



Evaluación de técnicas de infección en plántulas de *Allium cepa* L.
(Blanca barletta) por *Fusarium oxysporum* y de la interacción *in vitro* entre *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBT. Brenda Jennifer González Cruz

Director: Dra. Susana Valencia Díaz.

Co-Director: Dr. Pedro Mendoza de Gives

CUERNAVACA, MORELOS NOVIEMBRE DE 2018.

Agradecimientos

A la **Dra. Susana Valencia** quien dirigió este trabajo, agradezco su apoyo hasta el final, la confianza brindada y por estar al pendiente de este trabajo todo el tiempo, lo logramos a pesar de las dificultades. Gracias también al **Dr. Alejandro** por su apoyo y asesoría en materia estadística.

Al **Dr. Pedro Mendoza** por aportar la idea principal, por la confianza y brindarme herramientas para desarrollar este proyecto.

A mis sinodales **Dr. Sergio Rojas**, quien siempre estuvo dispuesto a aportar herramientas para facilitar el trabajo experimental, por sus consejos y compartir experiencia.

Dr. Víctor Hernández, quien me aconsejaba y compartía conocimiento estadístico.

A la **Maestra Laura Lina**, por su detallada revisión de mi documento, me ayudó a mejorar cada vez más.

Dra. Maru y Gabriel, por su paciencia y constancia al realizar mi ensayo molecular.

A mi familia, en especial a mis padres por la tolerancia en situaciones de estrés sé que siempre estarán cuando los necesite, muchas gracias por los grandes esfuerzos que hacen por mí.

A mi mejor amiga **Stefan** por siempre apoyarme sin condiciones, estar ahí, ante todo, de convencerme de celebrar el paso que doy, amigos que se convierten en familia.

Agradezco a **CONACYT** por la beca otorgada (607101) para la realización del proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE CUADROS.....	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES.....	11
Producción nacional y estatal de cebolla	11
Enfermedades comunes de la cebolla	11
Características de <i>Fusarium</i> y especies relacionadas a pudriciones radicales en cebolla	12
Medidas de manejo de las fungosis	13
Control químico	13
Control biológico.....	14
Fitoquímicos	14
Hongos.....	15
Mecanismos antagónicos.....	17
Competencia por nutrientes y espacio	17
Antibiosis.....	17
Micoparasitismo.....	18
Relación planta parásito antagonista.....	19
Técnicas de infección.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
Localización	26
ETAPA 1. Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de <i>C. rosea</i> y <i>T. harzianum</i> en contra <i>F. oxysporum</i>	27
Aislamiento de <i>Fusarium</i>	27
Reactivación de <i>T. harzianum</i> y <i>C. rosea</i>	30
Cultivos por dilución.....	30
Caracterización morfológica.....	31
Evaluación de velocidad de crecimiento	32

Confrontaciones	32
ETAPA 2. Evaluación <i>in vitro</i> de técnicas de infección sobre plántulas de cebolla	33
Cuantificación de esporas para inoculación en semilleros	35
RESULTADOS	38
ETAPA 1.....	38
Caracterización molecular	38
Caracterización morfológica de las cepas de hongos	38
Velocidad de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>C. rosea</i>	42
Crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i> en confrontación con <i>C. rosea</i> y <i>T. harzianum</i>	43
Crecimiento radial de <i>C. rosea</i> en confrontación con <i>F. oxysporum</i> y <i>T. harzianum</i>	47
Crecimiento radial de <i>T. harzianum</i> en confrontación con <i>F. oxysporum</i> y <i>C. rosea</i>	49
ETAPA 2.....	52
Técnicas de inoculación.....	52
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIÓN	59
PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS.....	72
ANEXO 1. Purificación de ADN.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía de <i>Trichoderma</i>	16
Figura 2. Parasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. en <i>Phytium capsici</i>	19
Figura 3. Diagrama de flujo mostrando los eventos correspondientes a la metodología de ambas etapas.....	26
Figura 4. Proceo de aislamiento de <i>Fusarium</i> a partir de cebollas infectadas.....	27
Figura 5. Proceso de extracción de ADN a partir de micelio.....	29
Figura 6. Protocolo para realizar cultivos monospóricos.....	31
Figura 7. Desinfección de semillas de cebolla con hipoclorito de sodio.....	34
Figura 8. Esquema de campos de conteo de cámara de Neubauer.....	35
Figura 9. Secuencia obtenida a partir del producto de PCR de la cepa de <i>Fusarium</i>	38
Figura 10. Descripción de características macro y microscópicas.....	41
Figura 11. Velocidad de crecimiento de A) <i>C. rosea</i> ; B) <i>F. oxysporum</i> ; C) <i>T. harzianum</i>	42
Figura 12. Confrontación de <i>F. oxysporum</i> contra <i>C. rosea</i> , crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.....	43
Figura 13. Crecimiento promedio (cm) durante distintos momentos.....	44
Figura 14. Confrontación de <i>F. oxysporum</i> contra <i>T. harzianum</i> , crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.....	44
Figura 15. Aspecto de cofrontaciones en caja Petri.....	46
Figura 16. Confrontación de <i>C. rosea</i> contra <i>F. oxysporum</i> , crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.....	47
Figura 17. Crecimiento promedio (cm) durante distintos momentos.....	48
Figura 18. Confrontación de <i>C. rosea</i> contra <i>T. harzianum</i> , crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.....	48
Figura 19. Confrontación de <i>T. harzianum</i> contra <i>F. oxysporum</i> , crecimiento promedio (cm) durante 15 días de interacción.....	49
Figura 20. Confrontación de <i>C. rosea</i> contra <i>T. harzianum</i> , crecimiento promedio (cm) durante 15 días de interacción.....	50
Figura 21. Confrontación de <i>C. rosea</i> y <i>F. oxysporum</i> contra <i>T. harzianum</i> , crecimiento promedio (cm) durante 15 días de interacción.....	50
Figura 22. Crecimiento promedio (cm) durante distintos momentos.....	51
Figura 23. Crecimiento máximo de plántulas en cada tratamiento en distintos momentos, así como respectivos controles.....	52

Figura 24. Proporción acumulada de plántulas emergidas en todos los tratamientos, así como respectivos controles.	53
Figura 25. Aspecto de plántulas en tratamiento 1.	54
Figura 26. Aspecto de plántulas en tratamiento control 1.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Evaluación de técnicas de inoculación en distintas plantas y porcentaje de infección.....	22
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar secuencias promotoras.....	28
Cuadro 3. Confrontaciones duales. Diseño experimental.....	32
Cuadro 4. Formas y momento de la infección, antes y después de la siembra de <i>F. oxysporum</i>	34
Cuadro 5. Crecimiento en cm de <i>F. Oxysporum</i> , <i>T. Harzianum</i> y <i>C. Rosea</i> y respectivo control, así como el porcentaje de inhibición de <i>F. Oxysporum</i>	45

RESUMEN

Especies del género *Fusarium* infectan a más de 100 especies de plantas, entre ellas *Allium cepa* (cebolla). *Fusarium* es un género que ocasiona en plantas de cebolla, una coloración que va de marrón a rosada, así como una pudrición del sistema radicular. A pesar de los daños que ocasiona al ambiente, esta enfermedad es controlada con fungicidas químicos. Actualmente existe una continua búsqueda de alternativas de control; por ejemplo, el uso de antagonistas naturales contra *Fusarium*, como *Clonostachys rosea* y *Trichoderma harzianum*. Estas especies de hongos se caracterizan por ser hiperparásitos, saprófitos, nematófagos y entomopatógenos. Por lo tanto, es necesario evaluarlas para obtener información sobre la interacción que existe con estas dos especies de hongos antagonistas en contra de *F. oxysporum*. Además, es relevante contar con técnicas eficientes de inoculación que garanticen la presencia de una infección bajo condiciones controladas y permitan desarrollar protocolos para evaluar tratamientos que la contrarresten. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* a) el efecto de la interacción de las especies antagonistas *C. rosea* y *T. harzianum* contra *F. oxysporum* y b) evaluar técnicas de infección en plántulas de cebolla. Se confrontaron los hongos antagonistas vs *F. oxysporum* y se evaluaron diferentes técnicas de infección que variaban en el tiempo y manera de inoculación. El criterio para determinar si *C. rosea* y *T. harzianum* disminuyen el halo de crecimiento de *F. oxysporum*, se determinó mediante la observación al microscopio de las muestras. Posteriormente, en semilleros y en condiciones controladas, se evaluaron las técnicas de infección en plántulas de cebolla. Las técnicas evaluadas consideraron la inoculación del sustrato directamente con esporas de *F. oxysporum* antes y después de la siembra de semilla de cebolla, inoculación del sustrato con cilindros de agar micelio de *F. oxysporum* antes y después de la siembra de semillas. Se tomaron muestras de cada una de las plántulas de todos los tratamientos a los 10 días de iniciado el experimento, todos los días se midió el crecimiento de la parte aérea y se evaluó el color de raíz y bulbo. Empleando la técnica de cultivo dual, los resultados demostraron que los mayores valores de inhibición para *F. oxysporum* fueron presentados por la interacción de *C. rosea* y *T. harzianum* con 48.42% de inhibición del crecimiento radial del patógeno, la interacción individual de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* presentó la menor tasa de inhibición de crecimiento radial. Al evaluar distintos sistemas de inoculación sobre plántulas, el presente estudio muestra que la mejor técnica para infectar plántulas de cebolla es la inoculación de esporas en suspensión antes de la siembra de semilla.

INTRODUCCIÓN

El manejo integrado de plagas, engloba técnicas de control eficaces desde el punto de vista ecológico, biológico y económico. Resalta el uso de poblaciones naturales para regular poblaciones de plagas o patógenos (Eljounaidi *et al.*, 2016). Una de las herramientas más utilizadas en el manejo integrado de plagas, es el control biológico, el cual se define como el uso de organismos vivos para reducir los efectos nocivos causados por patógenos o plagas. Muchos productos agrícolas no son completamente destruidos por enfermedades, debido a la presencia natural de estos agentes de biocontrol, los cuales son capaces de antagonizar plagas o patógenos reduciendo su efecto nocivo (Weaver *et al.*, 2016).

El antagonismo en sentido amplio y en términos de control biológico de plagas agrícolas, es un mecanismo por medio del cual algunos organismos actúan como enemigos naturales sobre individuos de otra población, pudiendo interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales. Estos antagonistas o enemigos naturales pueden ser: bacterias, hongos, nematodos, protozoarios, virus y plantas (Wisniewski *et al.*, 2016). El antagonismo se refiere a toda acción que ejercen estos organismos de manera directa o indirecta, sobre organismos patógenos de plantas y que da como resultado la reducción de la sintomatología vegetal y la recuperación de la salud de las plantas. La efectividad antagónica dependerá de la capacidad del agente de control biológico para controlar el proceso de enfermedad y si este organismo antagónico posee varios modos de acción, reduciendo así el riesgo de resistencia en el patógeno (Orietta y Larrea, 2001).

Un agente de control biológico eficaz cuenta, generalmente, con varios mecanismos antagonistas que actúan de manera conjunta para controlar la enfermedad. Estos microorganismos pueden presentar cinco modos de acción: Competencia o colonización rápida del hábitat (competencia por nutrientes o espacio) (Droby *et al.*, 2016), antibiosis o producción de antibióticos solubles en agua o volátiles (Sharifazizi *et al.*, 2017), lisis o producción de enzimas que degradan y destruyen al patógeno (Ferraz *et al.*, 2016), resistencia inducida o estimulación del mecanismo de resistencia de la planta en contra del patógeno (Punja *et al.*, 2016) e hiperparasitismo.

Entre los microorganismos antagonistas están los hongos *C. rosea* y *T. harzianum*. Especies de estos géneros tienen uso como agentes de control biológico contra fitopatógenos ya sea de forma indirecta absorbiendo nutrientes, modificando condiciones del medio ambiente, promocionando el crecimiento de la planta, produciendo metabolitos secundarios o enzimas

hidrolíticas o de forma directa con la formación de estructuras especializadas que intervienen en el micoparasitismo (Rey *et al.*, 2000; Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Hoitink *et al.*, 2006).

El manejo integrado de plagas, que incluye el uso de microorganismos antagonistas como los hongos, es actualmente implementado en México para el manejo de enfermedades en distintos cultivos entre ellos la cebolla, cultivo que aporta aproximadamente 4 % (PIB) al sector primario (Banco Mundial 2016). El aporte por variedad le corresponde 90 % a la cebolla blanca, 7 % cebolla morada y 3 % cebolla amarilla. A nivel nacional se obtiene una producción del 70 % entre los estados de Tamaulipas, Guanajuato, Chihuahua, Zacatecas, Baja California y Michoacán (SIAP-SAGARPA, 2015). Esta hortaliza es uno de los productos que mayormente se exporta al mundo con 318 toneladas de cebolla, con una remuneración equivalente a 363.721 millones de dólares estadounidenses (Valencia y Zetina, 2017).

Para lograr el desarrollo de protocolos de mejoramiento y regularización en el control de plagas y poder entender la relación entre los antagonistas *T. harzianum*, *C. rosea*, el fitopatógeno *F. oxysporum* y la cebolla, es necesario realizar estudios que permitan conocer aspectos biológicos, bioquímicos y ecológicos de las interacciones, dado que son componentes fundamentales para optimizar la supresión, y para esto es útil contar con técnicas de inoculación eficientes bajo condiciones de laboratorio o de invernadero.

ANTECEDENTES

Producción nacional y estatal de cebolla

La cebolla (*Allium cepa* L.) se produce en 139 países (FAO, 2013). India y China cultivan casi la mitad de la cebolla a nivel mundial, y es una de las principales hortalizas que se cultiva en México, ocupando el 4º lugar respecto a rendimiento.

Desde los años 90´s el Estado de Morelos contribuye de manera importante en la producción de esta hortaliza, cabe destacar que ocupa el 8º lugar en superficie sembrada alcanzando las 70 mil 945 ton y es un producto que va a la alza (SAGARPA, 2014), siendo Axochiapan, Ayala, Tepalcingo, Cuautla, Jonacatepec, Xochitepec, Temoac, Tlalquitenango, Zacualpan de Amilpas, Jantetelco, Yecapixtla, Emiliano Zapata, Tlaltizapan, Temixco, Atlatlahucan, Tetecala y Mazatepec los municipios principales (Mejía, 2015).

Enfermedades comunes de la cebolla

Existen diversas enfermedades importantes que afectan el cultivo de la cebolla y causan pérdidas severas en la agricultura, ya que reducen la calidad y rendimiento de la cosecha obtenida. Entre estas enfermedades destacan las causadas por hongos fitopatógenos que causan pudriciones radicales y están asociadas a la presencia de hongos del género *Fusarium*, *Sclerotium*, *Pyrenochaeta*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rizhooctonia*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Peronospora* y *Penicillium* (Flores et al., 2015; Montes et al., 2003; Pulido et al., 2008).

El género *Fusarium* es el más importante, produce tres estructuras de resistencia: macroconidios, microconidios y clamidosporas, las cuales le permiten sobrevivir como saprófito de vida libre en ausencia de un hospedero. Es una enfermedad que afecta el desarrollo de la planta, así como su almacenamiento. La forma en que se establece este tipo de patógeno es por medio de penetración directa o por aberturas ya sea natural o mecánica, heridas en las hortalizas, semillas, agua y suelos contaminados (Klokocar, 2008). Los síntomas de esta enfermedad incluyen: amarillamiento en el follaje, raquitismo, decoloración del bulbo y raíz, pudrición de la planta, marchitez y muerte de la misma (Montes et al., 2003; Lager, 2011).

Las plantas infectadas pueden arrancarse fácilmente porque las raíces afectadas muestran menor desarrollo, además de tener lesiones de color rojo o café; los bulbos presentan una pudrición seca y en ocasiones se puede observar un moho blanco en la parte basal. Esta

enfermedad puede presentar daños por damping-off o reducción en la germinación de la semilla (Dissanayake *et al.*, 2009).

En México, en el estado de Baja California, *F. oxysporum* y *F. subglutinans* se asocian con la pudrición radical en el cultivo de cebolla, lo que causa que los productores tengan que cambiar de parcelas cada 2 años. La falta de sanidad en el control de enfermedades relacionadas a la hortaliza y la prolongada repetición del cultivo ha provocado que el problema se presente continuamente ocasionando pérdidas en el rendimiento de alrededor de 15 t ha⁻¹ (Pulido *et al.*, 2012). En el Estado de Morelos se ha detectado la presencia de *F. culmorum* que al igual que varias especies de *Fusarium* son características por ocasionar coloración marrón, café, rosadas y una pudrición del sistema radical de la cebolla (Du Toit *et al.*, 2003; Montes, 2003).

Características de *Fusarium* y especies relacionadas a pudriciones radicales en cebolla

La característica morfológica principal del género *Fusarium* es la presencia de conidios que se forman sobre fiálides simples o ramificadas. Estas especies presentan esporas asexuales de tres tipos 1) Macroconidios: espora principal en la caracterización, presentan forma de media luna; 2) Microconidios: son de menor tamaño que los macroconidios y presentan formas globosas, fusiformes, ovales, de nabo o de riñón; 3) Clamidosporas: esporas de resistencia, doble pared gruesa, lisa o rugosa.

Para observar este tipo de estructuras suelen usarse medios naturales como el agar hojas de clavel (CLA) o agar nutriente sintético (SNA)). En cuanto a la caracterización macroscópica se pueden realizar observaciones culturales como tasa de crecimiento, pigmentación y aspecto del micelio el cual puede ser aéreo algodonoso con coloración salmón, morado, rosa, café claro, amarillo o gris (Leslie y Summerell, 2006).

El ciclo de vida de *Fusarium* comienza con el inóculo en suelo, agua o herramientas contaminadas presentándose en forma de clamidosporas. La enfermedad se desarrolla de manera idónea en una temperatura que oscila entre 25-28 °C, y dependiendo de la especie de *Fusarium* este puede invadir directamente el bulbo, la placa basal o la raíz. *Fusarium oxysporum* invade la raíz y ocasiona necrosis, posteriormente invade tallo y bulbo hasta infectar la planta completamente causándole la muerte, permaneciendo así en el suelo y/o material contaminado para iniciar el ciclo nuevamente (Koike *et al.*, 2007; Crammer, 2000).

Esta especie es la que se encuentra con mayor incidencia en los campos de cebolla (Galván *et al.*, 2008), y puede estar asociada con otras especies de hongos que afecten a la hortaliza, ocasionando heridas en la raíz y favoreciendo que el hongo *Pyrenochaeta terrestris* penetre y dañe la planta. Se han reportado en diferentes partes de mundo otras especies asociadas a tal enfermedad como: *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. redolens*, *F. proliferatum* (Bayaktar y Dólar, 2011).

Medidas de manejo de las fungosis

La principal herramienta de control de enfermedades es la rotación de cultivos de 3-4 años sin presencia de plantas del género *Allium* como lo son puerros, ajos o cebollín. La limpieza de las plantas que puedan ser un foco de alerta al tener inóculo del patógeno, así como el control de insectos causantes de heridas en la raíz, ya que estos pueden permitir el ingreso del patógeno con mayor facilidad (Pfender y Alderman, 2003)

Control químico

El control químico, continúa siendo necesario para el control de enfermedades y plagas en diversos cultivos, con la finalidad de tener un alto rendimiento en las cosechas. Como ya se sabe las enfermedades con mayor índice de pérdidas económicas en la agricultura, son aquellas producidas por hongos de diversos géneros y la protección de cultivos se ha centrado principalmente en el desarrollo de plaguicidas sintéticos; Sin embargo, actualmente existen riesgos elevados debido al uso indiscriminado de estos productos, su eficacia puede ser de corta duración y existen plagas y patógenos resistentes. Asimismo, estos productos se pueden acumular en los alimentos, suelo y agua con efecto negativo para el ambiente y la calidad de vida del consumidor (Hernández *et al.*, 2018).

Esta enfermedad se controla con productos químicos, por ejemplo 2-(tiocianometiltio) benzotiazol TCMTB y (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3- (1H-1, 2, 4-triazol)-1-ilmetil-pentan-3-ol tebuconazole. El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción; no obstante, tienen efectos tóxicos sobre el ambiente causando inestabilidad de los agroecosistemas, la cual se manifiesta en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos (Nygren *et al.*, 2018).

