



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CORROBORACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN
BLANCA *Sclerotium cepivorum* Berk. Y SU MANEJO
BIOLÓGICO, FÍSICO Y QUÍMICO, EN CEBOLLA

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA

FRANCO SÁNCHEZ MARIO ALBERTO

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2012



**CORROBORACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN
BLANCA *Sclerotium cepivorum* Berk. Y SU MANEJO
BIOLÓGICO, FÍSICO Y QUÍMICO, EN CEBOLLA**

Tesis realizada por **Franco Sánchez Mario Alberto**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESOR:



DR. ALBERTO MARGARITO GARCÍA MUNGUÍA

ASESOR:



DR. JUAN FERNANDO SOLÍS AGUILAR

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitir que culminara una meta más de mi vida, y que siempre me ha guiado por el buen camino.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar mis estudios de maestría, ya que sin su apoyo no hubiera podido superarme.

A mi Alma Mater, la Universidad Autónoma Chapingo, y al Departamento de Parasitología Agrícola por el apoyo y las facilidades recibidas para forjarme como profesionista y como persona.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por su dirección en la realización del presente trabajo, por su amistad, apoyo y confianza que me ha brindado. Y por ser una de las personas que me inspiran a seguir adelante.

Al Dr. Alberto Margarito García Munguía por las correcciones del presente trabajo, por su amistad, apoyo y confianza brindada.

Al Dr. Juan Fernando Solís Aguilar por su tiempo en la revisión de la presente investigación, por su apoyo y confianza brindada.

DEDICATORIA

A mi esposa: Argelia García Munguía, por su amor, apoyo y confianza incondicional que siempre nos hemos brindado, por estar presente en los buenos y malos momentos, para lograr todas las metas que siempre nos hemos planteado.

A mi hijo Mario: por ser el motivo más grande que me impulsa a seguir adelante y no dejarme vencer aun cuando me sienta derrotado.

A mis padres: mi madre María Hortensia Sánchez Navarro y a mi padre Prisco Mario Franco Lima, por darme la vida, por su amor, apoyo y confianza que me dan para poder superarme y lograr mis objetivos. Gracias a ellos pude lograr lo que me propuse.

A mi hermana: Karen Franco Sánchez por su apoyo incondicional tanto en los buenos como en los malos momentos, para lograr las metas que siempre nos hemos planteado.

Al Dr. Marcelo Acosta por todas sus enseñanzas, por darme la formación profesional y su amistad de manera incondicional.

DATOS BIOGRÁFICOS DEL AUTOR

Mario Alberto Franco Sánchez nació en el municipio de Cuautla, Morelos. Los estudios de primaria y secundaria los realizó en Cuautlixco, Cuautla, Morelos.

De 2003 a 2006 cursó la Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo, donde también concluyó la carrera de Ing. Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola de 2006 a 2010.

Del 2010 al 2012 realizó sus estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO I. REVISION DE LITERATURA	6
1.1. LA CEBOLLA	6
1.1.1. Origen y distribución	6
1.1.2. Importancia del cultivo	6
1.1.2.1. Mundial.....	6
1.1.2.2. Nacional	8
1.1.3. Clasificación taxonómica.....	9
1.1.4. Características botánicas botánica	9
1.1.5. Requerimientos ambientales.....	13
1.1.5.1. Temperatura.....	13
1.2. PUDRICIÓN BLANCA (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.)	14
1.2.1. Importancia y distribución de la enfermedad.....	14
1.2.2. Clasificación taxonómica.....	15
1.2.3. Morfología	16
1.2.4. Características de los esclerocios.....	16
1.2.5. Condiciones ambientales y edáficas favorables a <i>S. cepivorum</i> Berk. .	17
1.2.5.1. Temperatura.....	17
1.2.5.2. pH.....	17
1.2.5.3. Suelo	18

1.2.5.4. Clima	18
1.2.6. Síntomas y signos.....	19
1.2.7. Ciclo de vida	19
1.2.8. Epidemiología	21
1.2.9. Estrategias de manejo de <i>Sclerotium cepivorum</i> en cebolla.....	22
1.2.10. Combate por resistencia	23
1.2.11. Control biológico	24
1.2.12. Solarización	26
1.2.13. Uso de fertilizantes	26
1.2.14. Control químico.....	27
1.3. DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS ANTAGONISTAS	28
1.3.1. <i>Trichoderma</i> spp.	28
1.3.1.1. Importancia y distribución	28
1.3.1.2. Taxonomía	29
1.3.1.3. Descripción morfológica.....	29
1.3.1.4. Ciclo de vida	31
1.3.1.5. Mecanismos de acción	31
1.3.1.6. Microparasitismo.....	32
1.3.1.7. Competencia por nutrientes.....	32
1.3.1.8. Antibiosis	32
1.3.1.9. Inducción de resistencia	33
1.3.1.10. Control de enfermedades del suelo	34
1.3.1.11. Formulación del producto	35
1.3.2. <i>Pseudomonas</i> sp.	35
1.3.2.1. Características.....	36
1.3.2.2. Mecanismo de acción	37
1.3.2.3. Control de enfermedades	37
1.4. LITERATURA CITADA.....	39

CAPITULO II. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CORROBORACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANCA (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.), EN CEBOLLA.....	46
2.1. INTRODUCCIÓN.....	46
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
Fase de campo	47
2.2.1. Origen de las muestras	47
2.2.2. Sitio de muestreo	47
2.2.3. Características de las áreas seleccionadas	47
2.2.4. Toma de muestras	48
Fase de laboratorio	48
2.2.5. Preparación del material vegetal.....	48
2.2.6. Aislamiento del hongo.....	49
2.2.7. Purificación del hongo aislado.....	49
2.2.8. Cultivo de punta de hifa	50
2.2.9. Corroboración morfológica del agente causal de la pudrición blanca	50
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
2.3.1. Corroboración del agente causal de la pudrición blanca por sintomatología y hongo aislado.....	51
2.4. CONCLUSIONES.....	53
2.5. LITERATURA CITADA	54

CAPITULO III. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ANTAGONISTAS EN SUELOS INFESTADOS DE <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk. Y EVALUACIÓN DE LA EFICACIA EN EL MANEJO DE LA ENFERMEDAD <i>IN VITRO</i>.....	56
3.1. INTRODUCCIÓN.....	56
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
Fase de campo	58
3.2.1. Origen de las muestras	58
3.2.2. Toma de muestras	58

Fase de laboratorio	58
3.2.3. Aislamiento de los agentes de biocontrol	59
3.2.4. Purificación de los aislamientos	59
3.2.5. Cultivo de punta de hifa	60
3.2.6. Identificación morfológica de los agentes de biocontrol	60
3.2.7. Prueba de antagonismo <i>In Vitro</i> (Cultivos duales)	62
3.2.7.1. Localización del sitio experimental	62
3.2.7.2. Origen del patógeno	62
3.2.7.3. Origen de los aislamientos para probar antagonismo <i>In Vitro</i>	63
3.2.8. Control biológico <i>In Vitro</i> (Cultivos duales)	63
3.2.9. Diseño experimental	65
3.2.10. Tratamientos	65
3.2.11. Evaluación de las variables respuesta	65
3.2.12. Análisis de datos	65
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3.3.1. Identificación morfológica	67
3.3.2. Crecimiento radial micelial y porcentajes de inhibición de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk <i>In Vitro</i>	68
3.4. CONCLUSIONES	77
3.5. LITERATURA CITADA	78
CAPITULO IV. EVALUACIÓN DE <i>Trichoderma</i> spp. Y <i>Pseudomonas</i> sp. CONTRA <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk EN INVERNADERO 2011-2012	80
4.1. INTRODUCCIÓN	80
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	82
4.2.1. Localización del sitio experimental	82
4.2.2. Origen del patógeno	82
4.2.3. Preparación y cuantificación del inóculo	83
4.2.4. Origen de los aislamientos para probar antagonismo en invernadero ..	83
4.2.5. Preparación y cuantificación de los organismos antagonistas	84

4.2.6.	Aplicación de los tratamientos	84
4.2.7.	Diseño experimental	85
4.2.8.	Tratamientos	85
4.2.9.	Parámetro de medición de la efectividad biológica	86
4.2.10.	Método de evaluación	86
4.2.11.	Tipo y frecuencia del muestreo	87
4.2.12.	Análisis de datos	87
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	88
4.4.	CONCLUSIONES	92
4.5.	LITERATURA CITADA.....	93
CAPITULO V.	EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LOS MICROESCLEROCIOS DE <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk. CON CALOR HÚMEDO Y CALOR SECO	95
5.1.	INTRODUCCIÓN	95
5.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
5.2.1.	Localización del sitio experimental.....	97
5.2.2.	Origen del patógeno.....	97
5.2.3.	Prueba de calor seco	98
5.2.4.	Prueba de calor húmedo	98
5.2.5.	Diseño experimental	99
5.2.6.	Tratamientos	100
5.2.7.	Evaluación de las variables respuesta	100
5.2.8.	Análisis de datos	100
5.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
5.4.	CONCLUSIONES.....	108

CAPITULO VI. EFICACIAS DE FUNGICIDAS EN MEZCLAS PARA EL CONTROL DE <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk. EN CEBOLLA <i>IN VITRO</i>.....	111
6.1. INTRODUCCIÓN.....	111
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
6.2.1. Localización del sitio experimental.....	113
6.2.2. Origen del patógeno.....	113
6.2.3. Método de los discos de papel.....	113
6.2.4. Diseño experimental	114
6.2.5. Tratamientos	114
6.2.6. Evaluación de las variables respuesta	115
6.2.7. Análisis de datos	115
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
6.4. CONCLUSIONES	123
6.5. LITERATURA CITADA	124
CAPITULO VII. MANEJO QUÍMICO DE <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk EN CEBOLLA EN INVERNADERO	126
7.1. INTRODUCCIÓN.....	126
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
7.2.1. Localización del sitio experimental.....	128
7.2.2. Origen del patógeno.....	128
7.2.3. Preparación y cuantificación del inóculo	128
7.2.4. Reaislamiento y comparación del hongo inoculado	129
7.2.5. Aplicación de los tratamientos.....	130
7.2.6. Diseño experimental	130
7.2.7. Tratamientos	130
7.2.8. Parámetro de medición de la efectividad biológica	132
7.2.9. Método de evaluación	132
7.2.10. Tipo y frecuencia del muestreo	132

7.2.11. Análisis de datos	132
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	134
7.3.1. Evaluación de la incidencia de la pudrición blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk) en cebolla y eficacia de los tratamientos en invernadero	134
7.4. CONCLUSIONES	141
7.5. LITERATURA CITADA	142
APÉNDICE	145

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países productores de cebolla (<i>A. cepa</i>) en el año 2010.....	7
Cuadro 2. Principales estado productores de cebolla (<i>A. cepa</i>).....	8
Cuadro 3. Tratamientos evaluados para determinar el antagonismo <i>In Vitro</i> de los organismos aislados de plantas enfermas con la pudrición blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk).....	65
Cuadro 4. Comparación de medias de los datos de crecimiento radial micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk en las evaluaciones: 1 (26/01/12), 2 (28/01/12), 3 (30/01/12) y 4 (01/02/12) para determinar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial debido a <i>Trichoderma</i> sp. 1, <i>Trichoderma</i> sp. 2 y <i>Pseudomonas</i> spp. para el control de la pudrición blanca en cebolla, <i>In Vitro</i> . 2012.	69
Cuadro 5. Tratamientos evaluados para determinar el antagonismo en invernadero de las diferentes concentraciones de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> sp. en plantas de cebolla contra la pudrición blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk).....	85
Cuadro 6. Comparación de medias de los datos de incidencia de la pudrición blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk) en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (09/03/12) para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en el control de la pudrición blanca en cebolla Var. Suprema, en invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo, México. 2011-2012.	88
Cuadro 7. Eficacia biológica de los bioantagonistas para el control de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk, agente causal de la pudrición blanca de la cebolla en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12), en cebolla, en invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola, en Chapingo, Edo. de México. 2011-2012..	89
Cuadro 8. Tratamientos evaluados para determinar la inhibición <i>In Vitro</i> de la capacidad de germinación de los microesclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk mediante pruebas de calor seco y húmedo.....	100
Cuadro 9. Comparación de medias de los datos de porcentaje de germinación de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk en la evaluación 1 (06/03/12), para la determinación de la efectividad biológica del tratamiento físico: calor húmedo y calor seco en el control de la pudrición blanca, <i>In Vitro</i> . 2012.	102
Cuadro 10. Tratamientos evaluados para determinar la eficacia biológica <i>In Vitro</i> de las diferentes mezclas de fungicidas contra la pudrición blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk), agente causal de la pudrición blanca de la cebolla <i>In Vitro</i>	115
Cuadro 11. Comparación de medias de los datos de crecimiento radial micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk y Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) en la	

evaluación 1 (08/03/12) para determinar la eficacia biológica de mezclas de fungicidas para el control del agente causal de la pudrición blanca en cebolla (*Sclerotium cepivorum*), *In Vitro*. 2012. 117

Cuadro 12. Tratamientos evaluados para determinar la efectividad biológica de las diferentes mezclas de fungicidas en plantas de cebolla Var. Suprema contra la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) con 0.1 microesclerocios•g⁻¹ de suelo en invernadero. 2012. 131

Cuadro 13. Comparación de medias de los datos de incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en las evaluaciones 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12) en cebolla inoculadas y tratadas con diferentes mezclas de fungicidas en invernadero. 2011-2012. 135

Cuadro 14. Eficacia biológica de mezclas de fungicidas para el control de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en las evaluaciones 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12), en cebolla Var. Suprema, en invernadero. 2011-2012. 135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de cebolla (<i>A. cepa</i>) en el año 2010 (FAO, 2012).	7
Figura 2. Principales estados productores de cebolla (<i>A. cepa</i>) en el año 2010 (SIAP, 2012).....	8
Figura 3. Ciclo fenológico de la cebolla.	14
Figura 4. Germinación de los esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> 4 días después de la siembra.	49
Figura 5. Cepa de <i>Sclerotium cepivorum</i> formando microesclerocios.....	50
Figura 6. Cepa de <i>Sclerotium cepivorum</i> . A) Germinación de esclerocios. B) Crecimiento micelial. C) inicio de la formación de esclerocios. D) Esclerocios completamente formados.	52
Figura 7. Cepa de <i>Trichoderma</i> sp. aislada de micelio y esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> parasitados en plantas con síntomas de pudrición blanca procedentes de Cojumatlán, Michoacán.....	61
Figura 8. Cepa de <i>Pseudomonas</i> sp. aislada de esclerocios de plantas con síntomas de pudrición blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk), procedentes de Cojumatlán, Michoacán. 61	61
Figura 9 . Cultivo puro de <i>Sclerotium cepivorum</i> , 8 días después de la siembra.	62
Figura 10. Cultivos puros de los organismos antagonistas. A) cepa de <i>Trichoderma</i> sp. 1, aislada de suelo de una plantación de piña. B) Cepa de <i>Trichoderma</i> sp. 2, aislada de plantas enfermas de cebolla y C) cepa de <i>Pseudomonas</i> sp. Aislada de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	63
Figura 11. Enfrentamiento de <i>Sclerotium cepivorum</i> contra los organismos antagonistas mediante la técnica de cultivos duales.	64
Figura 12. Organismos antagonistas aislados. A) cepa de <i>Trichoderma</i> sp. 1, aislada de plantas enfermas de cebolla. B) cepa de <i>Pseudomonas</i> sp. Aislada de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	67
Figura 13. Crecimiento radial micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk en la evaluación 1 (26/01/12), evaluación 2 (28/01/12), evaluación 3 (30/01/12) y evaluación 4 (01/02/12) en la prueba de antagonismo <i>In Vitro</i> debido a <i>Trichoderma</i> sp. 1, <i>Trichoderma</i> sp. 2 y <i>Pseudomonas</i> sp. para el control del agente causal de la pudrición blanca de la cebolla. 2012.....	69

Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación 1 (26/01/12), evaluación 2 (28/01/12), evaluación 3 (30/01/12) y evaluación 4 (01/02/12) en la prueba de antagonismo *In Vitro* debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* spp. para el control del agente causal de la pudrición blanca de la cebolla. 2012..... 70

Figura 15. Establecimiento de la prueba de antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*..... 72

Figura 16. Primera evaluación a los 3 DDS (26/01/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*.73

Figura 17. Segunda evaluación a los 5 DDS (28/01/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*.74

Figura 18. Tercera evaluación a los 7 DDS (30/01/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivoru*.75

Figura 19. Cuarta evaluación a los 9 DDS (01/02/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*.76

Figura 20. Cepa pura de *Sclerotium cepivorum* produciendo esclerocios..... 82

Figura 21. Cultivos puros de los organismos antagonistas. A) cepa de *Trichoderma* sp. 1, aislada de plantas enfermas de cebolla. B) Cepa de *Trichoderma* sp. 2, aislada de suelo de una plantación de piña y C) cepa de *Pseudomonas* sp. Aislada de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*..... 83

Figura 22. Parcela experimental de cebolla var. Suprema inoculadas con 0.1 microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* agente causal de la pudrición blanca (Berk) por g de suelo, tratadas con dos cepas de *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas* sp. en invernaderos del departamento de Parasitología Agrícola, en Chapingo, Edo. de México. 86

Figura 23. Porcentaje de incidencia y eficacia biológica de los bioantagonistas para el control de *Sclerotium cepivorum* Berk, agente causal de la pudrición blanca de la cebolla, en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (09/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012. 89

Figura 24. Daño mostrado por <i>Sclerotium cepivorum</i> en la evaluación 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012, tratadas con: A) Testigo absoluto. B) <i>Trichoderma</i> sp. 1 (1×10^6 ufc•mL ⁻¹). C) <i>Trichoderma</i> sp. 1 (1×10^8 ufc•mL ⁻¹). D) <i>Trichoderma</i> sp. 2 (1×10^6 ufc•mL ⁻¹). E) <i>Trichoderma</i> sp. 2 (1×10^8 ufc•mL ⁻¹). F) <i>Pseudomonas</i> sp. (1×10^6 ufc•mL ⁻¹) y G) <i>Pseudomonas</i> sp. (1×10^8 ufc•mL ⁻¹).....	91
Figura 25. Esclerocios de un cultivo puro de <i>Sclerotium cepivorum</i> , aislado de plantas enfermas con la pudrición blanca en Cojumatlán de Regules, Michoacán.	97
Figura 26. Caja de Pétri con esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> , para determinar la efectividad biológica de tratamientos con calor para el control de la pudrición blanca, <i>In Vitro</i> . 2012.....	99
Figura 27. Cajas de Pétri con esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> , para determinar la efectividad biológica de tratamientos con calor para el control de la pudrición blanca, <i>In Vitro</i> . 2012.....	99
Figura 28. Porcentaje de germinación de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk y eficacia biológica de los tratamientos en la evaluación: 1 (06/03/12) <i>In Vitro</i> . 2012.....	102
Figura 29. Capacidad de germinación de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> después de haber sido tratados con: A) Testigo absoluto. B) Calor seco a 60 °C durante 25 minutos. C) Calor seco a 60 °C durante 10 minutos. D) Calor seco a 55 °C durante 25 minutos. E) Calor seco a 55 °C durante 10 minutos. F) Calor seco a 50 °C durante 25 minutos. G) Calor seco a 50 °C durante 10 minutos. H) Calor seco a 45 °C durante 25 minutos. I) Calor seco a 45 °C durante 10 minutos.....	106
Figura 30. Capacidad de germinación de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> después de haber sido tratados con: A) Testigo absoluto. B) Calor húmedo a 60 °C durante 25 minutos. C) Calor húmedo a 60 °C durante 10 minutos. D) Calor húmedo a 55 °C durante 25 minutos. E) Calor húmedo a 55 °C durante 10 minutos. F) Calor húmedo a 50 °C durante 25 minutos. G) Calor húmedo a 50 °C durante 10 minutos. H) Calor húmedo a 45 °C durante 25 minutos. I) Calor húmedo a 45 °C durante 10 minutos.	107
Figura 31. Cultivo puro de <i>Sclerotium cepivorum</i> 8 días después de la siembra.	113
Figura 32. Crecimiento radial micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk en la evaluación 1 (08/03/12) de la eficacia de las mezclas de fungicidas <i>In Vitro</i> . 2012.....	117
Figura 33. Porcentaje de inhibición (eficacia) del crecimiento radial micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk en la evaluación 1 (08/03/12) en diferentes tratamientos a base de mezclas de fungicidas <i>In Vitro</i> . 2012.....	118
Figura 34 A. Crecimiento radial micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> después de haber sido tratado con: A) Testigo inoculado. B) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 ppm). C) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (2095 ppm). D) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (973 ppm). E) Estrobilurina 1	

+ Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm). F) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (635.5 ppm). G) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (965.7 ppm). H) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 ppm). I) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (956 ppm).
 121

Figura 35 B. Crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* después de haber sido tratado con: A) Testigo inoculado. B) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 ppm). C) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (2095 ppm). D) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (973 ppm). E) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm). F) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (635.5 ppm). G) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (965.7 ppm). H) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 ppm). I) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (956 ppm).
 122

Figura 36. Incremento del inoculo de *Sclerotium cepivorum*..... 129

Figura 37. Parcela experimental de cebolla de la variedad Suprema inoculadas con el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk con 0.1 microesclerocios•g⁻¹ de suelo en invernadero. 2012..... 131

Figura 38. Porcentaje de incidencia y eficacia biológica de las mezclas de fungicidas para el control de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12), en cebolla Var. Suprema, en invernadero. 2011-2012. 136

Figura 39 A. Daño mostrado por *Sclerotium cepivorum* en la evaluación 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012, tratadas con: A) Testigo inoculado. B) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 ppm). C) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (2095 ppm). D) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (973 ppm). E) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm). F) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (635.5 ppm). G) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (965.7 ppm). H) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 ppm). I) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (956 ppm). 139

Figura 39 B. Daño mostrado por *Sclerotium cepivorum* en la evaluación 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012, tratadas con: J) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 ppm). K) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (1226 ppm). L) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 ppm). M) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm). N) Carboxamida. O) Carboxamida..... 140

CORROBORACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANCA *Sclerotium cepivorum* Berk. Y SU MANEJO BIOLÓGICO, FÍSICO Y QUÍMICO, EN CEBOLLA

CORROBORATION OF THE CAUSAL AGENT OF WHITE ROT *Sclerotium cepivorum* Berk. HANDLING AND BIOLOGICAL, PHYSICAL AND CHEMICAL IN ONION

M. A. Franco-Sánchez¹; M. Acosta-Ramos².

RESUMEN

El problema de la pudrición blanca en cebolla (*Allium cepa* L.) fue estudiado con los objetivos de corroborar el agente causal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) de la cebolla y determinar el efecto de diversas estrategias: biológicas, físicas y químicas para su manejo. El hongo *Sclerotium cepivorum* fue aislado e identificado morfológicamente de las muestras tomadas de una huerta comercial en Cojumatlán, Michoacán. Las muestras tomadas mostraron síntomas de clorosis, marchitez, pudrición del bulbo y muerte. Este aislamiento fue el agente causal de los síntomas mencionados en campo e inducidos en plantas de cebolla plantadas en macetas en invernadero. El reaislamiento fue identificado como la especie inoculada, de esta forma se cumplieron los postulados de Koch. De los 3 organismos antagonistas evaluados, *Trichoderma* sp. 1 y 2 (1×10^8 ufc \cdot mL⁻¹) permitieron incidencias de 23.3 y 20.0 % en invernadero, que se tradujo en eficacias de 75.0 y 78.5 %. Con las pruebas de calor que se realizaron en laboratorio, se encontró que temperaturas superiores a 55 °C con calor húmedo durante 10 minutos inhiben al 100 % la germinación de los esclerocios; mientras que a la misma temperatura con calor seco se requieren de 25 minutos para obtener el mismo resultado. De las 17 mezclas de fungicidas evaluadas contra *S. cepivorum* se encontró que la dosis baja y alta de Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Inimidazol (635.5 y 965.7 ppm), y la dosis alta de Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilino pirimidina (956 ppm) permitieron una incidencia de 0 %, lo que se tradujo en eficacias de 100 %. Así mismo, las dosis altas de Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamidas (2095 ppm), Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm) y Carboxamida (300 ppm), permitieron incidencias de 3.3 a 10.0 %, inducidas por *S. cepivorum* en invernadero, lo que se tradujo en eficacias de 89.2 a 96.4 %.

Palabras clave: *Allium cepa*, estrategias biológicas, físicas y químicas, pudrición blanca, *Sclerotium cepivorum*, incidencia.

ABSTRACT

The problem of white rot in onion (*Allium cepa* L.) was studied with the purpose of corroborate the causal agent of white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) of onion and determine the effect of various strategies: biological, physical and chemical for handling. The fungus *Sclerotium cepivorum* was isolated and identified morphologically from samples taken from a commercial orchard in Cojumatlán, Michoacán. The samples taken presented symptoms of chlorosis, wilting, bulb rot and death. This isolation was the causative agent of the symptoms mentioned in field and induced in onion plants planted in pots in the greenhouse. The reisolation was identified as the inoculated species, thus fulfilling Koch's assumptions. Of the three antagonistic organisms evaluated, *Trichoderma* sp. 1 y 2 (1×10^8 ufc \cdot mL⁻¹) allowed incidences of 23.3 and 20.0 % in the greenhouse, which resulted in efficiencies of 75.0 and 78.5 %. With the heat tests carried out in the laboratory, it was found that temperatures above 55 °C with moist heat during 10 minutes inhibit 100 % germination of esclerotia; while at the same temperature with dry heat it takes 25 minutes to obtain the same result. Of the 17 mixtures of fungicides evaluated against *S. cepivorum*, it was found that the low and high doses of Strobilurin 2 + Triazole 3 + Inimidazol (635.5 y 965.7 ppm), and the high doses of Estrobilurin 2 + Triazole 3 + anilino pyrimidine (956 ppm) allowed an incidence of 0 % which resulted in efficiencies of 100 %. Likewise, the high doses of Strobilurin 1 + Triazole 1 + Benzimidazole 1 + Pyrimidine (2095 ppm), Strobilurin 1 + Triazole 2 + Benzimidazole 1 (1646 ppm), Strobilurin 3 + Triazole 4 + Pyrimidine (656 ppm) y Carboxamide (300 ppm), allowed incidences from 3.3 to 10.0 %, induced by *S. cepivorum* in the greenhouse, which resulted in efficiencies from 89.2 to 96.4 %.

Key words: *Allium cepa*, Biological, Physical and Chemical strategies, white rot, *Sclerotium cepivorum*, incidence.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de las hortalizas día con día adquiere mayor importancia en México, por la superficie que se destina a su cultivo, por la fuente de empleo que esta actividad representa, así también por las divisas que de ellas se obtienen (Anaya y Romero, 1999). El cultivo de hortalizas en primer lugar existen más de un millón quinientas mil hectáreas destinadas a la gran diversidad de especies de hortalizas cultivadas, el segundo es que ocupa el 17.5 % del total de la fuerza de trabajo agrícola y el tercero, es que aporta aproximadamente el 40 % de ingresos del total generado por la exportación agrícola (Espinoza, 1999).

En México, el Bajío y Noroeste concentran la producción de hortalizas. Dos de cada cinco toneladas tienen como origen Sinaloa, mientras Zacatecas y Chihuahua aportan una de cada veinte respectivamente. Las hortalizas representan 5% de la producción nacional y 16% del valor; tres cultivos concentran más de la mitad del volumen: chile verde (21%), jitomate (20%) y cebolla (11%). (SIAP, 2012).

