evidenciada competencia por nutrientes frente al patógeno. No se demostró capacidad de micoparasitar al patógeno por parte de ningún aislamiento. Sumado a esto, el aislamiento nativo T21 demostró una clara capacidad de producir metabolitos secundarios con capacidad antibiótica frente al patógeno.

Por todo lo expuesto anteriormente, se concluye que los aislamientos nativos de *Trichoderma harzianum s.l.* T21 y T30, tienen capacidad como potenciales biocontroladores de *Fusarium oxysporum f.sp. cepae*. Dado que, tienen capacidad de competir por espacio y nutrientes en condiciones controladas, mientras que en condiciones semicontroladas (bioensayos en macetas) el aislamiento T21 obtuvo valores aceptables en el control de la enfermedad en almácigo y el aislamiento T30 al momento del transplante.

Conclusiones

Finales



En esta tesis se identificaron y caracterizaron 21 aislamientos de *Fusarium* nativos de dos de las principales regiones productoras de cebolla: Alto Valle de Río Negro y Neuquén y Valle Inferior de Río Negro.

Se estableció que *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* es el agente causal de la podredumbre basal de la cebolla.

La estrategia de aislamiento y selección de especies de *Trichoderma* nativas de los sitios de producción de cebolla con antecedentes de la enfermedad, permitió obtener 50 aislamientos de *Trichoderma* correspondientes a 5 especies distintas: *T. harzianum* s.l., *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. atroviride* y *T. gamsii*. De las cuales, *T. harzianum* s.l. fue la más frecuente.

El estudio de la capacidad antagónica de los aislamientos nativos, comparada con aislamientos comerciales se realizó *in vitro* e *in vivo*. De la misma, se destacaron 6 aislamientos identificados como *T. harzianum* s.l. (T21, T30 y T32) y *T. longibrachiatum* (T47, T53 y T61), por obtener valores de inhibición del crecimiento del patógeno *in vitro* entre el 45 y 53%; superar los 60 mm de diámetro de colonia a las 72 hs de crecimiento; no presentar crecimiento a 37°C; y tener sustancias volátiles que inhibieron el crecimiento del patógeno hasta en un 19%.

Entre los principales mecanismos de acción estudiados, se demostró que los aislamientos preseleccionados compiten con el patógeno por nutrientes, principalmente por hierro y fuentes carbonadas (glucosa y sacarosa). Además, son capaces de producir metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento del patógeno (56%) ó la germinación de los conidios del mismo (72%).

En los ensayos *in vivo*, se observó que los aislamientos seleccionados del antagonista tuvieron un comportamiento diferencial respecto al aislamiento de *Fusarium* utilizado. En general, los aislamientos de *Trichoderma* spp. lograron controlar con mayor eficiencia al aislamiento de *F. oxysporum* F10 (LJC 10466) originario de Valle Inferior. Los aislamientos nativos de *Trichoderma* T61 y T21 y comercial TC3 frente a este aislamiento de *Fusarium*, fueron los que tuvieron mejor comportamiento. Con el tratamiento de *T. harzianum* s.l. (T21) frente a *F. oxysporum* F4 (LJC10463) originario del Alto Valle, si bien se obtuvo un bajo porcentaje de germinación de semillas de cebolla, alcanzó el mayor porcentaje de colonización de raíces (28%). Mientras que al momento del transplante, el aislamiento de *T. harzianum* s.l. (T30), obtuvo valores de más del 7% de aumento del largo de raíz y hoja frente al patógeno. Por otra parte, el aislamiento comercial "TC3", logró en este ensayo el mayor valor de peso fresco, llegando a más del 40% en comparación con el testigo enfermo.

Los aislamientos nativos de *T. harzianum* s.l. T21 y T30 se destacan por haber logrado el mayor nivel de disminución de la enfermedad al momento de la germinación de la semilla (T21) y la mejor respuesta frente al patógeno en el transplante de cebolla (T30). Esto se podría relacionar con la capacidad de inhibición de la germinación de conidios de *F. oxysporum* demostrada *in vitro* e indicaría su potencial para usar como biofungicida protector de semilla. Además se demostró que son capaces de producir metabolitos secundarios con capacidad antagónica y de controlar al patógeno aún en bajas concentraciones de nutrientes.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que se debe continuar con más experiencias locales ajustando el momento de aplicación del antagonista y ampliando la estrategia de obtención de aislados nativos con diferente potencial de acción, para su uso en un manejo integrado de la enfermedad “podredumbre basal de la cebolla por *Fusarium*”

En base a los resultados obtenidos en el estudio de metabolitos secundarios producidos por el antagonista, se propone el estudio de la extracción y purificación de los mismos, para un posible uso en el biocontrol de esta enfermedad.