La aplicación de plaguicidas también ocasiona riesgos para el ser humano, ya sea como consumidor de vegetales, frutas o productos tratados. El uso de estos productos químicos se hace conforme a normas de inocuidad las cuales establecen límites máximos permisibles de

estos residuos, para que el riesgo a corto y mediano plazo en los consumidores sea mínimo. Sin embargo, en algunas ocasiones estos límites se rebasan o bien existe la presencia de varios residuos en un mismo producto y este efecto aditivo causa potencialización del riesgo (Pérez et al., 2009).

Control biológico

La contaminación ambiental con pesticidas químicos es un problema que ha motivado la búsqueda de alternativas inocuas para usarse en agricultura. El término de control biológico se ha usado frecuentemente en el área agrícola y este se define como la reducción de densidad de una población que afecta a plantas, animales o el hombre, mediante el uso de un organismo antagonista y se basa en el control natural (Eljounaidi et al., 2016; Weaver et al., 2016). Entre ellos se encuentran bacterias, compuestos químicos volátiles producidos por plantas, levaduras y hongos filamentosos (Wisniewski et al., 2016).

El manejo agroecológico de plagas ha sido desarrollado, para obtener rendimientos económicamente redituables para el agricultor, aun teniendo presencia del patógeno y para entender la naturaleza de la enfermedad y la fisiología del organismo afectado (Zaldúa, 2012).

Fitoquímicos

Existe una gran variedad de plantas productoras de metabolitos secundarios que son tóxicos, y esta característica les permite actuar como antagonistas de patógenos y plagas. La forma de explotar este potencial es asociándolas con los cultivos al incorporar sus residuos al suelo. Tal es el caso de *Tagetes erecta* o flor de muerto, que al incorporar residuos de esta planta y asociarlos a cultivos de chile se tiene una reducción significativa en el agallamiento radical ocasionado por los nematodos *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*. Esta especie es conocida como poseedora de propiedades fungicidas, nematicidas e insecticidas (Espejo et al., 2010) sus propiedades antagonistas se deben a la presencia de compuestos terpenoides en sus tejidos (Zavaleta et al., 1992).

Otro ejemplo son las Brassicaceae, como la col o el brócoli, que destacan por la alta eficacia de los isotiocianatos volátiles que liberan (Zurera et al., 2007) y tienen propiedades nematicidas y presentan actividad sobre incidencia y severidad de la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* (Zavaleta, 2000) o el aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*), a una concentración de 10,000 ppm detiene el crecimiento fúngico del patógeno *Colletotricum gloeosporioides* en un 100%, se ha elucidado también de forma analítica el tipo

de compuesto al que se le atribuye la propiedad antifúngica, siendo este aceite rico en eugenol (Pérez *et al.*, 2009). Con base en este tipo de estudios se tiene una idea del gran potencial que tienen las plantas como antagonistas.

Hongos

Entre la variedad de hongos importantes para la agricultura está la especie *Trichoderma* hongo anaerobio facultativo y saprófito ya que puede estar presente en materia orgánica de suelos o en residuos de cultivos usando como principal fuente de carbono la celulosa, es entomopatógeno, anamorfo y de reproducción asexual, es decir, forma tres tipos de estructuras: hifas, clamidosporas y conidios (Harman, 2006). La morfología corresponde a hifas hialinas septadas, conidióforos hialinos y ramificados, fialides hialinas en forma de botella, se pueden encontrar en racimos o de forma individual y finalmente conidios de pigmentación verdosa, unicelulares y forma redonda globosa o elipsoidal (Cupull *et al.*, 2003) en la Figura 1 se muestra las estructuras correspondientes.

En condiciones promedio de 25 °C, humedad relativa de 70%, pH de 6-6.5 el género *Trichoderma* tiene un crecimiento óptimo, sin embargo, puede sobrevivir a un pH mayor ya que tiene la capacidad de acidificar el medio en el que se encuentra, mediante secreción de ácidos grasos (Harman *et al.*, 2004). En la industria es utilizado debido a las enzimas hidrolíticas que secreta, celulasas y xilanasas que ayudan a degradar hemicelulosa, celulosa y algunos polisacáridos complejos.

Diversas especies de *Trichoderma* son bien conocidas por ser eficientes en controlar enfermedades de plantas induciendo la respuesta de defensa en la planta, o mediante mecanismos directos como el micoparasitismo (Harman *et al.*, 2004). Estas especies se han utilizado en contra de diversos patógenos de plantas como *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *S. sclerotium* (Lopes *et al.*, 2012). Una de las características de las especies de *Trichoderma*, es la producción de enzimas líticas como quitinasas, β -1,3-glucanasas, proteasas que destruyen la pared celular penetrando así en el patógeno (Geraldine *et al.*, 2013). Existen varios metabolitos secundarios activos, estos incluyen una variedad de pequeñas moléculas volátiles y no volátiles que han sido descritas con actividad insecticida y fungicida, por ejemplo, 6-pentil-2H-piran-2-ona, tricotecenos (Jélen *et al.*, 2014) y antibióticos oligopéptidos llamados peptabioles (Degenkolb *et al.*, 2015).

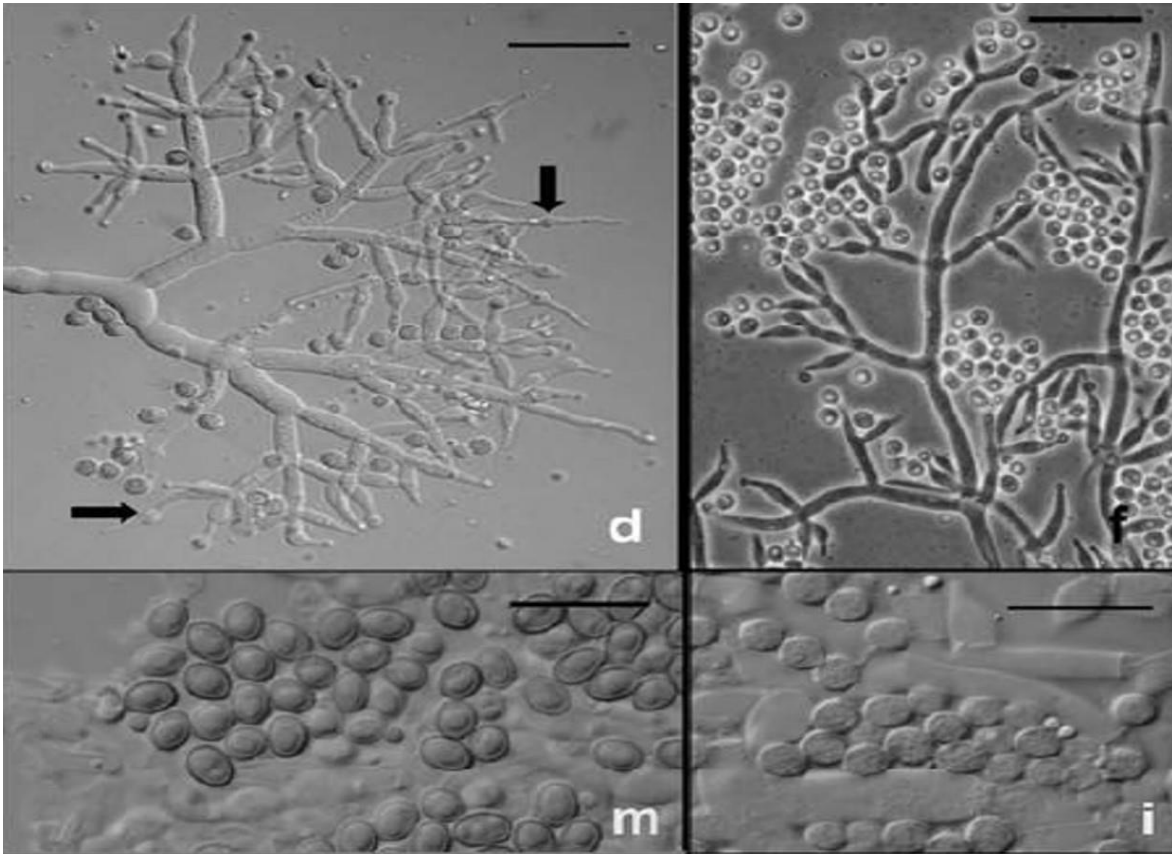


Figura 1. Microfotografía de *Trichoderma*. d) Conidióforo de *T. viridescens*, las flechas muestran proliferación de la fialide. f) Conidióforos. m) Conidios elipsoidales. i) conidios subglobosos (tomada de Jaklitsch et al., 2006).

Otro hongo conocido a nivel mundial es *Clonostachys rosea* o *Gliocladium roseum* (Schroers, H.-J), perteneciente al filo Ascomycota característico por colonizar de manera endófitra raíces, tallos, hojas, frutos y semillas de plantas, saprófito, entomopatógeno y parásito de otros hongos y nematodos (Toledo et al., 2006). Produce compuestos orgánicos volátiles como hidrocarburos, ácidos grasos, fenoles, esteroides y derivados del furano (Zaldúa, 2012) que son tóxicos para organismos patógenos como hongos, bacterias e insectos (Flores et al., 2015).

Esta especie es comúnmente usada en control biológico, al igual que especies de *Trichoderma*, en contra de hongos fiopatógenos como *Pythium ultimum*, *Alternaria* spp. y *R. solani*. Estudios fitoquímicos han elucidado algunos compuestos como dicetopiperazinas, terpenoides, péptidos y policétidos (Shiomi et al., 2000). Diversos mecanismos de biocontrol se le adjuntan a esta especie, entre ellos el micoparasitismo (Li et al., 2002), antibiosis (Rodríguez et al., 2011), producción de enzimas degradadoras de la pared celular (Chatterton y Punja, 2009), inducción de mecanismos de defensa en la planta (Lahlali y Peng, 2014) y promoción del crecimiento (Roberti et al., 2008), así como también se ha reportado como rasgo en esta

especie, la capacidad para eliminar la actividad tóxica de metabolitos producidos por los fitopatógenos (Dubey *et al.*, 2014; Kosawang *et al.*, 2014).

Mecanismos antagónicos

Competencia por nutrientes y espacio

La competencia por recursos es una interacción dónde hay repercusiones negativas para los interactuantes (-/-). La competencia por espacio sucede cuando un microorganismo cubre la superficie vegetal sin dejar que otro se desarrolle. Suele ser importante en patógenos que penetran por heridas o que necesitan una concentración inicial de inóculo para penetrar. En este caso es importante la relación entre la velocidad de crecimiento del patógeno y la del antagonista (Madriz, 2002). Ejemplo de ello, son diversas especies de *Trichoderma*, las cuales tienen habilidad para competir por nutrientes, esto lo hacen mediante la producción de compuestos llamados sideróforos que captan el hierro del medio limitando de esta manera el desarrollo y crecimiento de patógenos, reduciendo así la severidad de la enfermedad ocasionada en las plantas (Saha *et al.*, 2013). Se ha sugerido también en estudios anteriores, que especies de *Trichoderma* en ambientes pobres en Fe, Mn⁺, Ni²⁺ y Pb²⁺ mejoran la absorción en la planta mediante agentes quelantes (Zhao *et al.*, 2014) y tienen la capacidad de reducción de Fe³⁺ insoluble a Fe²⁺ mediante ácidos grasos o por enzimas reductoras.

La disponibilidad de los nutrientes en suelos influye también en la capacidad para ejercer control biológico de las distintas especies de *Trichoderma* y *Clonostachys*. De hecho, el uso eficiente de nutrientes por *Trichoderma* spp. depende de la capacidad que tenga la cepa para obtener energía de varios azúcares como celulosa, glucanos o quitina y de la eficiencia de su sistema de transporte de glucosa para obtener ATP, es por eso que todo este sistema juega un papel clave en la competencia por nutrientes y espacio (Benítez *et al.*, 2004).

Antibiosis

La antibiosis es un mecanismo de inhibición de las actividades metabólicas de un organismo por la acción de una sustancia (a bajas concentraciones) producida por otro organismo (Benítez *et al.* 2004). La producción de antibióticos depende de la disponibilidad de nutrientes que posea el medio y se vea favorecida por aportes suplementarios de compuestos orgánicos. Una ventaja de este mecanismo, es que no es necesario que el patógeno y el antagonista entren en contacto y, además, el antibiótico puede permanecer en el medio incluso tras la muerte del antagonista (Marques *et al.*, 2018).

Ambos géneros de hongos son capaces de producir antibióticos altamente tóxicos para otros microorganismos. Estos compuestos son estimulados de forma directa por la presencia de un microorganismo patógeno (Harman *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2005). Dentro de los metabolitos más importantes generados por *Trichoderma* spp. están: gliotoxina y gliovirina, los cuales tienen como característica ser biocidas, con un pronunciado aroma a coco (Howell *et al.*, 1993).

Se ha comprobado también que distintas especies de *Clonostachys* son capaces de producir metabolitos tóxicos y antibióticos (Okuda *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2011). Entre los metabolitos de importancia de *C. rosea* destacan cuatro tipos de glicopreninas y una mezcla de péptidos pertenecientes a la familia de peptabióticos los cuales están relacionados con sistemas de defensa de plantas contra patógenos (Viterbo *et al.*, 2007).

Micoparasitismo

El micoparasitismo es un tipo de interacción directa entre el antagonista y el patógeno, donde el antagonista usa al patógeno como alimento, logrando una actividad de simbiosis antagónica entre organismos. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, β 1, 3-glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parásitos. Estudios demuestran que *C. rosea* produce endoquitinasas (Mamarabadi *et al.*, 2008), N-acetil- β -D-glucosaminidasa, 1,4- β -quitobiosidasa (Roberti *et al.*, 2002) y proteasas, siendo algunas capaces de degradar la cutícula de nematodos (Li *et al.*, 2006).

Las fases del micoparasitismo según Benhamou y Chet 1997:

1. El microorganismo patógeno secreta exudados que atraen, por quimiotropismo, al antagonista.
2. El hongo antagonista se adhiere al patógeno mediante haustorios o apresorios (Figura 2), la degradación de la pared celular es mediante enzimas hidrolíticas (quitinasas, β -glucanasas, proteasas, lipasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, fosfolipasas, RNAsas y ADNAsas).
3. Ocurre una penetración en las hifas del patógeno, engrosándolas y produciendo haustorios, para absorber los nutrientes.
4. Finalmente se produce lisis de la pared celular.

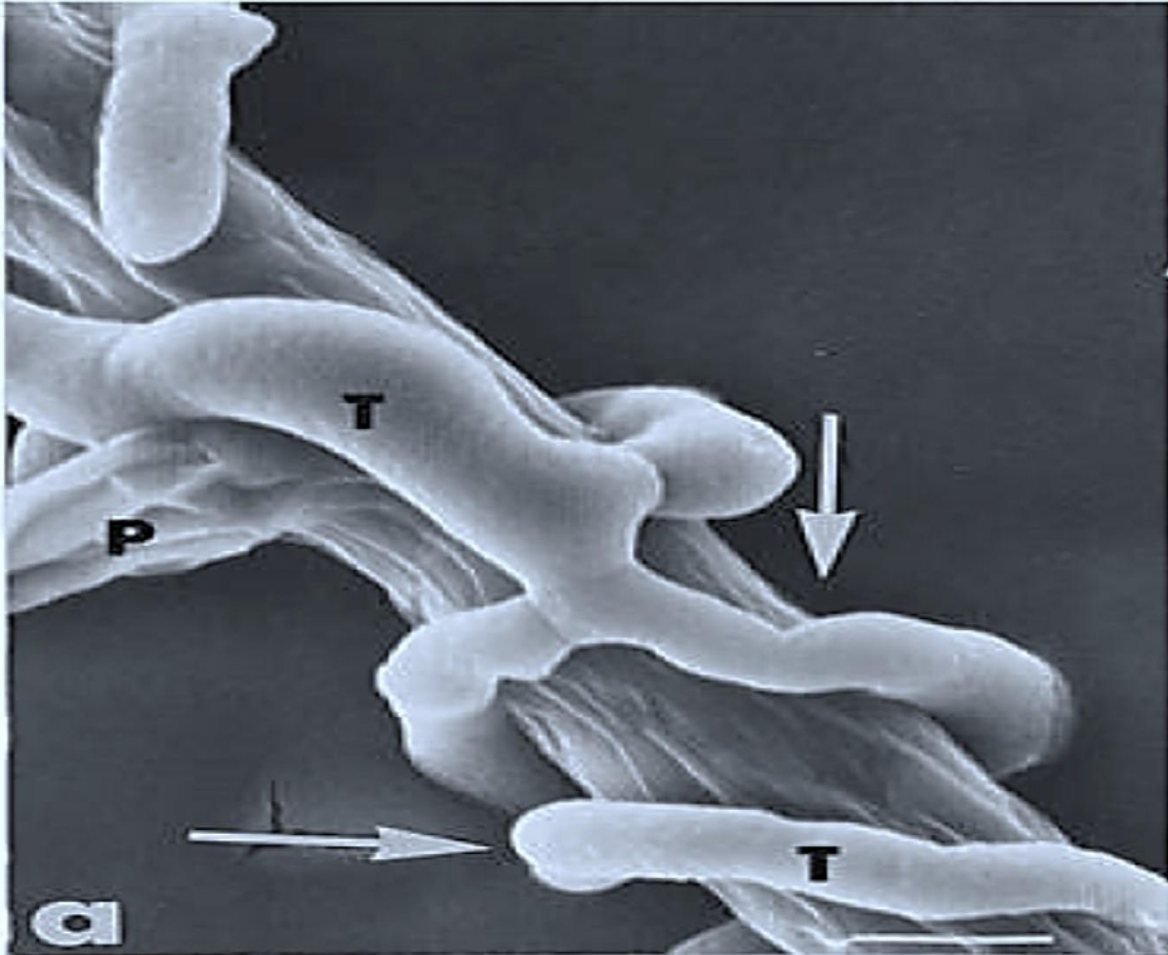


Figura 2. Parasitismo de *Trichoderma* spp. en *Phytium capsici*. Las flechas indican enrollamiento y formación de apresorios de las hifas de *Trichoderma* spp. sobre la hifa de *P. capsici* (tomado de Benhamou y Chet, 1997).

Relación planta parásito antagonista

Las plantas constantemente se encuentran expuestas a distintos tipos de estrés, ya sea biótico o abiótico. Por lo tanto, el contacto con un patógeno puede resultar en una interacción compatible dándose una infección, o incompatible donde la planta resiste la invasión por el patógeno, esto es resultado de diversas estrategias de defensa de la planta. Cuando las plantas han tenido un ataque inicial de patógenos, ya sea virus, hongos o bacterias, estas pueden protegerse contra ataques posteriores (Petrocelli *et al.*, 2018). Se ha observado que el primer patógeno infectante o algún daño mecánico, de cierta manera fortalece a la planta contra infecciones posteriores por patógenos homólogos, activando la expresión de reacciones de resistencia contra subsecuentes infecciones de patógenos, independientemente si son virus, bacterias u hongos. Esta respuesta puede ser específica para cada especie de patógeno que

ataque la planta y puede ocurrir de manera sistémica con larga duración y en partes aéreas o subterráneas (Rodríguez, 2012).

Durante el proceso de invasión de un patógeno, se producen barreras químicas y físicas en la planta que restringen la penetración y desarrollo de una infección, así mismo se generan distintos mecanismos de defensa que son desencadenados debido al reconocimiento de esta interacción induciendo la formación de moléculas que hacen funcionar al sistema inmune (Sentil *et al.*, 2013) y ocurren cambios en los niveles de varias fitohormonas, las cuales regulan aspectos como el desarrollo y crecimiento de la planta o la respuesta de defensa (Adie *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2016).