La cebolla es una de las hortalizas de exportación más importantes para México; la producción de esta hortaliza ubica al país en el décimo segundo lugar mundial con 1.2 millones de toneladas, atrás de China y con casi dos veces lo que obtienen Argentina y Perú (650 mil toneladas). En relación con la cebolla se observa un ritmo de crecimiento anual de 1.3 millones de toneladas, destacando Chihuahua (16%), Baja California (16%) y Tamaulipas (11%). Las exportaciones de cebolla a Estados Unidos también se duplicaron (de 112 mil a 205 mil toneladas de 2003 y 2011), mientras las ventas a Guatemala se triplicaron (de 7 mil a 22 mil toneladas en el mismo periodo). (SIAP, 2012).

La cebolla como cualquier otra planta está expuesta al ataque de plagas y enfermedades, las cuales son una fuerte limitante en la producción. De acuerdo con Toledo (1998), las principales enfermedades que afectan a este cultivo son:

mildiu (*Peronospora destructor* Berk), mancha purpura (*Alternaria porri* Ellis), pudrición del cuello de la cebolla (*Botrytis allii* Person), cancro de cuello y tallo (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.), marchitamiento (*Rhizoctonia solani* Khun), pudrición basal o marchitez (*Fusarium oxysporum* Sheld *cepae* S. & H.) y pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berkeley).

La pudrición blanca de la cebolla provoca pérdidas de hasta el 100 % y obliga a los productores a abandonar la tierra por falta de estrategias de manejo adecuadas. Se han reportado niveles de inóculo muy disímiles como 1.5 a 9000 esclerocios•Kg⁻¹ de suelo (Ponce, 2006).

Este hongo se caracteriza por producir esclerocios que permanecen viables en campo hasta por 20 años en ausencia del hospedante. Aunque se han utilizado diferentes tácticas para reducir la incidencia de esclerocios en el suelo, los que logran permanecer son suficientes para ocasionar una incidencia similar a donde no se aplica control sobre los esclerocios, ya que solo es necesario 0.1 esclerocios por gramo de suelo para ocasionar una incidencia del 100 % (Reyes, 2000).

El manejo de enfermedades de plantas ocasionadas por patógenos del suelo son verdaderos retos en la agricultura mundial que por su complejidad requieren un trato más cuidadoso que en el caso de los patógenos de la aerobiota. Las enfermedades no solo tienen el potencial de destruir enteramente las cosechas, aun en los casos en que no causan pérdidas totales, por lo general reducen en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligando a tomar medidas de combate que aumentan los costos de producción y afectan la calidad y la durabilidad de los productos cosechados, de manera que constituyen una de las principales causas de inestabilidad en la agricultura y del déficit alimentario mundial (Hoyos *et al.*, 2008).

El control de *S. cepivorum* es complicado debido a su alta capacidad de reproducción, elevada densidad de inóculo en suelos infestados y su gran longevidad (Delgadillo, 1998). El empleo de prácticas aisladas para el control de la pudrición blanca no ha dado resultados satisfactorios consistentes, comúnmente

reducen su incidencia pero al siguiente ciclo el inoculo que permanece en el suelo ocasiona niveles de la enfermedad con igual o mayor magnitud. Algunos autores han consignado que la integración de varias alternativas de control del patógeno han dado mejores resultados. Por lo tanto, el estudio de estrategias de manejo de la pudrición blanca, con enfoque de control integrado, que contempla la selección, integración e implementación de prácticas de control, considerando las condiciones del ecosistema, ofrece mejores perspectivas de éxito (Delgadillo, 1998).

El uso de productos biológicos en la agricultura, es una alternativa que está tomando gran importancia, debido a que los plaguicidas convencionales conllevan a una serie de riesgos al consumidor, principalmente por los residuos y por el riesgo toxicológico que estos ocasionan (García, 2004). Crowe *et al.*, (1980), evaluando viabilidad de esclerocios en suelos infestados, encontraron como microparasitos más frecuentes bacterias Gram negativas, *Trichoderma viride*, *Fusarium* spp., *Streptomyces* spp. Estos resultados son apoyado por diversos investigadores, quienes aislaron de esclerocios, rizosfera y suelo, con mayor frecuencia: *Trichoderma harzianum*, *Penicillium nigricans*, *Coniothyrium minitans*, *Gliocadium roseum* y *Sporidesmium esclerotivorum* (Ponce, 2006).

La forma más común de control de *S. cepivorum* ha sido el uso de fungicidas, destacando procymidone, fluazinam y tebuconazole, cuya eficacia depende de la densidad y distribución del inóculo en el suelo y de la oportunidad, forma y frecuencia de aplicaciones. Pérez *et al.*, (2000), mencionaron que el control de *S. cepivorum* ha sido difícil, los intentos de control empleando métodos químicos no han resultado del todo satisfactorios y tienen un elevado costo económico y ecológico. Sin embargo, aun se sigue recurriendo al uso de productos biocidas, como el bromuro de metilo, debido a que la nueva gama de productos generados recientemente, no ha cumplido las expectativas de control de la enfermedad.

De acuerdo a lo antes mencionado, la presente investigación está orientada a diseñar alternativas de manejo efectivas para mitigar el efecto devastador de *Sclerotium cepivorum* para lo cual se han planteado los objetivos siguientes:

OBJETIVOS

Objetivo General

- Corroborar el agente causal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) de la cebolla y determinar el efecto de diversas estrategias: biológicas, físicas y químicas para su manejo.

Objetivos Particulares

1. Corroborar el agente causal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) de la cebolla en Cojumatlán, Michoacán.
2. Aislar e identificar bioantagonistas de suelos infestados de *Sclerotium cepivorum* y evaluar su eficacia en el manejo de la enfermedad *In Vitro* e invernadero.
3. Manejar físicamente a *Sclerotium cepivorum* Berk, a través de conocer la temperatura y tiempo de exposición para inhibir la germinación de los esclerocios.
4. Determinar la eficacia biológica de diversos fungicidas de última generación en mezcla contra *Sclerotium cepivorum* Berk *In Vitro* e invernadero.

HIPÓTESIS

1. De las plantas con síntomas de pudrición blanca, se aislará a *Sclerotium cepivorum*.
2. Al menos un bioantagonista evidenciará un control bueno de la pudrición blanca en cebolla.
3. Al menos una temperatura y tiempo de exposición podrán inhibir la germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.
4. Al menos una mezcla de fungicidas evidenciará controles excelentes de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en cebolla.

CAPÍTULO I. REVISION DE LITERATURA

1.1. LA CEBOLLA

1.1.1. Origen y distribución

La cebolla es originaria de Asia Central, sus formas primitivas se encuentran silvestres en Irán, Turkmenia, Afganistán y las montañas de Altay. Por su parte Tejerina (1964), menciona que esta especie es de origen remoto y de procedencia Asiática, y comprende el Noroeste de la India, Afganistán, la República Soviética de Tayik y Vebek, y el Occidente de Tien Shan. Mendoza (1985), reporta que la cebolla es una de las legumbres mas antiguamente cultivadas, y que probablemente hace miles de años la cebolla silvestre se recolectaba y en los caldos se usaba para la magia (Toledo, 1998). La Biblia hace referencia de esta planta mencionándola como alimento en Egipto en el año 3000 a. C., posteriormente el cultivo de la cebolla se extendió a la india en el año 600 a. C. su distribución en Europa fue hecha por los españoles quienes a su vez en el siglo XVII la introdujeron a América (Ponce, 2006).

1.1.2. Importancia del cultivo

1.1.2.1. Mundial

El cultivo de cebolla se extiende por todas las regiones templadas del mundo (Méndez, 2003). La producción mundial de cebolla seca (sin rabo, sin barbillas y pre-descascarizada) fue de 74,250,809 toneladas en el 2010; alrededor del 50 % la concentran China, India, Estados Unidos, Turquía y Rusia. De estos países China destaca como principal productor a nivel mundial (FAO, 2012) (Cuadro 1. y Figura 1)

Cuadro 1. Principales países productores de cebolla (*A. cepa*) en el año 2010.

No	PAIS	PRODUCCIÓN (ton)
1	China	20,507,759
2	India	13,372,100
3	Estados Unidos de América	3,320,870
4	Egipto	2,208,080
5	Irán	1,922,970
6	Turquía	1,900,000
7	Pakistán	1,701,100
8	Brasil	1,556,000
9	Rusia	1,536,300
10	República de Corea	1,411,650
11	Países Bajos	1,302,000
12	México	1,266,170
13	Myanmar	1,137,900
14	Marruecos	1,131,320
15	Argelia	1,111,200
16	Otros países	18,865,390
Total		74,250,809

Fuente: Tabla elaborada con datos de la FAO, 2012.

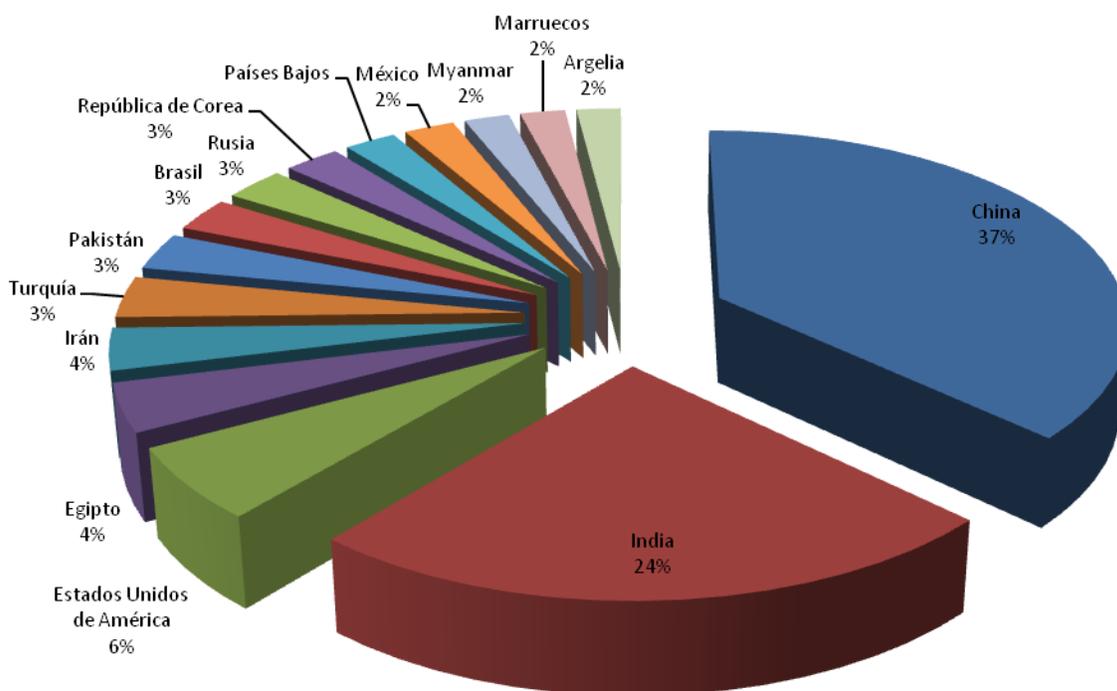


Figura 1. Principales países productores de cebolla (*A. cepa*) en el año 2010 (FAO, 2012).

1.1.2.2. Nacional

En el 2010, México participo con el 1.7 % del total de la producción a nivel mundial, se sembraron 44,843 ha, con una producción de 1,266,164.99 ton (Cuadro 2). Alrededor del 80 % de la producción proviene de los estados de Chihuahua, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Zacatecas, Guanajuato y Morelos; de ellos el estado de Chihuahua aporta el 16 % de la producción nacional (Figura 2).

Cuadro 2. Principales estado productores de cebolla (A. cepa).

No	Estado	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)
1	CHIHUAHUA	5,383.88	205,415.83
2	BAJA CALIFORNIA	7,070.00	195,702.14
3	TAMAULIPAS	4,698.50	141,970.58
4	MICHOACAN	3,859.00	135,579.03
5	ZACATECAS	4,110.00	135,239.96
6	GUANAJUATO	5,305.00	112,369.00
7	MORELOS	2,722.00	81,468.00
8	SAN LUIS POTOSI	2,198.00	70,802.50
9	OTROS	9,779.65	187,617.95
Total		45,123.03	1,266,164.99

Fuente: Tabla elaborada con datos obtenidos de SIAP, 2012.

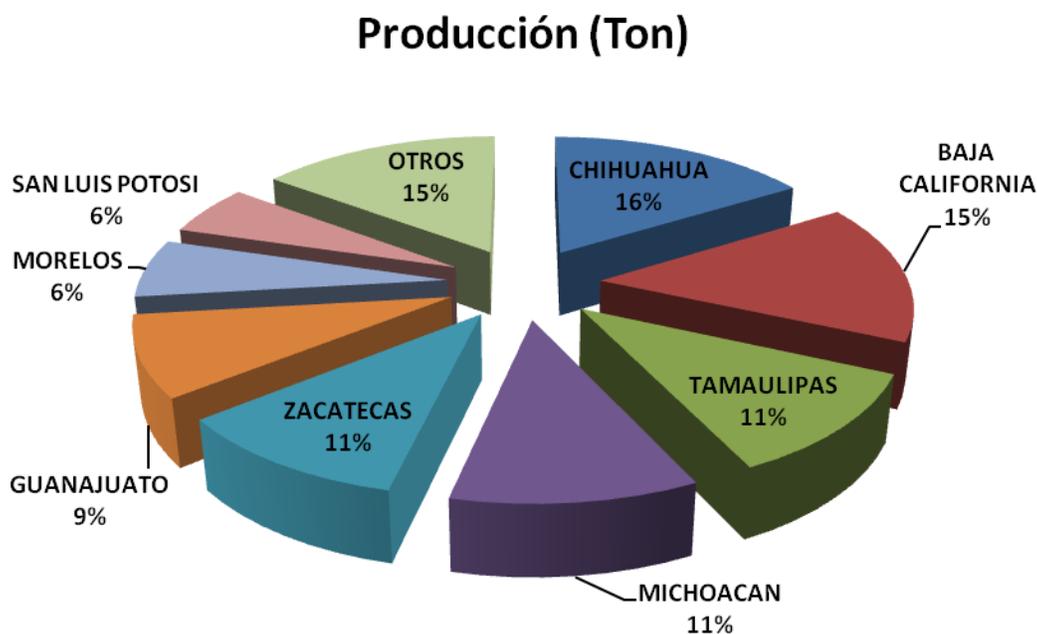


Figura 2. Principales estados productores de cebolla (A. cepa) en el año 2010 (SIAP, 2012).

1.1.3. Clasificación taxonómica

La cebolla constituye una de las 500 especies del género *Allium* de la familia de las *Liliaceae* de acuerdo con Brewster (1994), citado por Toledo (1998), la cebolla se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Vegetal

Subreino: Embryobionita

División: Antophyta

Clase: Monocotiledonea

Superorden: Liliiflorae

Orden: Asparagales

Familia: Alliaceae

Tribu: Allieae

Género: *Allium*

Especie: *Allium cepa* L.

1.1.4. Características botánicas

La cebolla es un cultivo que presenta variación en cuanto a su ciclo de cultivo, tenemos que puede ser anual, bianual o perenne. Se cultiva como anual para colectar sus bulbos y como bianual cuando se requiere obtener semilla (Toledo, 1998).

Sistema radical

Presenta un sistema radical limitado y como consecuencia una pobre capacidad de absorción. Genera raíces primarias en la germinación por semilla (Espinoza, 1999). Maroto (1992), citado por Toledo (1998), menciona que las raíces adventicias se desarrollan a partir del tallo, su número aumenta gradualmente casi hasta el final del periodo vegetativo, alcanzando un promedio de 70 a 80 raíces fusiformes de color blanco, sobre esta se forman raíces laterales, que llegan a una longitud de 25 a 30 cm, estas raíces presentan pocos pelos absorbentes, lo cual hace que la planta sea muy exigente en cuanto a su balance de humedad en

suelo. El sistema de raíces puede alcanzar un crecimiento lateral de 40 a 45 cm y 85 a 90 cm de profundidad (Toledo, 1998).

Tallo

El tallo es muy rudimentario y pequeño, ya que alcanza solo unos cuantos milímetros de longitud. Al tallo verdadero se le denomina plato; se sitúa en la base del bulbo y es muy corto, en este brotan las yemas, hojas y raíces (Toledo, 1998).

Durante el primer año de vida el tallo alcanza una altura de 0.5 – 1.5 cm y un diámetro de 1.5 – 2 cm, si las yemas son vernalizadas (estimuladas para adelantar la floración) en el segundo año crecen los tallos florales, los cuales son tubulares y huecos, pudiendo alcanzar alturas de hasta 90 cm (Espinoza, 1999).

Pseudotallo

El pseudotallo es el conjunto de hojas que forman el punto apical. (Toledo, 1998). Guenkov (1974), menciona que el pseudotallo está conformado por las vainas cilíndricas de las hojas que se sitúan una dentro de la otra. Debido a la turgencia de las vainas de las hojas, y al crecimiento de las hojas jóvenes en el interior, el falso tallo es duro y se mantiene erecto hasta el final de la zona del cuello bulbar.

Tallo floral

Son verdes, huecos y ensanchados en su parte central, sobre ellos no se forman tallos ni raíces, mueren después de madurar la semilla, generalmente se forman después del segundo año (Méndez, 2006).

El número de tallos florales puede ser de 1 a 20 (o hasta más) por planta y alcanzan una longitud de 1.5 m. estos tallos florales se forman en condiciones de

baja temperatura y después de que ha pasado su etapa de juvenibilidad (Toledo, 1998).

Yemas

Las yemas se forman sobre la base (tallo verdadero), generalmente después de la sexta hoja. Cuando más temprano y con menor número de hojas se forma la yema, tanto más rápido crece (porque las condiciones de crecimiento son favorables) y aumenta la posibilidad de que se deforme el bulbo. Las yemas que se forman después cuando existe un mayor número de hojas, y más tarde en la fase vegetativa; crecen más débilmente (porque las condiciones son menos favorables, ya no para el crecimiento, sino para la acumulación de sustancias nutritivas), y por eso las posibilidades de que se deforme el bulbo son menores (Toledo, 1998).

Hojas

Las hojas son tubulares, aguzadas en su parte superior y ensanchadas en la parte central, se desarrollan del tallo verdadero y están integradas del limbo (hoja verdadera) y vaina cilíndrica (Miguel, 1999). Las hojas son de color verde, con una película cerosa, dispuestas en dos hileras presentan entre 10 y 15 hojas por planta. Las vainas envolventes adquieren un color de a cuerdo a la variedad y se encuentran bulbos blancos, amarillos, pardos, rojos y morados (Guenkov, 1974).

Bulbo

El conjunto de vainas envolventes forman un órgano hinchado llamado botánicamente bulbo tunicado; en este se acumulan las sustancias nutritivas de reserva, el cual está integrado por túnicas o escamas carnosas, yemas y tallo verdadero. Las escamas carnosas pueden ser abiertas o cerradas (Miguel, 1999).

Cuando avanza el desarrollo del bulbo las escamas mas exteriores se van secando y se convierten en túnicas (totalmente secas) y escamas transitorias (parcialmente secas) (Espinoza, 1999).

Los bulbos de la cebolla pueden ser: formados, deformados y divididos. Los formados son aquellos que no presentan protuberancias y son simétricos; los deformados por lo general presentan protuberancias y se pueden presentar más de un falso tallo, lo que indica que presentan en su interior más de una yema; los divididos se clasifican por ser mas de un bulbo unidos por un solo tallo (Espinoza, 1999).

Inflorescencia

Es una umbela simple con gran cantidad de flores (200 a 1000), son de color lila o blancuzco, que se sostienen por brácteas; cada flor consta de un cáliz de tres sépalos, seis estambres y un pistilo de tres lóculos, cada uno de los cuales contienen dos óvulos, la flor es hermafrodita con polinización cruzada y entomófila (Guenkov, 1974).

Fruto

Es una capsula tricarpelar, en el cual se pueden formar hasta seis semillas. En la fase temprana la capsula es de color verde pardo, cuando las semillas alcanzan el inicio de la maduración, se torna verde amarillento en plena madurez es de color pardo claro; en este ultimo estado las capsulas se abren esparciendo las semillas, este proceso no se realiza al mismo tiempo en todas las capsulas, debido a que las flores no abren al mismo tiempo, por lo tanto la maduración es uniforme (Méndez, 2006).

Semilla

Las semillas son pequeñas, aplastadas, rugosas, redondas y angulosas (Toledo, 1998). El embrión es curvado en la punta con un solo cotiledón cilíndrico y radícula muy corta. Está comprobado que en un año, las semillas pueden perder entre el 30 y 35 % de su capacidad germinativa y el 100 % en dos años; un gramo contiene aproximadamente 256 semillas (Miguel, 1999).

1.1.5. Requerimientos ambientales

La cebolla se considera como una planta resistente al frío por la posición de sus yemas axilares localizadas en la base foliar, lo que le brinda protección. En general es de clima templado (Tenango, 2000).

1.1.5.1. Temperatura

La temperatura óptima para la germinación de la semilla es de alrededor de 18 a 25 °C, en la que la semilla germina a los 7 a 10 días (Guenkov, 1974). La parte aérea crece con temperaturas de 20 a 23 °C, las temperaturas bajas provocan un aumento en el ciclo vegetativo, y a temperaturas superiores de 33 °C el crecimiento de las hojas es muy lento. La brotación de las raíces se da entre 2 a 3 °C, adquiriendo rapidez con temperaturas de 4 a 10 °C y a 20 °C su crecimiento es lento. Durante la fase de plántula la cebolla requiere de temperaturas frescas y relativamente altas en la etapa de maduración del bulbo lo cual facilita junto con ambiente de escasa humedad el secado normal del bulbo (Tenango, 2000).

Temperaturas moderadamente altas combinadas con atmósfera seca facilitan la cosecha y el curado de bulbos. A temperaturas altas (28 °C) se altera el estado de reposo de la yema de los bulbos retardando el crecimiento de las hojas de las plántulas (Guenkov, 1974).

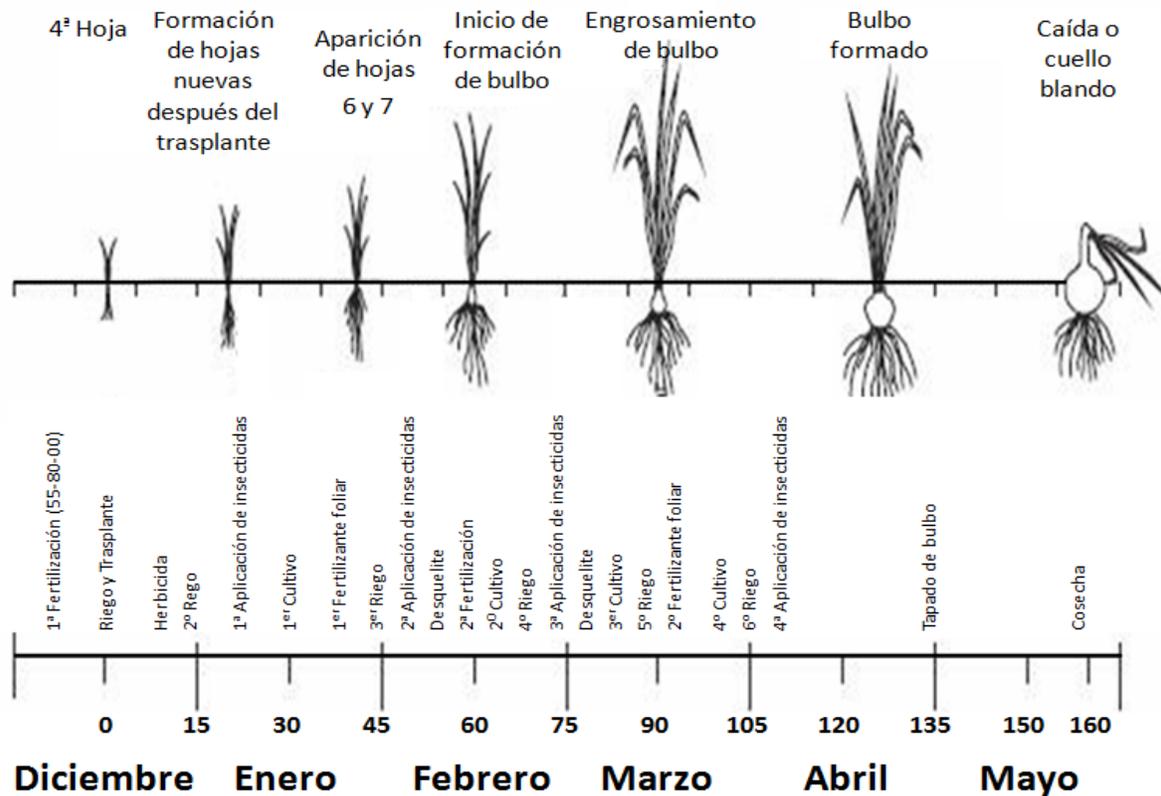


Figura 3. Ciclo fenológico de la cebolla.

1.2. PUDRICIÓN BLANCA (*Sclerotium cepivorum* Berk.).

1.2.1. Importancia y distribución de la enfermedad

La pudrición blanca es causada por el hongo llamado *Sclerotium cepivorum*, fue descrita por Berkley en 1841 en cebolla en el Reino Unido y en ajo en Italia (Méndez, 2003). De acuerdo con Sánchez (1998) la enfermedad está presente ahora en muchas áreas del mundo donde se cultiva el género *Allium* como lo son Estados Unidos, Canadá, Europa, Asia, África, Centro y Sud América, Austria y Nueva Zelanda (Méndez, 2003).

En México fue reportado por primera vez en el estado de Guanajuato en 1970, probablemente introducido en semillas infestadas provenientes de Taiwán. La pudrición blanca de la cebolla, está considerada como una de las enfermedades

destructivas que más daños económicos causa a la producción de ajo y cebolla, ya que destruye los bulbos y deja esclerocios en el suelo que obligan a los agricultores a cambiar a cultivos menos rentables (Ponce, 2006).

En México se encuentra en los estados de Guanajuato, Querétaro, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Morelos, Aguascalientes, Zacatecas, Chihuahua y Puebla. La pudrición blanca es un problema debido a: a) Las pérdidas en el cultivo y los costos adicionales asociados con la cosecha. b) La incertidumbre asociada con el aumento posible del daño cuando las *alliaceas* son cultivadas otra vez en tierras infestadas. C) La posibilidad de nuevas infestaciones en áreas no afectadas previamente por la enfermedad (Martin, 1998).

El problema fundamental para el control de la “pudrición blanca” se debe a que el hongo forma esclerocios en grandes cantidades que constituyen su forma de supervivencia y pueden permanecer viables en el suelo hasta por 20 años (Reyes, 2000).

Los suelos de Guanajuato pueden tener de 50 a 700 esclerocios por kilogramo de suelo, reportándose pérdidas de hasta el 100 % de los cultivos (Ponce, 2006).

1.2.2. Clasificación taxonómica

De acuerdo con Agrios(2005) y Romero (1988), la clasificación taxonómica de *S. cepivorum* es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Amastigomycota

Subdivisión: Eumicotina

Clase: Deuteromycetes

Orden: Mycelia Sterilia

Género: *Sclerotium*

Especie: *S. cepivorum* Berk.

1.2.3. Morfología

Las hifas miden de 9 a 18 μm de diámetro y las células miden en su mayoría de 30 a 100 μm de longitud, con células apicales 3 o 4 veces más largas (Sánchez, 1998). Forma esclerocios que son sus estructuras reproductivas, normalmente son uniformemente redondos (0.35 a 0.5 mm de diámetro) aunque se reportan esclerocios de hasta 0.75 mm y de variaciones de la forma redonda. Se ha observado que los esclerocios tienen un suave anillo negro compuesto de dos a cinco células de pared gruesa y compacta que rodean al micelio. Los esclerocios pequeños solo germinan una vez (Ponce, 2006).