Además se propone continuar con el estudio de una aplicación combinada de los dos aislamientos nativos seleccionados en este estudio frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* en el control de la podredumbre basal en cebolla.

Finalmente, se observó que hay aislamientos nativos con capacidad de promoción del crecimiento de la planta, por lo cual se puede continuar con un estudio más amplio de este mecanismo de acción con técnicas más apropiadas.

ANEXOS

ANEXO I

Medios de cultivo utilizados para evaluar la producción de inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae*.

Cantidades expresadas para la realización de un litro de cada medio.

1-.*Bilay's (modificado por Joffe)*

1g Potasio di hidrógeno fosfato (KH_2PO_4);

1g Nitrato de Potasio (KNO_3);

0,5g Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);

0,5g Cloruro de Potasio (KCl);

0,2g Almidón;

0,2g Glucosa;

0,2g Sacarosa.

2-. *Amstrong*

20g Sacarosa o glucosa;

0,4g Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);

1,6g Cloruro de Potasio (KCl);

1,1g Potasio di hidrógeno fosfato (KH_2PO_4);

5,9g Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$);

0,2 ppm Cloruro Férrico (FeCl_3);

0,2ppm Sulfato de Manganeso (MnSO_4);

0,2ppm Sulfato de Zinc (ZnSO_4).

3-. *Park (1961)*

0,7g Glucosa;

0,5g Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);

0,2g Potasio di hidrógeno fosfato (KH_2PO_4);

0,1g Nitrato de Amonio (NH_4NO_3).

4-. *Siban & Chet (1989)*

10g Glucosa;

5g Levadura;

5g Peptona.

ANEXO II

Medio de cultivo Rosa de Bengala de Martin

Dextrosa	10g
Peptona	5g
KHPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
Agar Agar	20g
Agua Destilada	1l
Estreptomicina	5ml/l



Medio de Cultivo SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar)

KHPO ₄	1g
KNO ₃	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
Glucosa	0,2g
Sacarosa	0,2g
Agar-Agar	20g
Agua Destilada	1l

Agar Papa Dextrosa Natural

Papa con piel	250g
Agua Destilada	1l
Azucar	10g
Agar-Agar	20g

Buffer de extracción

Tris-HCl pH 8.0	1M	-conc. final 50mM
EDTA	0.5M	- conc. final 10mM
CINa	5M	- conc. final 100mM
10% SDS		- conc. final 1%

BIBLIOGRAFÍA

- Abawi, G. & Lorbeer, J. 1972. Several aspects of the ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f.sp .*cepae* . Phytopathology 62 : 870-876.
- Acosta, A., Gaviola, J. C. & Galmarini, C. 1993. Manual de producción de semillas hortícolas. Cebolla. Asociación Cooperadora EEA La Consulta. INTA. 83 p.
- Agrios G. 2005. Fitopatología UTHEA Noriega editores. 952 p
- Ahmad, J. S. & Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77: 182-189.
- Alconada, M. & Zembo, J. 2000. Bromuro residual en suelos argiduoales vérticos desinfectados con bromuro de metilo. En: Métodos y Alternativas al uso de bromuro de Metilo, en frutilla, tomate y flores de corte. Seminario de cierre. Gráfica Sur Editora, Buenos Aires, Argentina. p. 81-87.
- Alonso Reyes, R., Barranco Martínez, B., Gracia Rivero, G. & Jiménez Montejó, G. 2002. Actividad *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 66: 45-48.
- Aquino Martínez, J. G., Vázquez García, L. M. & Reyes Reyes, B. G. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Revista Mejicana de Fitopatología. Vol. 26 (2): 127-137.
- Avila Miranda, M. E., Herrera Estrella, A. & Peña Cabrales, J. J. 2006. (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium withe-rot under field conditions. Soil Biology and Biochemistry. Vol. 38 (7): 1823-1830.
- Bailey B. A., & Lumsden R.D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to plant pathogens. Enzymes, biological control and commercial applications. In: Harman G.E., & Kubicek C.P. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2: 185-204.
- Baker, K. F. & Cook R. J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. Freeman. San Francisco. USA 442 pp.
- Barrera V. A. 2012. El género *Hypocrea* (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 241 pp.
- Bayraktar, H. & Sara Dolar, F. 2011. Molecular Identification and Genetic Diversity of *Fusarium* species Associated with Onion Fields in Turkey. Journal of Phytopathology 159:28–34
- Bello, A.; Escuer, M.; Sanz, R; López-Pérez J. A.; Guirao P. 1997. Biofumigación, nematodos y bromuro de metilo en el cultivo de pimiento. En: A. López; J. A. Mora (Eds). Posibilidad de Alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento de invernadero. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua, Murcia, España. p. 67-108.
- Bello, A., Gonzalez, J., Aria, s M. & Rodriguez Kabana, R. 1998. Alternatives to methyl bromide for the southern european countries. Phytoma –España, DG XI EU,CSIC, Valencia, Spain, 404 pp
- Bello, A., López-Pérez, J. A. & Díaz-Viruliche, L. 1999. Biofumigación y solarización cómo alternativas al Bromuro de Metilo. [http www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/intereshtml/biofumigacion/solarizacion.htm] Consulta: Mayo, 2014

- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. & Codon, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7:249-260.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62(5): 924-931.
- Bolivar, J. 1999. Current status of methyl bromide alternatives in Spain. 3rd International Workshop Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries. Creta (Greece) 139-140
- Botta, S. & Valdez, J. G. 2012. Efecto de filtrados obtenidos del hongo *Fusarium proliferatum* sobre la germinación de cebolla [*Allium cepa*]. Acta del Congreso Paulista de Fitopatología. Jaguariúna, SP. BR.
- Bokhari, N. A. & Perveen, K. 2012. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. *African Journal of Microbiology Research* 6(44): 7193-7197
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Surrey. England. 237 pp.
- Bucki, P., Reybet, G., Maero, E. & Azpilicueta, C. 1999. Aptitud de la solarización para incrementar la temperatura del suelo en campo e invernadero en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén: un ejemplo de aplicación agronómica. *Avances en energías renovables y medio ambiente* .Vol.3 (2): 57-60
- Caligiore Gei, P., Valdez, J. G., Piccolo, R. J. & Galmarini C. R. 2014. Influence of *Fusarium* spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion. *Tropical Plant Pathology*, 39 (1):019-027.
- Cebolla, V., Martinez, P., del Busto, A. & Cases, B. 1993. Control de *Fusarium* f.sp. *dianthi* mediante solarización combinada con fumigantes a bajas dosis. *Actas del V Congreso, S.E.C.H. Actas de Horticultura* 9: 552-557
- Cervantes- Díaz, L., Moreno Castro, J. V., Pulido-Herrera, A., Ceceña Durán, C., González Mendoza, D., Grimaldo Juárez, O. & Gutiérrez Estrada, A. S/A. Uso de *Trichoderma* sp. para el biocontrol de la pudrición radicular en cebolla.
- Chambers, S. M. & Scott, E. S. 1995. In vitro antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology* 143: 471-477.
- Chanchaichaovivat, A., Panijpan, B. & Ruenwongsa, P. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biological Control* 47: 207-215
- Chaverri, P. & Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. 119 pp.
- Chet, I. & Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soils naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290.
- Cook, R. J. 1985. Biological control of plant pathogens: theory to application. *Phytopathology*. 75: 25-29.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* 31:53-80.

- Coşkuntuna, A. & Özer, N. 2008. Biological control of onion basal rot disease using *Trichoderma harzianum* and induction of antifungal compounds in onion set following seed treatment. *Crop Protection* 27:330-336.
- Curcio, N. 2007. Cebolla: perfiles productivos [en línea]. Dirección Nacional de Alimentos Sector Hortalizas. Sec. de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Arg [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_38/cadenas/Hortalizas_cebolla.htm] Consulta: mayo 2014
- Danielson, R. M. & Davey, C. B. 1973. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil, Biology and Biochemistry*, 5: 495-504.
- Datnoff, L., Nemeček, S. & Pernezny, K. 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control* 5:427-431.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4): 19-21.
- Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 1: 41-48.
- Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. 1985. *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Ratón, FL. 261 pp.
- Dobry, S. & Chalutz, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. Cap 6. *Biological control of postharvest diseases*. 63-76. Editado por Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E. CRC Press, Boca Ratón.
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komoń-Zelazowski, M., Mulaw, T. B. & Bissett, J. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *Evolutionary Biology*, 10:94
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. & Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology*, 9: 749-759
- Du Toit, L. J. & Inglis, D. A. 2008. *Fusarium proliferatum* Pathogenic on Onion Bulbs in Washington. *Plant Disease*. Volume 87, (6): 750 - 751
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792-1797
- Elad, Y., Boyle, P. & Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*- Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73: 85-88.
- Evans, H. C., Holmes, K. A. & Thomas, S. E. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress* 2: 149–160.
- Ezziyani, M., Pérez Sanchez, C., Requena, M., Ahmed, S. & Candela, M. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*C. annuum*) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Annual Biology* 26:61-68.
- Fernández Barbosa, R. & Suárez Meza, C. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Sch. f.sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var.

Flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía - Medellín, 62 (1): 4743-4748.

FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 2009. Frac Code List: fungicides sorted by mode of action (including Frac Code numbering) www.scribd.com/doc/13649437/Frac-Code-List-2009-Web-MoAction-fungicidas. Consulta: septiembre 2014

FunBaPa. 2014. Programa de certificación de cebolla en origen. <http://www.funbapa.org.ar/cebolla/cebolla-noticias.html> consulta: junio de 2014.

Galmarini, C. R. 1997. Producción y mercado de la cebolla Argentina. En: Manual del cultivo de la cebolla. INTA Centro Regional Cuyo, Argentina. p. 6-14.

Gatica, M. & Oriolani, E. 1997. Enfermedades de la cebolla. En: Manual del cultivo de la cebolla. INTA Centro Regional Cuyo, Argentina. p. 76-80.

Ghanbarzadeh, B., Mohammadi Goltapeh, E. & Safaie N. 2014. Identification of *Fusarium* species causing basal rot of onion in East Azarbaijan province, Iran and evaluation of their virulence on onion bulbs and seedlings. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47 (9): 1050-1062.

Ghisalberti, E. L. & Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology & Biochemistry 23 (11): 1011-1020.

Giuffre, L., Alconada, M., Wisner, V., Mitidieri, M. & Sangiacomo, M. 2000. Alternativas al uso de Bromuro de metilo: Alternativas químicas. En: Seminario de cierre de Alternativas al uso de Bromuro de metilo, Buenos Aires, Argentina. p. 68.

González, H., Zaccari, F., Suárez, C., Giménez, G. & Vilaró, F. 2000. Estudio comparativo del comportamiento agronómico y conservación de nueve cultivares de cebolla (*Allium cepa*, L.) de día intermedio. Horticultura Argentina Vol 19. Nº 46: 105.

González Rodríguez, M. Castellanos-González, L. Ramos-Fernández, M. & Pérez-González, G. 2005. Efectividad de *Trichoderma* para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en frijol. Fitosanidad 9(1):37-41.

Gordon, T. & Martyn, R. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Review of Phytopathology. 35: 111-128.

Granados, M. M. & Wang, A. 2008. Efecto de biocontroladores aislados en fincas productoras de Cebolla sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*). Agronomía Costarricense 32(1): 9-17

Gray, L. E. 1996. Severity of foliar symptoms and root and crown rot of soybean inoculated with various isolates and inoculum rates of *Fusarium solani*. Plant Disease 80: 1197- 1199.

Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F. & Jakobsen, I. I. 1999. Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. Applied and Environmental Microbiology 65: 1428-1434

Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M., Mateos, P., Bridge, P., Monte, E. & García, A. 1998. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soil borne fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology 63:8.

Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millan, E., Ávila-Quezada, G., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. & Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de

- Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. Su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:87-96.
- Hansen, H. N. & Smith, R. 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 22: 699-706.
- Harman, G. E. 1992. The development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. *Journal of Plant Nutrition*. 15: 835-843.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* Vol. 84 (4): 377-393.
- Harman, G. E. 2001. *Trichoderma* spp including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and others spp. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>. Consulta: Julio 2014
- Harman, G. E., Howell, R. C., Viterbo, A., Chet, I & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*: Vol 2. 43-56
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190-194.
- Howell C. R., & Stipanovic, R. D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 29:321-324
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87 (1): 4-10
- Husson, F., Josse, J., Le, S. & Mazet J. 2015. FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining. R package version 1.31.3. <http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>
- Iriarte, L. E. 2010. Biofumigación con *Brassica oleracea* para disminuir el daño de *Fusarium oxysporum* en almácigos de cebolla. Tesis para optar por el título de Mg Sc en Horticultura. UNCu. 74 p.
- Khang, V. T., Thi My Anh, N., Minh Tu, P. & Thi Hong Tham T. 2013. Isolation and selection of *Trichoderma* spp. exhibiting high antifungal activities against major pathogens in Mekong Delta. *Omonrice* 19: 159-171.
- Khier, M., Delhey, R., Frayssinet, S., Anderson, F. & Azpilicueta, A. 1996. Enfermedades de cebolla en el Valle Bonaerense del Río Colorado, Argentina. *Horticultura Argentina*. 15:33-38
- Khier, M. & Delhey, R. 2007. Estrategias para el manejo de enfermedades de cebolla en el sur argentino. *Agro UNS*, IV (7): 5-10
- Kindermann, J., El-Ayouti Y., Samuels, G.J. & Kubicek, C.P.. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA clade. *Fungal Genetics and Biology*. 24: 298–309
- Kredics, L., Antal, Z., Doczi, I., Manczinger, L., Kevei, F., & Nagy, E. 2003. Clinical importance of the genus *Trichoderma*—a review. *Acta Microbiologica de Immunología Hungarica* 50:105-117.
- Kubicek, C. P. & Harman, G. E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. 293 pp. 1ª Ed.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Borner, T. & Gueho, E. 1999. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Medical Mycology* 37: 25–33.

- Küçük, Ç. & Kivanç, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. from Turkey soil and determination of their antifungal features. *Turkish Journal of Biology* 24: 1–7.
- Lacy, M. & Roberts, D. 1982. Yields of onion cultivars in Midwestern organic soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Pyrenochaeta terrestris*. *Plant Disease*. 66:1003–1006.
- Lanati, S. J. 1997. Plagas. En: Manual del cultivo de la cebolla. INTA Centro Regional Cuyo, Argentina. p. 83-92.
- Leslie, J. & Summerell, B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. 1ª Ed Blackwell Publishing. 388 p.
- Lifshitz, R., Windham, M. T. & Baker, R. 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 720-725.
- Lillbro, M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain – a comparison of mode of action of several yeast species. Master Thesis for the Agriculture Programme, Animal Science, Department of Microbiology. 21pp.
- Lockwood, J. L. 1977. Fungistasis in soils. *Biological Reviews*, 52 (1): 1-43.
- Lumsden, R. & Locke, J. 1989. Biological control of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* damping-off with *Gliocladium virens* in soil less mix. *Phytopathology* 70,301–366.
- Martínez-Álvarez, P., Alves-Santos, F. M., & Diez, J. J. 2012. In vitro and in vivo interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fenn*, 46, 303-316.
- Martínez de la Parte, E. 2010. Caracterización de poblaciones de *Fusarium oxysporum* mediante marcadores moleculares. Curso: diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o mal de panamá. 180 pp.
- Martinez, G., Albarracin, N., Arcia, A., Subero, L. & Albarracin, M. 1995. Pudrición basal del ajo causado por *Fusarium oxysporum*. *Agronomía tropical*. 46 (3): 265-273
- McLeod, A., Labuschagne, N. & Kotzé, J.M. 1995. Evaluation of *Trichoderma* for biological control of avocado root rot in bark medium artificially infested with *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*. 18:32-37
- Mondino, P. & Vero, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Facultad de Agronomía. Universidad de la república. Unidad de Educación Permanente. 1ª Ed. 160 pp.
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4: 1-4.
- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S. & Dietz, S. 2010. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 12: 292–301.
- Nelson, E. B., Kuter, G.A. & Hoitink, H. A. 1983. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73:1457-1462.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Cook, R.J. 1981. *Fusarium* diseases, biology and taxonomy. The Pennsylvania State University Press. USA. 459 pp.
- Nemec, S., Datnoff, L. E. & Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection* 15: 735–742