Asimismo, se desencadena una respuesta por parte de la planta llamada resistencia sistémica adquirida, y un requerimiento primario para que ocurra ese proceso es que la primera infección por un patógeno cause una lesión necrótica. Esta necrosis es el resultado de la muerte celular programada después del reconocimiento del patógeno. La activación de una cascada de señales para la respuesta sistémica, comienza de manera local; es decir, en las células que se encuentran más cercanas a la respuesta hipersensitiva. Se observa engrosamiento en estructuras como las paredes celulares por la incorporación de proteínas o lignina, deposición de calosa y la inducción de síntesis de fitoalexinas. En las partes más alejadas a la zona infectada de la planta, la reacción de defensa es la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis llamadas proteínas PR, las enzimas β -1,3 glucanasas, endohidrolasas, quitinasas, inhibidores de amilasa y proteinasas (Madriz, 2002).

Especies de *Trichoderma* han sido estudiadas sobre el concepto de interacción entre planta-patógeno-antagonista, demostrando la gran cantidad de vías y mecanismos de defensa que desencadena en *Allium cepa*. Encontrando carbohidratos como Xilosa, arabinosa, fructosa, rafinosa y fructanos (Peshev *et al.*, 2013). Estos altos niveles de azúcares y la gran cantidad de arabinosa y xilosa en los tejidos de la cebolla actúan como osmo protectores y refuerzan la pared celular (De Lima *et al.*, 2014). Los monosacáridos de fructosa, y los oligosacáridos como fructano y rafinosa actúan como compuestos antioxidantes y estimulan el sistema inmune del bulbo (Shoresh *et al.*, 2008).

Las cebollas al ser tratadas con diferentes especies de *Trichoderma* activan y se desencadenan la cascada de señalización de fenilalanina amonio liasa que está relacionada en la producción de flavonoides. Estos metabolitos secundarios, especialmente quercetina y kaempferol, cumplen un rol importante en la defensa de la cebolla ante patógenos y tensiones (Sudisha *et al.*, 2013). Estos son conocidos como potentes antioxidantes, los cuales protegen

ante el daño oxidativo que generan muchos patógenos, así como también restringen la penetración de estos a los haces vasculares y al córtex (Nakabayashi *et al.*, 2015).

El incremento de algunos aminoácidos también es notorio en la actividad de defensa de la cebolla. Entre los más importantes se encuentra la arginina, precursor de la biosíntesis de poliaminas, que son conocidas por su papel en el desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta a estrés (Walters *et al.*, 2003). Se incluye también la producción de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina que es el aminoácido base para la vía fenilpropanoide para compuestos orgánicos (La Camera *et al.*, 2004). De la misma manera los niveles de metionina y triptófano aumentan, y estos están relacionados a la vía de S-adenosil metionina para la producción de etileno (Liang *et al.*, 2013) y producción de serotonina y glucosinolatos indólicos (Winterberg *et al.*, 2014).

Dos tipos de protectores ante el estrés fotooxidativo como los carotenoides y la clorofila también se incrementan; esto posiblemente por la interacción entre *Trichoderma* y la cebolla, lo cual incrementa el nivel de auxinas y otras hormonas que contribuyen al contenido de clorofila interviniendo de manera positiva en el crecimiento de la planta (Babu *et al.*, 2014).

Técnicas de infección

Para lograr obtener información sobre las interacciones que existen entre planta-patógeno-antagonista, es necesario realizar pruebas confiables y protocolos de inoculación simples y eficientes, que sean consistentes para lograr una infección de manera artificial a modo de que se puedan mantener condiciones controladas y tener un procedimiento estándar que permita evaluar de forma cuantitativa y cualitativa la enfermedad que ocasiona *F. oxysporum*. El éxito para identificar y mantener artificialmente positiva una infección, signos y síntomas de marchitamiento en plantas causado por *Fusarium*, depende en gran medida del procedimiento utilizado (Engle *et al.*, 2003).

Existen reportes donde se utilizan distintas técnicas de inoculación para identificar a variedades de cultivos resistentes a patógenos transmitidos por el suelo. Estas técnicas van desde inmersión de raíces en inóculo, cultivo de semillas o plántulas en suelo infestado (Jun *et al.*, 2010), remojo de semillas en solución de esporas (Martínez *et al.*, 2012) e inyección de inóculo en las plantas (Engle *et al.*, 2003). La efectividad de estas técnicas depende de varios factores como la concentración de esporas, la edad de la planta en la inoculación, el vehículo utilizado para inocular y las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad (Figàs *et al.*, 2016).

Algunos autores han hecho uso de este tipo de métodos y técnicas para sus respectivos ensayos utilizando diferentes tipos de cultivos y distintas especies de *Fusarium* como patógeno principal. El siguiente cuadro (1) muestra el porcentaje de efectividad de las técnicas respectivas.

Cuadro 1. Evaluación de técnicas de inoculación en distintas plantas y porcentaje de infección						
Especie de planta	Especie de <i>Fusarium</i>	Concentración usada (esporas/ml)	Técnica implementada	Órgano blanco de la planta	% de infección	Autor
Pino (<i>Pinus pinaster</i>)	<i>F. oxysporum</i>	10 ⁵ , 10 ⁷	Inoculación de esporas	Semilla	20	Vivas et al., 2012.
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	<i>F. proliferatum</i>	N/A	Inoculación en sólido (uso de semillas de arroz con micelio)	Semilla, raíz	30	Campos., 2013.
			Inoculación en sólido (Uso de semillas de arroz con micelio)	Semilla	21.4	
Maíz (<i>zea mays</i>)	<i>F. verticilloides</i> <i>F. proliferatum</i>	10 ⁶	Inyección de conidios	Grano	80	Clements et al., 2003.
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	<i>F. acuminatum</i>	N/A	Inóculo con agar y gasa húmeda	Raíz	52	Constanza, et al., 2011
Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Fusarium</i> sp.	N/A	Inoculación en sólido (granos de arroz con micelio)	Raíz	15 de incidencia	Chávez et al., 2012.
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	<i>F. oxysporum</i>	10 ⁷	Inoculación de esporas	Raíz	28	Jun et al., 2010

JUSTIFICACIÓN

Los pesticidas químicos son importantes en el control de plagas en cultivos de hortalizas y diferentes especies de plantas económicamente importantes a nivel mundial; sin embargo, existe una gran preocupación por la contaminación ambiental que se ha generado al utilizarlos de manera indiscriminada. En este contexto, surge la necesidad de contar con estrategias diferentes como el control biológico que no presenta las desventajas de los compuestos químicos utilizados comúnmente para el control de plagas agrícolas. Conocer la actividad antagónica *in vitro* de los hongos *C. rosea* y *T. harzianum* contra *F. oxysporum*, así como estandarizar técnicas de infección de plántulas de cebolla por *F. oxysporum*, servirá para establecer futuros trabajos para determinar el potencial de estos hongos antagónicos a *F. oxysporum*, considerado como un patógeno de gran importancia en la producción de cebolla a nivel nacional y mundial.

HIPÓTESIS

1. Los hongos *Clonostachys rosea* y *Trichoderma harzianum* poseen un efecto *in vitro* en contra de *F. oxysporum*, inhibiendo su crecimiento radial.
2. Las plántulas de cebolla sembradas en sustrato e inoculadas con esporas de *F. oxysporum* presentaran pudrición basal, menor crecimiento y coloración amarilla del follaje.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro*, la capacidad antagónica de *C. rosea* y *T. harzianum* contra *F. oxysporum* y evaluar diversas técnicas de infección en plántulas de cebolla.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto antagónico, *in vitro*, de *C. rosea* y *T. harzianum* en *F. oxysporum*.
2. Determinar si la infección inducida en plántulas de cebolla por *F. oxysporum* varía dependiendo del momento de la infección (antes y después de la siembra de semilla) o de la formulación (cilindros de medio PDA o solución salina con esporas).

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología CEIB de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, UAEM; así como en instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, (CENID PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Jiutepec, Morelos, México.

Este estudio se realizó en dos etapas, en la primera se realizó una confrontación *in vitro* de *C. rosea* y *T. harzianum* en contra de *F. oxysporum*. En una segunda etapa se hizo una evaluación de técnicas de infección con *F. oxysporum* en plántulas de cebolla. En el diagrama se muestra la descripción de la metodología (Figura 3).

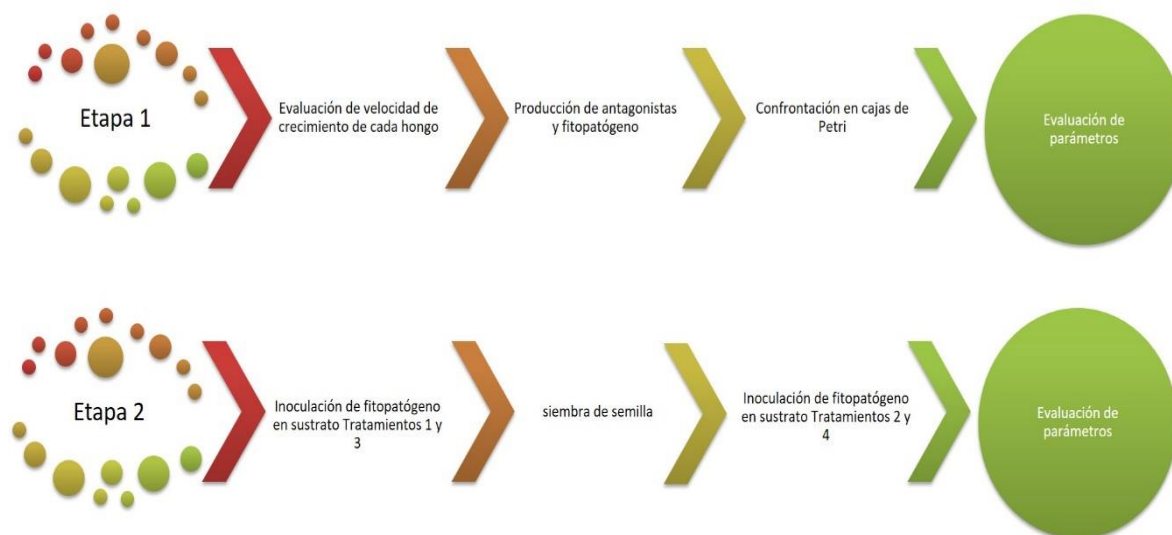


Figura 3. Diagrama de flujo mostrando los eventos correspondientes a la metodología de ambas etapas.

ETAPA 1. Evaluación de la actividad antagónica *in vitro* de *C. rosea* y *T. harzianum* en contra *F. oxysporum*

Aislamiento de *Fusarium*

A partir de un bulbo de cebolla con síntomas de enfermedad (podrición y tono rosado), se cortaron las raíces bajo condiciones asépticas para posteriormente ser lavadas con agua corriente para retirar el exceso de tierra. Las raíces fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.5% seguido de tres lavados con agua destilada estéril y se secaron con papel secante. Las raíces se cortaron en fragmentos pequeños y se sembraron en cajas Petri (100X15 mm) con medio de cultivo agua agar (AA) al 2% y de papa dextrosa agar (PDA) acidificado con ácido láctico al 25% para obtener un pH de 5. Las cajas sembradas se incubaron a 27°C bajo condiciones de obscuridad, a los 7 días se observaron bajo microscopio estereoscópico (Figura 4). Se realizaron cultivos extras en cajas Petri con medio PDA a partir de este aislamiento para su posterior uso en confrontaciones e identificación morfológica.

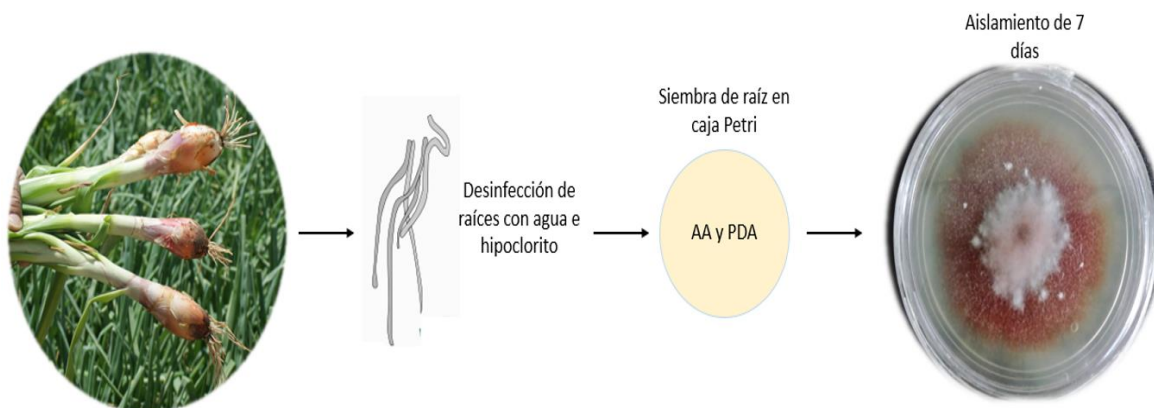


Figura 4. Proceso de aislamiento de *Fusarium* a partir de cebollas infectadas.

La identificación molecular se llevó a cabo basada en la amplificación de secuencias de rDNA de ITS1, ITS2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (Cuadro 2). Cada reacción de PCR contenía 10µL de GoTaq, 1µL de cada oligonucleótido, 4µL de ADN genómico y 4µL agua libre de nucleasas para un volumen final de 20µL. La técnica de PCR se realizó en un termociclador (c1000 BIO-RAD) iniciando con una desnaturalización a 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min. La Tm para ITS1 e ITS4 fue 55°C.

Los productos obtenidos se verificaron en gel de agarosa al 3% con buffer de corrida TBE 1X usando 10µL del producto de PCR, para llevar a electroforesis a 100 volts. El gel se observó en un fotodocumentador (UVP GelDoc-It).

Las bandas obtenidas se cortaron del gel de agarosa y fueron purificadas con el kit de Quiagen (QIAquick PCR Purification), cuantificando el producto obtenido en un nanofotómetro (IMPLEN np80). La secuenciación de los productos se realizó en el instituto de Biotecnología de la UNAM; posteriormente las secuencias fueron comparadas con las secuencias de hongos reportados en la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI) para determinar su identidad, empleando la herramienta BLAST (Figura 5).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar secuencias promotoras

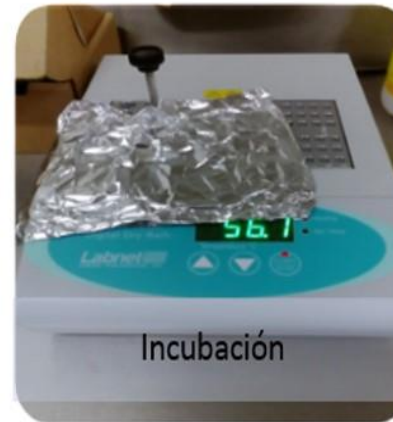
Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Bibliografía
ITS1	5´-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3´	White, <i>et al.</i> , 1990
ITS4	5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3´	



Obtención de micelio



Macerado



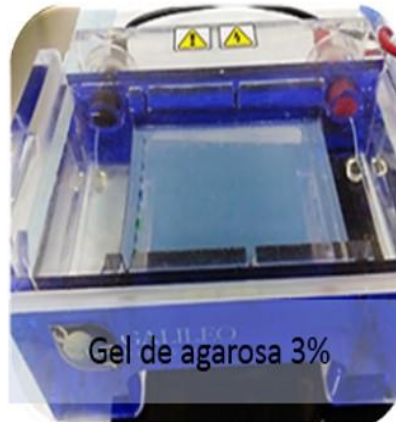
Incubación



Centrifugación



Reacción para PCR



Gel de agarosa 3%



Nanofotómetro



Determinación de identidad

Figura 5. Extracción del ADN a partir de micelio de *Fusarium*, hasta la determinación del % de la identidad de la especie utilizando Blast.

Reactivación de T. harzianum y C. rosea

Se utilizaron los hongos *T. harzianum*, y *C. rosea* (T3H-91) originarios de Campeche Yucatán. Las cepas de estos hongos se han mantenido suspendidos en glicerol bajo condiciones de criopreservación en nitrógeno líquido. Una vez que se sacaron del nitrógeno, se dejaron a temperatura ambiente para su lento descongelamiento. Una vez que las cepas estuvieron descongeladas, se extrajeron porciones de 1cm² de agar suspendido en el glicerol y se sembraron en cajas Petri con medio AA y PDA. Estas fueron incubadas en condiciones de oscuridad a una temperatura promedio de 27 °C. A los siete días se realizaron observaciones de las cepas con un microscopio estereoscópico y se registró su crecimiento. Estas cepas se mantienen como reserva para su posterior uso y resiembra.

Cultivos por dilución

Esta técnica sirve para obtener de cada una de las cepas, un cultivo más puro evitando contaminación con hongos que no son de nuestro interés. Una vez que las cepas han crecido durante 7 días, en la misma caja Petri se vierten 5mL de agua destilada estéril (ADE) y con ayuda de una espátula de drigalsky, cuidadosamente se realiza un raspado y se recolecta todo el micelio dentro de la caja, a partir de la solución que se forma, se homogeniza con ayuda de una micropipeta y se toma 1mL de la solución que contiene las esporas y se pasa a un tubo de ensayo previamente esterilizado con 9mL de ADE. Se realizaron diluciones hasta llegar a la dilución 1×10^{-7} . A partir de las tres últimas diluciones se homogenizan en vórtex y se toman alícuotas de 250 μ L colocándolas en una caja Petri con medio PDA y AA, se expande el líquido con espátula de drigalsky, teniendo cuidado de llegar bien a los bordes de la caja y cubriendo toda la superficie (Figura 6). Se incuban a 27 °C bajo condiciones de oscuridad.

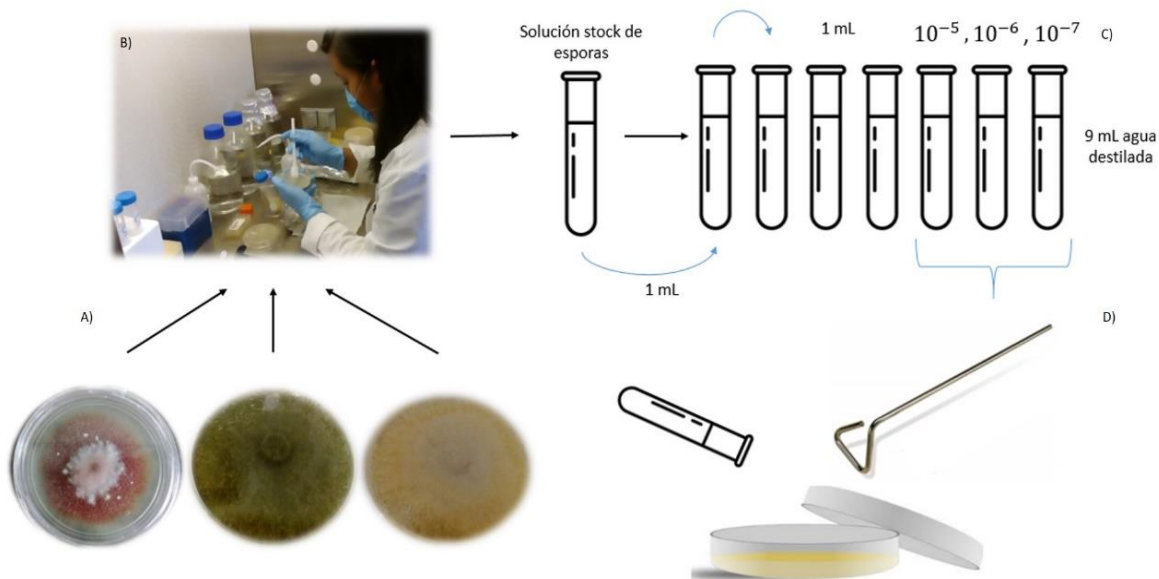


Figura 6. Protocolo para realizar cultivos monospóricos. A) Cepas de las tres especies de hongo; B) Clecta de micelio; C) Diluciones; D) Siembra en caja Petri con medio PDA.

Caracterización morfológica

A partir de los cultivos por dilución bajo condiciones asépticas y en campana de flujo laminar, se realizaron cortes finos de agar con micelio, se colocaron en un portaobjetos con una gota de ADE y se cubrieron con cubreobjetos. Se observaron al microscopio compuesto con un lente de 10X y 40X (Leica) y se tomaron fotografías con un microscopio compuesto con lente 40X (Leica).