1.2.4. Características de los esclerocios

Las principales características de los esclerocios son: a) Su producción en la base de las plantas hospederas. b) Su longevidad en la ausencia del hospedante. c) Los requerimientos de los exudados del hospedante *Allium* para germinar, y d) su mortalidad después de su germinación (Martín, 1998).

En tejido vivo y en medio PDA, desarrolla abundante micelio blanco, algodonoso y ramificado, de donde se forman posteriormente esclerocios esféricos, pequeños y negros sobre la superficie. Los esclerocios maduros muestran rápidamente su corteza diferenciada y frecuentemente con paredes pigmentadas, la corteza es de 2 a 3 células gruesas; la corteza y medula muestran contenido celular granular, la pared de las células no. Los espacios inter-hifales de la medula contienen material gelatinoso. En general hay producción abundante de esclerocios pero se reportan razas aberrantes que producen mayormente micelio (Martín, 1998).

Madurez. La población incluye una mezcla de esclerocios los cuales están maduros (oscuros), inmaduros (claros) o dañados con la corteza rota). La falta de una corteza protectora o una corteza dañada puede reducir su sobrevivencia (Martín, 1998).

1.2.5. Condiciones ambientales y edáficas favorables a *S. cepivorum* Berk.

1.2.5.1. Temperatura

La temperatura es el elemento climático mas estudiado y el que más influye en la germinación, desarrollo del patógeno y la enfermedad en el cuello, comprobándose que tanto la infección como la germinación del patógeno se inician en un rango diferente de temperatura. La máxima germinación de los esclerocios es estimulada por la presencia del hospedante y temperaturas de 15 a 18 °C y un potencial de matriz del suelo de -85 a -300 mb, pocos esclerocios germinan a 9 °C (Ponce, 2006).

En condiciones controladas, la germinación del esclerocio de *S. cepivorum*, tiene un rango de 15 a 25 °C con un óptimo de 20 °C, mientras que el desarrollo de la infección tiene un rango de 10 a 18 °C y un óptimo de 15 °C. en campo cuando la temperatura se mantiene a 27 °C por varios días, el crecimiento del micelio se detiene. El micelio puede crecer dos centímetros a través del suelo e infectar las raíces de plantas vecinas, pocos esclerocios se forman en las raíces. La sobrevivencia de esclerocios es directamente proporcional al incremento de la temperatura, pues de 21 a 30 °C la viabilidad disminuyo en un 50 a 80 %, a temperaturas mayores de 35 °C los esclerocios son incapaces de sobrevivir (Ponce, 2006).

1.2.5.2. pH

Los primeros trabajos fueron realizados por Coley-Smith (1959) quien al evaluar el pH de 3.5 a 8.5 encontró que existen grandes diferencias en la germinación de esclerocios, siendo más alta cuando el pH aumenta, por otra parte observó que la persistencia y viabilidad del esclerocio no fue afectado por el pH del suelo (Ponce, 2006).

Al respecto Adams y Papavizas (1971) determinaron que la germinación óptima de esclerocios es de pH 4.8, con rango de 4.5 a 7.8; a un pH menor de 5 la incidencia fue menor de 30 %; a pH de 6.0 o más la incidencia fue de 90 % (Ponce, 2006).

1.2.5.3. Suelo

Los primeros trabajos que evaluaron el efecto de suelos orgánicos e inorgánicos en la decadencia de esclerocios de *S. cepivorum* mostraron que en este último tipo de suelo la disminución de esclerocios es poco afectada, pero en suelos orgánicos los resultados fueron variables, pues en algunos años se obtuvo una alta reducción de esclerocios, y en otras poca reducción. La germinación de los esclerocios de *S. cepivorum* varía con el tipo de suelo; se encontró un bajo porcentaje de germinación y decadencia de esclerocios en suelos orgánicos (19.4 %), intermedio en suelos arcillosos-arenosos (69.4 %) y alto porcentaje en suelos arcillosos-arenosos con adición de cal (94.4 %) (Ponce, 2006).

1.2.5.4. Clima

Se ha observado que la mayor incidencia de pudrición blanca en el cultivo de cebolla, es en las siembras de otoño (Agosto-Octubre) y cosecha en primavera (Marzo-Mayo). Cuando el cultivo es rastreado y arado así como replantado a fines de la primavera o a principios de otoño, el cultivo raramente es dañado (Adams 1981).

En el caso del Bajío en México los mayores daños ocasionados por *S. cepivorum* son en la siembra de trasplante de otoño (Septiembre-Octubre) y cosecha de Marzo a Mayo. En siembras realizadas a fines de primavera (Junio) los daños prácticamente no existen. Pinto *et al.*, (2000) aseguran que el tiempo de siembra guarda una importante relación con las pérdidas ocasionadas por *S. cepivorum* en ajo; que puede ocurrir hasta un 100 % de pérdidas de ajo cuando estos son sembrados en suelos fríos de Marzo (Ponce, 2006).

1.2.6. Síntomas y signos

La enfermedad puede atacar a la planta en cualquier fase de su ciclo. Los síntomas usualmente se presentan a los 90 días después de la siembra y difieren de acuerdo al estado de desarrollo de la planta y la duración de las condiciones favorables en el suelo, principalmente la temperatura (Granados, 2005). Los síntomas se inician con el amarillamiento, decoloración y la muerte progresiva de las hojas que se inicia apicalmente y continua en sentido descendente. La velocidad de avance varía con la rapidez de ataque del hongo. Las plantas jóvenes pueden marchitarse y morir rápidamente. La infección está acompañada por el desarrollo de micelio en la base del tallo, el micelio es grisáceo o blanco verdoso y de apariencia algodonosa o vellosa y es más evidente cuando las plantas se sacan de la tierra. Una podredumbre semiacuosa destruye las raíces y los catafilos. A partir de un micelio algodonoso aparecen como embebidos en los tejidos en descomposición esclerocios de color blanquecino, que luego se tornan cafés y finalmente negros. Si los bulbos se infectan al final de su desarrollo durante la cosecha solo aparecerá una pudrición incipiente que posteriormente se desarrollará en el almacén (Martín, 1998).

Cuando hay alta densidad de inóculo las plantas pueden morir de forma repentina en grandes áreas del campo, si la infestación es baja pueden morir en grupos de 2 a 40, siendo las plantas centrales del manchón las primeras en morir (Granados, 2005).

El daño mecánico por insectos o nematodos pueden también incrementar la exudación radical, favoreciendo la estimulación de la germinación del esclerocio (Martín, 1998).

1.2.7. Ciclo de vida

Los esclerocios representan el inóculo primario para el desarrollo de la enfermedad, estos pueden permanecer viables de 10 a 20 años en condiciones de

campo y sin necesidad del hospedante. De acuerdo con Coley-Smith (1979) y Coley-Smith *et. Al.* (1990) el porcentaje de sobrevivencia se mantiene por encima del 92 % y la viabilidad puede llegar hasta un 96 % entre los 5 y 10 años de entierro, si el periodo de entierro aumenta a 15 o 20 años los porcentajes de viabilidad oscilan entre 72 y 96 % dependiendo de la profundidad (Granados, 2005).

Una vez formado el esclerocio, permanece en estado de latencia, encontrándose nula respuesta a la germinación en los primeros tres meses aun en presencia del hospedante, obteniéndose un 47 % de germinación a los seis meses de estar enterrado en el suelo, después de este periodo, los esclerocios son fuertemente estimulados a germinación en condiciones de invernadero o campo, cuando está presente el hospedante (Ponce, 2006).

Este proceso es estimulado solamente por exudados de las raíces de las especies del genero *Allium*. Los exudados están constituidos por sustancias no volátiles de sulfoxidos de alkyl y alkenyl-cisteína, los cuales son metabolizados por la microflora del suelo, especialmente por bacterias presentes en la rizosfera, para producir compuestos volátiles (sulfuros de n-propil y alil cisteina) que activan los esclerocios latentes hasta una distancia de 10 cm de la raíz y 30 cm de profundidad. De acuerdo con Somerville y Hall (1987), citado por Granados (2005), solo se requiere de un tiempo de exposición de 15 min para estimular la germinación y el nivel optimo de germinación se alcanza después de 24 h o más, los mismos autores indican que con una concentración de 2.5 % (v/v) de alil sulfuro es posible obtener un 100 % de germinación y conforme aumenta la concentración hasta un 20 % la germinación disminuye hasta el 47 %.

Una vez que el esclerocio ha germinado, penetra en las raíces por medio de un aprehesorio, después crece intra e intercelularmente en las células que componen al parénquima, el tejido cortical se desintegra y luego y luego el tejido vascular es invadido y macerado. La maceración es acompañada por la producción secuencial de enzimas que degradan la pared celular, sobre todo de poligacturonasas (PG) y pectin transeliminadas. También se produce la fitotoxina ácido oxálico que actúa

de forma sinérgica con las PG, quelatan el Ca^{++} y bajan el pH cerca del óptimo para la acción enzimática, provocando la pudrición suave característica; sin embargo, la relación entre las hifas y la distribución de enzimas extracelulares que degradan la pared celular no ha sido bien investigada (Metcalf y Wilson, 1999).

Dos a tres días después de comenzar la germinación, el primitivo esclerocio se produce en la punta de la hifa y mediante la coalescencia de hifas se forman los esclerocios (Romero, 1988). Según Crowe (1995), el micelio se propaga planta a planta por el contacto de las raíces infectadas con las sanas, si se encuentran a una distancia de 1 a 2 cm. Unos pocos esclerocios pueden ser formados en las raíces, sin embargo, la mayoría es formada en la base del bulbo una vez que el hongo ha logrado invadir y desarrollarse en esta parte.

De acuerdo con Adams y Papavizas (1971), la temperatura y el pH óptimos para la germinación de esclerocios es 20 °C con un rango óptimo de 15-25 °C y un pH de 4.8, aunque pueden germinar en pH cercanos a 8. Por otro lado, la temperatura y el pH óptimos para el desarrollo de la enfermedad es de 15 °C con un rango de 10-18 °C y el pH es de 6.1 con un rango óptimo de 5.4-7.8. Walker (1969), citado por Granados (2005), menciona que a temperaturas mayores de 24 °C las plantas permanecen saludables aun en un suelo fuertemente infectado y que la enfermedad se desarrolla más rápidamente en suelos secos (40 % de humedad) que en suelos húmedos (60-80 % de humedad). Galli *et. al.* (1980), confirman lo anterior al mencionar que una baja humedad del suelo es un factor de predisposición importante que favorece el desarrollo del patógeno y que la enfermedad es más severa en suelos de zonas altas y bien drenados. Al respecto, Hartman y Datnoff (1997) citan que suelos saturados pueden enmascarar por completo la enfermedad.

1.2.8. Epidemiología

La pudrición blanca es una enfermedad monocíclica y el patrón de disseminación es típicamente agregado; los esclerocios representan el inóculo primario como se

mencionó anteriormente. La diseminación a largas distancias se da por bulbos o almácigos contaminados; a escala local los esclerocios son diseminados por vientos fuertes, inundaciones e irrigación, además del movimiento de materiales y equipo agrícola, así como de animales y trabajadores, lo que podría resultar en una distribución generalizada en todo el terreno (Crowe, 1995). Al respecto, Adams (1979), citado por Granados, 1995, menciona que los esclerocios pueden pasar a través de una bomba de irrigación y ser asperjados en el campo a razón de 0.2 esclerocios por litro de agua. Recientemente, Ramírez, *et. al.* (2002) citan que el acaro *Rhizoglyphus robustus* (Astigmata: Acaridae) puede influir en la epidemiología de la pudrición blanca, ya que se descubrió que transporta fragmentos de micelio y esclerocios a través de sus piezas bucales y excretas.

Adams y Papavizas (1971), citado por Granados, (2005), menciona que en sus primeros estudios sobre la relación entre la densidad de inóculo y enfermedad, mencionan que 5 esclerocios por gramo de suelo pueden causar una incidencia apreciable de enfermedad. Más tarde Crowe *et. al.* (1980), citan que el inóculo de *S. cepivorum* es muy eficiente, debido a que muchos esclerocios germinan y que cada esclerocio puede iniciar una infección. Así, reportan una incidencia de 10 a 100 % debida a densidades de inóculo de 0.001 a 0.1 esclerocios por gramo de suelo.

1.2.9. Estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* en cebolla

A pesar de que la pudrición blanca es una enfermedad muy seria en las principales regiones productoras de México, relativamente poca investigación ha sido generada para solucionar este importante problema, en parte por lo difícil que resulta trabajar con los problemas fitopatológicos del suelo (Ponce, 2006).

Los primeros intentos para el combate de la pudrición blanca datan aproximadamente del año 1920, en la primera instancia se probó con prácticas de combate cultural como rotación de cultivos y exclusión de material contaminado; pero conforme la infestación se hizo más intensa y ampliamente distribuida, estas

medidas fueron cada vez menos eficaces, por lo que se inició con el uso de fungicidas químicos. Hasta la fecha el control de *S. cepivorum* ha sido difícil, los intentos de combate empleando métodos químicos no han resultado del todo satisfactorios y tienen un elevado costo económico y ecológico (Pérez *et al.*, 2000).

1.2.10. Combate por resistencia

Utkhede y Rahe (1978), citados por Granados, (2005), realizaron ensayos para evaluar la resistencia de la cebolla ante la infección por *S. cepivorum*. En el primero evaluaron 64 cultivares tanto en el laboratorio como en el campo y en el segundo 294 cultivares analizados en campo. En ambos experimentos la conclusión fue la misma “ninguno de los cultivares es inmune a la infección por pudrición blanca”, mencionan que los cultivares comerciales difieren significativamente en susceptibilidad y rendimiento en presencia de niveles de inóculo altos y uniformes. Citan que, estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones ambientales o variaciones en el patógeno. Años más tarde Coley-Smith (1990) informó que las investigaciones concernientes a variedades resistentes han producido resultados inconsistentes, causados probablemente por no tomar en cuenta factores geográficos y climáticos durante la ejecución de los experimentos. Menciona, además, que la resistencia no ha sido descubierta y que los progenitores silvestres presentan poco potencial genético para hallarla, por lo que pensar en combate por resistencia como alternativa de manejo para esta enfermedad, es una posibilidad remota.

Recientemente, Hunger *et al.* (2002), mencionan que la posible ruta para obtener cultivares resistentes es la ingeniería genética, por medio de ella se podrían producir materiales que no exuden estimulantes de la germinación o cultivares que produzcan compuestos inhibitorios a la pudrición blanca.

1.2.11. Control biológico

La siembra consecutiva de un cultivo ayuda a la intensificación parasítica que puede causar una rápida manifestación de la enfermedad al incrementar la concentración de inóculo y propiciar la pérdida de eficacia del biocontrol. El conocimiento de mico-parásitos de *S. cepivorum* en condiciones de campo, nos permite definir mejor nuestras estrategias de control biológico, ya que incrementaríamos aquellos mico-parásitos que son más frecuentes en campo, los cuales se encuentran bien adaptados (Ponce, 2006).

El combate biológico, en este tipo de enfermedades, está dirigido a disminuir la densidad de inóculo mediante antagonistas que destruyan los esclerocios o en algunos casos que eviten su formación (Cook, 1979).

Crowe *et al.*, (1980) evaluando viabilidad de esclerocios en suelos infestados, encontraron como mico-parásitos más frecuentes a bacterias Gram negativas, *Trichoderma viride*, *Fusarium* spp., *Streptomyces* spp. Estos resultados son apoyados por diversos investigadores (Steward *et al.*, 1986; Hindarf y Fawzy, 1986) quienes aislaron de esclerocios, rizosfera y suelo, con mayor frecuencia: *Trichoderma harzianum*, *Penicillium nigricans*, *Coniothyrium minitans*, *Gliocadium roseum* y *Sporidesmium esclerotivorum* (Ponce, 2006).

En 1982, Oliveira *et al.*, Evaluaron la acción antagónica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium* sp. Sobre *S. cepivorum*. Los resultados mostraron alta eficiencia antagónica de los 3 hongos; así, *T. harzianum* destruyó las hifas del patógeno e inhibió su crecimiento en un 65.6 %, mientras que *P. lilacinus* y *Penicillium* sp. Redujeron la colonia de *S. cepivorum* en 60.3 %.

Por otro lado, Utkhede y Rahe (1983), estudiaron 4 aislamientos de la bacteria *Bacillus subtilis* como agente de combate biológico y demostraron que esta presenta un alto grado de estabilidad en la formación de la zona de inhibición *In Vitro*, lo que indicó que la bacteria es un antagonista potencial.

Posteriormente, Mesén (1997) encontró que los hongos *Penicillium italicum*, una especie de *Trichoderma* y bacterias no identificadas fueron capaces de colonizar esclerocios o restos no viables de ellos, provenientes de suelo enmendado tanto en campo como en laboratorio. Por otra parte, McLean y Stewart (2000), confirmaron el poder antagonista de los hongos *Chaetomium globosum*, *Coniothyrium minitans*, *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. virens* contra *S. cepivorum* en ensayos de invernadero. En el mismo año, cortes indica que se obtuvo más del 60 % de protección contra el patógeno, con la aplicación al suelo de suspensiones de esporas de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp., *Gliocadium* sp. En el 2001, Obregón menciona que *T. harzianum* es un antagonista potencial en el combate de la pudrición blanca en cebolla, ya que presentó capacidad de invasión entre 50 y 75 % sobre el patógeno en ensayos *In Vitro*. Al respecto, Peyghami (2001), cita que el mecanismo por el cual *T. harzianum* y *T. viride* actúan es el enrollamiento de hifas, la deformación y la lisis.

Luego, Paris *et al.*, (2002), evaluaron la efectividad de siete aislamientos nativos de cebolla contra *S. cepivorum* en invernadero. Encontraron el actinomiceto Ac001, la levadura *Pichia anychis* Lv031 y la bacteria *Serratia marcescens* Br3129 suprimiendo el patógeno en 67.1, 65.8 y 63.5 %. Respectivamente, siendo significativamente mejores que los otros tratamientos; mientras que las bacterias *Pantoea agglomerans* Br3124, *Bacillus subtilis* Br006, *B. lentus* Br3118 y *Paeni Pseudomonasalvei* Br3119 presentaron valores de supresión, entre el 40 y 56 %; entre tanto *T. harzianum* T39 suprimió el 68.2 % y no presentó diferencias significativas con los demás tratamientos.

En Costa Rica, Granados (2004), encontró que es posible aislar hongos con potencial antagónico, nativos de las zonas productoras de cebolla, como *Trichoderma* spp., *Gliocadium* sp. Y *Paecilomyces* sp.

1.2.12. Solarización

La solarización redujo la densidad y la viabilidad del inoculo de *S. cepivorum* hasta en un 75 y 84 %, respecto del testigo no solarizado (Ulacio, 2003). Por su parte Méndez (2003) buscando alternativas de manejo de la pudrición blanca en cebolla, reporta que los tratamientos de extracto de cebolla, la incorporación de brócoli y azida de sodio (20 y 40 ppm) presentaron el menor progreso de la enfermedad. El tratamiento azida de sodio con solarización presentó los más altos rendimientos de bulbo y tallo en cebolla. La incorporación de crucíferas como brócoli, col mas solarización reduce el número de esclerocios en el suelo entre 61 a 75 %, lo cual permite incrementos en la producción de cebolla del orden de 30 a 41 % (Ponce, 2006).

Adams (1987), citado por Granados (2005), menciona que la alta temperatura combinada con baja humedad del suelo reduce la supervivencia y actividad de los esclerocios de *S. cepivorum*. Así, a una temperatura de 35 °C es posible dañar completamente el 50 % de los propágulos (DL_{50}) en 129.6 h, mientras que si la temperatura aumenta a los 50 °C se requieren solamente 0.8 h para lograr el mismo efecto. Este hongo es más sensible al calor que otros que producen esclerocios. El autor indica que la solarización con plástico claro debería aumentar la temperatura del suelo lo suficiente, como para reducir efectivamente la viabilidad de los esclerocios. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la localización de los propágulos en el perfil del suelo es un factor determinante para el éxito de esta práctica de combate.

1.2.13. Uso de fertilizantes

Las fuentes de nitrógeno tienen un fuerte efecto sobre la incidencia de la enfermedad. El tratamiento a base de nitrato de potasio resulto ser la mejor fuente de nitrógeno observando solo un 3 % de incidencia, en contraste, la urea y el sulfato de amonio aumentaron la incidencia en un 100 % (Méndez, 2003). La incidencia de la pudrición blanca depende de la cantidad de azufre aplicado al

suelo y de la interacción entre la cantidad y fuente de nitrógeno con el azufre. Se observó una relación sinérgica en la absorción de calcio, nitrógeno y en la absorción de nitrógeno y azufre, mientras que la interacción entre calcio y azufre fue antagonista. La incidencia de la enfermedad depende de la cantidad de calcio en la planta, observándose que a mayor cantidad de calcio en el bulbo guarda una relación con la pared celular en bulbo y raíz, que redundaría en una mayor cantidad de bulbos sanos (Delgadillo, 1998).

1.2.14. Control químico

Porter *et al.*, (1991) trabajando con la pudrición blanca de la cebolla encontró que los tratamientos más efectivos consistieron en la combinación de tratamiento de semilla seguida de aspersiones al suelo de procymidone, que redujeron la enfermedad de 78 a 16 % e incrementaron la producción de cebolla de 5.7 a 14.6 ton•ha⁻¹. Delgadillo (1988), al estudiar el efecto de la densidad de inóculo de *S. cepivorum* en la eficacia del fungicida tebuconazole (Folicur 250 EW), para controlar la pudrición blanca en el cultivo de ajo, observó que el tebuconazole redujo 1.6 % la incidencia de la enfermedad, aumentó el rendimiento a 5,441 kg•ha⁻¹ y disminuyó la densidad final de esclerocios después de la cosecha del ajo.

La aplicación foliar del tebuconazole y triadimenol llega a reducir la enfermedad en un 85 % comparado con el testigo sin aplicar. La aplicación al suelo de tebuconazole antes de sembrar provee altos niveles de control durante la temporada, el tratamiento a la semilla con este fungicida causa problemas de fitotoxicidad (Ponce, 2006).

1.3. DESCRIPCIÓN DE LOS ORGANISMOS ANTAGONISTAS

1.3.1. *Trichoderma* spp.

1.3.1.1. Importancia y distribución

El género *Trichoderma* es cosmopolita en el suelo, madera y material vegetal muerto. Las especies de *Trichoderma* son componentes dominantes de la microflora del suelo de hábitats con condiciones muy diversas. Esta puede ser atribuible a la diversidad de la capacidad metabólica de cada especie de *Trichoderma* y su naturaleza agresivamente competitiva (Rangel, 2006).

En el caso de hongos, especies de *Trichoderma* son antagonistas muy conocidos, particularmente en el suelo, además de ser un organismo que se caracteriza por su rápido crecimiento, involucra competencia, antibiosis, así como interacciones hiperparásitas, lo cual hace a este género atractivo para su uso como agente de biocontrol (Rangel, 2006).

El género tiene excelentes propiedades para el control biológico, siendo especialmente efectiva contra *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium*. A su vez, es un excelente estimulador del crecimiento radicular, su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente. Algunas cepas, son capaces de colonizar y crecer en raíces a medida que estas se desarrollan (Valenzo, 2005).

Las especies de *Trichoderma* utilizadas mayormente en el control biológico son: *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma viride* Pers, *Trichoderma hamatum* (Bonord) Bainier, *Trichoderma polysporum* Link y *Trichoderma koningii* Oudem, las cuales se han reportado con exitosa inhibición del crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos; *T. harzianum* es mencionada con mayor frecuencia, especialmente contra hongos del suelo (Valenzo, 2005).

1.3.1.2. Taxonomía

El género *Trichoderma* lo propuso Person en 1794 con 4 especies. Si se considera que la mayoría de las especies del género *Hypocrea* representan especies de este hongo, por lo tanto hoy en día habrá más de 100 especies (Valenzo, 2005).

La clasificación taxonómica de acuerdo a Noyd, (2000), es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hyphales (Moniliales)

Familia: Moniliaceae

Género: *Trichoderma*

El género *Trichoderma* está dividido en 5 secciones de acuerdo con Bisset, 1991.

1. Sección *Trichoderma*
2. Sección *Pachybasium* (Sacc)
3. Sección *Longibrachiatum* (Bissett)
4. Sección *Saturnisporum* (Doi)
5. Sección *Hypocreanum* (Doi)

1.3.1.3. Descripción morfológica

Este hongo se caracteriza por tener conidióforos largos y densos, a menudo con elongaciones hifales estériles; ramas estériles en su mayoría cortas y densas, que fructifican abundantemente a través de fiálides cortas y gruesas; las colonias formadas pueden ser de color blanco, verde pálido, verde amarillas o verde oscuro, además por su micelio de crecimiento rápido, colonias hialinas, conidióforos ramificados que terminan en macizos con divergencias, a menudo inclinados irregularmente, con fiálides en forma de botella. En algunas especies los conidióforos pueden terminar en apéndices estériles y entonces las fiálides nacen de ramas laterales; los conidios son hialinos o más comúnmente verdes con

paredes rugosas o lisas; las clamidosporas son hialinas y generalmente, se encuentran presentes en el micelio de de cultivos viejos (Valenzo, 2005).

Las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente, usando un amplio rango de compuestos como única fuente de carbono y nitrógeno, que al cabo de cuatro días llenan la superficie de medio del cultivo contenido en una caja Pietri. La mayoría de las especies de *Trichoderma* son fotosensitivas, esporulan rápidamente sobre muchos sustratos naturales o artificiales formando anillos concéntricos en respuesta a alternativas de luz y oscuridad, con producción de conidios durante periodos de luz (Valenzo, 2005).

Las estructuras de esporulación son conidios y las de resistencia, clamidosporas; estas son similares a las de los otros hongos formadores de clamidosporas, son de 5 a 10 veces más grandes que los conidios por sus grandes reservas de lípidos; las cuales son intercalares o terminales, de forma cilíndrica a globosa. Aunque estas son mencionadas rutinariamente en informes taxonómicos, muy poco se ha reportado sobre la formación e importancia ecológica de estas estructuras y su potencial en el biocontrol; además, por su naturaleza representan la forma de propagación más efectiva. Los conidios son subglobosos u ovoides y miden desde 2.1 a 3 μm , de paredes lisas, hialinas o de color verde pálido. (Valenzo, 2005).

Las preferencias ecológicas de algunas especies de *Trichoderma* de acuerdo con Danielson y Davey (1973), al observar que cuando se mantienen en condiciones secas en el suelo por largos periodos de tiempo, las poblaciones del hongo decrecen. Así mismo, afirman que ciertas líneas de *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pseudokoningii* están adaptadas a condiciones de humedad excesiva del suelo y que *T. viride* y *T. polysporum* se ubican en áreas donde prevalecen bajas temperaturas, mientras *T. harzianum* se encuentra comúnmente en regiones cálidas y *T. hamatum* y *T. koningii* están ampliamente distribuidas en áreas de diversas condiciones climáticas.

1.3.1.4. Ciclo de vida

En el suelo se identifica como una mota de color verde, cuando se observan en el microscopio da una apariencia de un pequeño árbol, que produce esporas o conidios asexuales, las que van a asegurar la sobrevivencia del hongo en la próxima generación. Este produce en el micelio unos ensanchamientos, que toman forma globosa u ovoide llamadas clamidosporas, las cuales son bastante tolerantes a condiciones ambientales adversas y son las estructuras de sobrevivencia, que pueden perdurar a través del tiempo (Valenzo, 2005).