- Ozbay, N. & Newman, S. E. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp with emphasis on *T. harzianum*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 7 (4): 478-484.
- Pankhurst, C. 2005. Biocontrol of soil-borne plant diseases. Land and Water, Townsville, QLD, Australia JM Lynch, University of Surrey, Guildford, UK_ ElsevierLtd.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54
- Pellejero, G., Pozzo Ardizzi, C., Ashkar, G. & Lui, P. 2004. Efecto de dos modalidades de acondicionamiento de cebollas conservadas en el campo sobre el desarrollo de *Aspergillus niger* en postcosecha. Revista Pilken. Sección Agronomía. Universidad Nacional del Comahue. Año VI. (6) p. 7
- Perez Vicente, L. 2010. Identificación y taxonomía de *Fusarium*: conceptos morfológicos, biológicos y genéticos. Curso: diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o mal de panamá. 180 pp.
- Poggi, M. T. 2011. Informe Estadístico de Exportaciones Argentinas: Frutas y Hortalizas. Disponible en: <http://www.exportar.org.ar/download.php?st=pub&fid=337534fe84540d9fb95f4ea619c19574.pdf&mn=39final.pdf>. Fecha de consulta: Octubre, 2014
- Puerta Bula C. J. & Ureña Pinzón C. P. 2005. Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. 104 pp.
- Quiroga-Rojas, L. F., Ruiz-Quiñones, N., Muñoz-Motta, G., & Denis Lozano-Tovar, M. 2012. Microorganismos rizoféricos, potenciales antagonistas de *Fusarium* sp. causante de la pudrición radicular de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims). Acta Agronómica. 61 (3): 265-272.
- Reybet, G., Suárez, A., Starik, C., Stickar, W. & Escande A. 2002. Efecto de la solarización sobre la producción de plantines de cebolla (*Allium cepa*). XXV Congreso Argentino de Horticultura. Encuentro Virtual de las Ciencias Hortícolas. [<http://www.asaho.com.ar/cahorticultura/intran/hortirama.htm>]. Fecha de consulta: Junio, 2014.
- Riddell, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycologia, 265-270.
- Ridgway, R. 1912. Color standars and color nomenclature. Washington, DC. 43p
- Rodríguez Molina, M. 2001. Caracterización de las poblaciones de *Fusarium Link* de suelos de dehesas de Badajoz. Boletín de sanidad vegetal. Plagas. 27:433-437.
- Roiger, D. J. & Jeffers, S. N. 1991. Evaluation of *Trichoderma* spp. For biological control of Phytophthora Crown and root rot of apple seedlings. Phytopathology 81: 910-917.
- Rose, S. & Parquer, M. 2003. Efficacy of biological and chemical treatments for control of Fusarium root and stem to greenhouse cucumber. Plant Disease. 87: 462-470.
- Salvalaggio, A. E. & Ridao, A. C. 2013. First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Rot on Garlic and Onion in Argentina. Plant Disease 97 (4): 556.2
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research. 100 (8): 923-935.

- Samuels, G.J. 2004. *Trichoderma* a guide to identification and biology. United States. Department of Agriculture-Agricultural Research Service. Systematic Bitany and Mycology Laboratory. 40 p
- Samuels, G.J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96(2): 195-206.
- Samuels, G. J. & Ismaiel, A. 2009. *Trichoderma evansii* and *T.lieckfeldtia*: two new *T.hamatum*-like species. *Mycologia* 101:142–156
- Samuels, G. J., Rossman, A., Chaverri, P., Overton, B. & Poldmaa, K. 2006. Hypocreales of Southeastern United States: An identification guide. *CBs Biodiversity Ser*, 4: 1-145.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., de Souza, J. & Chaverri, P. 2011. *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. *Mycological Progress*. 11 (1): 215-254.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek C. P. & Jaklitsch, W. M. 2012. The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity* 55: 77-108.
- Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved September 2, 2014, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm. Fecha de consulta: Agosto, 2014
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. 2000. Introduction to food and airborne fungi. 6th ed. 383 pp.
- Santillan, Salas C. F., Joshi, A. Y., Dhiman, N., Banerjee, R., Huskins, W.C., Wengenack, N. L. & Henry, N. K. 2011. Fatal post-operative *Trichoderma longibrachiatum* mediastinitis and peritonitis in a paediatric patient with complex congenital cardiac disease on peritoneal dialysis. *Journal of Medical Microbiology*. 60: 1869–1871
- Saxena, A. & Cramer, C.S. 2009. Screening of onion seedlings for resistance against new mexico isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*. *Journal of Plant Pathology*.91 (1): 199-202.
- Scher, F. M., J. S. Ziegler, & J. W. Kloepper. 1984. A method for assessing the root colonization capacity of bacteria on maize. *Canadian Journal of Microbiology*. 30: 151_157
- SENASA. 2006. Resolución N° 77/2006. [en línea]. Buenos Aires, Argentina. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1036&io=2772>. Fecha de consulta: Diciembre, 2014.
- SENASA. 2014. Resolución N° 803/2005. [en línea]. Buenos Aires, Argentina. <http://www.senasa.gov.ar/oldeweb/marcolegal>. Fecha de consulta: Septiembre, 2014.
- Sharma, K., Mishra, A. K. & Mishra, R. S. 2009. Morphological characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. *Journal of Phytopathology* 157: 51-56.
- Singh, K., Frisvad, J. C., Thrane, U., & Mathur, S. B. 1991. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria* and *Penicillia* and their mycotoxins., Danish- Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Denmark.
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. SINAVIMO. 2014. [en línea]. <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/cebolla>. Fecha de consulta: Agosto, 2014.
- Sivan, A., Elad, Y. & Chet, I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 74: 498-501.