Por medio de la técnica de la cinta adhesiva se realizaron las observaciones pertinentes, como el tipo de micelio, conidióforos, presencia o ausencia de conidios, así como su tamaño y disposición. Dicha técnica consiste en poner una gota de azul de lactofenol o azul de algodón sobre el portaobjetos, y con ayuda de un pedazo de cinta adhesiva transparente se toma con cuidado una muestra del micelio aéreo de la cepa a estudiar, posteriormente se coloca sobre el portaobjetos conteniendo el azul de lactofenol. Se observa al microscopio en los aumentos 10X y 40X. Posteriormente las observaciones se compararon con reportes ya establecidos y con los manuales de identificación morfológica de Leslie y Summerell (2006) y de Barnett y Hunter (1998).

Posterior a la identificación del patógeno y reactivación de antagonistas, se procedió a realizar la confrontación *in vitro*. Dichos experimentos fueron conformados por siete tratamientos con 5 cajas de Petri cada uno (repeticiones), como se describen a continuación (cuadro 3).

Cuadro 3. Confrontaciones duales. Diseño experimental	
Tratamientos	Combinaciones
1	<i>C. rosea</i> - <i>F. oxysporum</i>
2	<i>T. harzianum</i> - <i>F. oxysporum</i>
3	<i>C. rosea</i> - <i>T. harzianum</i> - <i>F. oxysporum</i>
4	<i>C. rosea</i> - <i>T. harzianum</i>
5	<i>F. Oxysporum</i> (Control)
6	<i>C. rosea</i> (Control)
7	<i>T. harzianum</i> (Control)

Evaluación de velocidad de crecimiento

Las cepas se mantuvieron en crecimiento durante 15 días en medio PDA, posteriormente se sembraron en cajas de Petri siguiendo el mismo diseño experimental (Cuadro 3). Pasados nueve días el crecimiento fungal fue medido utilizando un escáner convencional y el software Assess 2.0 con el cual se obtiene la medida del halo de crecimiento, en base a la resolución obtenida con el escáner, obteniendo el promedio de crecimiento en cm, esto con la finalidad de tener un estimado de la velocidad de crecimiento de cada cepa para evaluarlas en confrontación.

Confrontaciones

De acuerdo con la velocidad de crecimiento estimada, los hongos fueron sembrados en distintos tiempos; de manera que la primera especie de hongo sembrada fue aquella con la velocidad de crecimiento más lenta y al final aquella cuya velocidad fue más rápida. Para los tratamientos control; se depositaron en el centro de la placa, cilindros de agar inoculados con la especie de hongo correspondiente siguiendo la misma dinámica. Cada cilindro tuvo 1.4 cm de diámetro y se colocó a una distancia de 1 cm de la pared de la caja de Petri y cada tratamiento contó con cinco repeticiones.

En el tratamiento 1 y 2 (Cuadro 3) se colocaron de manera individual *C. rosea* y *T. harzianum*, esto para determinar su crecimiento y posible invasión en contra de *F. oxysporum*. En el tratamiento 3) se colocó un cilindro de cada de uno de los 3 hongos de manera

equidistante entre ellos para determinar si existía antagonismo entre *C. rosea* y *T. harzianum* o un sinergismo entre ambas especies, y finalmente en el tratamiento 4) se colocaron de la misma manera, cilindros de los hongos antagonistas con la finalidad de observar si existía competencia entre esas cepas. Una vez realizada la siembra las cajas son selladas con parafilm y se envolvieron en film plástico para evitar contaminaciones de otros hongos o ácaros de polvo, se incubaron a 25°C con fotoperiodo 12/12 luz/obscuridad, durante 15 días. El criterio para determinar si los hongos antagonistas lograron infectar o no a las hifas de *F. oxysporum* fue determinado mediante la toma de imágenes escaneadas de cada una de las placas Petri que conformaron los tratamientos, durante los días 3, 6, 9 y 15. De las imágenes obtenidas el crecimiento radial del halo de cada cepa, se midió con ayuda del programa Assess 2.0 de la APS, el cual permite obtener una medida en cm² basados a la resolución de cada imagen escaneada. Los resultados de las mediciones del crecimiento micelial de las 5 placas, fueron promediados y se utilizaron para realizar el análisis de varianza (ANOVA) y observar diferencias significativas entre tratamientos, para ello se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 7; en virtud de que se observaron diferencias significativas, se realizó la prueba de Tukey, al 5% de probabilidad, para definir los mejores tratamientos analizados.

ETAPA 2. Evaluación *in vitro* de técnicas de infección sobre plántulas de cebolla

Para la siembra de las semillas de cebolla blanca (Vita) se emplearon tres semilleros por cada uno de los ocho tratamientos (Cuadro 4). Cada semillero tenía un total de 6 pozos y en cada pozo se sembró una semilla de cebolla blanca. La infección por micelio de *Fusarium oxysporum* se realizó en forma de suspensión ($\frac{[1 \times 10^6]}{mL}$) ya sea antes o después de la siembra de las semillas de cebolla (Cuadro 4). Se consideraron 4 tratamientos y dos controles por tratamiento. En el caso del control de suspensión sólo se agregaron 5mL de agua destilada y en el caso del control de agar, sólo se agregó 1cm² de medio PDA sin micelio de *F. oxysporum*.

Cuadro 4. Formas y momento de la infección, antes y después de la siembra de *F. oxysporum*

Forma de infección	Momento de Infección	
	Antes de la siembra	Después de la siembra
Suspensión de esporas	3 semilleros	3 semilleros
Agar con micelio	3 semilleros	3 semilleros
Ctrl. Suspensión de esporas	3 semilleros	3 semilleros
Ctrl. Agar con micelio	3 semilleros	3 semilleros

A continuación, se describe el protocolo de desinfección de las semillas previo a su siembra. En un tubo falcon de 50mL se añadieron 10mL de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones: 3%, 1% y 0.05%; posteriormente se agitaron durante 1 minuto con ayuda de un vórtex, luego se decantaron y se desechó la solución de cloro. Posterior a cada lavado con hipoclorito de sodio, estas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel toalla estéril. Finalmente, durante 30 segundos, las semillas se lavaron con etanol al 50%. Después se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se secaron con papel. Las semillas desinfectadas se almacenaron en un tubo falcon estéril (Figura 7).



Figura 7. Desinfección de semillas de cebolla con hipoclorito de sodio. >

Cuantificación de esporas para inoculación en semilleros

Respecto a la colecta del material fúngico, el hongo patógeno fue sembrado en medio PDA durante 15 días en condiciones controladas, 25 °C y 12/12 luz/obscuridad, para luego colectar su micelio y colocarlo en un tubo falcón de 50mL con solución salina al 0.09%. Finalmente se cuantificaron las esporas con una cámara de Neubauer (Figura 8).

Para realizar el conteo, se tomaron 10µL de la suspensión de esporas recolectadas previamente en el tubo falcón, se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y posicionando la punta de la micropipeta en el borde del cubreobjetos sobre el extremo de la cámara de Neubauer, se colocó la suspensión de esporas. Este paso se llevó a cabo con la finalidad de dejar que el líquido penetrara por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos desde la parte lateral, teniendo cuidado de no expulsar aire con la micropipeta, ya que dificultaría la lectura. Posteriormente la cámara fue colocada bajo el lente del microscopio (40X) enfocando hasta ver nítidas las esporas y los campos de la cámara. El conteo de esporas se comenzó a partir del cuadro superior izquierdo como se muestra en la Figura 8B, repitiendo el proceso para todos los 5 cuadrantes Figura 8A y obteniendo el promedio general de los cuadrantes leídos.

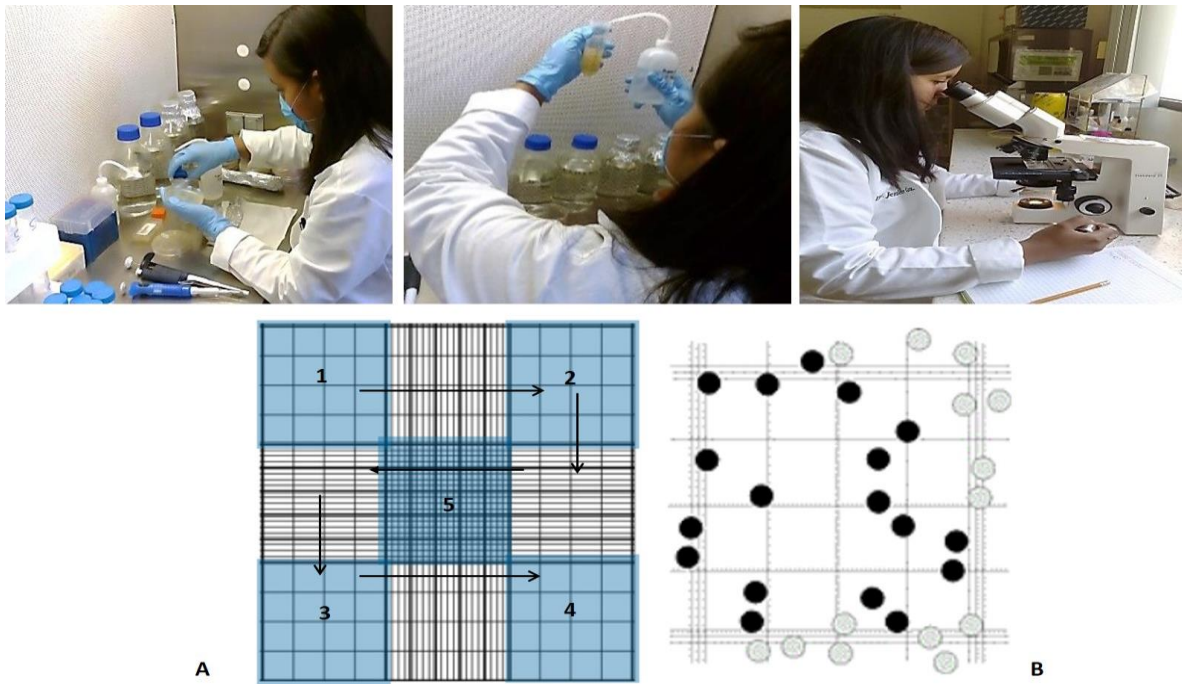


Figura 8. A) Esquema de campos de conteo de cámara de Neubauer; B) Forma correcta de conteo de esporas dentro de un cuadrante; las flechas indican el sentido de la lectura conforme se avanza en el conteo dentro de cuadrante.

El cálculo de la concentración de esporas se realizó con la fórmula 1:

$$\text{Concentración} = \bar{X} \text{ de esporas} \times 10,000 (\text{Factor de cámara}) \times \text{Vol. de la suspensión stock} \quad [1]$$

El factor de la cámara está dado por el volumen representado en cada cuadrante, es decir:

- Área= 1mm X 1mm= 1mm²
- Volumen= 1mm² X 0.1mm (profundidad)= 1x10⁻³mL

Una vez conocido el número de conidios existentes en el volumen inicial, se calculó el volumen a tomar para obtener la concentración deseada (Fórmula 2).

$$\text{Volumen requerido} = \frac{\text{Número de esporas deseadas} \times \text{Volumen del stock}}{\text{Número de esporas contenidas en stock}} \quad [2]$$

Una vez obtenido el inóculo y la concentración deseada se almacenó a 4°C en un contenedor de vidrio sellado con parafilm hasta su posterior uso.

Posterior a la cuenta de esporas, el sustrato [peatmoss 60% y 40% de tierra negra (Nutrigarden)] se esterilizó (121° C, 40 minutos) dos veces seguidas. En campana de flujo laminar, los semilleros correspondientes al tratamiento de infección antes de la siembra con suspensión de esporas, se llenaron con 50 g de sustrato por pozo y a cada pozo se les adicionó 5mL de suspensión de esporas, a los dos días de la infección del sustrato se sembraron las semillas.

Para el tratamiento correspondiente a la infección del sustrato antes de la siembra con agar, se realizó el mismo procedimiento; excepto que el micelio estaba en el agar. Para esto se cortaron cilindros de agar de 1.4 cm con ayuda de un tubo de ensayo estéril. Los cilindros con esporas se depositaron en cada pozo con sustrato humedecido previamente solo con agua estéril y se cubrieron con más sustrato. Dos días después de la infección del sustrato se sembraron las semillas.

La infección después de la siembra ocurrió a la inversa. Las semillas se sembraron al mismo tiempo que los tratamientos antes descritos. El protocolo de infección se hizo siguiendo el mismo procedimiento que el anterior, excepto que la inoculación con el fitopatógeno se colocó después de 5 días de que la semilla fue sembrada.

Después de la siembra y cada siete días se registró el número de plántulas emergidas por tratamiento, así como su crecimiento (cm). Estas mediciones se realizaron 6 veces. Se realizó un análisis de varianza de dos factores para comparar el número de plántulas emergidas entre tratamientos. Un factor se consideró al momento de la infección (antes y después) y el otro factor fue la forma de infección (suspensión y agar). Se realizó un análisis de varianza para detectar diferencias significativas entre tratamientos y la prueba de Tukey, al 5% de probabilidad, para definir el mejor tratamiento. Respecto al crecimiento de las plántulas, se realizó un análisis de sobrevivencia considerando el crecimiento en cm como variable de respuesta. Los factores fueron los ya mencionados.

RESULTADOS

ETAPA 1

Caracterización molecular

La amplificación para los oligonucleótidos utilizados fue la esperada, las bandas obtenidas amplificaron a 600pb. El análisis con la herramienta BLASTn de la secuencia ITS obtenida (Figura 9), mostró 99% de identidad con las secuencias de *F. oxysporum* depositada en el GenBank con el número de acceso KU097320.

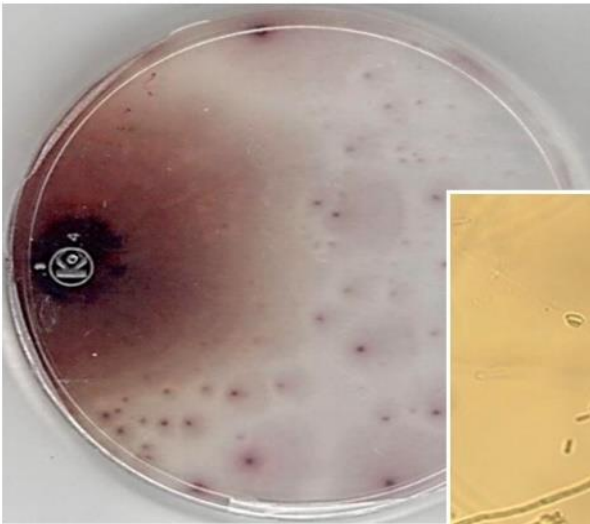
```
CTCKACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTG
CCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTC
TGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA
TTTCAACCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCCGGC
CCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCTCGCAACTGG
TACGCGGCGCGGCCAAGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA
ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAARGCGGRRGGAAAGA
```

Figura 9. Secuencia obtenida a partir del producto de PCR de la cepa de *Fusarium*.

Caracterización morfológica de las cepas de hongos

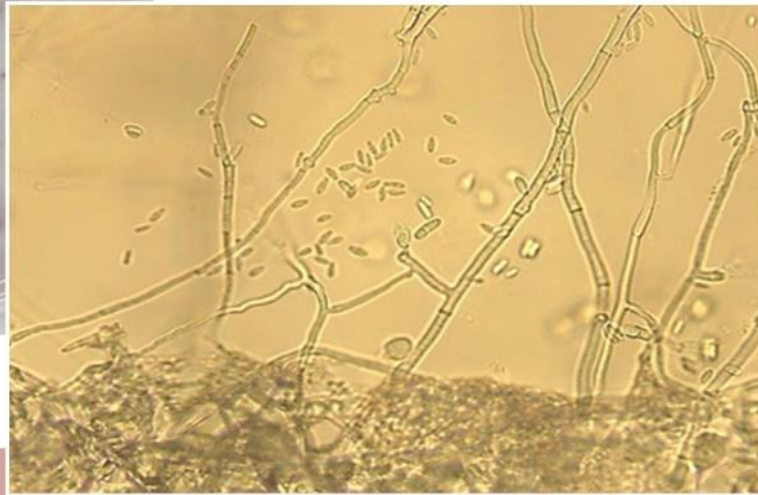
En la Figura 10 se presenta una descripción de las características macro y microscópicas observadas en el desarrollo individual de A) *F. oxysporum*, B) *C. rosea* y C) *T. harzianum* en cajas Petri conteniendo medio PDA e incubadas a una temperatura promedio de 25 °C durante 15 días.

A)



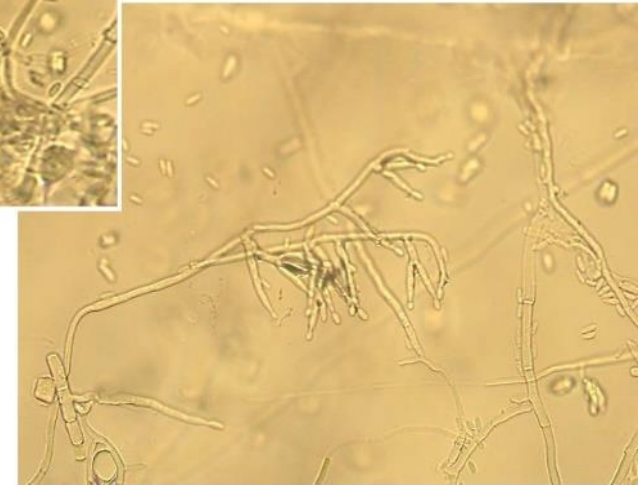
Macroscópicas

La colonia en medio PDA presenta un color morado intenso, micelio filamentoso, aéreo y abundante de color blanco, superficie elevada, textura algodonosa.

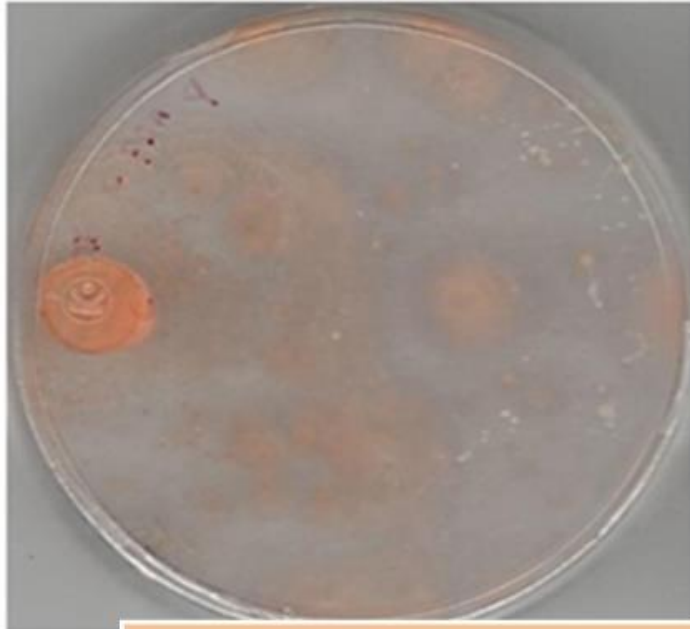


Microscópicas

Hifas hialinas septadas, microconidios abundantes en forma de media luna, conidióforos con fiálides ramificadas.