El hongo crece y ramifica a través de hifas típicas de 5 a 10 μm de diámetro. La esporulación asexual ocurre en una sola célula, dan generalmente una apariencia de color verde, estos se reproducen en forma abundante en las colonias donde crece. También el hongo forma clamidosporas de resistencia intercelular, que forman en una sola célula, pero pueden fusionarse dos o más de estas (Valenzo, 2005).

1.3.1.5. Mecanismos de acción

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre las plantas o en las heridas. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Esto se debe a que los riesgos de selección del patógeno por resistencia al antagonista, se reducen al actuar este último por varios mecanismos. También el riesgo de resistencia se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas de diferente modo de acción (Valenzo, 2005).

Los principales modos de acción ejercidos por *Trichoderma* para el control biológico es el microparasitismo, competencia por nutrientes, antibiosis e inducción de resistencia; así mismo, algunas especies producen bajos niveles de pH, aunque este no es el principal mecanismo de acción (Valenzo, 2005).

A continuación se citan los principales mecanismos mediante los cuales actúa *Trichoderma* spp.

1.3.1.6. Microparasitismo

Se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro; puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, Beta-1-3-glucanas y proteasas, que lisan las paredes de las hifas y conidios (Valenzo, 2005).

Hernández (2005), cita que el hongo actúa por partes, de la siguiente forma: 1) altera la pared celular, el cual provoca la degradación de esta 2) retracción de la membrana plasmática de la pared y 3) desorganización del citoplasma (Valenzo, 2005).

1.3.1.7. Competencia por nutrientes

Esto se puede definir como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial, para que exista competencia es que haya “escasez” de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Valenzo, 2005).

1.3.1.8. Antibiosis

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas a otros microorganismos, las cuales actúan a bajas concentraciones menores a 10 ppm. La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado (Valenzo, 2005).

Trichoderma y *Gliocladium* spp., producen una variedad de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, los que inhiben a otros microorganismos; también tienen una actividad biológica ya que no actúa solamente la estructura suave de la hifa sino también en su pared dura, como conidios, clamidosporas y esclerocios maduros. Este hongo también actúa produciendo enzimas como las endo y exoglucanasas, quitinasas y otras como las proteasas, lipasas y fosfatasas que degradan la pared celular durante el biocontrol; así bien, utiliza a las enzimas, quitinasa junto con la enzima hidrolítica β -1,3 glucanasa, para degradar las células del patógeno y reducir la enfermedad (Valenzo, 2005).

La antibiosis es deseable que no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que al igual que cuando se usan fungicidas sintéticos, existe el riesgo de aparición de cepas de patógeno resistentes al antibiótico (Valenzo, 2005).

1.3.1.9. Inducción de resistencia

Las plantas como otros seres vivos han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra que les ha llevado a desarrollar mecanismos de defensa muy poderosos contra invasores. De esta forma se acostumbra postular que la resistencia es la regla, mientras que la susceptibilidad es la excepción. Las plantas presentan mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia, todos ellos gobernados genéticamente. Se puede inducir resistencia en productos cosechados mediante el uso de diferentes inductores como bajas dosis de luz ultravioleta, compuestos naturales de las plantas como quitosano (producto de la deacetilación de la quitina), y también mediante el uso de microorganismos antagonistas. Está demostrado, que levaduras utilizadas en el biocontrol de patógenos de postcosecha, además de competir por espacio y nutrientes son capaces de inducir resistencia en la planta; tal es el caso de *Pichia guilliermondii* Wickerman (US-7), la cual ha mostrado ser inductora de la producción de fitoalexinas en frutos de cítricos (Valenzo, 2005).

En algunos casos se especula la capacidad de solubilización de algunos nutrientes minerales como zinc o fosforo, escasamente solubles o insolubles. Si bien, *Trichoderma* es un agente efectivo de control biológico, sus efectos son más lentos que los originados por los pesticidas, ya que generalmente transcurren de 5 a 10 días antes de que este muestre sus efectos. El hongo es susceptible a los fungicidas; sin embargo, las investigaciones han detectado genotipos especiales, los cuales son más resistentes a muchos fungicidas, este descubrimiento aumenta el potencial de uso de este hongo y algo muy importante es que estos agentes de control se deben usar con propósitos preventivos más que como correctivos (Valenzo, 2005).

1.3.1.10. Control de enfermedades del suelo

La mayoría de los resultados obtenidos con *Trichoderma* spp., se han obtenido con pruebas realizadas bajo condiciones de laboratorio y/o invernadero, aunque en los últimos años se han realizado varios experimentos en campo, con la finalidad de obtener resultados reales de la actividad biológica; bajo condiciones naturales se debe a su capacidad hiperparasítica contra hongos del suelo como: *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium* sp., *Amillaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Verticillum* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., y *Rhizopus* sp., al actuar como micoparásito este, compite por un sitio y nutrientes y es capaz de producir metabolitos antibióticos como Gliotoxin, muy toxico para *R. solani* (Valenzo, 2005).

Trichoderma ha reducido la pudrición de fresas y vides causadas por *Botrytis cinérea* Pers, durante la cosecha y almacén; otras enfermedades que se han podido reducir en más del 50% son las causadas por *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Septoria*, *Colletotrichum* y *Phoma* (Valenzo, 2005).

1.3.1.11. Formulación del producto

Trichoderma harzianum es un agente de control biológico controlador de fitopatógenos que se formula como polvo humectable, se usa ampliamente contra hongos tales como *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum* spp., *Plasmopara cubensis*, *Pseudoperonospora* sp., *Monilina* sp., entre otros. No es tóxico para animales ni humanos, no contamina el agua, ni es tóxico a peces, se puede aplicar a las semillas (Rangel, 2006).

Harman (1996), afirmó que los fungicidas a base de este hongo aplicados en conjunto con otros fungicidas químicos tiene una relación favorable pues los sintéticos ofrecen protección a corto plazo, mientras que *T. harzianum* funciona a largo plazo y este mismo autor menciona que *T. harzianum* se mezcla en tanque con iprodiona, el primero actúa como un excelente sinergista para controlar *B. cinérea* en uva (Rangel, 2006).

A diferencia de los pesticidas, "*Trichoderma*" no deja residuos en la tierra y actúa como un habitante natural del suelo (respetando el sabor natural de cultivos comestibles). "*Trichoderma*" subsiste en cualquier territorio pero antes se tiene que adaptar. Se adapta perfectamente en los suelos arcillosos y arenosos (Rangel, 2006).

1.3.2. *Pseudomonas* sp.

El género *Pseudomonas* constituye uno de los grupos más complejos, son cosmopolitas y su ubicuidad les permite colonizar cualquier sustrato imaginable, son colonizadoras de las raíces de las plantas hasta casi formar una simbiosis, son capaces de poner en forma asimilable el hierro, imprescindible en la función clorofílica vegetal, algunas tienen un marcado carácter antagonista frente a otros microbios (Botero, 1999).

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* participa en el control biológico de fitopatógenos de cultivos agrícolas. *P. fluorescens* es un habitante común de la

rizosfera, se caracteriza por producir pigmentos amarillo verdosos que fluorescen bajo luz ultravioleta y que funcionan como sideróforos. Estos compuestos se producen en condiciones de escasez o en ausencia de hierro, actúan como quelantes de este elemento y sirven en un sistema de transporte de hierro de alta afinidad hacia el interior de la célula bacteriana (Valencia *et al.*, 2005).

Taxonomía

La clasificación taxonómica de acuerdo con Agrios, (2005), es la siguiente:

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Grammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: *P. fluorescens*.

1.3.2.1. Características

Pseudomonas es una bacteria que posee células en forma de varilla rectas o ligeramente curvadas, cuyo tamaño oscila entre 0.5-1.0 μm de ancho por 1.5-5.0 μm de largo; es Gram negativa y móvil mediante uno o varios flagelos polares; es un organismo aerobio. Entre los diversos pigmentos producidos por las *Pseudomonas* figuran los pigmentos fluorescentes llamados pioverdinas, cuya existencia se hace más patente cuando las bacterias crecen en medios pobres en hierro como es el king-B; las pioverdinas son de color verde-amarillento, solubles en agua y difusibles en medio de cultivo, poseen fluorescencia bajo luz ultravioleta que varía de blanca a verde-azulada. Se pueden visualizar con una longitud de onda de 400 nm. Además algunas especies usadas en el control biológico producen pigmentos como la fluoresceína y la piocianina, los cuales se difunden en el medio de cultivo (Botero, 1999).

1.3.2.2. Mecanismo de acción

Los mecanismos de acción de estas bacterias en contra de fitopatógenos son diversos. Investigaciones han mostrado que varias especies de *Pseudomonas* producen antibióticos como pirrolnitrina, 2,4- diacetilfloroglucinol, piocianina y el ácido fenacín-1- carboxílico, además de los sideróforos y bacteriocinas. La síntesis de estos metabolitos secundarios participan en el biocontrol de diversos fitopatógenos. Particularmente, a la síntesis de sideróforos por *Pseudomonas* fluorescentes se les ha atribuido un enorme interés por participar en la promoción del crecimiento vegetal y suprimir el crecimiento de patógenos de raíz. Se ha propuesto que tales compuestos pueden secuestrar el hierro del ambiente rizosférico, impidiendo que sea disponible para los patógenos (Santoyo *et al.*, 2010).

Anteriormente, los autores reportaron el papel inhibitorio de la cepa ZUM80 de *Pseudomonas fluorescens* hacia los patógenos *Erwinia carotovora* y *Ralstonia solanacearum* (antes clasificada dentro del género *Pseudomonas*). Estudios recientes mostraron que la misma cepa ZUM80, logra inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum*. Dicha cepa ZUM80 de *P. fluorescens*, inhibe el crecimiento del fitopatógeno en condiciones limitantes de hierro. De forma interesante, se observó que la mutante Sid, aún en condiciones donde el hierro no era una limitante, seguía mostrando actividad antagónica hacia dicho patógeno. Los resultados sugirieron que probablemente algún otro metabolito, no regulado por hierro, podía inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* (Martín, 2009).

1.3.2.3. Control de enfermedades

Las bacterias *Pseudomonas* del grupo fluorescente se consideran una opción prometedora en el control biológico de fitopatógenos (Johri *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 2005). Este grupo bacteriano es un importante colonizador de la rizósfera de plantas, además de presentar actividad antagónica hacia diversos fitopatógenos y ser promotoras del crecimiento (Bangera y Tomashow, 1996; Burkhead diversas

cepas de *Pseudomonas fluorescens* que han sido registradas (y algunas de ellas patentadas) para ser usadas en los cultivos agrícolas (Santoyo *et al.*, 2010).

1.4. LITERATURA CITADA

- Adams P. B. 1981. Forecasting onion White root disease. *Phytopatology* 71, 1178 – 1181.
- Adams, P. B.; Papavizas, G. C. 1971. Effect of Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some Soil Environmental factor son disease severity. *Phytopatology*.61:1253.
- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. Editorial LIMUSA. 2ª ed. México, D.F. 838 p.
- Anaya Rosales S., Romero Nápoles, J. 1999. Hortalizas, Plagas y Enfermedades. Trillas. 544 p.
- Bautista M. N.; Díaz G. O. 2001. Estudios de efectividad biológica con insecticidas. *In: Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas*. Grupo Editorial Sagitario. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 29-42.
- Botero O., M. J. 1999. Estudios de la Interacción Biológica de Microorganismos Relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.) PENZ. SACC, Agente Causal de la Antracnosis en Tomate de Árbol (*Solanum betaceae* (CAV.) SENDT.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Manizales, Colombia. Pp 58.
- Castellanos J. Z. 2009. Manual de Producción de Tomate en Invernadero. Intagri. Celaya, Guanajuato. 458 p.
- Cepeda S. M. 1996. Nematología agrícola. Ed. Trillas. México. 305 p.
- Cepeda S. M. 2009. El tomate rojo: cultivo y control parasitológico. Ed. Trillas. México. 222 p.
- Cid Del Prado V. I.; Cristóbal A. J. 2001. Estudios de efectividad biológica con nematicidas. *In: Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas*. BAUTISTA M. N.; DIAZ G. O. Ed. Grupo Editorial Sagitario. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 99-105.

- Coley-Smith JR, Mitchel CM, Sansford EC, 1990. Long-term survival of *Sclerotinia* of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant pathology* 39, 58-69.
- Cook, R.J. 1979. Antagonism and biological control: concluding remarks. In *Soil borne plant pathogens*. Eds. Schippers, B y Gams, W. New York, Academic Press. p. 653-657.
- Crowe, F. J. 1995. White rot .In *Compendium of onion and garlic diseases* .Eds. H.F. Schwartz y S.K. Mohan. Minnesota. APS Press. p 14-16.
- Crowe, F. J.; Hall, D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74-78.
- Gil V.; Sánchez del C.; Miranda V. 2003. Producción de jitomate en hidroponía bajo invernadero. UACH-Preparatoria Agrícola. Chapingo, Méx. 90 p.
- Delgadillo S., F. 1998. Control Integrado de la Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en el Cultivo de Ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Doctorado, Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 86 p.
- Entwistle, A., R. 1990a. Allium white rot and its control. *Soil Use and Management* 6: 201-209.
- FAO. 2012. Dirección de Estadística. <http://www.faostat.fao.org>. (Consultado en octubre de 2012).
- García, A.C.de J. 2007. Reconsideración epidemiológica de estrategias para el manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-23 p.
- Granados M., M. 2005. Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 29 (2): 143-156. ISSN:0377-9424.

- Granados M., M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Agronomía Costarricense 105 p.
- Guenkov, G. (1969). Fundamentos de la Horticultura Cubana. Edición Revolucionaria. La Habana, Cuba. 18p.
- Hartman, G.; Datnoff, L. 1997. Vegetable Crops. In Soil bone diseases of tropical crops. Eds R. J. Hillocks y J.M. Waller. CAB INTERNATIONAL. Cambridge, University Press. p.161-162.
- Hoyos, C.L. et al. 2008. Antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* spp. Sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. Y *Rhizoctonia* spp. Revista colombiana de ciencias hortícolas, Vol. 2-No.176-86 pp.
- Hunger, S. A.; McLean, K. L.; Eady, C. C.; Stewart, A. 2002. Seedling infection assay for resistance to *Sclerotium cepivorum* in allium species (en línea). New Zealand Plant Protection 55:193-196. Consultado 04 mar. 2004. Disponible en <http://www.hortnet.co.nz/publications/nzpps>
- Marban M. N.; THOMASON. 1985. Fitonematología avanzada. Cámara Nacional de la Industria Editorial. México. 345 p.
- Martín H., M. J. 2009. Aislamiento y Selección de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal en Cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) con Capacidad Antagónica Frente a *Fusarium* sp. Cris Venner Rodríguez. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, D.C.
- Martín, M.R. 1998. Inducción de la germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. Por germoplasma de ajo (*Allium sativum* L.) con respuesta diferencial a la pudrición blanca. Tesis profesional. Depto. De Parasitología agrícola. UACH. Chapingo, México. 31 p.

- McLean, K. L.; STEWART, A. 2000. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28: 115-122.
- Mendez, D. M. 2003. Estrategias de manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) para el cultivo de cebolla en condiciones de campo e invernadero. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-28 pp.
- Mendoza Z., C. 1996. Enfermedades fungosas de las hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 85 p.
- Mendoza Z., C. 1999. Diagnóstico de enfermedades fungosas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 168 p.
- Mesen, R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p.
- Metcalfe, D. A.; Wilson, C. R. 1999. Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant Pathology* 48: 445-452.
- Nieto A. D.; Acosta R. M.; Valencia A. M.; Mena N. G. 2001. Estudios de efectividad biológica con fungicidas. *In: Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas*. BAUTISTA M. N.; DIAZ G. O. Ed. Grupo Editorial Sagitario. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 106-129.
- Nuez F. 1995. El cultivo del tomate. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 385-461.
- Papavizas G. C. 1972. Insolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. *Phytopathology* 62:545-549.

- Paris, M. A.; Cotes, A. M.; Elad, Y.; Kolh, J.; Shtienberg, D. 2002. Evaluation of microbial isolates for control of *Sclerotium cepivorum* in onion. In Proceedings of 7 th working group meeting. IOBC-WPRS Working Group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens". Kusadasi, Turkey. 25(10): 311-314.
- Peyghami, E. 2001. Antagonic effects of several isolates of Trichoderma on fungi causing onion root rot, East Azarbaijan Province. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 32(4): 747-755.
- Pérez R. B. 2009. Escala de daño para *Alternaria mali* en el cultivo de manzano. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 37 p.
- Pérez, M. L.; Hernández, V. O.; Cantú, G. F.; Romero, R. A. 2000. Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo *Allium sativum* L. en la zona del Bajío, México. In XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. p. L67.
- Pinto, C.M.F., L.A. Maffia, V.W.D. Casali, R.D. Berger, A.A. Cardoso, 2000. Production components and yield loss of garlic cultivars planted at different times in a field naturally infested with *Sclerotium cepivorum*. International Journal of Pest Management 46:67-72.
- Ponce, H.V. 2006. Análisis temporal y espacial de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo, en condiciones del Bajío, México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-15 pp.
- Ramírez, A.; Zavaleta, E.; Kawasoe, S.O.; Sánchez, M.; Valdez, J. 2002. A possible role for *Rhizoglyphus robustus* Nesbitt (Astigmata: Acaridae) in transmission of *Sclerotium cepivorum* Berk. (Deuteromycetes: Mycelia Sterilia). Appl. Entomol. Zool. 37(4): 663-669.

- Reyes, P.N. 2000. Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk. Y su relación con ARN de cadena doble. Maestría. Depto. De Parasitología Agrícola. UACH. Chapingo, México. 1-8 pp.
- Reyes, P.N. *et al.* 2003. Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk. Y su relación con ARN de cadena doble. *Agrociencia* 37: 495-502 pp.
- Rodríguez M. M. 2010. Enfermedades bacterianas en hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 305 p.
- Romero, C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Departamento de Parasitología Agrícola. UACH. Chapingo, México. 361 p.
- Sánchez, G.T. 1998. Efecto del extracto de la raíz de *Heliopsis longipes* en el control de *Sclerotium cepivorum* Berk. En ajo (*Allium sativum* L.). Tesis profesional. Depto. De Parasitología agrícola. UACH. Chapingo, México. 1-20 pp.
- Sánchez, P.J.R. *et. al.* 2002. Patogenicidad de cuatro aislamientos mexicanos de *Sclerotium cepivorum* Berk. En tres cultivares de ajo (*Allium sativum* L.). *Agrociencia*. Volumen 36, Número 1.
- Santoyo, G.; Valencia C., E.; Orozco M., M. C.; Peña C., J. J.; Farías R., R. 2010. Papel de los Sideróforos en la Actividad Antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 Hacia Hongos Fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, vol. 28, núm. 1, pp. 53-60.
- SEDAGRO. 2006. Cierre preliminar 2006 de producción de tomate rojo en el estado de Morelos.
- <http://www.morelos.gob.mx/portal/index.php/morelos/141/1839-estadisticas-cuernavaca> (Consultado en marzo 2011).
- SIAP-SAGARPA. 2012. Producción agrícola anual por cultivo, superficie y producción. <http://www.sagarpa.gob.mx/siap/estadisticas.htm>. (Consultado octubre, 2012).
- Tenango, P. J. A. 2000. Determinación de una Especie de Trips (Thysanoptera: Thripidae) y su Control Mediante Hongos Entomopatógenos (Deuteromycotina)

- en el Cebolla (*Allium cepa* L.) en Tepalcingo, Morelos. Tesis profesional. Depto. Parasitología Agrícola. U.A.Ch. Chapingo, México. 78 p.
- Toledo, B.A. 1998. La cebolla cultivada en fertirrigación. Tesis profesional. Depto. De Parasitología agrícola. UACH. Chapingo, México. 1-41 pp.
- Ulacio O., D. *et.al.* 2003. Materia Organica y Microorganismos Antagonistas como Estrategias de Manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. Y su Impacto en el Progreso de la Pudrición Blanca de en Ajo (*Allium sativum* L.). revista Mexicana de la Ciencia de Fitopatología. 21 (3): 346-354.
- Utkhede, R. S.; Rahe, J. E. 1978. Screening commercial onion cultivars for resistance to white rot. *Phytopathology* 68: 1080-1083.
- Valencia C., E; Villegas M., J.; SánchezY., Juan, M.; Peña C. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* Zum80 incapaces de producir sideróforos. *TERRA Latinoamericana*, Vol. 23, Núm. 1, pp. 81-88.
- Villa, P. M.; Frías, A.; González, G. 2005. Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. vol. XXXIX, núm. 3. Ciudad de La Habana, Cuba. pp. 40-44.
- Zamora G. I. A. 2008. Principales insectos plaga que afectan los cultivos de jitomate y chile en Vista Hermosa y Yurécuaro, Mich. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 68 p.

<http://www.harrismoran.com/products/tomato/ponyexpress.htm>.

CAPITULO II. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CORROBORACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANCA (*Sclerotium cepivorum* Berk.), EN CEBOLLA

2.1. INTRODUCCIÓN

La cebolla es una de las hortalizas de exportación más importantes para México; la producción de esta hortaliza ubica al país en el décimo tercer lugar mundial con 1.2 millones de toneladas, atrás de China y con casi dos veces lo que obtienen Argentina y Perú (650 mil toneladas) (SIAP, 2012).

La cebolla como cualquier otra planta está expuesta al ataque de plagas y enfermedades, las cuales son una fuerte limitante en la producción. De acuerdo con Toledo (1998), la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) se encuentra dentro de las principales enfermedades que afectan a este cultivo.

La pudrición blanca de la cebolla provoca pérdidas de hasta del 100 % y obliga a los productores a abandonar la tierra por falta de estrategias de manejo adecuadas. Se han reportado niveles de inóculo muy disímiles como 1.5 a 9000 esclerocios•Kg⁻¹ (Ponce, 2006).

El diagnóstico exacto de una enfermedad es el primer paso hacia un control exitoso de los patógenos. Cuando se ha identificado correctamente una enfermedad y se conoce su causa, se pueden tomar las medidas necesarias para su control. Para hacer un diagnóstico es necesario examinar varios individuos de la población, conocer las condiciones ambientales prevalentes durante la aparición y desarrollo de la enfermedad y examinar otros factores del suelo, manejo del cultivo y sobre todo conocer perfectamente los diferentes tipos de síntomas que provoca cada enfermedad, así como las características morfológicas del patógeno para poder sacar conclusiones. Algunos de los factores que son tomados muy en cuenta, incluyen la naturaleza de los síntomas en las diferentes partes de la planta, la distribución de las plantas dañadas en el campo, cuándo se presenta ron los primeros síntomas, y además, es necesario conocer el patrón de diseminación

desde el brote de la enfermedad. También es necesario considerar todos los detalles agronómicos relevantes, tales como: variedad, tratamientos de pre plantación, nutrición y el uso de pesticidas. De todos estos los más importantes son: la naturaleza y distribución de los síntomas, así como la morfología del patógeno (Mendoza, 1999).

Con estos antecedentes se planteó como objetivos: caracterizar síntomas de daño y diagnosticar morfológicamente el patógeno causante de la pudrición blanca en cebolla.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de campo

2.2.1. Origen de las muestras

Las muestras se obtuvieron de una huerta comercial de cebolla Var. Suprema, de aproximadamente 4 ha de superficie, ubicada en Cojumatlán de Regules, Michoacán, propiedad del Sr. Raúl Rodríguez Moreno, en donde se encontraron síntomas de pudrición blanca.

2.2.2. Sitio de muestreo

La toma de muestras se realizó en un cinco de oros, tomando 4 plantas con síntomas característicos de pudrición blanca de cada sitio de muestreo.

2.2.3. Características de las áreas seleccionadas

Se hizo un recorrido de campo, para observar síntomas de pudrición blanca, presentes en la huerta comercial y se procedió a realizar la toma de muestras.

2.2.4. Toma de muestras

Para la identificación y aislamiento del agente causal de la pudrición blanca de la cebolla, se procedió a recolectar plantas y bulbos que mostraron síntomas causados por hongos (amarillamiento, marchitamiento y muerte total de la planta).

Las muestras se sacaron extrayendo las plantas por completo, jalándolas del pseudotallo (conjunto de hojas) que posteriormente se colocaron en bolsas de plástico previamente etiquetadas y se llevaron al laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Edo. de México para su procesamiento.

Fase de laboratorio

El aislamiento del hongo se realizó en el laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

2.2.5. Preparación del material vegetal

De las plantas de cebolla colectadas se extrajeron los micro-esclerocios que se encontraban sobre el tejido vegetal, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 1.5 minutos, se enjuagaron en agua destilada estéril tres veces y finalmente se colocaron sobre toallas absorbentes esteriles para secarlos; los pasos anteriores se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar, para evitar posibles contaminaciones (García, 2008).

2.2.6. Aislamiento del hongo

Se utilizó el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) contenido en cajas Pétri de 90 mm de diámetro; en cada una de ellas se colocaron cinco esclerocios de *Sclerotium cepivorum*. Estos fueron incubados a temperatura de 18 a 24 °C y en oscuridad constante; el material se revisó cada 24 h, hasta detectar los primeros crecimientos de hongos a los 4 días (Figura 4).

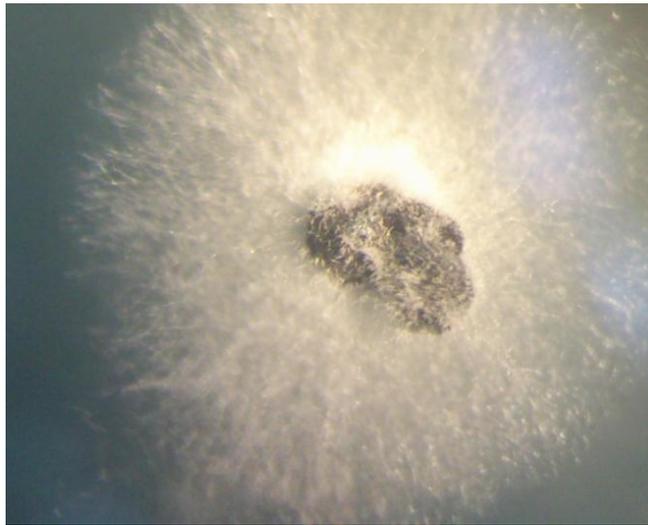


Figura 4. Germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. 4 días después de la siembra.

2.2.7. Purificación del hongo aislado

Cuando los aislamientos tuvieron un crecimiento micelial bien definido (2 a 4 días después de que se sembraron) se hizo la transferencia a cajas con medio de cultivo PDA, tomando trozos pequeños de medio de cultivo con el crecimiento micelial limpio. Para evitar la contaminación del medio de cultivo con bacterias se adicionaron los antibióticos: ampicilina y rifampicina 0.25 y 0.5 g respectivamente después de esterilizar el medio (120 °C por 15 minutos); cuando éste ya estaba tibio (33 °C), finalmente se llenaron las cajas Pétri (Fernández, 2006).

2.2.8. Cultivo de punta de hifa

Se hizo crecer el hongo en medio PDA sólido durante 72 horas a temperatura ambiente (22 ± 3 °C); con ayuda de un microscopio estereoscópico y una aguja de punta fina se cortaron varias puntas de hifa del hongo, las cuales se transfirieron en forma individual a cajas Pétri con PDA para su pleno crecimiento (Fernández, 2006).

2.2.9. Corroboración morfológica del agente causal de la pudrición blanca

Transcurridos 20 días a partir de la purificación del aislamiento, el hongo fue capaz de formar esclerocios en la periferia de la caja de Pétri (Figura 5), los cuales fueron observados en el microscopio estereoscópico y se tomó en cuenta el color, tamaño y forma, según la descripción de Ponce (2006) y Martín (1998), para identificar a *Sclerotium cepivorum*.