- Sivan, A. & Chet, I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79, 198–203.
- Smith, V., Wilcox, W. & Harman, G. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- Smith, I., Dunez J., Lelliott, R., Phillips, D. & Archer, S. 1992. Manual de las enfermedades de las plantas. Ediciones Mundi Prensa 671pp.
- Snyder, W. & Hans, H. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. Vol 27 (2):64-67
- Srivastava, R. K., Singh, R. K. & Prasad, R. D. 2011. Relative antagonistic effect of different isolates of *Trichoderma viride* and *T. harzianum* against *Phytophthora capsici* – a bell pepper pathogen. *Journal of Biological Control*, 25 (3): 239-241.
- Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A. & Moretti A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*. 118 (2): 165-172.
- StatSoft, Incorporated (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Tamura. K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Taylor, A., V. Vagany, D.J. Barbara, B. Thomas, D.A.C Pink, J.E. Jones & J.P. Clarkson. 2013. Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathology* 62: 103-111.
- Tello, J. 1999. Búsqueda de alternativas al Bromuro de metilo, Guatemala .C.A. ICTA UNIDO – CONYICIT-IPM-CRSP-CONAMA. Programa ONUDI.Internacional Workshop
- Thomas, W. 1996. Methil bromide Effective pest management tool and environmental threat. Supplement to *Journal of Nematology*. 28: (4 S) 586-589.
- Valdez, J., Makuch, M. & Marini, G. 2004. Patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* spp en plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Horticultura Argentina* 23:90.
- Valdez, J. & Marini, G. 2005. Prueba de cultivares argentinos de cebolla por su tolerancia a pudrición basal. Resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. A.A.F., Villa Carlos Paz, Córdoba. P 470.
- Valdez, J. G., Caligiore Gei, P. & Thrane, U. 2011. Identification and pathogenecity of Argentinean seed-borne *Fusarium* isolates of onion seeds. 2º Congreso Argentino de Fitopatología. P 234.
- Valdez, J. G. 2013. Producción y calidad de semillas hortícolas en San Juan y Mendoza. Organización de Productores y Enfermedades emergentes. Primer simposio de calidad de semillas. 52 pp.
- Vargas Gil, S., Pastor, S. & March, G. J. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research* 164 (2): 196-205.

- Vargas, W. A., Mandawe, J. C. & Kenerley, C. M. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology*. 151: 792–808.
- Vinalea, F., Sivasithamparamb, K., Ghisalbertic, E. L., Marraa, R., Wooo, S. L. & Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 40: 1-10.
- Vero, S., Garmendia, G., González, M. B., Garata, M. F. & Wisniewski, M. 2009. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Science and Technology* 1-17.
- Wanjiru, W. M., Zhensheng, K. & Buchenauer, H. 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology*, 108 (8): 803-810.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. 2009. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench *Bioinformatics* doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
- Wilson, C. & Wisniewski, M. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27:425-441.
- Wickham, H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer New York, 2009.
- Withe, T. J., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications*, edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. & Withe, T. J. San Diego, CA, USA: Academic Press
- Zaccari, F. 2007. Conservación de cebollas para guarda (*Allium cepa*, L.). *Curso de Horticultura*. 5pp. [en línea]. http://www.fagro.edu.uy/~horticultura/CURSO%20HORTICULTURA/CEBOLLA_AJO/Material%20Apoyo%20Resumen%20conservacion%20de%20cebollas.pdf
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7:203–214.