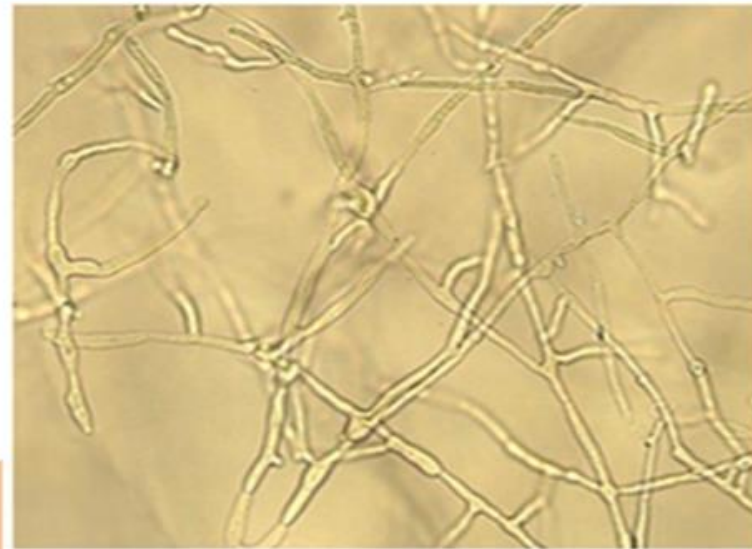


B)



Macroscópicas

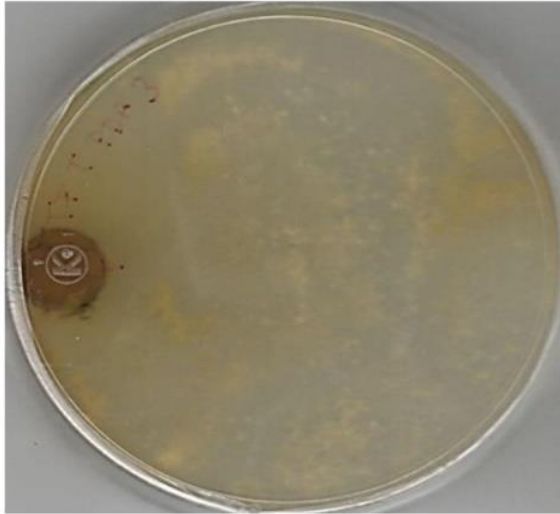
Micelio filamentoso aéreo color salmón pálido.



Microscópicas

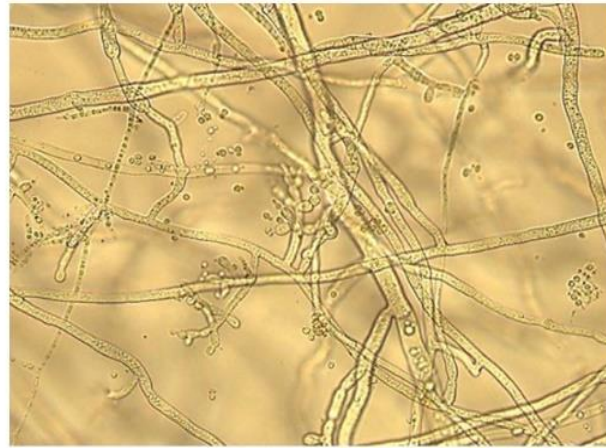
Cepas hialinas, cenocíticas en forma de raqueta y lineales.

C)



Macroscópicas

Micelio abundante color verde. Aspecto granuloso.



Microscópicas

Hifas cenocíticas con presencia de células internas, microconidios abundantes, forma globosa, fiálides ramificadas en forma de botella

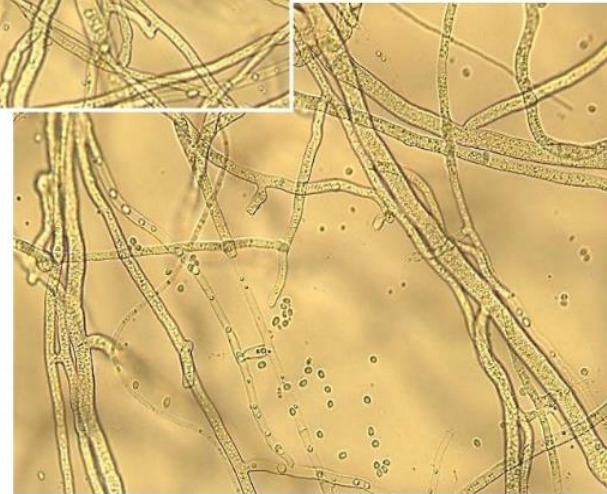


Figura 10. Descripción de características macro y microscópicas. A) *F. oxysporum*; B) *C. rosea*; C) *T. harzianum*.

Velocidad de crecimiento de *F. oxysporum*, *T. harzianum* y *C. rosea*

Se observa un desarrollo gradual del crecimiento radial en cada cepa, el promedio en cm fue para *C. rosea* 1.08, *F. oxysporum* 1.46 y 4.89 para *T. harzianum* (Figura 11), durante un ensayo de 9 días. Asimismo, se nota que la cepa de *T. harzianum* tiene una velocidad mayor a los dos restantes, seguido de *F. oxysporum* y finalmente *C. rosea*. De esta manera las disposiciones de los cilindros de agar se cumplieron de acuerdo al protocolo establecido.

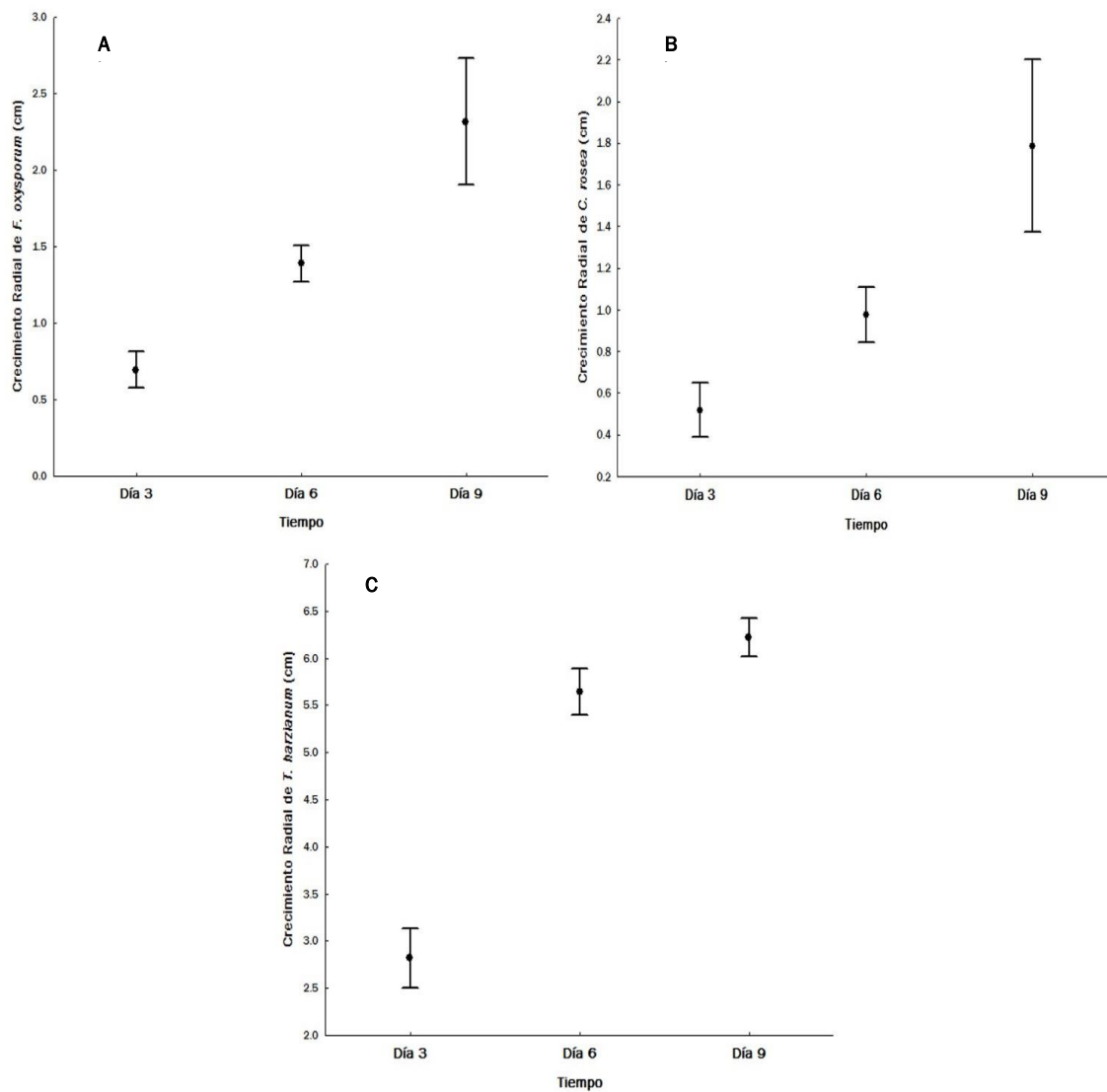


Figura 11. Velocidad de crecimiento de A) *C. rosea*; B) *F. oxysporum*; C) *T. harzianum*.

Crecimiento radial de *F. oxysporum* en confrontación con *C. rosea* y *T. harzianum*

En promedio el crecimiento radial del halo de *F. oxysporum* fue afectado por la interacción individual de los antagonistas *C. rosea* (Figura 12) $F(1,16) = 17.35, P < 0.05$ y por *T. harzianum* $F(1,16) = 7.36, P < 0.05$ (Figura 13), mostrando una disminución en el crecimiento cuando el antagonista se encontraba presente. Por otro lado, el tiempo afectó de manera positiva el crecimiento radial de *F. oxysporum* (Figura 14) $F(2,72) = 27.54, P < 0.05$ observándose crecimiento progresivo, obteniéndose el mayor punto de crecimiento a los nueve días de interacción.

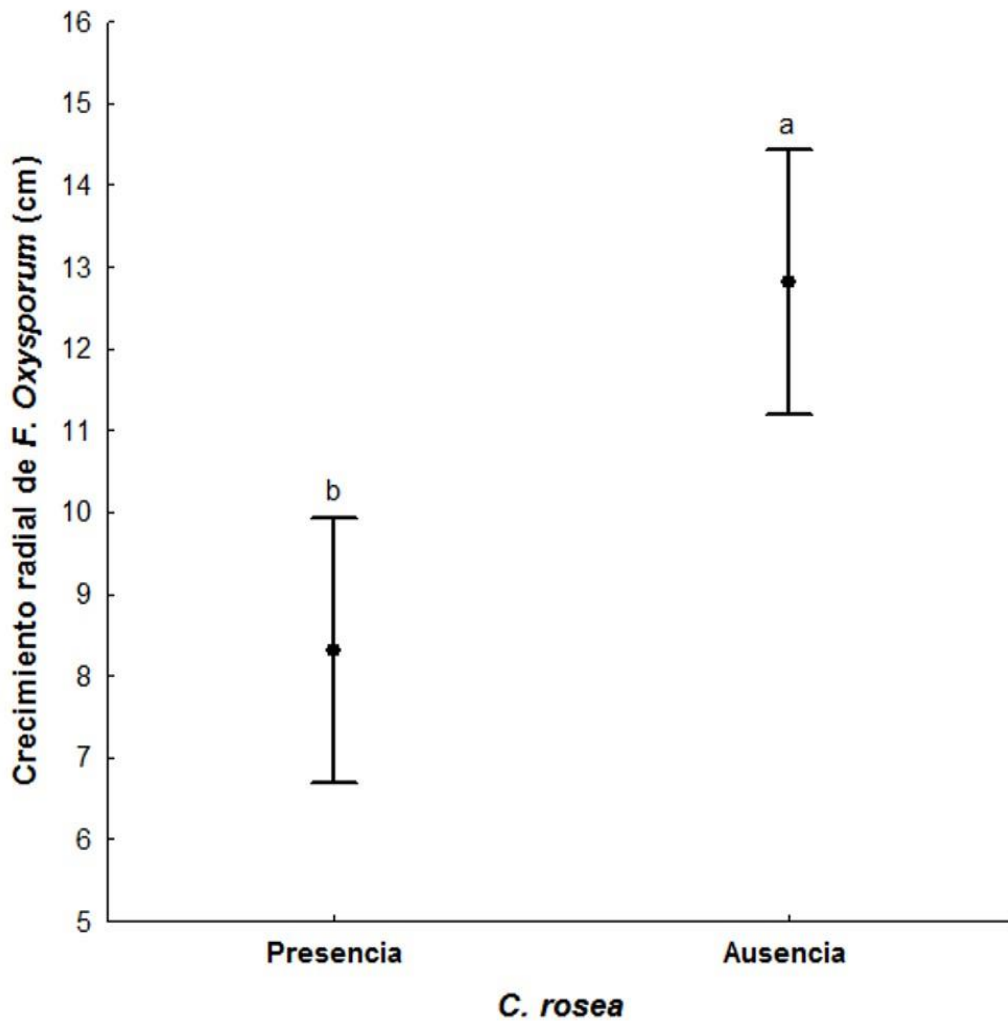


Figura 12. Confrontación de *F. oxysporum* contra *C. rosea*, crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.

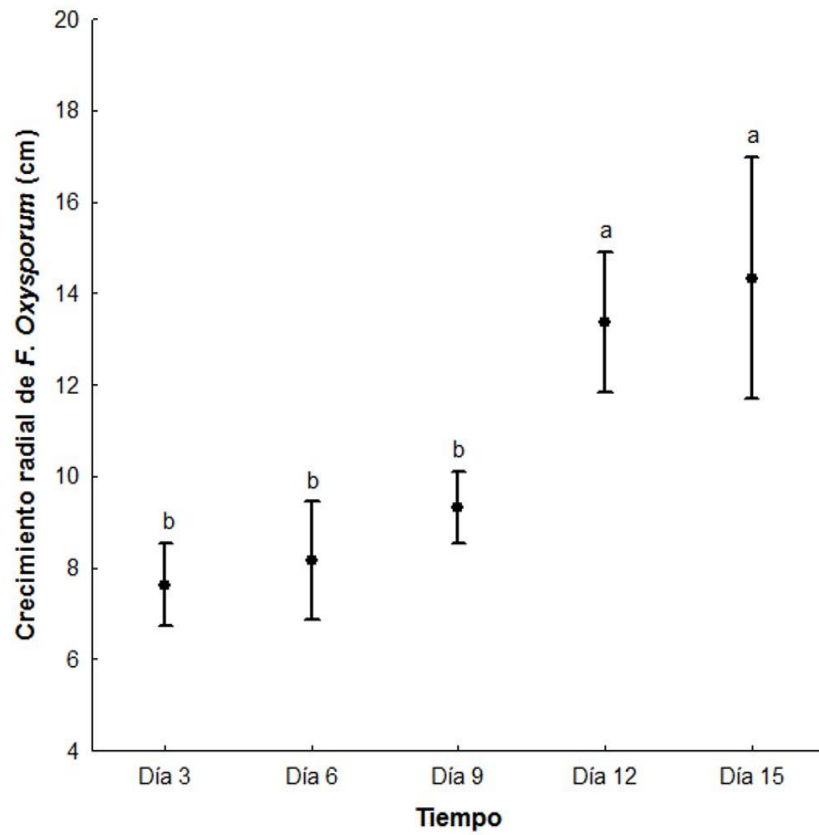


Figura 14. Crecimiento promedio (cm) durante distintos momentos.

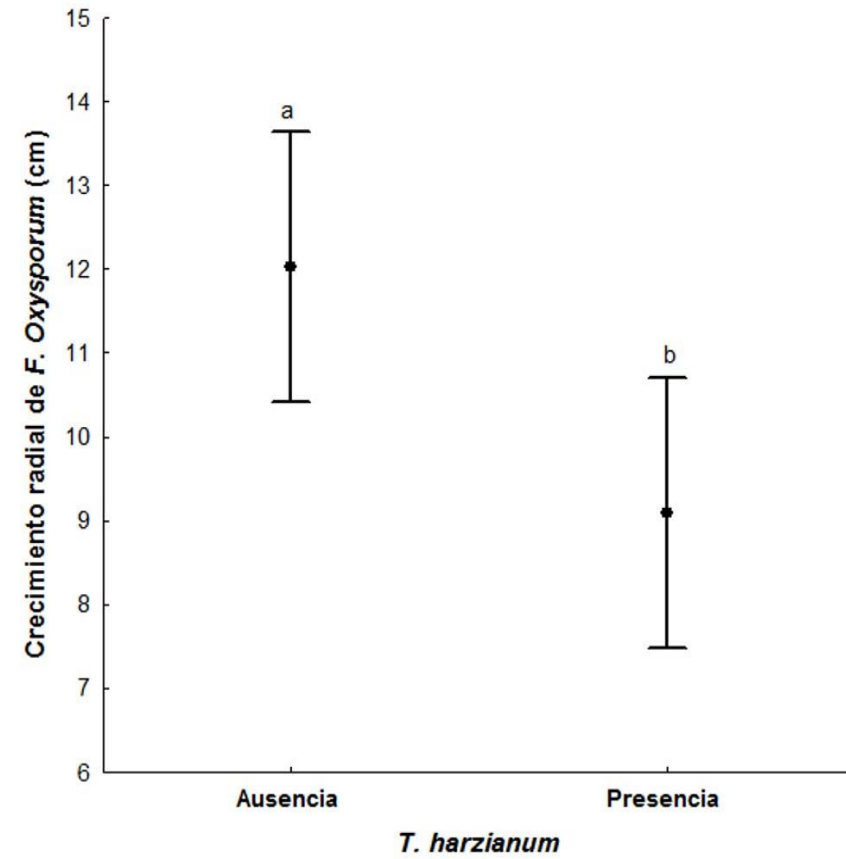


Figura 13. Confrontación de *F. oxysporum* contra *T. harzianum*, crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.

Los resultados correspondientes al promedio de las mediciones del crecimiento micelial de los hongos bajo distintas interacciones, así como el porcentaje de inhibición de los hongos antagonistas sobre *F. oxysporum* se muestran en el cuadro 5.

El enfrentamiento de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* presentó los índices más bajos de inhibición de crecimiento micelial a los quince días de confrontación con un porcentaje de 33.06%. Sin embargo, se puede notar que el porcentaje de inhibición mayor se alcanza cuando *F. oxysporum* interactúa con *C. rosea* y *T. harzianum* de forma conjunta obteniéndose una inhibición de 48.41% del patógeno, demostrando así que ese fue el mejor tratamiento obtenido seguido de la interacción entre *C. rosea* con una inhibición de 43.27%.

Cuadro 5. Crecimiento radial en cm de *F. oxysporum*, *T. harzianum* y *C. rosea* y respectivo control, así como el porcentaje de inhibición de *F. oxysporum*.

Interacción	<i>F. oxysporum</i> (cm)	<i>T. harzianum</i> (cm)	<i>C. rosea</i> (cm)	% Inhibición
<i>C. rosea</i> - <i>F. oxysporum</i>	8.70	-	20.21	43.27
<i>T. harzianum</i> - <i>F. oxysporum</i>	10.27	19.38	-	33.06
<i>C. rosea</i> - <i>T. harzianum</i> - <i>F. oxysporum</i>	7.91	13.79	17.75	48.41
<i>C. rosea</i> - <i>T. harzianum</i>	-	21.06	19.60	-
Control <i>F. oxysporum</i>	15.34	-	-	-
Control <i>T. harzianum</i>	-	42.95	-	-
Control <i>C. rosea</i>	-	-	23.79	-

En la figura 15, se muestra el aspecto del crecimiento de cada cepa del hongo antagonista al ser confrontada con el fitopatógeno. A simple vista se nota una mayor disminución del crecimiento radial de *F. oxysporum* cuando este es confrontado con ambas cepas al mismo tiempo, en segundo lugar, queda la confrontación con *C. rosea* y por ultimo *T. harzianum*. Esto confirma los porcentajes obtenidos en las mediciones realizadas en los tratamientos.