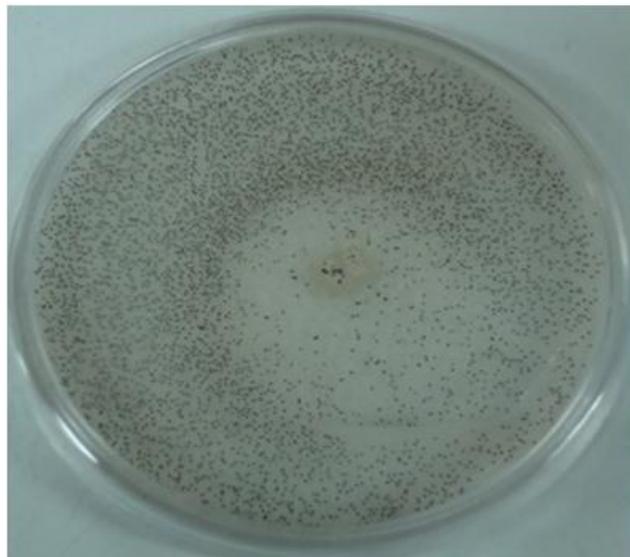


Figura 5. Cepa de *Sclerotium cepivorum* formando microesclerocios.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Corroboración del agente causal de la pudrición blanca por sintomatología y hongo aislado

De las muestras de plantas de cebolla que mostraron los síntomas siguientes: clorosis, marchitez, muerte total, bulbos esponjosos, bofos y abundante producción de micelio color blanco de apariencia algodonosa en la parte basal del bulbo y presencia de microesclerocios negros, se recuperaron microesclerocios que se encontraban entre el tejido vegetal enfermo, de los cuales se pudo aislar a *Sclerotium cepivorum* Berk, ya que este hongo produjo un gran número de microesclerocios color negro y de apariencia esférica con un diámetro menor a 0.5 mm; esta descripción coincide con Ponce (2006), quien mencionó que *Sclerotium cepivorum* forma esclerocios que son sus estructuras reproductivas, normalmente son uniformemente redondos (0.35 a 0.5 mm de diámetro) aunque se reportan esclerocios de hasta 0.75 mm y de variaciones de la forma redonda; así mismo Martín (1998), argumenta que los síntomas se inician con el amarillamiento, decoloración y la muerte progresiva de las hojas que se inicia apicalmente y continua en sentido descendente. La velocidad de avance varía con la rapidez de ataque del hongo. Las plantas jóvenes pueden marchitarse y morir rápidamente. La infección está acompañada por el desarrollo de micelio en la base del tallo, el micelio es grisáceo o blanco y de apariencia algodonosa o vellosa y es más evidente cuando las plantas se sacan de la tierra. Una pudrición semiacuosa destruye las raíces y los catafilos. A partir de un micelio algodonoso aparecen como embebidos en los tejidos en descomposición microesclerocios de color blanquecino, que luego se tornan cafés y finalmente negros.

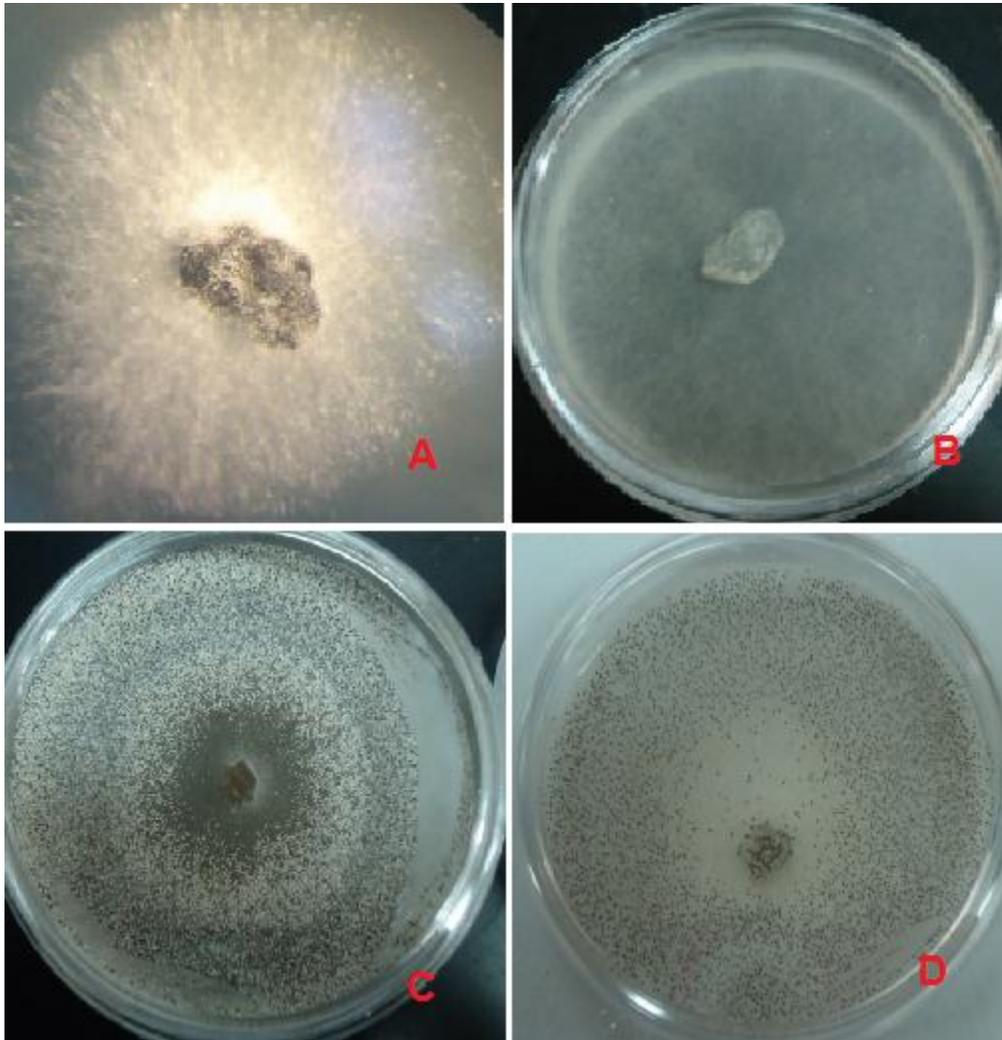


Figura 6. Cepa de *Sclerotium cepivorum*. A) Germinación de esclerocios. B) Crecimiento micelial. C) inicio de la formación de esclerocios. D) Esclerocios completamente formados.

2.4. CONCLUSIONES

De las muestras de plantas con síntomas de clorosis, marchitez y muerte total, bulbos esponjosos, bofos y abundante producción de micelio color blanco de apariencia algodonosa y presencia de microesclerocios negros, provenientes de la huerta comercial del Sr. Raúl Rodríguez Moreno del municipio de Cojumatlán de Regules, Michoacán, se aisló, purificó y corroboró a *Sclerotium cepivorum* Berk, agente causal de la pudrición blanca de la cebolla.

2.5. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. Editorial LIMUSA. 2ª ed. México, D.F. 838 p.
- Coley-Smith JR, Mitchell CM, Sanford EC, 1990. Long-term survival of *Sclerotinia* of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant pathology* 39, 58-69.
- Crowe, F. J. 1995. White rot. In *Compendium of onion and garlic diseases*. Eds. H.F. Schwartz y S.K. Mohan. Minnesota. APS Press. p 14-16.
- Crowe, F. J.; HALL, D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74-78.
- Delgadillo S., F. 1998. Control Integrado de la Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en el Cultivo de Ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Doctorado, Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 86 p.
- Fernández, H. E. 2006. Manejo de la Enfermedad del Moho Gris (*Botrytis cinerea*) en el Cultivo de Zorzamora (*Rubus* spp) Mediante Aplicaciones de Fungicidas Cúpricos. Tesis Profesional. Depto. De Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 42 p.
- García, M., A. M. 2008. Determinación Morfológica, Molecular, Patogénica y Manejo de Enfermedades de Raíz y Cuello en Céspedes de Campos de Golf. Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 164 p.
- Granados M., M. 2005. Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 29 (2): 143-156. ISSN:0377-9424.
- Granados M., M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*

- Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Agronomía Costarricense 105 p.
- Hartman, G.; Datnoff, L. 1997. Vegetable Crops. In Soilborne diseases of tropical crops. Eds R.J. Hillocks y J.M. Waller. CAB INTERNATIONAL. Cambridge, University Press. p.161-162.
- Martín, M.R. 1998. Inducción de la germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. Por germoplasma de ajo (*Allium sativum* L.) con respuesta diferencial a la pudrición blanca. Tesis profesional. Depto. De Parasitología agrícola. UACH. Chapingo, México. 31 p.
- Pérez, M. L.; Hernández, V. O.; Cantú, G. F.; Romero, R. A. 2000. Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo *Allium sativum* L. en la zona del Bajío, México. In XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. p. L67.
- Ponce, H.V. 2006. Análisis temporal y espacial de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo, en condiciones del Bajío, México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-15 pp.
- Romero, C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Departamento de Parasitología Agrícola. UACH. Chapingo, México. 361 p.
- SIAP-SAGARPA. 2012. Producción agrícola anual por cultivo, superficie y producción. <http://www.sagarpa.gob.mx/siap/estadísticas.htm>. (Consultado octubre, 2012).
- Toledo, B.A. 1998. La cebolla cultivada en fertirrigación. Tesis profesional. Depto. De Parasitología agrícola. UACH. Chapingo, México. 1-41 pp.

CAPITULO III. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ANTAGONISTAS EN SUELOS INFESTADOS DE *Sclerotium cepivorum* Berk. Y EVALUACIÓN DE LA EFICACIA EN EL MANEJO DE LA ENFERMEDAD *IN VITRO*

3.1. INTRODUCCIÓN

Sclerotium cepivorum es un patógeno específico del género *Allium*; es un hongo Imperfecto perteneciente al Orden Mycelia Sterilia. Se reproduce a través de la producción de pequeños esclerocios (0.3 a 0.6 mm de diámetro) que funcionan como propágulos y como inóculo (Granados, 2004).

El principal método de control de la enfermedad es mediante la utilización de diferentes grupos químicos, del subgrupo de los triazoles, benzimidazoles y carbamatos. Sin embargo el uso continuo de estos productos provocan el decremento de la sensibilidad del fitopatógeno y genera resistencia a los químicos (Ochoa, 2002).

Una alternativa al uso de los productos químicos, en el control de las enfermedades de las plantas es el control biológico, mediante la utilización de microorganismos, como agentes de control. Las especies de *Trichoderma*, que son cosmopolitas y habitan en todos los suelos y climas del mundo, muchas de ellas se consideran agentes de control biológico de enfermedades causadas por hongos en las partes aéreas, en raíz de plantas cultivadas y enfermedades de postcosecha (Ochoa, 2002). La posibilidad del combate biológico para el manejo de la pudrición blanca de la cebolla ha sido investigada desde 1969 por Ghaffar (citado por Kay y Stewart, 1994) y se han identificado tanto hongos como bacterias con potencial de control.

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

Los mecanismos de acción por los cuales los agentes de control biológico afectan a los fitopatógenos son: antibiosis, micoparasitismo y competencia (Papavizas, 1985). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, por lo que mientras uno parece ser el principal, en realidad pueden actuar en conjunto. La competencia se da principalmente por espacio o factores nutricionales limitantes, como pueden ser: carbono y nitrógeno; ya que los requieren para germinar, penetrar e infectar el tejido. La antibiosis se da a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas y de enzimas hidrolíticas como son quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas; las cuales se inducen durante la acción parasítica, entre especies de *Trichoderma* y algunos hongos fitopatógenos; las enzimas disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y glucanos de la pared celular de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo. La producción de enzimas hidrolíticas por especies de *Trichoderma* depende de la composición del medio donde se desarrolla; así, se ha demostrado que estas enzimas inhiben el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos (Ochoa, 2002).

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* participa en el control biológico de fitopatógenos de cultivos agrícolas; el mecanismo mediante el cual *P. fluorescens* ejerce el control biológico sobre hongos fitopatógenos no está completamente entendido; la capacidad de *Pseudomonas* para ejercer este control biológico ha sido documentada. Los mecanismos propuestos son: i) la producción de sideróforos que, al secuestrar el hierro, quedaría no disponible para los fitopatógenos, y ii) la producción de distintos antibióticos, como el 2,4-diacetilfluoroglucinol, la pyoluteorina, la pyrrolnitrina y el ácido fenazin-1-carboxílico que son capaces de suprimir el crecimiento de hongos patógenos en cultivos agrícolas (Valencia *et al.*, 2005).

Dado que no existe información sobre la eficacia de hongos y bacterias antagónicos a *Sclerotium cepivorum* que se encuentran de forma natural en las áreas productoras de cebolla en la región de la ciénega michoacana, y que podrían estar ejerciendo algún grado de control biológico natural. Por tanto, sería

de gran importancia para los productores de cebolla de Cojumatlán, Michoacán se realizaron estudios para buscar agentes de control biológico del patógeno de la pudrición blanca: con base en lo anterior se realizó el presente trabajo con el objetivo siguiente: Aislar e identificar antagonistas de suelos infestados de *Sclerotium cepivorum* y evaluar su eficacia en el manejo de la enfermedad *In Vitro*.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de campo

3.2.1. Origen de las muestras

Las muestras se obtuvieron de huertas comerciales de cebolla, ubicadas en Cojumatlán, Michoacán, con síntomas de pudrición blanca.

3.2.2. Toma de muestras

Se realizó un recorrido de campo para observar síntomas de pudrición blanca y presencia de microesclerocios, presentes en huertas comerciales de cebolla y síntomas de micelio blanco, azul o verdoso, correspondientes a hongos que estaban parasitando o invadiendo los esclerocios y micelio de *Sclerotium cepivorum*. De este tipo de sintomatología, se procedió a realizar la toma de muestras.

Fase de laboratorio

El aislamiento de los posibles agentes de control biológico se realizó en el laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2.3. Aislamiento de los agentes de biocontrol

De los bulbos con micelio blanco y microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* colectados, con la presencia de un crecimiento micelial de color blanco, verde azulado, característico del género *Trichoderma* spp., se transfirió una porción del crecimiento micelial de color verde a cajas de Pétri de 90 mm de diámetro que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar PDA con ayuda de una aguja de disección, realizándose dentro de una cámara de flujo laminar, para evitar posibles contaminaciones. Las cajas se incubaron a 22 ± 3 °C en oscuridad constante, el material se revisó cada 24 h hasta detectar los primeros crecimientos de hongos a los 4 días.

Para el aislamiento de bacterias, se tomaron esclerocios procedentes del tejido vegetal enfermo y se sometieron a baño maría a 56 °C durante 10 minutos, posteriormente se metió una asa bacteriológica a la suspensión de esclerocios y se rayó en una caja de Pétri con medio de cultivo PDA, el cual no contenía antibiótico; el material se revisó cada 24 h, hasta detectar los primeros crecimientos de bacterias a los 2 días.

3.2.4. Purificación de los aislamientos

Cuando los aislamientos tuvieron un crecimiento micelial bien definido (3 a 6 días después de que se sembraron) se hizo la transferencia a cinco cajas con medio de cultivo PDA, tomando trozos pequeños de medio de cultivo con el crecimiento micelial limpio. Para evitar la contaminación del medio de cultivo con bacterias se adicionaron los antibióticos: ampicilina y rifampicina 0.25 y 0.5 g respectivamente después de esterilizar el medio (120 °C por 15 minutos); cuando éste ya estaba tibio (33 °C), finalmente se llenaron las cajas Pétri (Fernández, 2006).

La purificación de las cepas bacterianas se realizó tomando una porción del crecimiento bacteriano con un asa bacteriológica que posteriormente se hizo un

rayado en una caja de Pétri con medio de cultivo PDA sin antibiótico con cinco repeticiones.

3.2.5. Cultivo de punta de hifa

Se hizo crecer el hongo *Trichoderma* en medio PDA sólido durante 72 horas a temperatura ambiente (24 °C); con ayuda de un microscopio estereoscópico y una aguja de punta fina se cortaron varias puntas de hifa del hongo, las cuales se transfirieron en forma individual a cajas Pétri con PDA para su pleno crecimiento (Fernández, 2006).

3.2.6. Identificación morfológica de los agentes de biocontrol

Transcurridos 10 días a partir de la purificación, las cepas de los hongos llenaron por completo la superficie de la caja de Pétri y formaron conidios. Se prepararon montajes para su observación en microscopio compuesto (American optical®). Se colocó una gota de lacto fenol en un portaobjetos y se colocó una pequeña porción de micelio con una guja de disección, posteriormente se colocó el cubreobjetos para su observación al microscopio.

Para la identificación a nivel de género (*Trichoderma* spp.) (Figura 6), se tomó en cuenta en color, forma de la colonia, forma y color de estructuras morfológicas (conidios), según lo mencionado por Valenzo (2005).

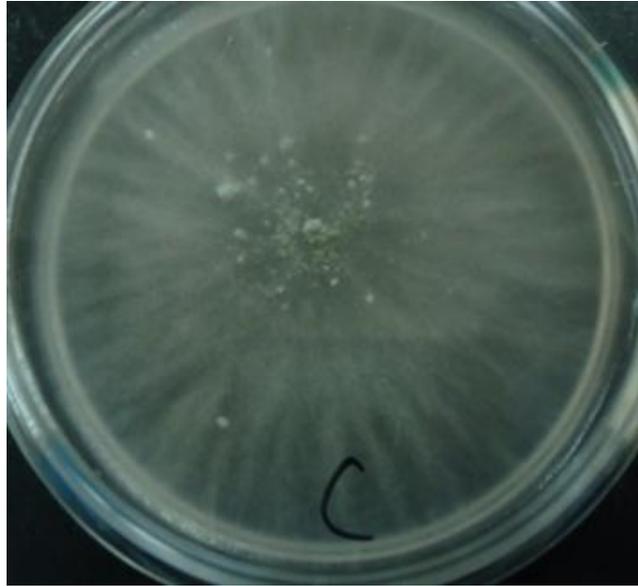


Figura 7. Cepa de *Trichoderma* sp. aislada de micelio y esclerocios de *Sclerotium cepivorum* parasitados en plantas con síntomas de pudrición blanca procedentes de Cojumatlán, Michoacán.



Figura 8. Cepa de *Pseudomonas* sp. aislada de esclerocios de plantas con síntomas de pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), procedentes de Cojumatlán, Michoacán.

3.2.7. Prueba de antagonismo *In Vitro* (Cultivos duales)

3.2.7.1. Localización del sitio experimental

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2.7.2. Origen del patógeno

Se utilizó un aislamiento obtenido a partir de plantas enfermas de una huerta comercial ubicada en el municipio de Cojumatlán de Regules, en el estado de Michoacán (Figura 9).

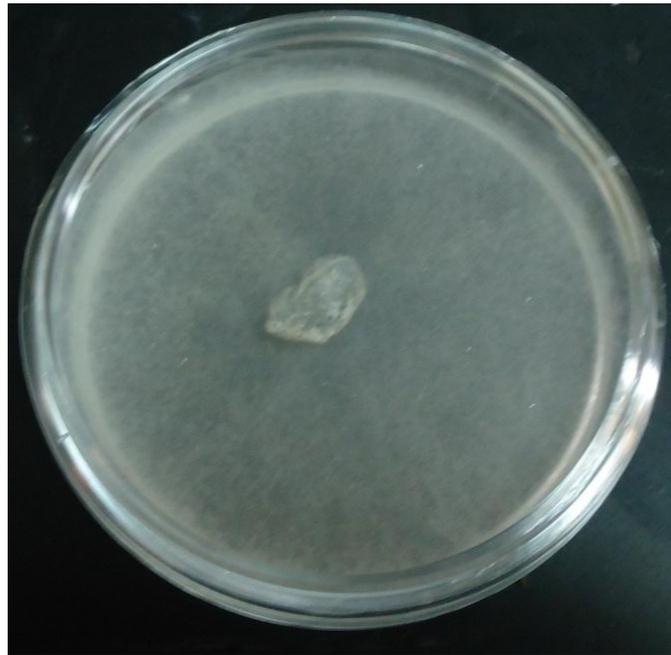


Figura 9 . Cultivo puro de *Sclerotium cepivorum*, 8 días después de la siembra.

3.2.7.3. Origen de los aislamientos para probar antagonismo *In Vitro*

En las pruebas *In Vitro* se utilizaron 2 aislamientos de *Trichoderma* spp. y una cepa de *Pseudomonas* sp., de los cuales el *Trichoderma* sp. 1 se obtuvo a partir de suelo de una huerta comercial de piña en Loma Bonita, Veracruz. El *Trichoderma* sp. 2 y la cepa de *Pseudomonas* spp. fueron recuperado a partir de plantas de cebolla con síntomas de pudrición blanca provenientes de una huerta comercial en el municipio de Cojumatlán, Michoacán (Figura 10).

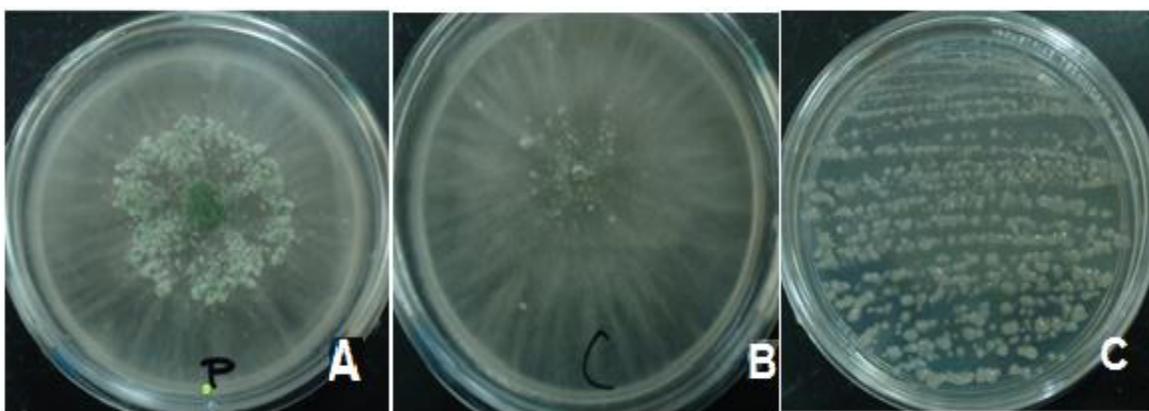


Figura 10. Cultivos puros de los organismos antagonistas. A) cepa de *Trichoderma* sp. 1, aislada de suelo de una plantación de piña. B) Cepa de *Trichoderma* sp. 2, aislada de plantas enfermas de cebolla y C) cepa de *Pseudomonas* sp. Aislada de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

3.2.8. Control biológico *In Vitro* (Cultivos duales)

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en cajas de Pétri de 4.5 cm de radio, conteniendo 20 ml del medio de cultivo PDA pH 5.5. Se colocó en un extremo de la caja de Pétri un disco de PDA de 4 mm de diámetro con micelio del patógeno (*Sclerotium cepivorum*) y en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio del antagonista (*Trichoderma* spp.) a 5 cm aproximadamente entre ellos (Howell, 2003); se sembró en cajas separadas, un disco de PDA (inóculo) con los hongos de cada antagonista y del patógeno, los cuales correspondieron a los controles; posteriormente, los cultivos se incubaron a

22 ± 3 °C, durante 10 días, haciéndose mediciones cada 48 h durante 9 días después de haber iniciado el experimento (Figura 11).

En el caso de *Pseudomonas* sp. se tomo una porción del crecimiento bacteriano con una asa bacteriológica, posteriormente se hizo el rayado en una caja Pétri con medio de cultivo PDA (solo la mitad de la superficie) y en la otra mitad se colocó un disco de PDA con crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum*, los cultivos se incubaron a 22 ± 3 °C, durante 10 días, haciéndose mediciones cada 72 h del crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos, haciéndose mediciones cada 48 h durante 9 días después de haber iniciado el experimento.

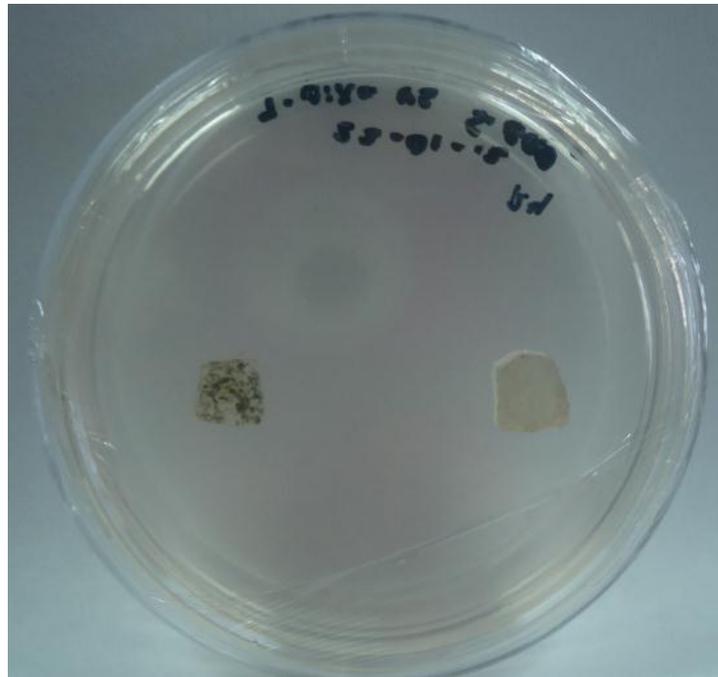


Figura 11. Enfrentamiento de *Sclerotium cepivorum* contra los organismos antagonistas mediante la técnica de cultivos duales.

3.2.9. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar ($Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$) con tres repeticiones, un total de 3 tratamientos y 1 testigo. Cada tratamiento correspondió a una cepa diferente de los organismos antagonistas aislados.

3.2.10. Tratamientos

Los tratamientos para evaluar la el antagonismo *In Vitro* de las cepas de organismos aislados a partir de plantas enfermas por la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en cebolla, se indican en el cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados para determinar el antagonismo *In Vitro* de los organismos aislados de plantas enfermas con la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk).

No	Tratamiento
1	<i>Sclerotium cepivorum</i> (S.c.)
2	<i>Trichoderma</i> sp. 1
3	<i>Trichoderma</i> sp. 2
4	<i>Trichoderma</i> sp. 1 vs S.c.
5	<i>Trichoderma</i> sp. 2 vs S.c.
6	<i>Pseudomonas</i> sp. vs S.c.

3.2.11. Evaluación de las variables respuesta

Se evaluó el crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* para cada uno de los tratamientos cada 48 h durante 9 días después de haber iniciado el experimento.

3.2.12. Análisis de datos

Los datos de crecimiento micelial se sometieron a un análisis de varianza, en los casos donde hubo diferencias entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey

($\alpha=0.05$) con el software SAS® para separar las medias de cada uno de los tratamientos.

Por otra parte, se determinó el efecto inhibitorio de los antagonistas como porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del micelio de *Sclerotium cepivorum* con respecto del testigo (López *et al.*, 2005); utilizando las medias de crecimiento micelial obtenidas a los 9 días después de haber iniciado el experimento, empleando la fórmula de Samaniego *et al.* (1989).

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

Donde R_1 y R_2 son los radios mayor y menor de crecimiento radial del hongo patógeno respectivamente.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Identificación morfológica

Se aisló una cepa de un hongo con las siguientes características: crecimiento micelial acelerado, de color verde oscuro; las estructuras de reproducción asexual (conidios) fueron observados en el microscopio compuesto, los cuales presentaron las siguientes características: conidios ovoides de paredes lisas, de color verde pálido. Esta descripción coincide con Valenzo (2005), quien menciona que las colonias formadas por *Trichoderma* spp. pueden ser de color blanco, verde pálido, verde amarillas o verde oscuro, además de su micelio de crecimiento rápido; los conidios son subglobosos u ovoides y miden desde 2.1 a 3 μm , de paredes lisas, hialinas o de color verde pálido.