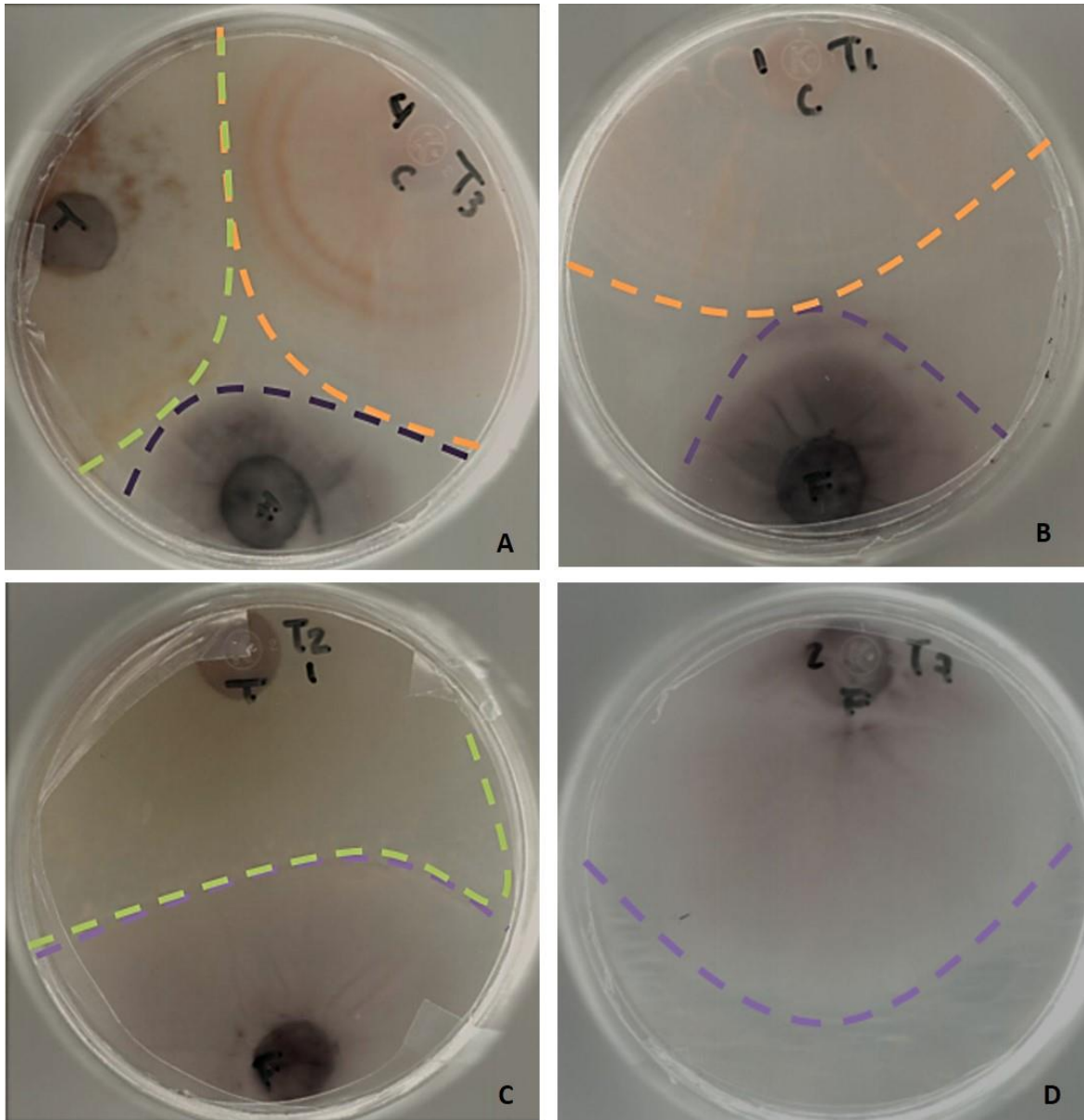


Figura 15. Aspecto de confrontaciones en caja Petri, las líneas punteadas señalan el crecimiento radial de cada hongo. A) Confrontación triple con *C. rosea*, *T. harzianum* y *F. oxysporum*; B) *C. rosea*/*F. oxysporum*; C) *T. harzianum*/*F. oxysporum*; D) Control *F. oxysporum*

Crecimiento radial de *C. rosea* en confrontación con *F. oxysporum* y *T. harzianum*

Similar a los resultados obtenidos para los efectos vistos sobre el crecimiento del fitopatógeno, *C. rosea* se vio afectado al tener interacción con *F. oxysporum* (Figura 16) $F(1,16) = 34.33$ $P < 0.05$ disminuyendo el crecimiento radial 2.71 cm cuando el fitopatógeno se encontraba presente y una disminución de 3.33 cm con la presencia del antagonista *T. harzianum* (Figura 17) $F(1,16) = 51.36$ $P < 0.05$.

Así mismo el crecimiento radial tuvo una influencia positiva y progresiva a través del tiempo hasta el final del experimento (Figura 18) $F(4,64) = 678.94$ $P < 0.05$ con un promedio de 12.55, 13.00, 21.05, 25.80 y 29.28 cm durante los días 3, 6, 9, 12 y 15 respectivamente.

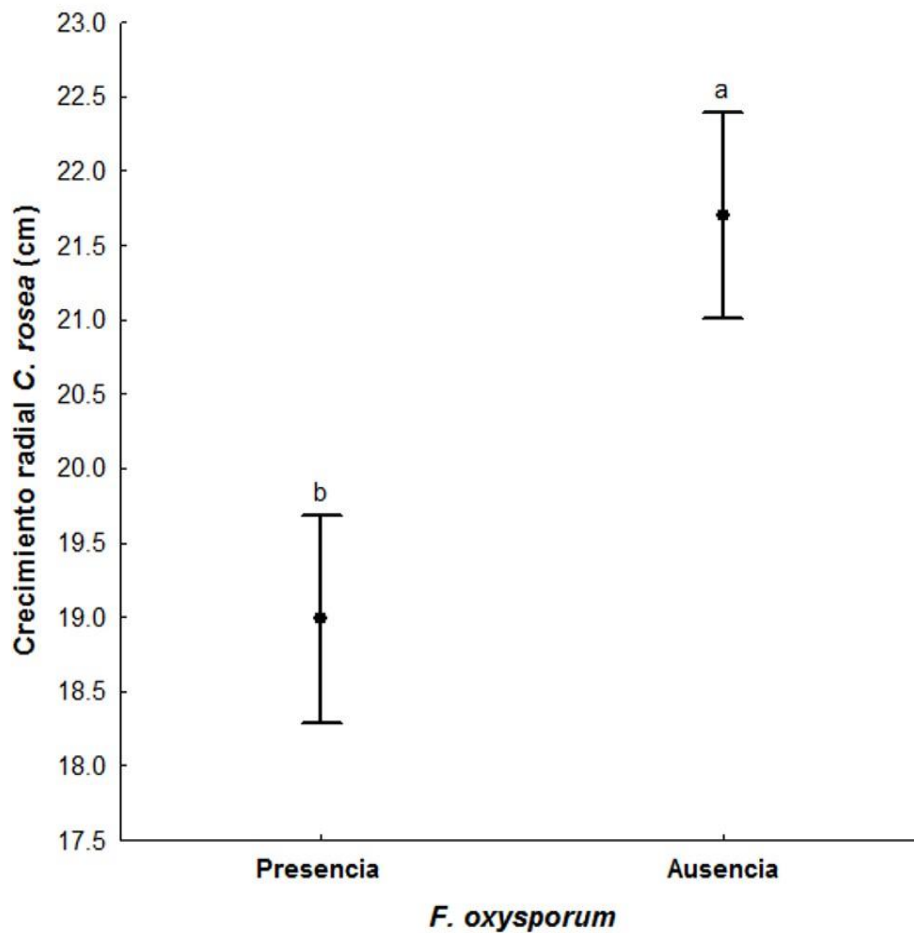


Figura 16. Confrontación de *C. rosea* contra *F. oxysporum*, crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.

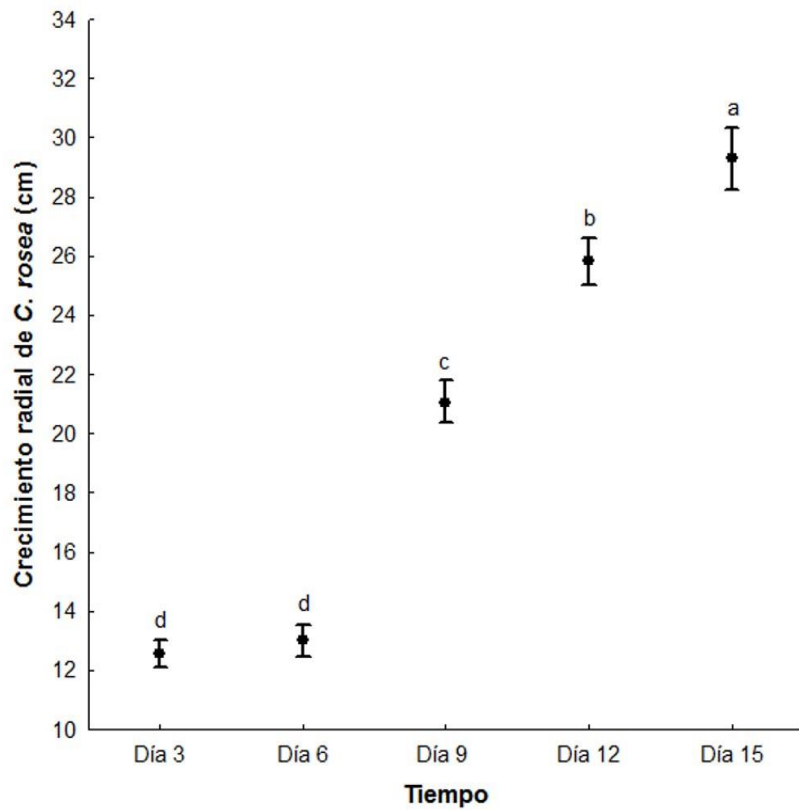


Figura 18. Crecimiento promedio (cm) durante distintos momentos.

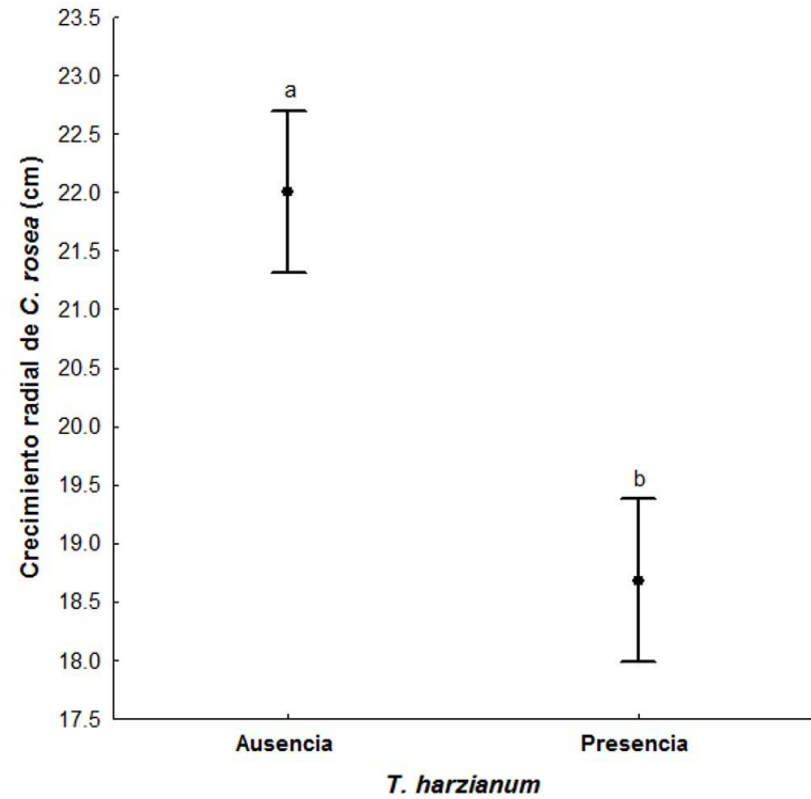


Figura 17. Confrontación de *C. rosea* contra *T. harzianum*, crecimiento promedio (cm) a los 15 días de interacción.

Crecimiento radial de *T. harzianum* en confrontación con *F. oxysporum* y *C. rosea*

De manera simultánea el análisis se realizó también para el antagonista *T. harzianum*, observándose una disminución de 17.81 cm en su crecimiento causado por *F. oxysporum* (Figura 19) $F(1,16) = 578.10$ $P < 0.05$ y de manera similar el agente antagónico *C. rosea* causó diferencia de 13.74 cm cuando este se encuentra en interacción $F(1,16) = 456.85$ $P < 0.05$ (Figura 20).

La interacción entre el fitopatógeno y el antagonista *C. rosea* afectaron también el crecimiento de *T. harzianum* (Figura 21) $F(1,16) = 163.88$ $P < 0.05$, cuando estos dos hongos están presentes, el crecimiento se reduce a 13.0 cm en quince días, comparado con el control donde se observa un crecimiento de 24.29 cm en promedio en el mismo tiempo. El tiempo de interacción influyó positivamente (Figura 22) $F(4,64) = 224.52$ $P < 0.05$ con un crecimiento de 12.76, 21.62, 23.8, 29.79 y 33.49 cm durante los días 3, 6, 9, 12 y 15 respectivamente.

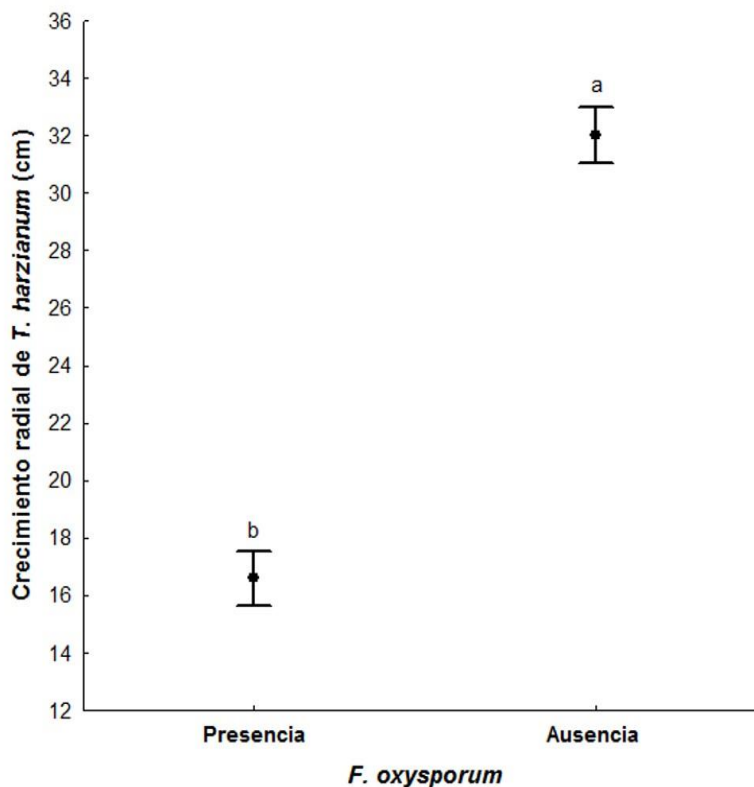


Figura 19. Confrontación de *T. harzianum* contra *F.oxysporum*, crecimiento promedio (cm) durante 15 días de interacción.

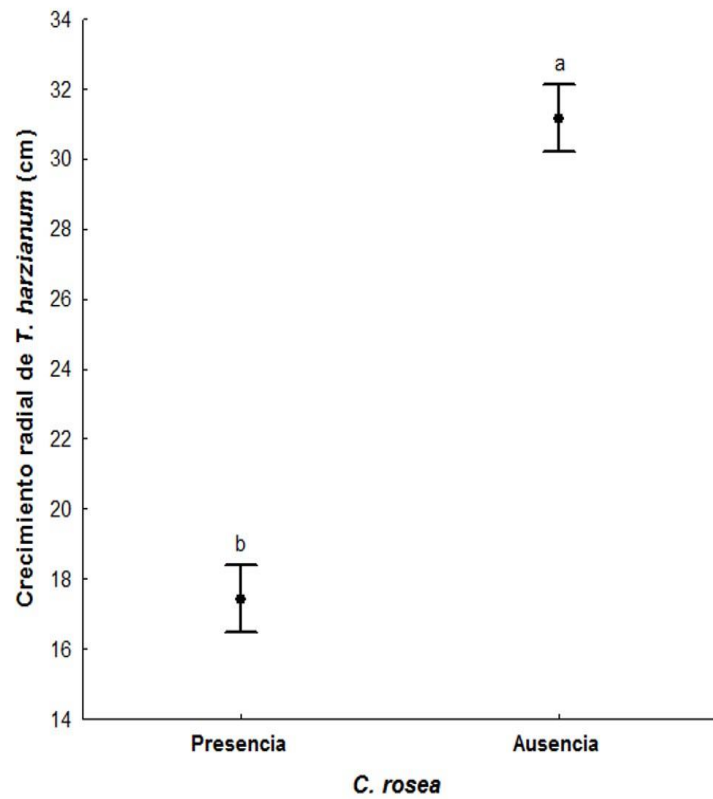


Figura 20. Confrontación de *C. rosea* contra *T. harzianum*, crecimiento promedio (cm) durante 15 días de interacción.

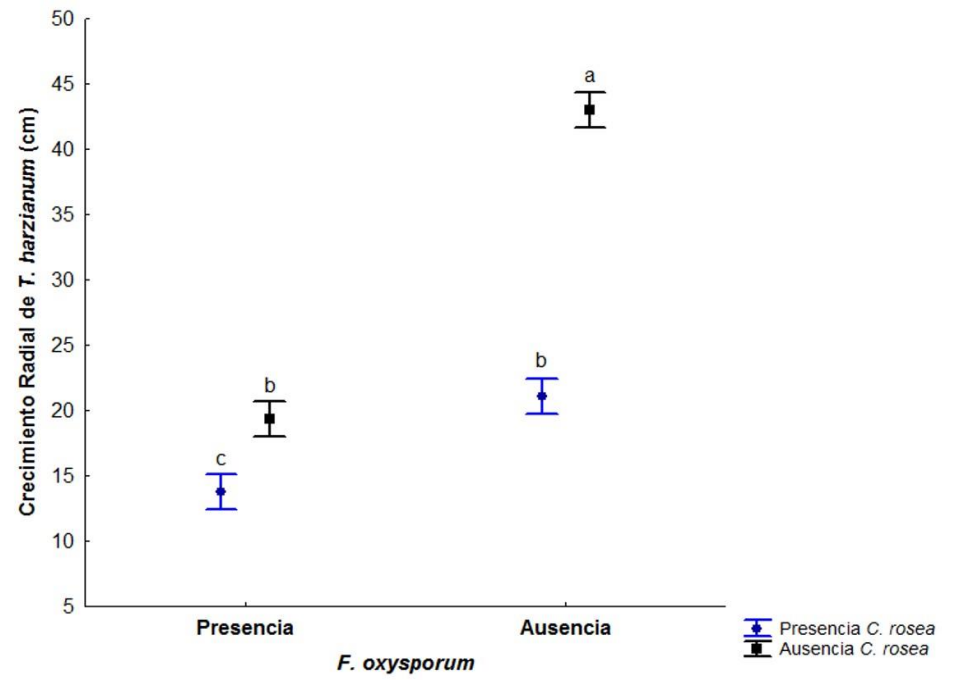


Figura 21. Confrontación de *C. rosea* y *F. oxysporum* contra *T. harzianum*, crecimiento promedio (cm) durante 15 días de interacción.

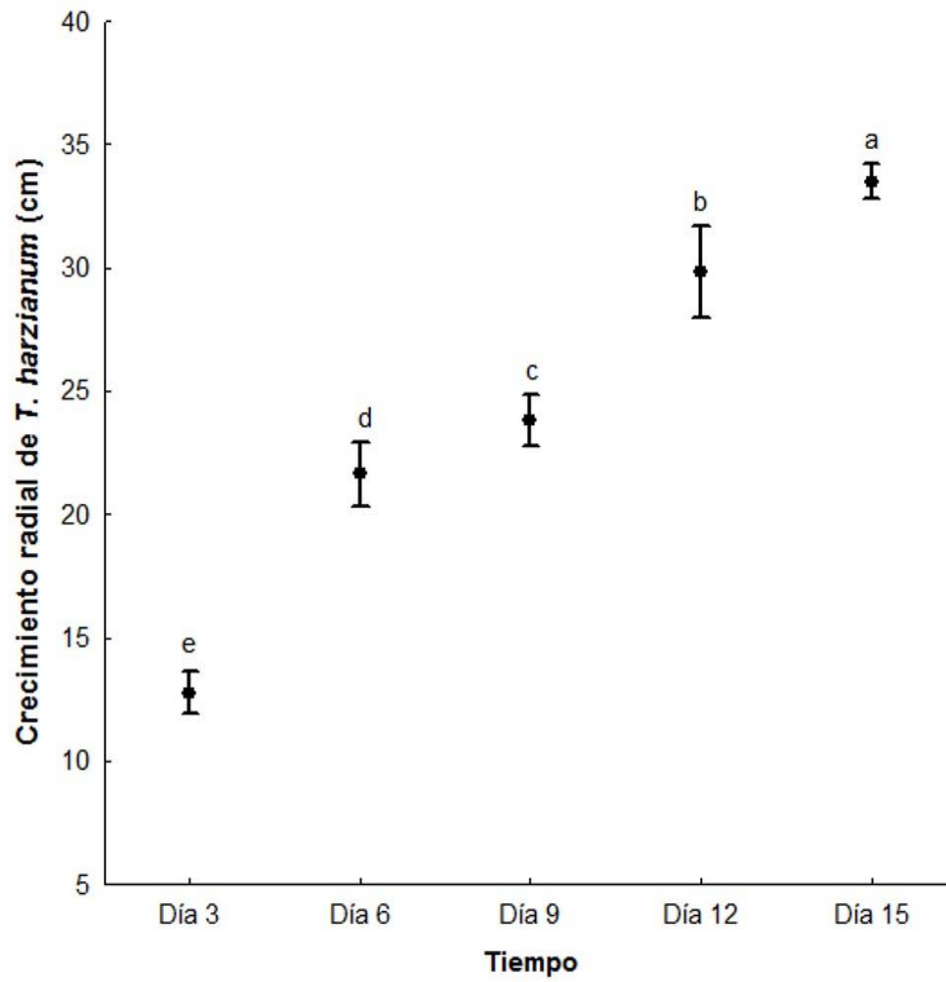


Figura 22. Crecimiento promedio (cm) durante distintos momentos.

ETAPA 2

Técnicas de inoculación

Los resultados muestran que el tratamiento con mejor respuesta de infección de plántulas, es inoculando solución con esporas antes de la siembra de semilla de cebolla, ($F(3,100) = 9.1588, P < 0.05$). En la figura 23, se muestra el comportamiento de las plántulas emergidas, notándose un menor desarrollo de estas con un promedio de 7.9 cm de crecimiento máximo en comparación con 9.8 cm de crecimiento en el tratamiento control. Los tratamientos restantes demuestran un comportamiento muy similar entre ellos, no habiendo diferencia alguna.

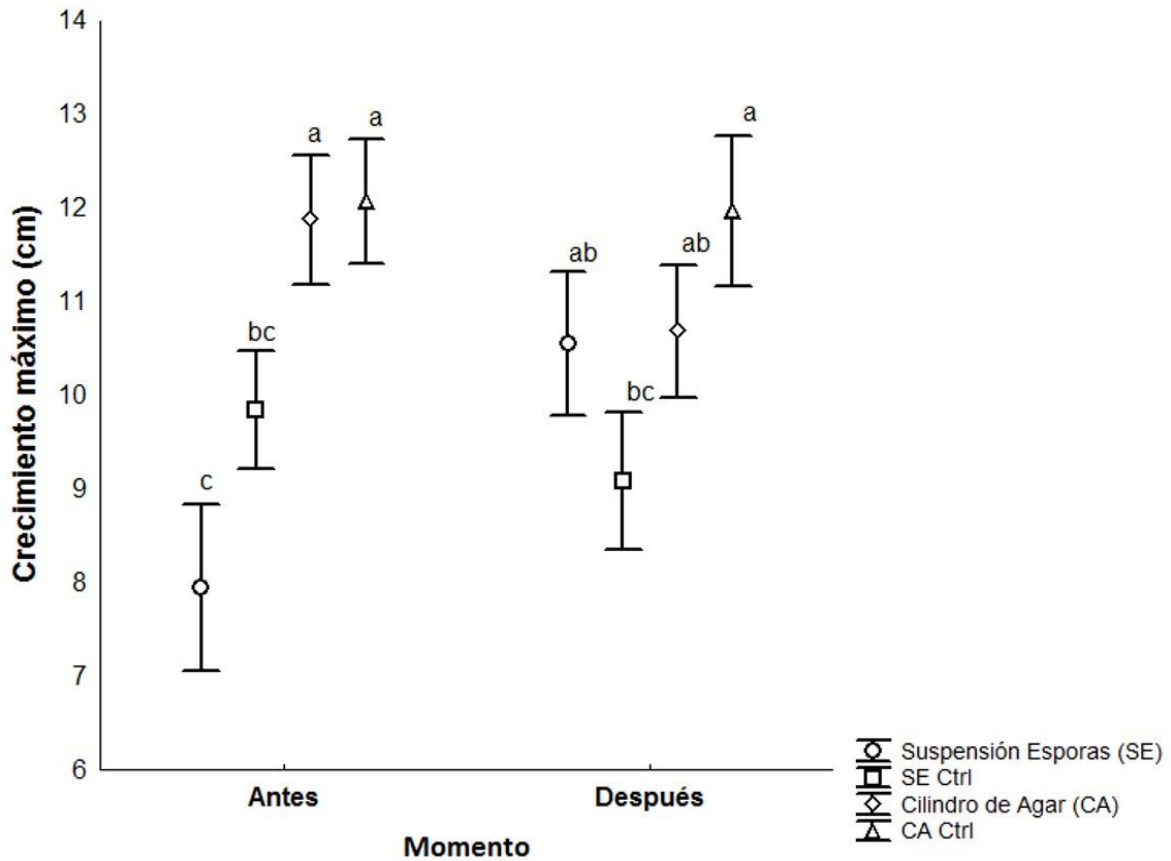


Figura 23. Crecimiento máximo de plántulas en cada tratamiento en distintos momentos, así como respectivos controles.

Se realizó también un análisis de supervivencia, Figura 24, el cual demuestra la proporción de semillas germinadas durante determinado tiempo y bajo ciertos tratamientos. Los resultados arrojan que ciertamente la proporción en el tratamiento 1, inoculación de esporas antes de la siembra de semillas, es en la que se tiene menor cantidad de semillas emergidas en el tiempo en comparación con los demás tratamientos los cuales su comportamiento es similar.

En las figuras 25 y 26 se muestran fotografías del aspecto de las plántulas en el tratamiento 1 así como sin control, dentro del cual se obtuvieron menor cantidad de semillas sin germinar.

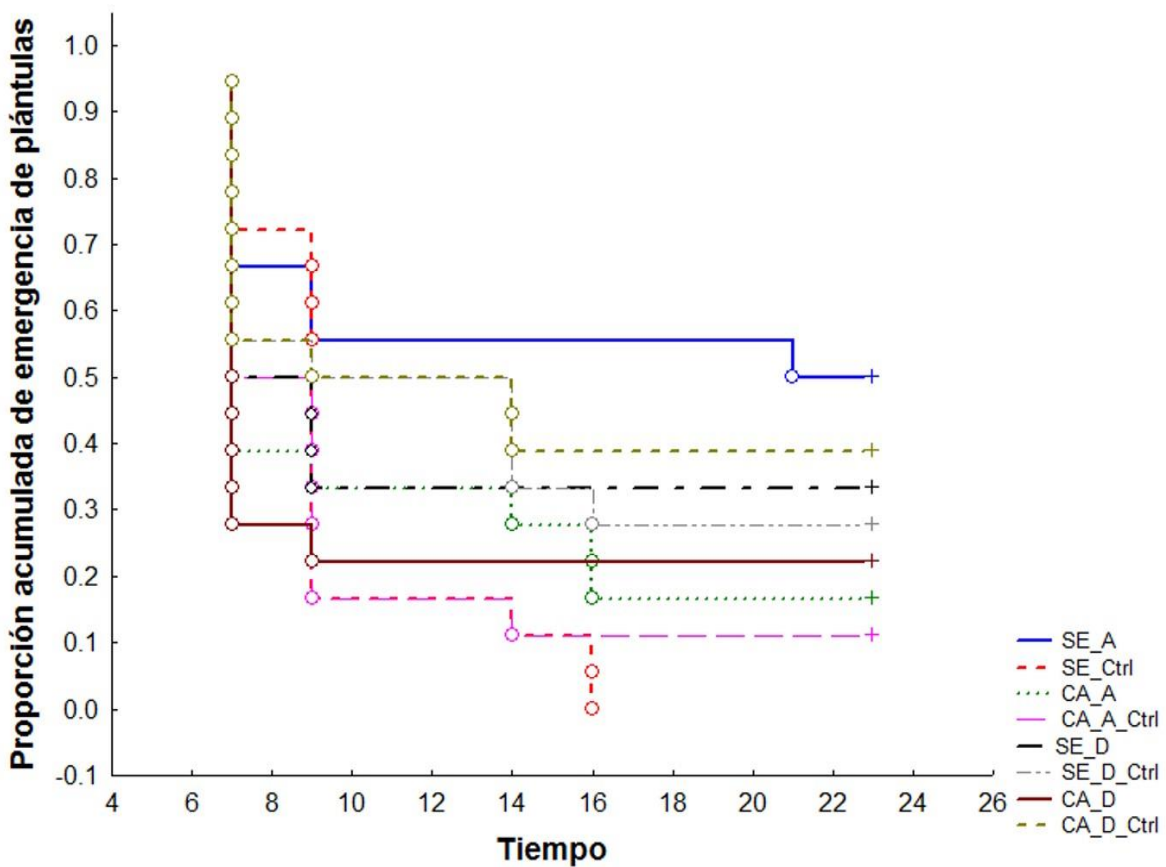


Figura 24. Proporción acumulada de plántulas emergidas en todos los tratamientos, así como respectivos controles.



Figura 25. Aspecto de plántulas en tratamiento 1.



Figura 26. Aspecto de plántulas en tratamiento control 1.

DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado para determinar la presencia de antagonismo de forma individual y combinada de dos hongos antagónicos *C. rosea* y *T. harzianum* frente a uno de los agentes fungales más relevantes por su patogenicidad y su amplio rango de hospederos en la naturaleza, *Fusarium oxysporum*. De acuerdo a las pruebas experimentales *in vitro* y a la comparación de medias de los promedios de crecimiento radial, se pudo comprobar que la interacción con *Clonostachys rosea* y *Trichoderma harzianum* presenta de 48.41% de inhibición en el desarrollo radial de *Fusarium oxysporum*.

A pesar de que *T. harzianum* coloniza más de la mitad del medio de cultivo en las placas Petri en confrontación con *F. oxysporum* y presenta en todos los tratamientos los índices más altos de velocidad de crecimiento micelial a los 9 días de interacción, sobrepasando los promedios de *C. rosea* y *F. oxysporum*, el porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* es menor al que se obtiene en confrontación con *C. rosea*.

Estos resultados son consistentes con estudios previos donde se informa que cepas de *Trichoderma*, inhiben el crecimiento de patógenos como un mecanismo de control biológico (Benítez *et al.*, 2004) y que su velocidad de crecimiento es rápida en comparación con otros hongos antagónicos o fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008) y por lo tanto es mayor su capacidad de colonización del substrato (Elías *et al.*, 1993). Se ha demostrado que *Trichoderma* es un buen organismo controlador, ya que derivado de su metabolismo se producen moléculas tóxicas volátiles y enzimas líticas capaces de dañar polímeros mayoritarios como quitina y β -1-3-glucanos que son parte estructural de la pared celular de hongos fitopatógenos (Michel *et al.*, 2005). Existen reportes sobre cepas de *Trichoderma* que muestran valores del 22.5 al 86.44% de inhibición contra la cepa de *Fusarium* (Paez y Sanabria, 2007; Chakraborty y Chatterjee, 2008); la cepa utilizada en estos trabajos presentó valores inhibitorios estimados similares a los registrados en el presente estudio en contra de *F. oxysporum*.

Clonostachys rosea presentó valores de crecimiento mayores a los de *F. oxysporum*. Por lo tanto, obtiene el segundo lugar en inhibición del crecimiento del fitopatógeno con un porcentaje del 43.27%. Existen reportes donde se comprueba la capacidad de esta cepa para crecer de manera rápida y de producir conidios en poco tiempo (Anwar *et al.*, 2018), y al igual que *T. harzianum* es capaz de absorber y metabolizar los compuestos del medio y de esta manera crecer más rápido en comparación con *F. oxysporum*.

Salomé en 2012, informa que dos cepas de *C. rosea* UDC-A10 y ADC-A11 reducen en 54% y 71% respectivamente al fitopatógeno *Botrytis cinerea* en estacas de *Eucalyptus globulus* pudiéndose observar el mecanismo micoparásito en estructuras de germinación; sin embargo, en ninguno de los dos aislamientos probados mostraron mecanismo micoparásito, ya que no se observó interacción hifal entre los hongos, ambas cepas antagónicas utilizadas en este ensayo no presentan tendencia a dominar al fitopatógeno sin un crecimiento visible sobre el micelio de *F. oxysporum*; sino más bien a través de la formación de un halo de inhibición del crecimiento frente a la cepa patógena la cual pareciera tener un efecto fungistático o antibiótico. En el presente estudio en todas las interacciones se logra observar que el crecimiento de *C. rosea* y *T. harzianum* se detiene en cuanto entran en contacto con *F. oxysporum* sin invadir al micelio del patógeno. Esta capacidad de rápida colonización del medio y alta tasa de crecimiento micelial que presentan ambos géneros es característica de los mecanismos de biocontrol que están ejerciendo en la interacción como, competencia por sustrato y espacio (Madriz, 2002) y por la producción de metabolitos secundarios como tricodermina, tricotoxina, alamecina, glisoprenina y enzimas líticas, las cuales pudieran estar involucradas en el halo de inhibición que se nota en cada confrontación.

Por otro lado, se consideró también la velocidad de crecimiento de las tres cepas tratadas sobre el medio PDA, por lo tanto, en los ensayos duales se decidió inocular la cepa de *F. oxysporum* inicialmente, dos días después *C. rosea* y finalmente cuatro días después de la inoculación del fitopatógeno *T. harzianum*, para evitar valores de inhibición elevados por el efecto de la velocidad de crecimiento de los hongos utilizados.

Un criterio importante para determinar la capacidad antagónica es la acción rápida de *T. harzianum* y *C. rosea* para contrarrestar a *F. oxysporum* y poder ejercer mecanismos de control. El ensayo dual es un método rápido y directo que permite estimar el antagonismo de hongos contra fitopatógenos; sin embargo, el porcentaje de inhibición depende del parámetro a medir. En este caso de acuerdo a la velocidad de crecimiento *T. harzianum* presenta los valores mayores, pero de acuerdo al porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum*, *C. rosea* predomina sobre *T. harzianum* ejerciendo un mayor control del fitopatógeno tratado; sin embargo, al ser puestos en interacción triple, el valor de inhibición del crecimiento radial del fitopatógeno aumenta un 5.41% más que la interacción con *C. rosea* y un 15.35% más que cuando se encuentra en interacción con *T. harzianum*.

Existe una amplia gama de interacciones entre especies que son moduladas por factores bióticos y abióticos, entre algunas por mencionar se encuentra la relación sinérgica, antagónica,

así como competencia tanto física como bioquímica. Generalmente en la rizósfera es donde se encuentran principalmente microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, biocontroladores y especies patógenas, quienes comúnmente compiten por espacio y nutrientes. Microorganismos del género *Clonostachys* y *Trichoderma* son catalogados como agentes de biocontrol que en conjunto pueden presentar efectos sinérgicos contra agentes patógenos y potencializan los beneficios de protección producidos en las plantas. Esto se puede extrapolar al sistema que en este proyecto se ha realizado, al elaborar un microambiente de forma *in vitro* en cajas de Petri, proporcionando los elementos necesarios y funcionales para el desarrollo de sus actividades como antagonistas de fitopatógenos como *F. oxysporum*. Estos dos hongos antagonísticos presentan actividad sinérgica en contra de *F. oxysporum* como lo denota el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno.

Fusarium oxysporum muestra evidencia de muerte por inanición que es lo más común en microorganismos que compiten por nutrientes limitantes. Esta evidencia se ejemplifica con la actividad de competencia por nutrientes que ambos géneros antagonísticos *Clonostachys* y *Trichoderma* presentan, ya que ambos son hongos filamentosos que necesitan de una fuente de hierro para cubrir sus necesidades. Cuando en el ambiente se presentan deficiencias de hierro, estos hongos antagonísticos excretan agentes quelantes llamados sideróforos, que le permiten tomar el hierro en forma reducida (Eisendle *et al.*, 2004).

De manera simultánea las evidencias en los resultados muestran que otra actividad sinérgica de control ejercida por los antagonistas fue antibiosis, al excretar al medio compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos que inhiben el crecimiento de *F. oxysporum*. Algunos de estos compuestos que pudieran tener interferencia en el halo de inhibición formado en las cajas de Petri son ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptabioles, antibióticos, 6-pentyl α pirona, viridina, gliovirina o glisopreninas, dentro de las cuales algunas ya han sido reportadas y otras están siendo descritas (Vinale *et al.*, 2008).

Esta interacción sinérgica observada con *F. oxysporum*, es comparable con los resultados obtenidos por Carreño *et al.*, (2006), contra el fitopatógeno *Phytophthora cactorum* en cultivo de manzano suprimiendo la enfermedad en 68% con cepas de *Clonostachys* y *Trichoderma* seleccionadas bajo criterios solo de comportamiento en variaciones de temperatura. Ambos géneros demostraron su alta capacidad biocontroladora de *P. cactorum*, bajo condiciones de invernadero.

En cuanto a la segunda etapa de este trabajo, en lo referente a la evaluación de técnicas de infección, los resultados demuestran que la mejor técnica implementada es inocular esporas en solución a una concentración de $\frac{[1 \times 10^6]}{\text{mL}}$ previo a la siembra de las semillas. De acuerdo a trabajos anteriores, la Fusariosis en cebolla es una enfermedad que afecta principalmente en la etapa de almácigo, ya que la semilla y el suelo son los principales factores de inóculo para esta enfermedad (Özer y Köycü, 2004). Es por esto que el sustrato, al ser tratado previamente con una cantidad de esporas, afectaron directamente en la capacidad de germinación de las semillas modificando el medio en el que se encontraban y facilitando la acción de enzimas líticas que produce *F. oxysporum*, las cuales utiliza como estrategia para infectar la semilla. Posiblemente la semilla al entrar en etapa de germinación produzca exudados que estimulan el crecimiento de propágulos de *F. oxysporum* para infectar la semilla inhibiendo su desarrollo normal.

Por otra parte, no se observaron síntomas como coloración rojiza en raíz o pudrición basal en las plántulas que lograron emerger; sin embargo, la variable de comparación entre los tratamientos, fue el crecimiento aéreo de cada una de las plántulas y decoloración aérea. Donde hay una disminución notable entre el tratamiento 1 y su respectivo control, así como los tratamientos restantes. Al momento de inocular una cantidad de esporas en suspensión del fitopatógeno, la semilla logró emerger; sin embargo, no se desarrolló normalmente ya que *F. oxysporum* tiene como estrategia invadir las raíces penetrando la epidermis con ayuda de movimientos mecánicos y químicos con enzimas líticas y dado que las raíces comienzan su desarrollo, le facilita al fitopatógeno penetrar de una manera más sencilla (Klokocar, 2008), una vez dentro, este comenzó a afectar el sistema vascular de la raíz impidiendo la llegada de nutrientes y agua a toda la planta. Esta puede ser una posible explicación al hecho de su diferencia de tamaño, además de que se presenta amarillamiento y apariencia débil en la parte aérea. Estas observaciones realizadas concuerdan con un ensayo elaborado en esquejes de clavel invadidos con *R. solani* que presenta una estrategia similar para atacar a la planta y causar enfermedad. Los resultados obtenidos en este ensayo son semejantes, respecto a la longitud de la parte aérea, donde la acción patogénica de *R. solani* y *F. oxysporum* se manifiesta en el menor crecimiento de esquejes y plántulas respectivamente, así como un marchitamiento de la planta (Tovar, 2008).

CONCLUSIÓN

Los resultados de la primera etapa experimental muestran que el desarrollo *in vitro* del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* en presencia de los hongos *C. rosea* y *T. harzianum* en placas de agar se ve inhibido hasta en 40.1%. Este efecto inhibitorio puede estar asociado a los mecanismos de biocontrol como competencia por sustrato y espacio y antibiosis presentado por ambas cepas antagónicas del hongo fitopatógeno.