Se pudo aislar una bacteria, la cual presentó las siguientes características: al observarlas al microscopio compuesto se pudo apreciar células de forma de varilla, móviles, gram negativa y mostró fluorescencia al exponerla a la luz ultravioleta, lo cual coincide con Botero (1999), quien indicó que *Pseudomonas fluorescens* es una bacteria que posee células en forma de varilla rectas o ligeramente curvadas cuyo tamaño oscila entre 0.5-1.0 μm de ancho por 1.5-5.0 μm de largo; es Gram negativa y móvil mediante uno o varios flagelos polares; es un organismo aerobio.

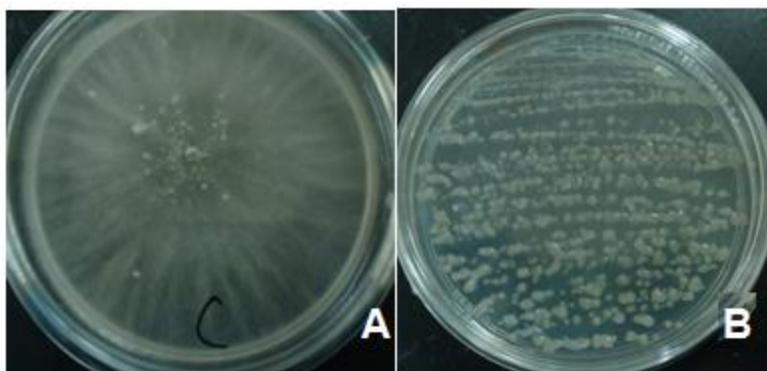


Figura 12. Organismos antagonistas aislados. A) cepa de *Trichoderma* sp. 1, aislada de plantas enfermas de cebolla. B) cepa de *Pseudomonas* sp. Aislada de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

3.3.2. Crecimiento radial micelial y porcentajes de inhibición de *Sclerotium cepivorum* Berk *In Vitro*

Con los datos de crecimiento radial micelial *In Vitro* de *Sclerotium cepivorum* Berk, causante de la pudrición blanca de la cebolla, obtenidos a los 3, 5, 7 y 9 días después de haberlo puesto a competir con los organismos antagonistas evaluados (*Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp.) en la **evaluación 1 (26/01/12)**, **evaluación 2 (28/01/12)**, **evaluación 3 (30/01/12)** y **evaluación 4 (01/02/12)**, se realizaron varios análisis de varianza, en donde se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Apéndice A; Apéndice 1-4). Las diferencias se verificaron al llevar a cabo una comparación múltiple de medias de Tukey (0.05) Cuadro 4, en donde se observó que el crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* fue menor y diferente estadísticamente en los tratamientos donde fue puesto a competir contra los organismos antagonistas evaluados, con respecto al testigo absoluto. Así mismo, se observó que los tratamientos a base de *Trichoderma* sp. 1 y *Trichoderma* sp. 2 fueron los mejores tratamientos, ya que limitaron el crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* entre 0.41 a 0.55 y 0.22 a 0.3 cm, lo que se tradujo en porcentajes de inhibición del crecimiento radial micelial de 79.6 a 92.8 y 87.2 a 96.1 % respectivamente, con respecto al testigo absoluto en donde *Sclerotium cepivorum* presentó un crecimiento radial micelial de 2.36, 3.4, 5.76 y 5.76 cm en la primera, segunda, tercera y cuarta evaluación respectivamente.

Lo anterior se tradujo en un control excelente de la enfermedad y se muestra gráficamente en las Figuras 13 y 14.

Cuadro 4. Comparación de medias de los datos de crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en las evaluaciones: 1 (26/01/12), 2 (28/01/12), 3 (30/01/12) y 4 (01/02/12) para determinar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* spp. para el control de la pudrición blanca en cebolla, *In Vitro*. 2012.

Tratamientos	Eval.1 (3 DDS)		Eval.2 (5 DDS)		Eval.3 (7 DDS)		Eval.4 (9 DDS)	
	CRM (cm)	PICRM (%)						
1 <i>Sclerotium cepivorum</i> (S.c.)	2.36 A	-	3.4 B	-	5.76 A	-	5.76 A	-
2 <i>Trichoderma</i> sp. 1	2.49 A	-	4.02 A	-	5.86 A	-	5.86 A	-
3 <i>Trichoderma</i> sp. 2	2.51 A	-	4.27 A	-	6.01 A	-	6.01 A	-
4 <i>Trichoderma</i> sp. 1 vs S.c.	0.48 C	79.6	0.55 D	83.8	0.41 C	92.8	0.41 C	92.8
5 <i>Trichoderma</i> sp. 2 vs S.c.	0.3 C	87.2	0.26 D	92.3	0.22 C	96.1	0.22 C	96.1
6 <i>Pseudomonas</i> sp. vs S.c.	1.4 B	40.6	1.37 C	59.7	1.34 B	76.7	1.34 B	76.7

DDS: Días Después de la Siembra (*In Vitro*). CRM.: Crecimiento radial micelial. PICRM: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial micelial.

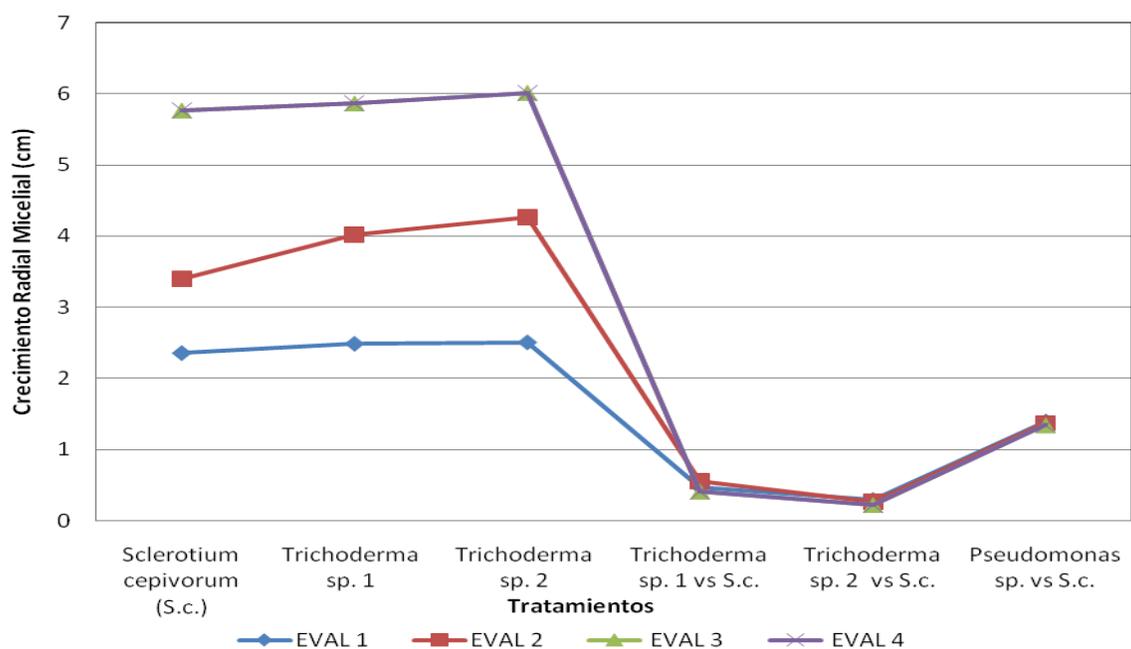


Figura 13. Crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en las evaluaciones: 1 (26/01/12), 2 (28/01/12), 3 (30/01/12) y 4 (01/02/12) en la prueba de antagonismo *In Vitro* debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* spp. para el control del agente causal de la pudrición blanca de la cebolla. 2012.

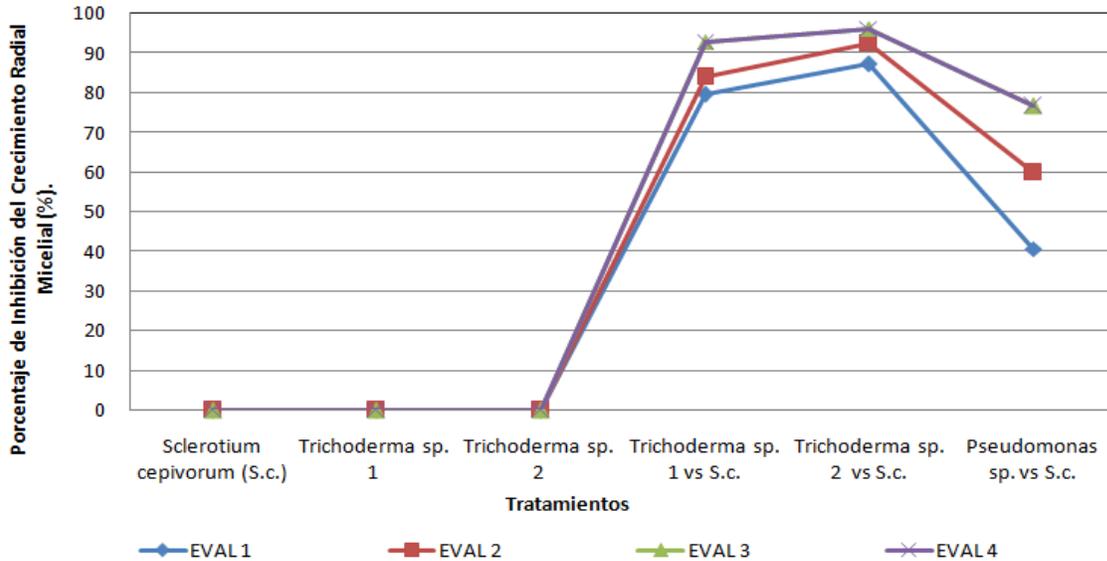


Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en las evaluaciones: 1 (26/01/12), 2 (28/01/12), 3 (30/01/12) y 4 (01/02/12) en la prueba de antagonismo *In Vitro* debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* spp. para el control del agente causal de la pudrición blanca de la cebolla. 2012.

El hecho de que los tratamientos 2 y 3 (*Trichoderma* sp. 1 y *Trichoderma* sp. 2) hayan sido los mejores tratamientos, se debe principalmente a lo mencionado por Michel (2001), quien indicó que *T. harzianum* posee distintos mecanismos como secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xylasas y muchas veces proteasas, las cuales pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiéndole al antagonista aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de disponer de ellos.

En un estudio realizado por Medina *et al.*, (2010), encontró que en la confrontación de los hongos *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, el patógeno limita la invasión del antagonista mediante la elevación de su micelio y, a continuación, actúa como una barrera. Durante la confrontación de *Trichoderma* con *Sclerotinia minor* se observó una zona de inhibición progresiva que puede atribuirse en parte al rápido crecimiento de *Trichoderma*, después de la inhibición, se detectó un marcado efecto hiperparasítico de las cepas IBA-22, y la IBA-37. Además, se

observó un pequeño halo naranja-rojizo como resultado de la invasión de micelio del patógeno.

Por su parte Suárez *et al.*, (2008), indica que probablemente, *T. harzianum* puede tener una tasa de incorporación de nutrientes, tasa de metabolismo y tasa de crecimiento superior a *F. solani*, lo cual puede ser la causa del biocontrol.

En la presente investigación, los tratamientos 2 y 3 (*Trichoderma* sp. 1 y *Trichoderma* sp. 2) inhibieron la formación de esclerocios por parte de *S. cepivorum* a diferencia de el tratamiento 4 (*Pseudomonas* sp.), en donde se observó que la cantidad de esclerocios producidos fue incluso superior a los formados en el testigo. Lo anterior coincide con Medina *et al.*, (2010), quien menciona que al poner a competir a *Trichoderma* con *Sclerotinia*, cuando entra en contacto el micelio de ambos hongos, *Sclerotinia* detiene su crecimiento y comienza la formación de esclerocios en la periferia de su colonia; el desarrollo de estos esclerocios es irregular, ya que algunos de ellos tienen deformaciones.

Por su parte, Tronsmo (1996), indicó que *Trichoderma* sp. tiene la capacidad de conducir sus hifas hacia las de otros hongos, enrollándose en ellas; esta reacción esta mediada por lecitinas, que van degradando la pared celular del hospedante, y por la secreción de exoenzimas hidrolíticas. Dicho proceso limita el crecimiento y la actividad del hongo patógeno y algunas especies de *Trichoderma* sp. son conocidas por producir elevadas concentraciones de enzimas degradadoras de la pared celular, tales como α -1,3-glucanasa y diferentes enzimas quitinolíticas que actúan en conjunto con proteasas y celulasas.

Sin embargo, cuando se realizo la prueba de mezclas entre los antagonistas con los microesclerocios de *S. cepivorum* (*Trichoderma* sp. + microesclerocios, *Pseudomonas* sp. + microesclerocios y *Trichoderma* sp. + *Pseudomonas* sp. + microesclerocios) y se sembraron en medio de cultivo PDA, la bacteria *Pseudomonas* sp., no permitió la germinación de los microesclerocios, inhibiendo su germinación y desarrollo del hongo patógeno, e inclusive dicha bacteria inhibió al hongo *Trichoderma* sp., por lo que no serian compatibles los antagonistas en

una integración de estrategias de manejo. Por lo que tendrían que aplicarse en momentos diferentes, es decir primero la bacteria y 15 o 21 días después el hongo.

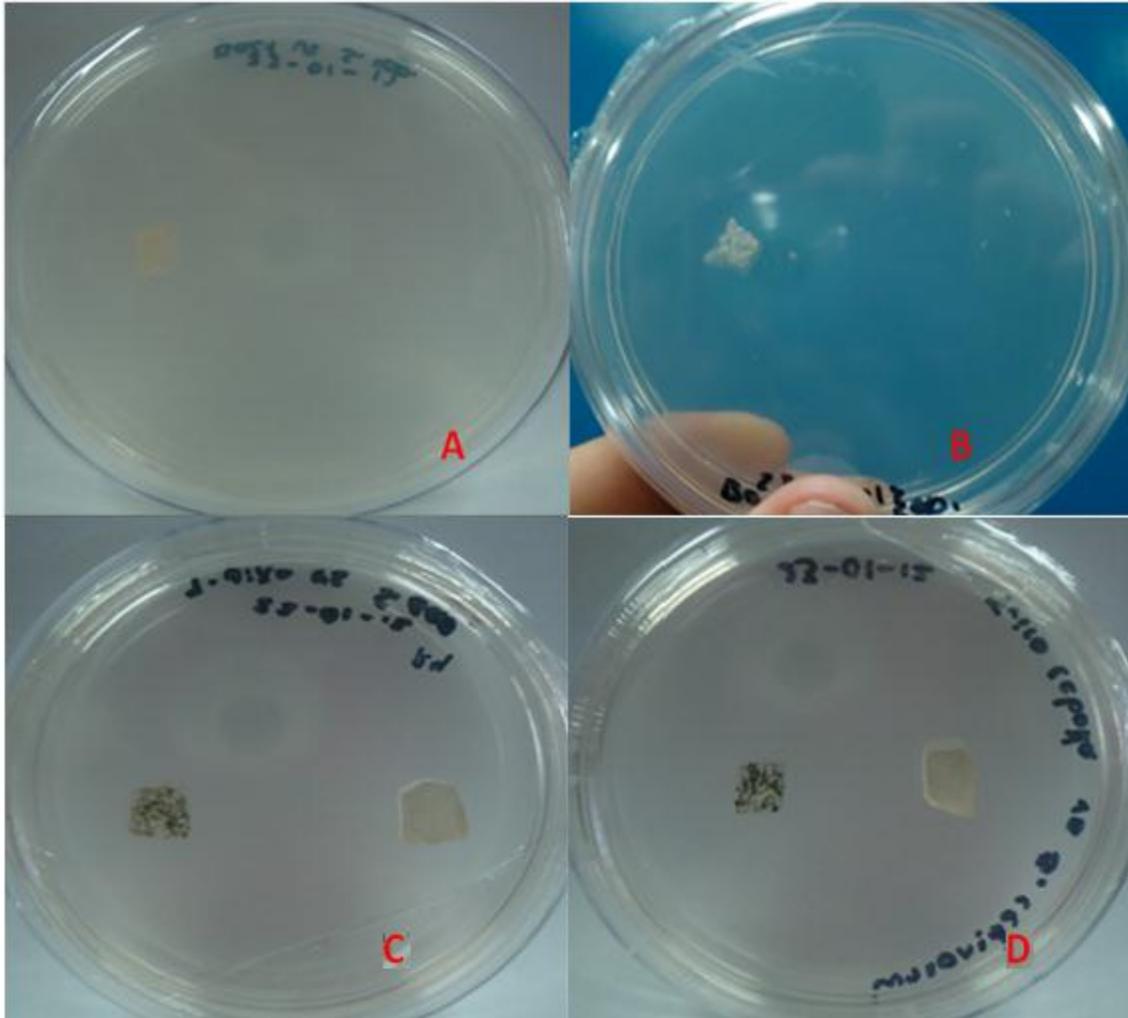


Figura 15. Establecimiento del estudio de antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*.

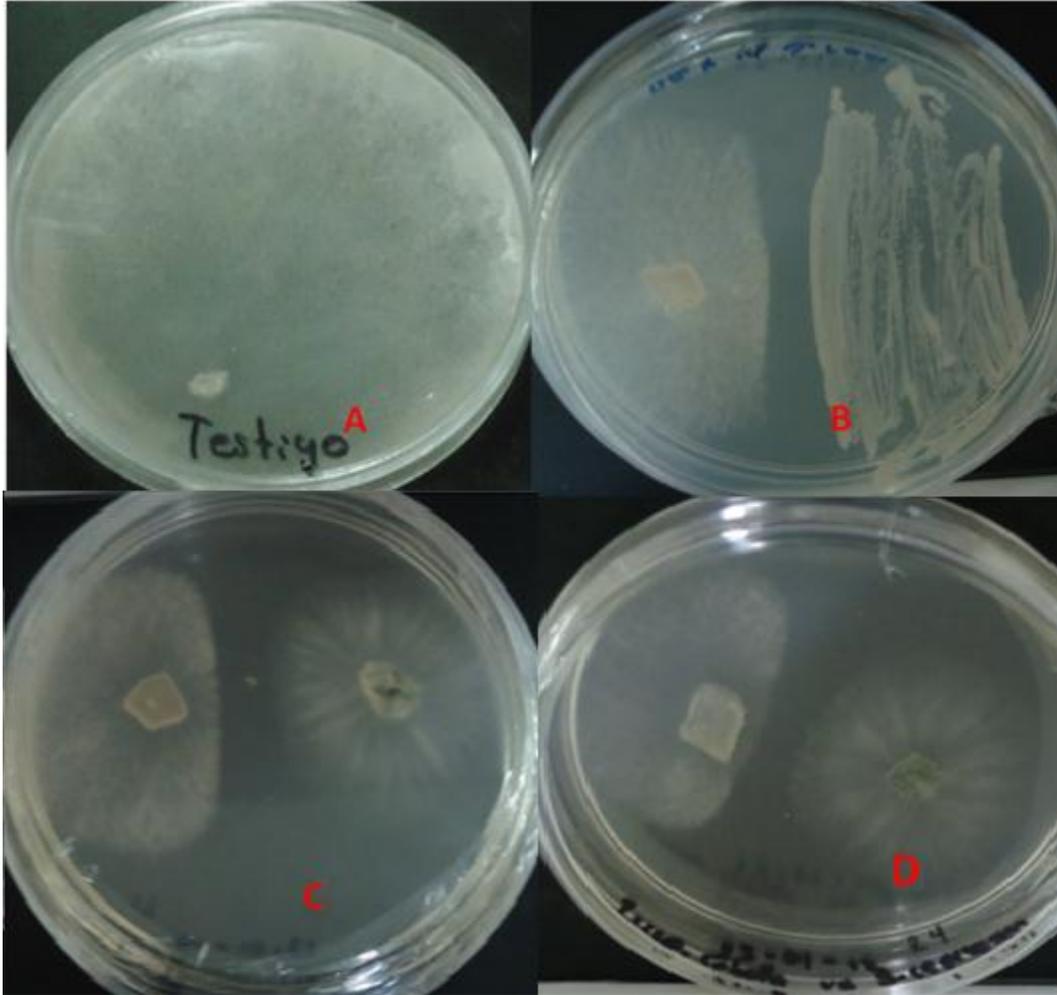


Figura 16. Primera evaluación a los 3 DDS (26/01/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*.

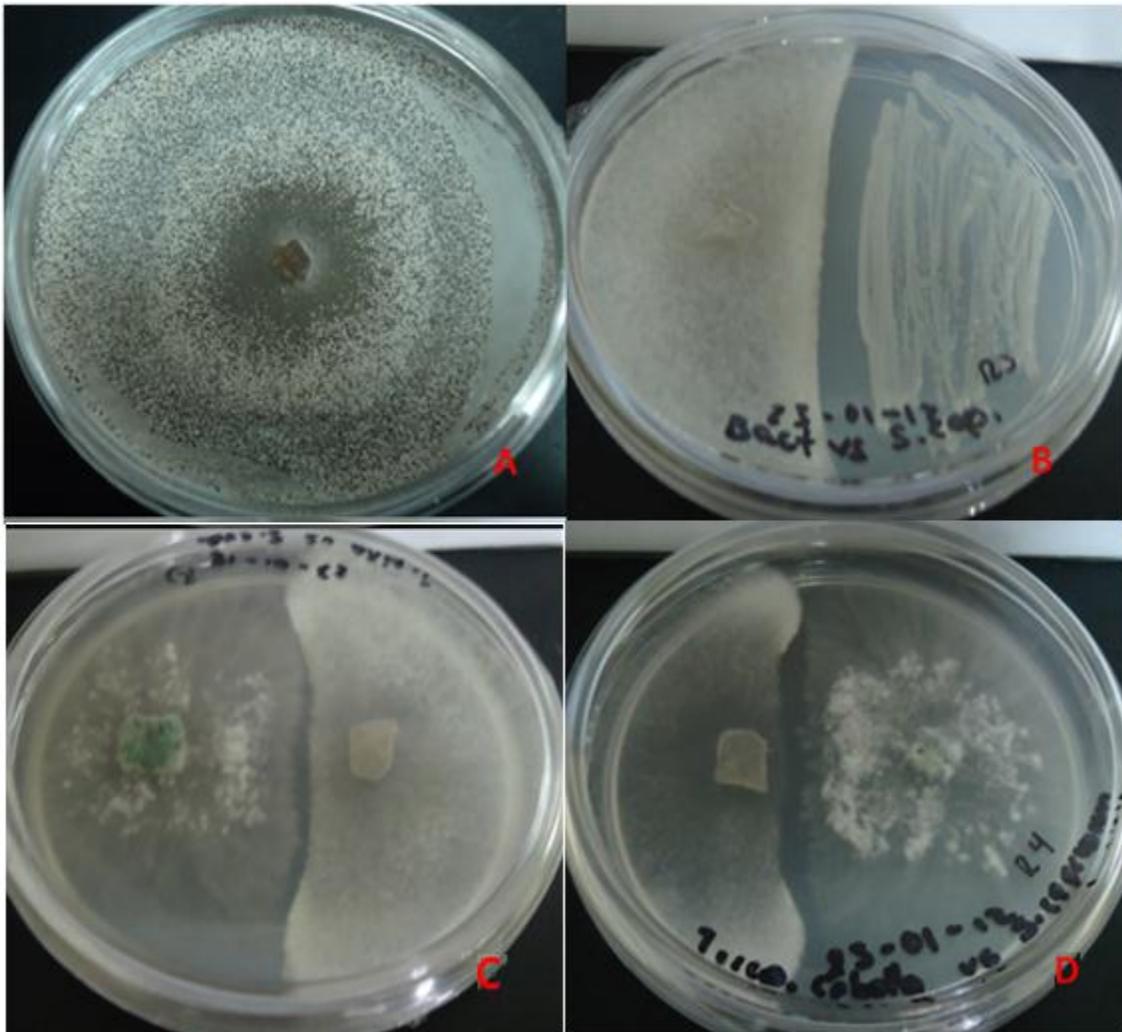


Figura 17. Segunda evaluación a los 5 DDS (28/01/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*.

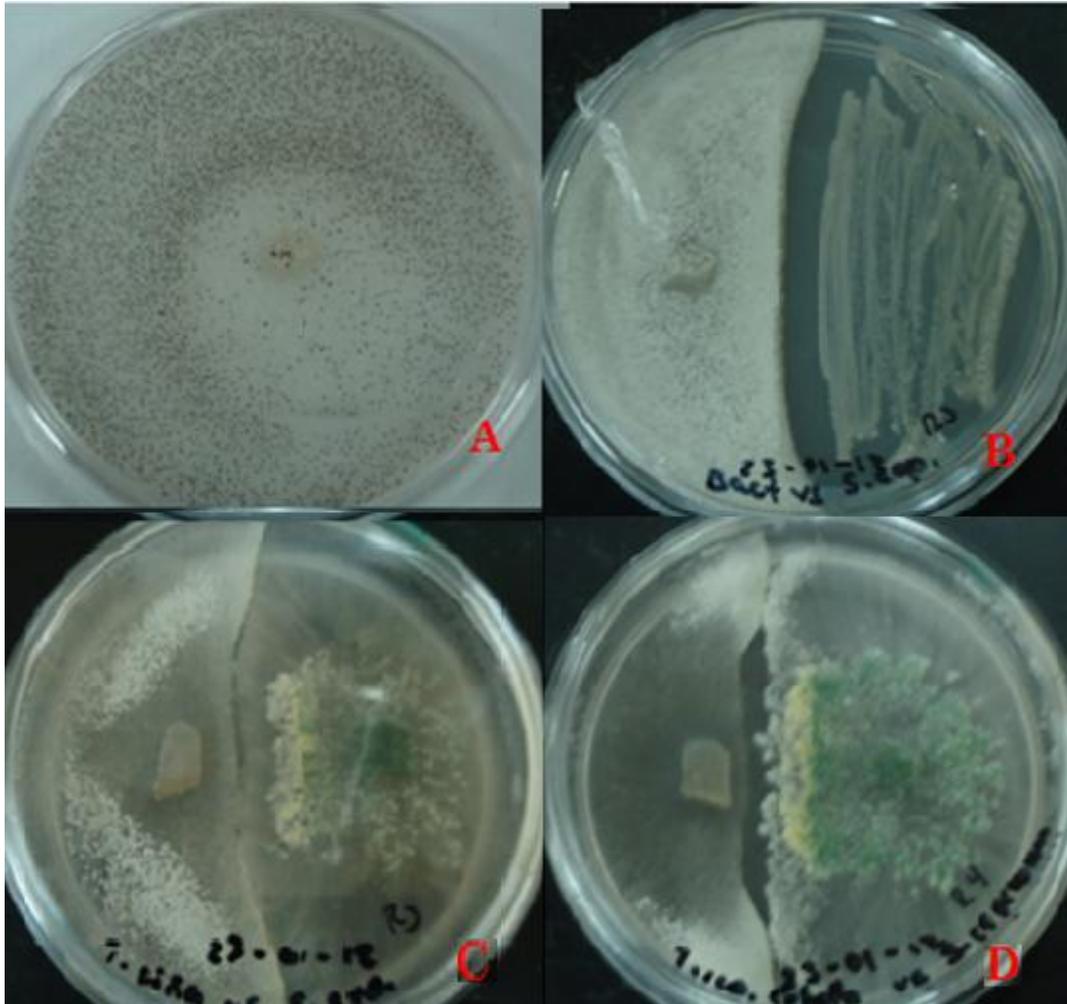


Figura 18. Tercera evaluación a los 7 DDS (30/01/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivoru*

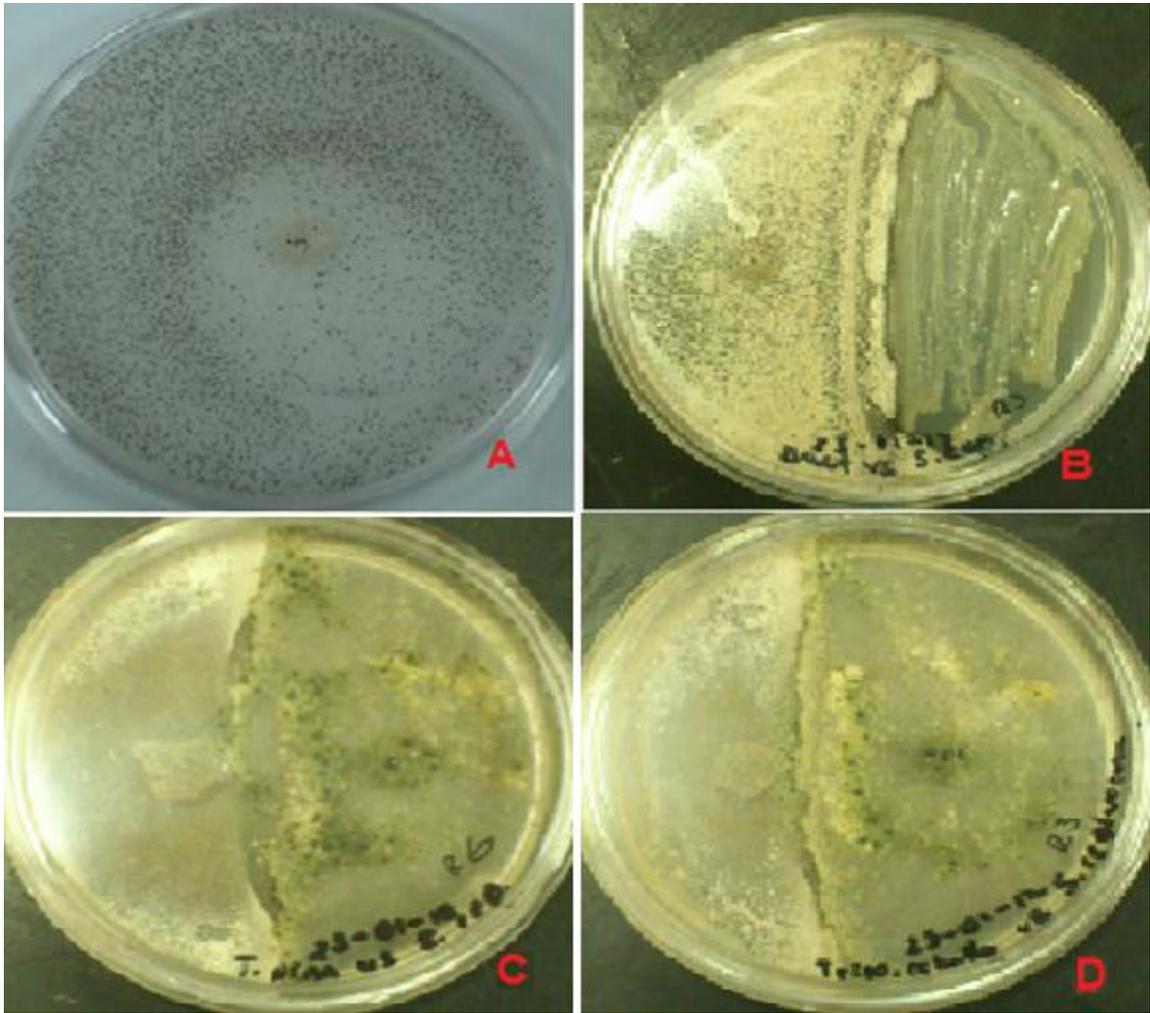


Figura 19. Cuarta evaluación a los 9 DDS (01/02/12) del antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro*. 2012. A) Testigo absoluto. B) *Pseudomonas* sp. Vs *S. cepivorum*. C) *Trichoderma* sp. 1 vs *S. cepivorum*. D) *Trichoderma* sp. 2 vs *S. cepivorum*.

3.4. CONCLUSIONES

De plantas con síntomas de clorosis, marchitez, muerte total y bulbos con micelio blanco y microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* e invadidos parcialmente de un crecimiento micelial de color blanco, verde azulado, procedentes de Cojumatlán de Regules, Michoacán, se aisló una cepa de *Trichoderma* sp. y una cepa de *Pseudomonas* sp.

Una cepa de *Trichoderma* sp. y una de *Pseudomonas* sp., presentaron una capacidad alta de antagonismo, colonizando el crecimiento del micelio e inhibiendo la germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk, respectivamente.

Se aislaron hongos y bacterias nativas de la zona de Cojumatlán de Regules, Michoacán antagónicos *In Vitro* a *Sclerotium cepivorum* agente causal de la pudrición blanca de la cebolla.

Trichoderma sp. cepa 1 (cebolla) y *Trichoderma* sp. cepa 2 (piña), limitaron el crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* entre 0.22 y 0.41 cm con respecto al testigo, lo que se tradujo en porcentajes de inhibición del crecimiento radial micelial de 92.8 a 96.1%.

Los aislamientos de *Trichoderma* sp. cepa 1 y *Trichoderma* sp. cepa 2, inhibieron el crecimiento *In Vitro* de *Sclerotium cepivorum* por medio de antibiosis, competencia y micoparasitismo.

La cepa de *Pseudomonas* sp., mostro porcentajes de inhibición del crecimiento radial micelial de 76.7% en la prueba de cultivos duales.

La cepa de *Pseudomonas* sp., inhibió la germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* en un 100% en la prueba de colonización o mezcla de antagonista-patógeno y su desarrollo micelial por medio de antibiosis y competencia.

3.5. LITERATURA CITADA

- Ayers, W. A.; Adams, P. B. 1981. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladum*. *Can. J. Microbiol.* 27: 886-892.
- Cook, R.J. 1979. Antagonism and biological control: concluding remarks. In *Soilborne plant pathogens*. Eds. Schippers, B y Gams, W. New York, Academic Press. p. 653-657.
- Fernández, H. E. 2006. Manejo de la Enfermedad del Moho Gris (*Botrytis cinerea*) en el Cultivo de Zorzal (*Rubus* spp) Mediante Aplicaciones de Fungicidas Cúpricos. Tesis Profesional. Depto. De Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 42 p.
- Granados M., M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 105 p.
- López, B.A. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. F. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. *Revista Mexicana de fitopatología*. Volumen 23, Número 2.
- Kay, S. J.; Stewart, A. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology* 43: 371-377.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathology* 23:23-54.
- Rai, J. N.; Saxena, V. C. 1975. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of "white rot" disease. *Plant and Soil* 43: 509-513.

Valencia C., E; Villegas-Moreno, J.; SánchezY., Juan, M.; Peña C. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* Zum80 incapaces de producir sideróforos. TERRA Latinoamericana, Vol. 23, Núm. 1, pp. 81-88.

CAPITULO IV. EVALUACIÓN DE *Trichoderma* spp. Y *Pseudomonas* sp. CONTRA *Sclerotium cepivorum* Berk EN INVERNADERO 2011-2012

4.1. INTRODUCCIÓN

Sclerotium cepivorum es un patógeno específico del género *Allium*. Se reproduce a través de la producción de pequeños esclerocios (0.3 a 0.6 mm de diámetro) que funcionan como propágulos y como inóculo (Granados, 2004).

El principal método de control de la enfermedad es mediante el uso de diferentes grupos químicos, del subgrupo de los triazoles, benzimidazoles y carbamatos. El uso continuo de estos productos provoca el decremento de la sensibilidad del fitopatógeno y genera resistencia a los químicos (Ochoa, 2002).

Una alternativa al uso de productos químicos en el control de las enfermedades de las plantas, es el control biológico mediante la utilización de microorganismos como agentes de control. Muchas de las especies de *Trichoderma*, que son cosmopolitas y habitan en todos los suelos y climas del mundo, se consideran agentes de control biológico de enfermedades causadas por hongos en las partes aéreas, raíz de plantas cultivadas y enfermedades de postcosecha (Ochoa, 2002). La posibilidad del manejo biológico para el manejo de la pudrición blanca de la cebolla ha sido investigada desde 1969 por Ghaffar y se han identificado tanto hongos como bacterias con potencial de control.

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

Los mecanismos de acción por los cuales los agentes de control biológico afectan a los fitopatógenos son: antibiosis, micoparasitismo y competencia (Papavizas, 1985). Estos mecanismos no son excluyentes, por lo que mientras uno parece ser el principal, en realidad pueden actuar en conjunto. La competencia se da principalmente por espacio o factores nutricionales

limitantes, como pueden ser: carbono y nitrógeno; ya que los requieren para germinar, penetrar e infectar el tejido. La antibiosis se da a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas y de enzimas hidrolíticas como son quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas; las cuales se inducen durante la acción parasítica, entre especies de *Trichoderma* y algunos hongos fitopatógenos; las enzimas disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y glucanos de la pared celular de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo. La producción de enzimas hidrolíticas por especies de *Trichoderma* depende de la composición del medio donde se desarrolla; se ha demostrado que estas enzimas inhiben el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos (Ochoa, 2002).

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* participa en el control biológico de fitopatógenos de cultivos agrícolas; el mecanismo mediante el cual ejerce el control biológico sobre hongos fitopatógenos no está completamente entendido, los mecanismos propuestos son: i) la producción de sideróforos que, al secuestrar el hierro, quedaría no disponible para los fitopatógenos, y ii) la producción de distintos antibióticos, como el 2,4-diacetilfluoroglucinol, la pyoluteorina, la pyrrolnitrina y el ácido fenazin-1-carboxílico que son capaces de suprimir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Valencia *et al.*, 2005).

Dado que no existe información sobre la eficacia de hongos y bacterias antagónicas a *Sclerotium cepivorum* que se encuentran de forma natural en las áreas productoras de cebolla en la región de la ciénega michoacana, y que podrían estar ejerciendo algún grado de control biológico natural. Por tanto, sería de gran importancia para los productores de cebolla de Cojumatlán, Michoacán se realizaran estudios para buscar agentes de control biológico del patógeno de la pudrición blanca: con base en lo anterior se realizó el presente trabajo con el objetivo siguiente: Aislar e identificar antagonistas de suelos infestados de *Sclerotium cepivorum* y evaluar su eficacia en el manejo de la enfermedad en invernadero.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Localización del sitio experimental

La presente investigación se llevó a cabo en un invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada a 19° 29´ y 98° 53´ de latitud norte y longitud oeste, respectivamente; ubicado a una altitud de 2,250 msnm, temperatura media anual de 15 °C y precipitación de 644.8 mm, con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (García, 2008).

4.2.2. Origen del patógeno

Se utilizó un aislamiento obtenido a partir de plantas enfermas de una huerta comercial ubicada en el municipio de Cojumatlán de Regules, en el estado de Michoacán (Figura 20).

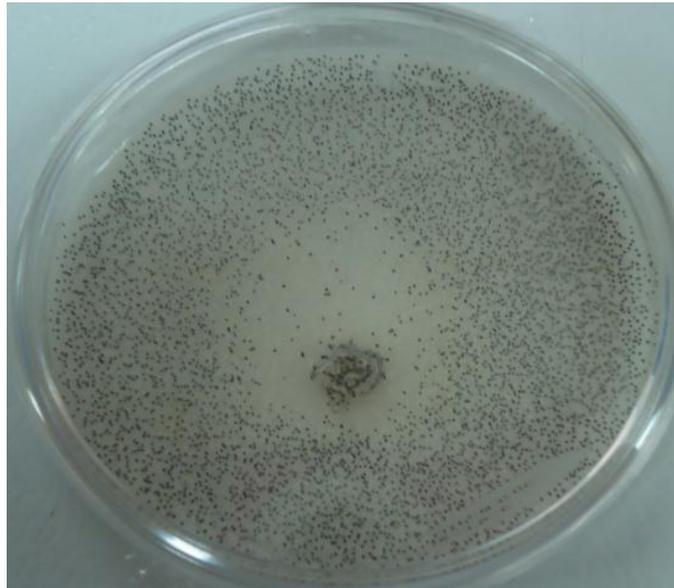


Figura 20. Cepa pura de *Sclerotium cepivorum* produciendo esclerocios.

4.2.3. Preparación y cuantificación del inóculo

El patógeno *S. cepivorum* se sembró en 40 cajas Pétri con medio de cultivo PDA sólido. El micelio del hongo formó esclerocios en la periferia de la caja de Pétri a los 20 días; posteriormente se les dejó reposar por tres meses para después incorporarlos en el suelo esterilizado con vapor que se utilizó para el estudio (figura 11). La densidad de inóculo utilizada fue de $0.1 \text{ esclerocios} \cdot \text{g}^{-1}$ de suelo, la cual es capaz de causar 100 % de incidencia (Crowe *et. al.*, 1980).

4.2.4. Origen de los aislamientos para probar antagonismo en invernadero

En las pruebas *In Vitro* se utilizaron 2 aislamientos de *Trichoderma* spp. y una cepa de *Pseudomonas* sp., de los cuales el *Trichoderma* sp. 1 se obtuvo a partir de suelo de una huerta comercial de piña en Loma Bonita, Veracruz. El *Trichoderma* sp. 2 y la cepa de *Pseudomonas* spp. fueron recuperados a partir de plantas de cebolla con síntomas de pudrición blanca provenientes de una huerta comercial en el municipio de Cojumatlán de Regules, Michoacán. (Figura 21)

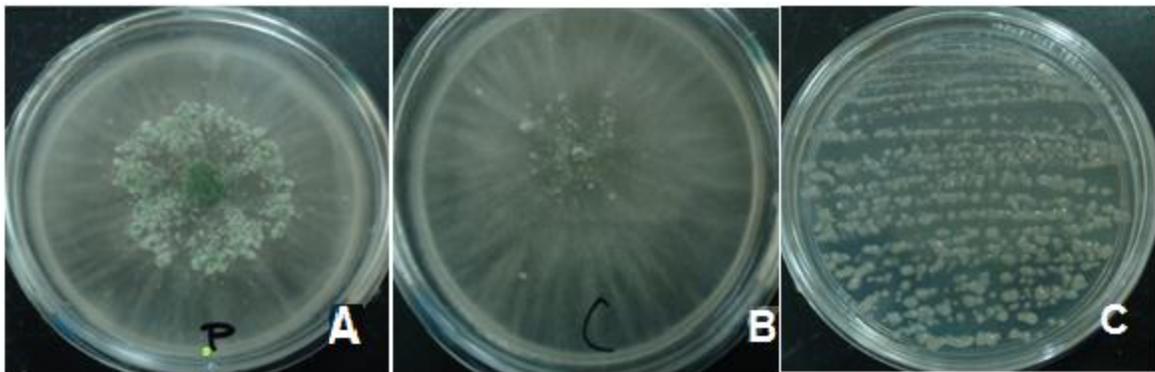


Figura 21. Cultivos puros de los organismos antagonistas. A) cepa de *Trichoderma* sp. 1, aislada de plantas enfermas de cebolla. B) Cepa de *Trichoderma* sp. 2, aislada de suelo de una plantación de piña y C) cepa de *Pseudomonas* sp. Aislada de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

4.2.5. Preparación y cuantificación de los organismos antagonistas

***Trichoderma* spp.**

Cada cepa del hongo se sembró en 10 cajas de Pétri con medio de cultivo PDA sólido. Cuando el micelio del hongo cubrió la totalidad de la superficie de las cajas (a los 20 días) se les agregó 10 mL de agua destilada estéril; después con un portaobjeto se raspó el micelio para separar los conidios, la suspensión resultante se pasó a través de una manta de cielo para retener el micelio y que solo pasaran los conidios; el filtrado se colectó en un vaso de precipitados debidamente etiquetado y esterilizado. Posteriormente con ayuda de un hemacitómetro y un microscopio compuesto, se determinó la concentración de la solución madre y finalmente se preparó una suspensión de conidios para ambos aislamientos de *Trichoderma* spp. a una concentración de 1×10^6 y 1×10^8 conidios•mL⁻¹.

***Pseudomonas* sp.**

La bacteria se sembró en 10 cajas de Pétri con medio de cultivo PDA sólido. Cuando las colonias de la bacteria llenaron por completo la superficie de la caja (a los 20 días) se les agregó 10 mL de agua destilada esterilizada; después con un portaobjeto se raspó para separar el crecimiento bacteriano del medio de cultivo; la suspensión resultante se colectó en un vaso de precipitados debidamente etiquetado y esterilizado. Posteriormente con ayuda de la escala de McFarland, se prepararon dos soluciones a una concentración de 1×10^6 y 1×10^8 ufc•mL⁻¹.

4.2.6. Aplicación de los tratamientos

Se llevaron a cabo 5 aplicaciones de las diferentes concentraciones de organismos antagonistas como se indica a continuación **1)**. Al momento del trasplante **(10/11/11)**, **2)**. 15 días después de la primera aplicación **(25/11/11)**. **3)**. 15 días después de la segunda aplicación **(10/12/11)**, **4)**. 30 días después de la tercera aplicación **(9/01/12)** y **5)**. 30 días después de la cuarta aplicación

(08/02/12). La aplicación de las soluciones de conidios se realizó en “Drench”, con una aspersora manual de 5 L marca Pacto. Se utilizó un volumen de agua de 5.28 mL/planta, 158.4 mL/tratamiento; dando un total de 1500 L/ha.

4.2.7. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar ($Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$) con tres repeticiones, un total de 6 tratamientos y 1 testigo. Cada tratamiento correspondió a una concentración diferente (1×10^6 y 1×10^8 ufc•mL⁻¹) de los organismos antagonistas.

La unidad experimental quedó conformada por 10 plantas, con tres repeticiones por tratamiento, dando un total de 30 plantas (Figura 12), las cuales fueron trasplantadas en macetas de 2 L que contenían suelo con el inóculo de *Sclerotium cepivorum*. Todos los tratamientos (incluyendo el testigo) se regaron diariamente y se mantuvieron en invernadero a una temperatura de 15-23 °C y a 80-85 % de H.R. con ayuda de nebulizadores.

4.2.8. Tratamientos

Los tratamientos para evaluar el antagonismo en invernadero de *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. sobre *Sclerotium cepivorum* se indican en el cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos evaluados para determinar el antagonismo en invernadero de las diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* sp. en plantas de cebolla contra la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk).

Tratamientos	Dosis
	Concentración ufc•mL ⁻¹
1 Testigo inoculado	-----
2 <i>Trichoderma</i> sp. 1	1x10 ⁶
3 <i>Trichoderma</i> sp. 1	1x10 ⁸
4 <i>Trichoderma</i> sp. 2	1x10 ⁶
5 <i>Trichoderma</i> sp. 2	1x10 ⁸
6 <i>Pseudomonas</i> spp.	1x10 ⁶
7 <i>Pseudomonas</i> spp.	1x10 ⁸



Figura 22. Parcela experimental de cebolla var. Suprema inoculadas con 0.1 microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* agente causal de la pudrición blanca (Berk) por g de suelo, tratadas con dos cepas de *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas* sp. en invernaderos del departamento de Parasitología Agrícola, en Chapingo, Edo. de México.

4.2.9. Parámetro de medición de la efectividad biológica

Se evaluó la incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*). Considerada como el No. de plantas que muestren el síntoma típico de la enfermedad con respecto al No. total de plantas muestreadas, en las 10 plantas de cebolla de cada repetición y se expresó en porcentaje. Solamente se determinó la incidencia de la pudrición blanca, de la cebolla (*Sclerotium cepivorum*) ya que es una enfermedad sistémica y las plantas que presenten síntomas aunque sea de daño bajo o medio finalmente morirán, por eso se justifica solo evaluar la incidencia.

4.2.10. Método de evaluación

Se consideró el número de plantas que mostraron síntomas típicos de pudrición blanca con respecto al número total de plantas muestreadas, y se expresó en porcentaje.

4.2.11. Tipo y frecuencia del muestreo

Se efectuaron 6 evaluaciones a los 20, 40, 60, 80, 100 y 120 DDAT días después de la primera aplicación de los fungicidas para determinar el porcentaje de control de la enfermedad.

4.2.12. Análisis de datos

Los porcentajes de incidencia se sometieron a un análisis de varianza, en los casos donde hubo diferencias entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con el software SAS® para separar las medias de infección de cada uno de los tratamientos.

Por otra parte, la eficacia biológica de los tratamientos se obtuvo con la fórmula Abbott (1925):

$$\% \text{ Ef} = \frac{Cd - Td}{Cd} \times 100$$

Donde:

% Ef= Eficacia biológica.

Cd=Incidencia en la parcela testigo después de la aplicación.

Td= Incidencia en la parcela tratada después de la aplicación.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los datos de porcentaje de incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en cebolla, en invernadero, obtenidos en la evaluación 1 (30/11/11), evaluación 2 (20/12/11), evaluación 3 (9/01/12), evaluación 4 (29/01/12), evaluación 5 (18/02/11) y evaluación 6 (9/03/12), se llevaron a cabo varios análisis de varianza, en donde se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Apendice B; Apendice 1-6). Las diferencias se corroboraron al llevar a cabo una comparación de medias de Tukey (0.05) (Cuadro 6), en donde se observó que la incidencia de la pudrición blanca de a cebolla (*S. cepivorum* Berk) fue menor y diferente estadísticamente a los tratamientos en donde se aplicaron las soluciones de conidios de organismos antagonistas, con respecto al testigo, el cual presentó un porcentaje de incidencia de 93.3 % en la última evaluación (120 DDAT) (Cuadro 7). Así mismo se observó que los tratamientos 3 y 5 [*Trichoderma* sp. 1 (1×10^8 ufc•mL⁻¹) y *Trichoderma* sp. 2 (1×10^8 ufc•mL⁻¹)], fueron los mejores tratamientos para el control de la pudrición blanca (*S. cepivorum* Berk), ya que mostraron incidencias finales de 23.3 y 20.0 %, obteniendo eficacias de 75.0 y 78.5 % respectivamente. Posteriormente, los tratamientos 4 y 7 [*Trichoderma* sp. 2 (1×10^6 ufc•mL⁻¹) y *Pseudomonas* sp. (1×10^8 ufc•mL⁻¹)], fueron estadísticamente el segundo grupo que mejor controló la enfermedad, ya que el porcentaje de incidencia final fue de 26.6 %, obteniendo eficacias de 71.4 % en ambos casos (Figura 23).

Cuadro 6. Comparación de medias de los datos de incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (09/03/12) para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en el control de la pudrición blanca en cebolla Var. Suprema, en invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo, México. 2011-2012.

Tratamientos	Eval.1 (20 DDAT)	Eval.2 (40 DDAT)	Eval.3 (60 DDAT)	Eval.4 (80 DDAT)	Eval.5 (100 DDAT)	Eval.6 (120 DDAT)
1 Testigo inoculado	0 A	13.3 A	26.6 A	56.6 B	93.3 A	93.3 A
2 <i>Trichoderma</i> sp. 1 (1×10^6 ufc•mL ⁻¹)	0 A	10.0 A	16.6 A	33.3 B	43.3 B	43.3 B
3 <i>Trichoderma</i> sp. 1 (1×10^8 ufc•mL ⁻¹)	0 A	3.3 A	6.6 A	13.3 B	23.3 C	23.3 C
4 <i>Trichoderma</i> sp. 2 (1×10^6 ufc•mL ⁻¹)	0 A	3.3 A	10.0 A	16.6 B	26.6 BC	26.6 BC
5 <i>Trichoderma</i> sp. 2 (1×10^8 ufc•mL ⁻¹)	0 A	0 A	6.6 A	13.3 B	20.0 C	20.0 C
6 <i>Pseudomonas</i> spp. (1×10^6 ufc•mL ⁻¹)	0 A	13.3 A	16.6 A	26.6 B	36.6 BC	36.6 BC
7 <i>Pseudomonas</i> spp. (1×10^8 ufc•mL ⁻¹)	0 A	6.6 A	13.3 A	16.6 B	26.6 BC	26.6 BC

Cuadro 7. Eficacia biológica de los bioantagonistas para el control de *Sclerotium cepivorum* Berk, agente causal de la pudrición blanca de la cebolla en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12), en cebolla, en invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola, en Chapingo, Edo. de México. 2011-2012.

Tratamientos	Eval.1 (20 DDAT)	Eval.2 (40 DDAT)	Eval.3 (60 DDAT)	Eval.4 (80 DDAT)	Eval.5 (100 DDAT)	Eval.6 (120 DDAT)
1 Testigo inoculado	-	-	-	-	-	-
2 <i>Trichoderma</i> sp. 1 (1×10^6 ufc•mL ⁻¹)	0	24.8	37.5	41.1	53.5	53.5
3 <i>Trichoderma</i> sp. 1 (1×10^8 ufc•mL ⁻¹)	0	75.1	75.1	76.5	75.0	75.0
4 <i>Trichoderma</i> sp. 2 (1×10^6 ufc•mL ⁻¹)	0	75.1	62.4	70.6	71.4	71.4
5 <i>Trichoderma</i> sp. 2 (1×10^8 ufc•mL ⁻¹)	0	100	75.1	76.5	78.5	78.5
6 <i>Pseudomonas</i> spp. (1×10^6 ufc•mL ⁻¹)	0	0	37.5	53.0	60.7	60.7
7 <i>Pseudomonas</i> spp. (1×10^8 ufc•mL ⁻¹)	0	50.3	50	70.6	71.4	71.4

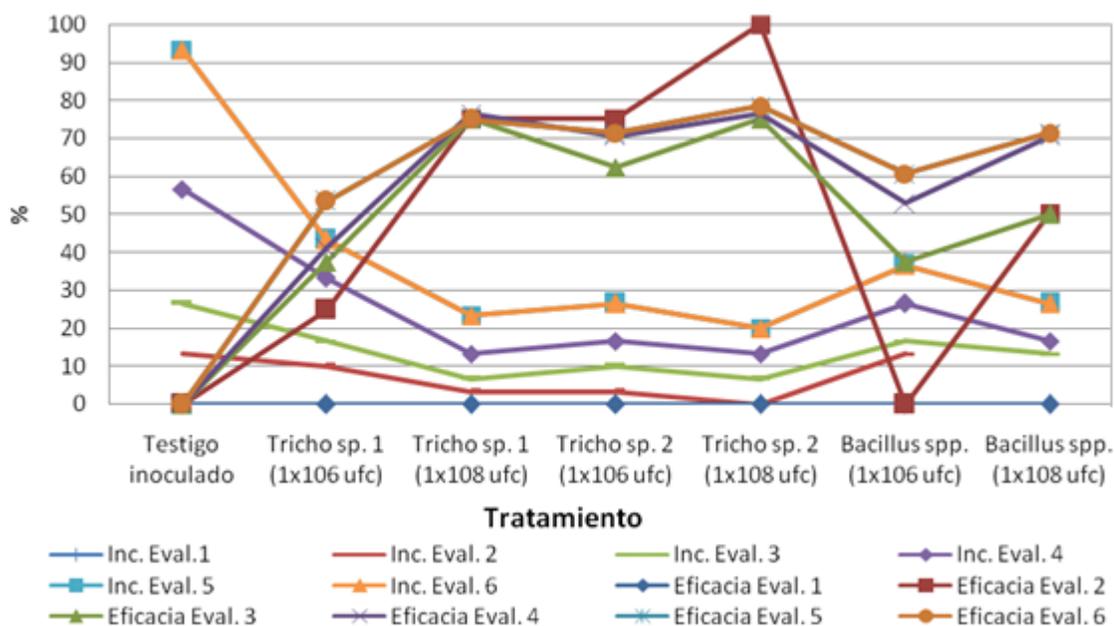


Figura 23. Porcentaje de incidencia y eficacia biológica de los bioantagonistas para el control de *Sclerotium cepivorum* Berk, agente causal de la pudrición blanca de la cebolla, en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (09/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012.