En la segunda etapa de la presente investigación se observa que la mejor metodología para implementar una infección de plántulas de cebolla por *F. oxysporum* es la inoculación de sustrato con esporas del fitopatógeno antes de la siembra de la semilla de cebolla.

PERSPECTIVAS

Para trabajos futuros evaluar la infección inducida de plántulas de cebolla con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* deberán considerar las condiciones experimentales de la presente investigación, inoculando previamente el sustrato donde serán sembradas las semillas o bien donde serán trasplantadas las cebollas para obtener los mejores resultados. De esta manera se podrá lograr el establecimiento de las infecciones inducidas para realizar evaluaciones de antagonismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adie B.A., Perez-Perez J., Perez-Perez M.M., Godoy M., y Sánchez-Serrano J.J., 2013. affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, *Antioxid. Redox Signal.* 19. 998–1011.
2. Anwar W., Ali S., Nawaz K., Iftikhar S., Javed A.M., Hashem A., Alqarawi A.A., Abd_Allah E.F., y Akhter A., 2018. Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). *Biocontrol Science and Technology*. University of the Punjab, Quaid-e-Azam Campus. Pakistan.
3. Babu A.G., Shim J., Shea P.J., y Byung-Taek O.H., 2014. *Penicillium aculeatum* PDR-4 and *Trichoderma* sp. PDR-16 promote phytoremediation of mine tailing soil and bioenergy production with Sorghum-Sudan grass, *Ecol. Engineering* 69 186–191.
4. Banco Mundial., 2016. [http:// datos.bancomundial.org/](http://datos.bancomundial.org/) (febrero de 2016).
5. Bayraktar H., y Dolar, F.S., 2011. Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 159:28-34.
6. Benhamou N., y Chet, I., 1997. Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum* *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (5):2095-2099.
7. Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C. y Codón A.C., 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains. Department of genetics university of Sevilla, Spain *International Microbiology* 7: 249-260.
8. Campos S.V., 2013. Patogenicidad de *Fusarium proliferatum* y la utilización de fungicidas en el tratamiento de semillas como control preventivo en la fase inicial de desarrollo del arroz (*Oryza sativa*).
9. Chatterton S., y Punja Z. K., 2009. Chitinase and beta-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 356–367.
10. Chávez R.A., y Aquino J.A.S., 2012. Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., y *Sclerotium* sp., con extractos vegetales. Departamento de

Protección Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

11. Chakraborty M.R., y Chatterjee N.C., 2008. Control of *Fusarium* Wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp., *Biología Plantarum* 52: 582-586, Holanda.
12. Clements M.J., y Kleinschmidt C.E., 2003. Evaluation of Inoculation Techniques for *Fusarium* Ear Rot and Fumonisin Contamination of Corn. Department of Crop Sciences, University of Illinois.
13. Constansa C.L., Sánchez L.C., Cuervo J., Bautista, D. González, L. Guevara, y M., 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp. bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis*. Universidad Nacional de Colombia. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.
14. Crammer C.S. 2000. Breeding and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica*, 115:159-166.
15. Cupull M.A., y Cisterna O.V. 1998. Control integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento. Efecto de los hongos antagonistas sobre el crecimiento de las plantas. *Agricultura Técnica* 58: s/p.
16. De Lima R.B., Dos Santos B.T., Esteves V.L.G., Lúcio F.M.L., Ferrarese F.O., Donattid L., Torres B.M.R., y Petkowicz C.L.O., 2014. Salt stress alters the cell wall polysaccharides and anatomy of coffee (*Coffea Arabica* L.) leaf cells. *Carbohydrate Polymers* 112. 686–694.
17. Degenkol T., Fog Nielsen K., Dieckmann R., Branco-Rocha F., Chaverri P., Samuels G. J., y Brückner H., 2015. Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* complex. *Chemistry & Biodiversity*, 12, 662–684.
18. Dissanayake M.L.M.C., Kashima R., Tanaka S., e Ito S., 2009. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J Gen Plant Pathol* 75:37-45.
19. Droby S., Wisniewski M., Teixidó N., Spadaro D., y Jijakli M.H., 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122:22-29.

20. Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Komoj M., Bissett J., Szakacs G., y Kubicek C.P., 2005. An Oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 813-828.
21. Du Toit L.J., Inglis D.A., y Pelter G.Q., 2003. *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*, 87:750-750.
22. Dubey M. K., Jensen D. F., y Karlsson M., 2014. An ATP-binding cassette pleiotropic drug transporter protein is required for xenobiotic tolerance and antagonism in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 725–732.
23. Eisendle M., Oberegger H., Buttinger R., Illmer P., y Haas H., 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk Cell* 3:561-563.
24. Eljounaidi K., Lee S.K., y Bae H., 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases. Review and future prospects. *Biol. Control*. 103:62-68.
25. Engle J.S., Madden L.V., y Lipps P.E., 2003. Evaluation of Inoculation Method to Determine Resistance Reactions of Wheat to *Fusarium graminearum*. Department of Plant Pathology, OARDC, The Ohio State University, Wooster 44691.
26. Espejo Q.F., Espinosa R.R., Puente I.M., Cupull S.R., y Rodríguez G.M., 2010. Efecto alelopático de *Tagetes erecta* L. y *Terminalia catappa* L. sobre *Rizhoctnia solani* (Kühn). Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés (UMSA). La Paz, Bolivia.
27. FAO., 2013. FAO Statistical Database (online) consultado en junio 2013.
28. Ferraz L. P., da Cunha T., da Silva A. C., Kupper K.C., 2016. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiol. Res.* 188-189:72-79.
29. Figàs M.R., Alfaro H.A., Font M.I., Borràs D., Casanova C., Hurtado, Prohens J.P., y Soler S., 2016. Inoculation of cucumber, melon and zucchini varieties with *Tomato leaf curl New Delhi virus* and evaluation of infection using different detection methods. Institut de Conservació i Millora de l'Agrodiversitat Valenciana, Universitat Politècnica de València, València, Spain.

30. Flores B.W., Chico R.J., y Cerna R.L., 2015. Actividad antagónica *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinérea*. Laboratorio de Fitopatología, Universidad Nacional de Trujillo-Perú. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas.
31. Galván G.A., Koning-Boucoiran C.F.S., Koopman W.J.M., Burger M.K., González P.H., Waalwijk C., Kik C., y Scholten O.E., 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal root in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*, 121:499-512.
32. Geraldine A.M., Lopes F.A.C., Carvalho D.D.C., Barbosa E.T., Rodrigues A.R., Brandão R.S., y Lobo J.M., 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 67, 308–316.
33. Harman G.E., 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96:190-194.
34. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., y Lorito M., 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
35. Hernández M.L.G., Rivas G.T., Romero B.M., Chiquito C.C.J., Ruiz E.F.H., y Chiquito C.R.G., 2018. Antagonistic Potential of Bacteria and Marine Yeast for the Control of Phytopathogenic fungi. Center for Biological Research of the Northwest, SC. La Paz, Baja California Sur, Mexico. CP. 23096.
36. Hoitink H.A.J., Madden L.V., y Dorrance A.E., 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organize matter quality. *Phytopathology* 96: 186-189.
37. Howell C.R, Stipanovic R.D., y Lumsden R., 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to biocontrol on cotton seedling diseases. *Biocontrol Science Technology* 3: 435-441.
38. Jaklitsch W.M., Samuels G.J., Dodd S.L., Lu B.S., y Druzhinina I.S., 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species whit and whitout warted conidia. *Studies in Mycology* 55:135-177.

39. Jeleń H., Błaszczak L., Chełkowski J., Rogowicz K., y Strakowska J., 2014. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress*, 13, 589–600.
40. Jun L.H., Xian G.L., Jun H.W., Wei S.S., Shu W., Su P.P., y Ting T.M., 2010. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculation Enhances Suppression of Cucumber *Fusarium* Wilt in Greenhouse Soils. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Joint Laboratory of Soil and the Environment, Hong Kong Baptist University & Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing China.
41. Klokocar S.Z., Levic J., Masirevic S., Grozdanovic V.J., Vasic M., y Aleksic S., 2008. *Fusarium* rot of onion and possible use of bioproduct. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 135-148.
42. Koike S.T., Gladders P., y Paulus A.O., 2007. *Vegetable Diseases: A Color Handbook*, Gulf Professional Publishing. 448p.
43. Kosawang C., Karlsson M., Jensen D.F., Dilokpimol A., y Collinge D.B., 2014. Transcriptomic profiling to identify genes involved in *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol and zearalenone tolerance in the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea*. *BMC Genomics*, 15, 55.
44. La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S., Hoffmann L., Fritig B., Legrand M., y Heitz T., 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways, *Immunol. Rev* 198 () 267–284.
45. Lager S., 2011. Survey of *Fusarium* species on yellow onion (*Allium cepa*) on Öland. Department of Forest Mycology and Planta Pathology. 30p.
46. Lahlali R., y Peng G., 2014. Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. *Plant Pathology*, 63, 447–455.
47. Leslie J.F., y Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishing. EUA. 388p.
48. Li G.Q., Huang H.C., Kokko E.G., y Acharya S.N., 2002. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43, 211–218.

49. Li J., Yang J., Huang X., y Zhang K.Q., 2006. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry* 41: 925 – 929.
50. Liang X., Zhang, L., Natarajan S.K., Becker D.F., 2013. Proline Mechanisms of Stress Survival. Forum Review Article. Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska. Volume 00, Number 00.
51. Lopes F.A.C., Steindorff A.S., Geraldine A.M., Brandão R.S., Monteiro V.N., Lobo J.M., y Silva R.N., 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116, 815–824.
52. Madriz O.K., 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p. 22-32.
53. Mamarabadi M., Jensen B. y Lubeck, M., 2008. Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. *Curr Genet* 53:57-70.
54. Marqués E., Martins I., y Marques de Mello C.S., 2018. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología, Controle Biológico, Laboratorio de Fitopatología, Brasília, DF, Brazil. *Biotaneotropica* ISSN 1676-0611.
55. Martínez A.P., Alves S.F.M., y Diez J.J., 2012. *In vitro* and *in vivo* Interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. Sustainable Forest Management Research Institute, University of Valladolid – INIA, Palencia, Spain.
56. Mejía R.E., 2015. Aislamiento e identificación de *Fusarium* spp. en cebolla y de bacterias antagónicas para su control. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos México. 93 p.
57. Montes B.R., Nava J.R., Flores M.H.E. y Mundo O.M., 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado de Morelos, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:300-304.
58. Nakabayashi R., y Saito K., 2015. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24. 10–16.
59. Nygren K., Dubey M., Zapparata A., Iqbal M., Tzelepis G.D., Durling M.B., Jensen D.F., y Karlsson M., 2018. The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea*

responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey. Department of Forest Mycology and Plant pathology, Uppsala Biocenter, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

60. Okuda T., Kohno J., Kishi N., Asai Y., Nishio M., y Komatsubara S., 2000. Production of TMC-151, TMC-154 and TMC-171, a new class of antibiotics, is specific to "*Gliocladium roseum*" group. *Mycoscience* 41: 239 – 253.
61. Orietta F., y Larrea V., 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica, No. 62* p.96-100
62. Özer N., y Köycü N.D., 2004. Seed-borne fungal diseases of onion, and their control. En: *Fruit and Vegetable diseases*. Springer Netherlands. Pp. 281-306.
63. Paez M.E., y Sanabria N.A., 2007. Evaluation of the Antagonistic Capacity of *Trichoderma koningii* Above *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Rev. Fac. Agron.* 24 (1): 27-31, Venezuela.
64. Pérez M. A., Segura A., García R., Colinas T., Pérez M., Vázquez A., y Navarro H., 2009. Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brócoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25, 103-110
65. Peshev D., Vergauwen R., Moglia A., Hideg E., y Van den Ende W., 2013. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *J. of Exp. Bot.* 64, 1025–1038.
66. Petrocelli S., Pizarro D.M., Alet A., De Ollas C., Talón F.T., Gómez C.A., Arbona V., Orellano G.E., y Aurelio D.L., 2018. Phytohormone participation during *Citrus sinensis* non-host response to *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.
67. Pfender W.F., y Alderman S.C., 2003. Evaluation of postharvest burning and fungicides to reduce the polyetic rate of increase of choke disease in orchardgrass seed production *Plant Dis.* 87:375-379.
68. Pulido H.A., Zavaleta, M.E., Cervantes, D.L., Grimaldo, J.O., Avilés, M.S.M., 2008. Incidencia, severidad e identificación del agente causal de la pudrición radical de

- la cebolla (*Allium cepa* L.) en el Valle de la Trinidad, Baja California, México. XI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas, Baja California. 201-205 p.
69. Pulido H.A., Zavaleta M.E., y Grimaldo J.L.C.O., 2012. Alternativas de control en la pudrición radical de cebolla para el Valle de la Trinidad, Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3:97-112.
70. Punja Z.K., Rodríguez G., y Tirajoh A., 2016. Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. *Crop Prot.* 84:98-104.
71. Rey M., Delgado J.J., Rincón A.M., Limón M.C. y Benítez T., 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicida. *Revista Iberoamericana Micology* 17: s31-s36.
72. Roberti R., Veronesi A., Cesari A., Cascone A., Di Berardino I., Bertini L., y Caruso C., 2008. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*, 175, 339–347.
73. Roberti R., Zakrisson E., Flamigni F., de Vero L. y Cesari, A., 2002. Antagonistic fungi producing hydrolytic enzymes, active in degrading the cell wall of some foot rot pathogens (*Fusarium* spp.) of wheat. *Journal of Plant Disease and Protection* 109: 101- 108.
74. Rodríguez M.A., Cabrera G., Gozzo F.C., Eberlin M.N., y Godeas A., 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: Mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1177–1186.
75. Rodríguez S.C., 2012. La Ecología Química de Interacciones Tri-Tróficas. Temas Selectos en Ecología Química de Insectos. Colegio de la Frontera Sur, México. 446 p.
76. SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación., 2014. Arranque de la Temporada de Siembra de Cebolla en Morelos. Axochiapan, Mor., México. 1 p.
77. Saha R., Saha N., Donofrio R.S., y Bestervelt L.L., 2012. Microbial siderophores: a mini review. Department of Microbiology and Molecular Biology, NSF International, Ann Arbor, MI, USA, *Journal of Basic Microbiology* 2012, 52, 1–15.

- 78.Senthil-Kumar M., y Mysore K.S., 2013. Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 407–427.
- 79.Sharifazizi M., Harighi B., y Sadeghi A., 2017. Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. *Biol. Control.* 104:28-34.
- 80.Shiomi K., Arai N., Iwai Y., Turber, A., y Omura S., 2000. Structure of arginin, a new chitinase inhibitor produced by *Gliocladium* sp. Research Center for Biological Function, The Kitasato Institute, Tokyo 108-8642, Japan.
- 81.Shores M., Harman G.E. y Mastouri F., 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review Phytopathology* 48: 21 – 43.
- 82.SIAP-SAGARPA., 2015. Agricultura producción anual. <http://www.siap.gob.mx/> (enero de 2015).
- 83.Sudisha J., Abdelrahman M., Tran L.S.P., e Ito S., 2013. Characterization of rhizosphere fungi that mediate resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, Issue 12, 1. Pages 3829-3842.
- 84.Sutton J.C., Li D.W., Peng G., Yu H., Zhang P.G., Valdebenito-Sanhueza R.M., 1997. *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Dis.* 81: 316-28.
- 85.Toledo A., Virla E., Humber R., Paradell S., y Lastra C. L., 2006. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimiagrossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2,7– 10.
- 86.Tovar C.J.C., 2008. Evaluación de la capacidad antagonista *in vivo* de aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C.
- 87.Valencia S.K., y Zetina E.A.M., 2017. La cebolla mexicana: un análisis de competitividad en el mercado estadounidense, 2002-2013. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Económico Administrativas.

88. Verma V., Ravindran P., y Kumar P.P., 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. Department of Biological Sciences, Faculty of Science, National University of Singapore, Singapore 117543. 16:86.
89. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.I., Marra R., Barbetti M.I., Li H., Woo S.I., y Lorito M., 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72:80-86.
90. Viterbo A., Wiest A., Brotman Y., Chet I. y Kenerley C., 2007. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defense responses. *Molecular Plant Pathology* 8 (6): 737 – 746.
91. Vivas M., Martín J.A., Gil L., y Solla A., 2012. Evaluating methyl jasmonate for induction of resistance to *Fusarium oxysporum*, *F. circinatum* and *Ophiostoma novo-ulmi*. *Ingeniería Forestal y del Medio Natural*. Universidad de Extremadura. Plasencia, Spain.
92. Walters D., 2003. Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism, *New Phytol* 159 (1469–8137).
93. Weaver M.A., Abbas H.K., Jin X., y Elliott B., 2016. Efficacy of water-dispersible formulations of biological control strains of *Aspergillus flavus* for aflatoxin management in corn. *Food Addit. Contam.* 33(2):346-351.
94. Winterberg B., ADu L. Fall, Song X., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., y Solomon P.S., 2014. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defense response in susceptible wheat leaves, *BMC Plant Biol.* 14. 215.
95. Wisniewski M., Droby S., Norelli J., Liu J., y Schena L., 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biol. Tec.* 122:3-10.
96. Zaldúa F.S.A., 2012. Caracterización de cepas de *Clonostachys rosea* para el control de *Botrytis cinerea* en viveros de *Eucalyptus globulus*. Universidad de Concepción Dirección de Postgrado Facultad de Ciencias Forestales. Concepción-Chile 9 p.
97. Zavaleta M.E., 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Instituto de fitosanidad, Colegio de Postgraduados, 56230. Montecillo, Edo. De México. México.

- 98.Zavaleta M.E., Villar A.C., Reyna R.M.I., y García E.R., 1992. Efecto de la incorporación de col y brócoli en la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla. Rev. Mex. Fitopatol. 10:179-185.
- 99.Zhao L., Wang F., Zhang Y., y Zhang J., 2014. Involvement of *Trichoderma asperellum* strain T6 in regulating iron acquisition in plants. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, Shandong, P. R. China Journal of Basic Microbiology Volume 54, Issue S1.
- 100.Zurera C., Romero M., Porrás M., Barrau C., y Romero F., 2007. Efecto biofumigante de especies de Brassica en el crecimiento de *Phytophthora* spp. *in vitro*. XI Congreso SECH. Albacete, España. Actas de Hort. 48:306-309.

ANEXOS

ANEXO 1. Purificación de ADN

Bajo condiciones de esterilidad, con una espátula estéril, y a los 15 días de su siembra, se colectó micelio del fitopatógeno, dicho micelio fue colocado en tubos eppendorf, los cuales fueron almacenados a una temperatura de -80°C durante 24 horas. Posterior a ello, la extracción de ADN genómico se efectuó con el Kit Qiagen QIAamp DSP DNA Blood mini. Al micelio obtenido en cada tubo, se le agregaron $180\mu\text{L}$ de buffer de lisis ATL en dos partes, agregando inicialmente $90\mu\text{L}$ y macerándolo con un pistilo manteniéndolo en hielo para evitar sobrecalentar el tubo, una vez obtenido el micelio homogéneo se agregó el volumen restante del buffer, añadiendo $20\mu\text{L}$ de proteinasa K agitando en vórtex e incubando durante 40min a 56°C llevándolo a agitación cada 5 min para optimizar la lisis de las células. Una vez incubado se añadieron $200\mu\text{L}$ de buffer AL y $200\mu\text{L}$ de etanol al 96-100%. Se llevó a centrifugación durante 3min a 3000 rpm colectando el sobrenadante en una columna de limpieza, se centrifugó a 8000rpm por 1 min, descartando la elusión y se agregó $500\mu\text{L}$ de buffer de lavado AW1 llevándolo a centrifugación 8000rpm 1min descartando elusión, se añadieron $500\mu\text{L}$ de buffer de lavado AW2, centrifugando 14,000 rpm por 3 min, se transfirió la columna a un tubo eppendorf nuevo y se colocaron $50\mu\text{L}$ de buffer de recuperación AE teniendo precaución de mojar completamente la membrana de la columna con el volumen depositado, se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugó a 8000rpm por 1 min, el producto obtenido era ADN genómico puro, el cual fue almacenado en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.