El hecho de que los tratamientos 3 y 5 [*Trichoderma* sp. 1 (1×10^8 ufc•mL⁻¹) y *Trichoderma* sp. 2 (1×10^8 ufc•mL⁻¹)] hayan sido los mejores tratamientos, se debe principalmente a lo mencionado por Michel (2001), quien indica que *T. harzianum* posee distintos mecanismos como secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xylasas y muchas veces proteasas, las cuales

pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiéndole al bioantagonista aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar dichos recursos.

Por su parte, Tronsmo (1996), indicó que *Trichoderma sp.* tiene la capacidad de conducir sus hifas hacia las de otros hongos, enrollándose en ellas; esta reacción esta mediada por lecitinas, que van degradando la pared celular del hospedante, y por la secreción de exoenzimas hidrolíticas. Dicho proceso limita el crecimiento y la actividad del hongo patógeno y algunas especies de *Trichoderma sp.* son conocidas por producir elevadas concentraciones de enzimas degradadoras de la pared celular, tales como α -1,3-glucanasa y diferentes enzimas quitinolíticas que actúan en conjunto con proteasas y celulasas.



Figura 24. Daño mostrado por *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012, tratadas con: A) Testigo absoluto. B) *Trichoderma* sp. 1 (1×10^6 ufc•mL⁻¹). C) *Trichoderma* sp. 1 (1×10^8 ufc•mL⁻¹). D) *Trichoderma* sp. 2 (1×10^6 ufc•mL⁻¹). E) *Trichoderma* sp. 2 (1×10^8 ufc•mL⁻¹). F) *Pseudomonas* sp. (1×10^6 ufc•mL⁻¹) y G) *Pseudomonas* sp. (1×10^8 ufc•mL⁻¹).

4.4. CONCLUSIONES

La concentración alta de *Trichoderma* sp. 1 (1×10^8 ufc•mL⁻¹) procedente de cebolla y *Trichoderma* sp. 2 (1×10^8 ufc•mL⁻¹) de piña, permitieron las incidencias más bajas de 23.3 y 20.0 % inducidas por *Sclerotium cepivorum* Berk, procedente de Cojumatlán de Regules, Michoacán, lo que se tradujo en eficacias de 75.0 y 78.5 % después de 6 aplicaciones.

La concentración baja de *Trichoderma* sp. 2 (1×10^6 ufc•mL⁻¹) de piña y la concentración alta de *Pseudomonas* spp. (1×10^8 ufc•mL⁻¹), permitieron una incidencia de 26.6 %, inducidas por *Sclerotium cepivorum* Berk, aislado de cebolla de Cojumatlán de Regules, Michoacán, lo que se tradujo en eficacias de control de 71.4 % en ambos casos, después de 6 aplicaciones y a los 120 días después del trasplante.

4.5. LITERATURA CITADA

- Ayers, W. A.; Adams, P. B. 1981. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladum*. *Can. J. Microbiol.* 27: 886-892.
- Coley-Smith JR, Mitchel CM, Sansford EC, 1990. Long-term survival of *Sclerotinia* of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant pathology* 39, 58-69.
- Cook, R.J. 1979. Antagonism and biological control: concluding remarks. In *Soil borne plant pathogens*. Eds. Schippers, B y Gams, W. New York, Academic Press. p. 653-657.
- Crowe, F. J.; HALL, D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74-78.
- García, M., A. M. 2008. Determinación Morfológica, Molecular, Patogénica y Manejo de Enfermedades de Raíz y Cuello en Céspedes de Campos de Golf. Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 164 p.
- Granados M., M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 105 p.
- Kay, S. J.; Stewart, A. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology* 43: 371-377.
- McLean, K. L.; Stewart, A. 2000. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28: 115-122.

Mesen, R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p.

Rai, J. N.; Saxena, V. C. 1975. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of "white rot" disease. *Plant and Soil* 43: 509-513.

CAPITULO V. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LOS MICROESCLEROCIOS DE *Sclerotium cepivorum* Berk. CON CALOR HÚMEDO Y CALOR SECO

5.1. INTRODUCCIÓN

La pudrición blanca, causada por *Sclerotium cepivorum* es una de las enfermedades más limitantes del cultivo de la cebolla (*Allium cepa* L.) (Granados, 2004). Los problemas asociados a enfermedades del suelo son mucho más comunes e importantes debido a la prevalencia permanente de condiciones ambientales favorables para el crecimiento y multiplicación de dichos patógenos. Consideraciones económicas y ambientales se convierten en las mayores limitaciones al uso de pesticidas químicos que han sido y continúan siendo usados para combatir estas plagas. Sin embargo, existen alternativas no-químicas que han probado ser efectivas para el control de patógenos habitantes del suelo, entre las cuales se destaca la solarización (FHIA, 2007).

La solarización es un proceso natural hidrotérmico en el cual el calor solar al pasar a través de plástico transparente incrementa la temperatura del suelo o sustrato húmedo a niveles letales para los patógenos (49 °C o más). Esta técnica ha probado ser efectiva en el control de patógenos habitantes del suelo causante de grandes pérdidas en varios cultivos hortícolas. Además, algunos estudios realizados en diferentes lugares y circunstancias demuestran que la solarización también está asociada a la reducción de malezas y nematodos, así como a un incremento en los niveles de nutrientes solubles y cambios en la biota del suelo, que favorecen la colonización de microorganismos benéficos (FHIA, 2007).

Según Adams (1987), citado por Granados (2005), menciona que la alta temperatura combinada con baja humedad del suelo reduce la supervivencia y actividad de los esclerocios de *S. cepivorum*. Así, a una temperatura de 35 C es posible dañar completamente el 50% de los propágulos (DL50) en 129,6 horas,

mientras que si la temperatura aumenta a los 50 C se requieren solamente de 0,8 horas para lograr el mismo efecto. Este hongo es más sensible al calor que otros que producen esclerocios, por ejemplo *Sclerotinia minor* tiene una DL50 de 624 horas a 35 °C. El autor indicó que, la solarización con plástico claro debería aumentar la temperatura del suelo lo suficiente, como para reducir efectivamente la viabilidad de los esclerocios. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la localización de los propágulos en el perfil del suelo es un factor determinante para el éxito de esta práctica de combate.

En Australia y Egipto se han obtenido reducciones en la población de esclerocios mediante el uso de la solarización (Porter, 1983; citado por Coley Smith, 1990).

Este método es efectivo para reducir la densidad de inóculo inicial, tanto por el efecto físico del calor sobre los esclerocios, como por el favorecimiento de la microflora parasítica a *S. cepivorum* (Enwistle, 1992 citado por Mesén, 1997). En un estudio realizado por Lifshitz *et al.* (1983) con esclerocios de *S. rolfsii* se encontró un incremento en la colonización de estas estructuras tanto por bacterias como por actinomicetos (estreptomicetos). El calentamiento aumentó la frecuencia de rupturas superficiales de los esclerocios, así como las concentraciones de bacterias sobre o alrededor de estas grietas y se notó una disminución de 43% en la incidencia de la enfermedad.

Al respecto, Mc Lean y colaboradores (2001) hallaron, en dos experimentos separados, que la solarización redujo significativamente la viabilidad de microesclerocios de *S. cepivorum* y además que los esclerocios recuperados estaban colonizados superficialmente por especies de *Trichoderma*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus* y cuatro especies de bacterias no identificadas.

Debido a lo antes mencionado, la presente investigación tiene como objetivo: 1) determinar la temperatura y tiempo a la cual se inhibe la germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk y 2) determinar si el calor húmedo o el calor seco es más efectivo para inhibir la germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Localización del sitio experimental

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.2.2. Origen del patógeno

Se utilizaron microesclerocios de un aislamiento de *S. cepivorum* obtenidos a partir de plantas enfermas de una huerta comercial ubicada en el municipio de Cojumatlán de Regules, en el estado de Michoacán (Figura 25).

A dichos microesclerocios se les realizó una prueba de germinación, la cual consistió en sembrar 10 esclerocios en una caja de Petri con medio de cultivo PDA, la cual se incubó a 22 ± 3 °C; transcurridos 4 días se determinó el porcentaje de germinación de los microesclerocios fue de 93 %, (promedio de tres repeticiones).

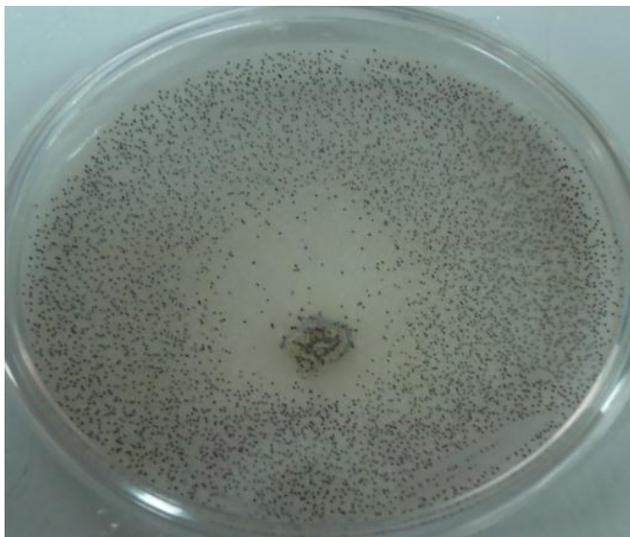


Figura 25. Esclerocios de un cultivo puro de *Sclerotium cepivorum*, aislado de plantas enfermas con la pudrición blanca en Cojumatlán de Regules, Michoacán.

5.2.3. Prueba de calor seco

Para cada tratamiento se tomaron 30 microesclerocios del patógeno, los cuales fueron envueltos en una sanita de papel previamente esterilizada que posteriormente se colocó dentro de una bolsa, la cual se cerró con una liga y se sometió a baño maría, colocándola dentro de un vaso de precipitados que contenía agua a la temperatura que indicaba el tratamiento; la temperatura fue monitoreada por 5 minutos, una vez que se estabilizó la temperatura se introdujo la bolsa con los microesclerocios envueltos en la sanita, a partir de este momento se comenzó a tomar el tiempo, una vez que se cumplió el tiempo de exposición se sacó la bolsa y se abrió dentro de la cámara de siembra previamente esterilizada; posteriormente se sembraron 10 microesclerocios en una caja de Pietri con medio de cultivo PDA, la cual se consideró como una repetición, dando un total de 3 repeticiones por tratamiento.

5.2.4. Prueba de calor húmedo

Para cada tratamiento se tomaron 30 esclerocios del patógeno, los cuales fueron envueltos en una sanita de papel previamente esterilizada, la cual fue humedecida con agua destilada estéril, posteriormente se colocó dentro de una bolsa, la cual se cerró con una liga y se sometió a baño maría, colocándola dentro de un vaso de precipitados que contenía agua a la temperatura que indicaba el tratamiento; la temperatura fue monitoreada por 5 minutos, una vez que se estabilizó la temperatura se introdujo la bolsa con los esclerocios envueltos en la sanita, a partir de este momento se comenzó a tomar el tiempo, una vez que se cumplió el tiempo de exposición se sacó la bolsa y se abrió dentro de la cámara de siembra previamente esterilizada; posteriormente se sembraron 10 esclerocios en una caja de Pietri con medio de cultivo PDA, la cual se consideró como una repetición, dando un total de 3 repeticiones por tratamiento (Figura 26).



Figura 26. Caja de Pétri con esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, para determinar la efectividad biológica de tratamientos con calor para el control de la pudrición blanca, *In Vitro*. 2012.

5.2.5. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar ($Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$) con tres repeticiones, un total de 16 tratamientos y 1 testigo. Cada tratamiento correspondió a una temperatura y un tiempo de exposición diferente.



Figura 27. Cajas de Pétri con esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, para determinar la efectividad biológica de tratamientos con calor para el control de la pudrición blanca, *In Vitro*. 2012.

5.2.6. Tratamientos

Los tratamientos para evaluar la inhibición *In Vitro* de la capacidad de germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk mediante pruebas de calor, se indican en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Tratamientos evaluados para determinar la inhibición *In Vitro* de la capacidad de germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk mediante pruebas de calor seco y húmedo.

	Calor	° C	Tiempo (min)
1	Testigo absoluto	-	-
2	Húmedo	60	25
3	Húmedo	60	10
4	Húmedo	55	25
5	Húmedo	55	10
6	Húmedo	50	25
7	Húmedo	50	10
8	Húmedo	45	25
9	Húmedo	45	10
10	Seco	60	25
11	Seco	60	10
12	Seco	55	25
13	Seco	55	10
14	Seco	50	25
15	Seco	50	10
16	Seco	45	25
17	Seco	45	10

5.2.7. Evaluación de las variables respuesta

Se evaluó el porcentaje de germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* a los 7 días después de haber sido expuesto a diferentes temperaturas y a distintos tipos de calor (húmedo y seco).

5.2.8. Análisis de datos

Los datos de porcentaje de germinación de los microesclerocios se sometieron a un análisis de varianza, en los casos donde hubo diferencias entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con el software SAS[®] para separar las medias de cada uno de los tratamientos.

Por otra parte, la eficacia de los tratamientos se obtuvo con la fórmula Abbott (1925):

$$\% \text{ ET} = \frac{GT - gt}{GT} \times 100$$

Donde:

% ET= Eficacia del tratamiento.

GT= Porcentaje de germinación del testigo.

gt= Porcentaje de germinación de cada tratamiento.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* y eficacia de los tratamientos (porcentaje de inhibición de la germinación).

Con los datos de porcentaje de germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk, causante de la pudrición blanca de la cebolla, obtenido a los 7 días después de haber sido expuesto a diferentes temperaturas, dos tiempos y dos tipos de calor (húmedo y seco) y sembrados en cajas de Pétri con medio de cultivo PDA **evaluación 1 (06/03/12)**, se realizó un análisis de varianza, en donde se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Apéndice C; Apéndice 1). Las diferencias se verificaron al llevar a cabo un una comparación múltiple de medias de Tukey (0.05) Cuadro 9, en donde se observó que el porcentaje de germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* fue menor y diferente estadísticamente en los tratamientos donde se aplicó calor a diferentes temperaturas, con respecto al testigo absoluto. Así mismo, se observó que los tratamientos 2 y 3 [calor húmedo a 60 °C (25 y 10 min)], 4 y 5 [calor húmedo a 55 °C (25 y 10 min)], 10 y 11 [calor seco a 60 °C (25 y 10 min)], y 12 [calor seco a 55 °C (25 min)] mostraron una inhibición total de la capacidad de germinación de los esclerocios Cuadro 9. lo que llevó a eficacias de 100 %, comparado con el testigo

absoluto, que mostro un porcentaje de germinación de 100 %. Lo anterior indicó que existe un control excelente de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, lo cual se evidencia gráficamente en la figura 28.

Cuadro 9. Comparación de medias de los datos de porcentaje de germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación 1 (06/03/12), para la determinación de la efectividad biológica del tratamiento físico: calor húmedo y calor seco en el control de la pudrición blanca, *In Vitro*. 2012.

	Calor	° C	Tiempo (min)	% de germinación	Eficacia Abbott (%)
1	Testigo absoluto	-	-	100 A	-
2	Húmedo	60	25	0 C	100
3	Húmedo	60	10	0 C	100
4	Húmedo	55	25	0 C	100
5	Húmedo	55	10	0 C	100
6	Húmedo	50	25	23.3 B	76.7
7	Húmedo	50	10	100 A	0
8	Húmedo	45	25	100 A	0
9	Húmedo	45	10	100 A	0
10	Seco	60	25	0 C	100
11	Seco	60	10	0 C	100
12	Seco	55	25	0 C	100
13	Seco	55	10	3.3 BC	96.7
14	Seco	50	25	100 A	0
15	Seco	50	10	100 A	0
16	Seco	45	25	100 A	0
17	Seco	45	10	100 A	0

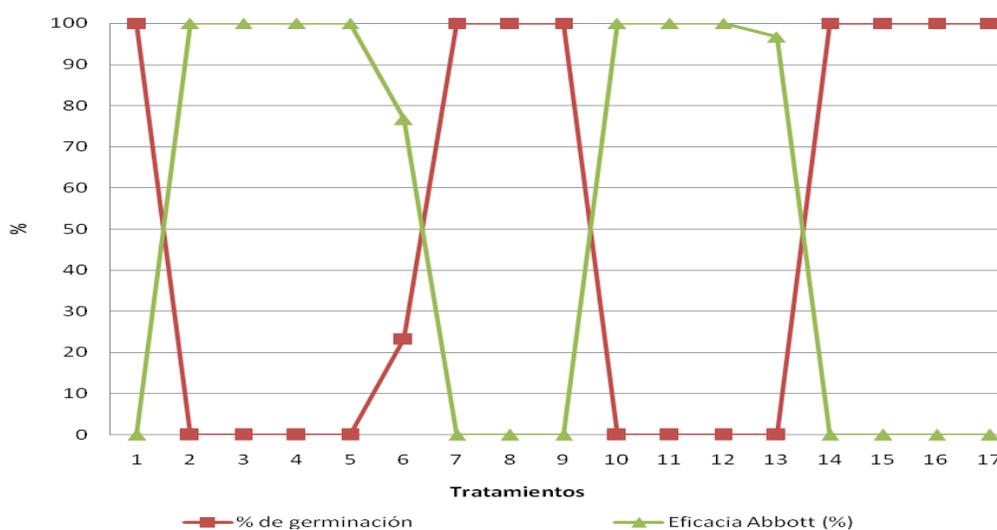


Figura 28. Porcentaje de germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk y eficacia biológica de los tratamientos en la evaluación: 1 (06/03/12) *In Vitro*. 2012.

El hecho de que los tratamientos 2 y 3 [calor húmedo a 60 °C (25 y 10 min)], 4 y 5 [calor húmedo a 55 °C (25 y 10 min)], 10 y 11 [calor seco a 60 °C (25 y 10 min)], y 12 [calor seco a 55 °C (25 min)] hayan mostraron una inhibición total de la capacidad de germinación de los esclerocios, se puede deber a que este hongo es más sensible al calor que otros hongos que producen esclerocios; esto coincide con lo mencionado por Adams (1987), quien indicó que a una temperatura de 35 °C es posible dañar completamente el 50% de los propágulos de *Sclerotium cepivorum* (DL50) en 129,6 horas, mientras que *Sclerotinia minor* tiene una DL50 de 624 horas a 35 °C. lo cual también se puede atribuir al tamaño del esclerocio, ya que uno es micro y el otro es macroesclerocio.

Así mismo, se observó que temperaturas superiores a 55 °C tanto a 25 y 10 min de exposición fueron letales para los esclerocios; esto concuerda con lo mencionado por Adams (1987), quien señaló que cuando la temperatura del suelo es de 50 °C, se requieren solamente de 0,8 horas para lograr eliminar el 50 % de los esclerocios. El mismo autor mencionó que la solarización con plástico claro debería aumentar la temperatura del suelo lo suficiente, como para reducir efectivamente la viabilidad de los esclerocios. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la localización de los propágulos en el perfil del suelo es un factor determinante para el éxito de esta práctica de combate.

Por otro lado Wakaida, 1968, Adams, 1987; citados por Delgadillo, (1998), mencionaron que los esclerocios pierden su viabilidad con exposiciones por 32 días a 35 °C, por 4 días a 36 °C o 10 min a 48 °C. Dichas temperaturas y tiempos son diferentes a las encontradas en este trabajo, por lo cual es de suma importancia que se tomen en cuenta al realizar un paquete de manejo integrado, en donde se incluya el acolchado y la solarización con uno a dos riesgos previos, para que se tenga un calor húmedo, el cual fue mas efectivo en esta investigación, lo anterior también se apoya con lo que recientemente, Castillo y Albarracín (2003) informaron que en parcelas solarizadas se redujo entre 5 y 18% el número de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, así como su viabilidad y la incidencia de la enfermedad y con McLean y colaboradores (2001) hallaron que la solarización

redujo significativamente la viabilidad de microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* y además que los esclerocios recuperados estaban colonizados superficialmente por especies de *Trichoderma*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus* y cuatro especies de bacterias no identificadas. . Por lo que este método es efectivo para reducir la densidad de inóculo inicial, tanto por el efecto físico del calor sobre los esclerocios, como por el favorecimiento de la microflora parasítica a *Sclerotium cepivorum* (Enwistle, 1992; citado por Granados, 2004).

En otro estudio realizado con microesclerocios de *S. rolfsii* se encontró un incremento en la colonización de estas estructuras tanto por bacterias como por actinomicetos (estreptomicetos). El calentamiento aumentó la frecuencia de rupturas superficiales de los esclerocios, así como las concentraciones de bacterias sobre o alrededor de estas grietas y se notó una disminución de 43% en la incidencia de la enfermedad.

Otros resultados en mezcla con otros tratamientos son señalados por Arias *et al.* (2007), quienes observaron que cuando la temperatura del suelo solarizado se incrementó hasta 50°C, los porcentajes de incidencia de la enfermedad fueron: con procimidona del 3.3%; con *T. harzianum* del 10.0%; con solarización del 15.8%; con solarización y procimidona del 8.8%; con solarización y *T. harzianum* del 9.2% y testigo: 18.3%.

Por su parte, Adams y Ayers (1979), citado por Arias *et al.* (2007) ,mencionan que las temperaturas del suelo entre 10 y 30°C no afectan adversamente la supervivencia de los esclerocios; a su vez, una temperatura constante de 35°C durante tres semanas o más reduce la supervivencia de los mismos; así también, el uso integrado de *Trichoderma* y solarización dan una supresión más duradera sobre *Rhizoctonia solani* que la solarización sola.

De acuerdo con Ulacio *et al.*, (2003), la solarización redujo la densidad y la viabilidad del inóculo de *Sclerotium cepivorum* hasta en un 75 y 84 %, respecto del testigo no solarizado.

En la presente investigación se pudo observar que el calor húmedo fue más efectivo que el calor seco, ya que a 55 °C durante 10 min se obtuvo el 100 % de inhibición de la germinación de los microesclerocios; mientras que a 55 °C de calor seco, se requirieron de 25 min para lograr el mismo efecto. Lo anterior se atribuye a que el calor húmedo es más efectivo en la desnaturalización del inoculo del patógeno y que el calor húmedo se transforma en vapor de agua, el cual se difunde por ósmosis a través de la membrana de los microorganismos destruyendo más rápidamente los propágulos de *Sclerotium cepivorum*. Lo antes expuesto coincide con lo mencionado por Anónimo b (2012), quien indicó que el “calor húmedo” es más efectivo en la desnaturalización de enzimas y otros componentes proteicos importantes para la célula que el “calor seco”, y con Santambrosio y Ortega, (2009), quienes mencionaron que el calor seco presenta la desventaja, con respecto al calor húmedo, de que es poco penetrante. Además señalaron que el aire húmedo es un conductor más eficiente del calor que el aire seco, ya que el coeficiente de transmisión del calor del agua es mayor que la del aire, por lo que a muerte de microorganismos en este caso se produce por deshidratación y por tanto hay que llegar a temperaturas elevadas y tiempos más largos; también mencionaron que el calor húmedo es más eficiente, ya que el vapor de agua se difunde por ósmosis a través de la membrana de los microorganismos, produciendo la muerte de los mismos por coagulación de su protoplasma y no por deshidratación, como en el caso del calor seco.

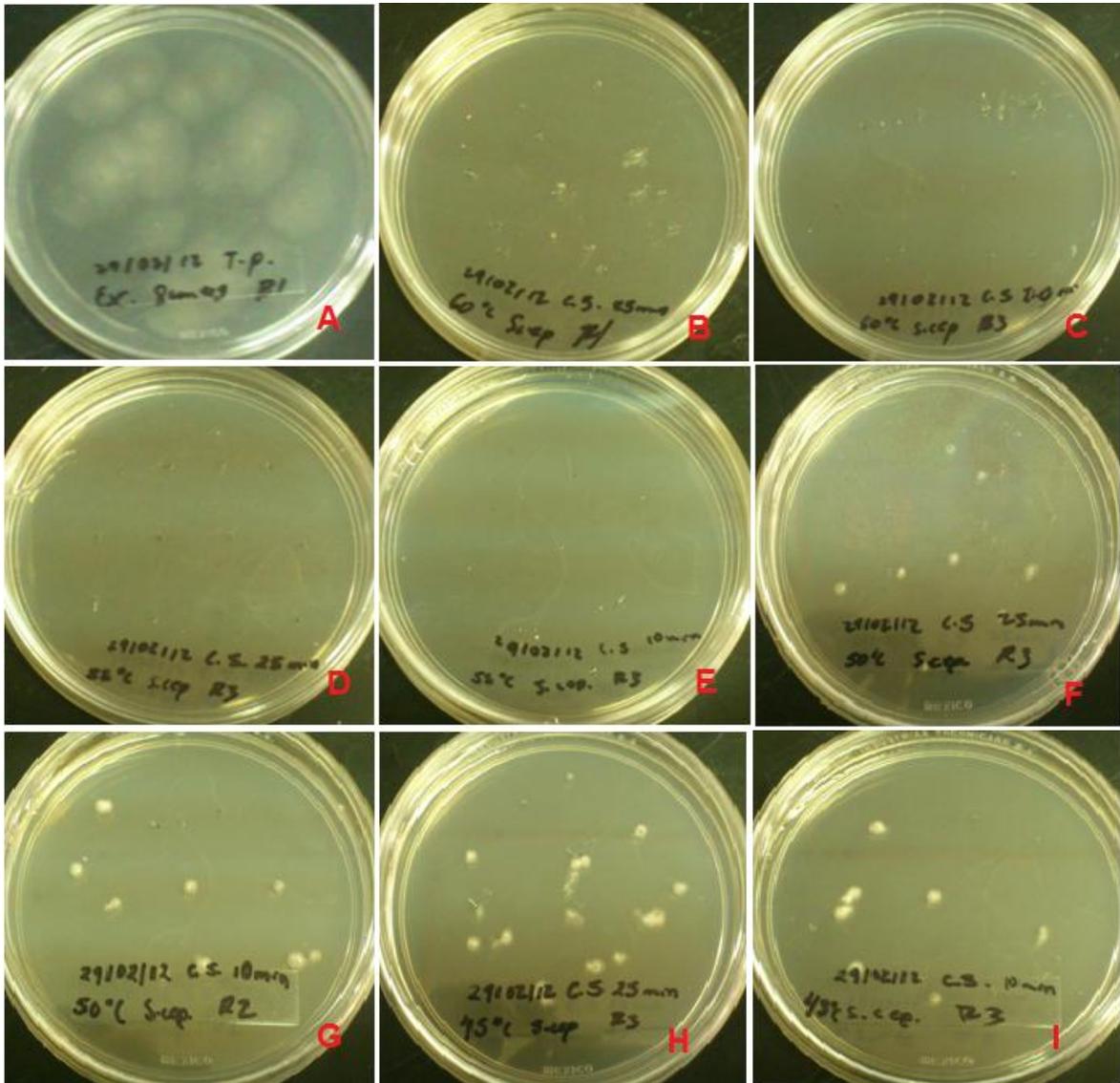


Figura 29. Capacidad de germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* después de haber sido tratados con: A) Testigo absoluto. B) Calor seco a 60 °C durante 25 minutos. C) Calor seco a 60 °C durante 10 minutos. D) Calor seco a 55 °C durante 25 minutos. E) Calor seco a 55 °C durante 10 minutos. F) Calor seco a 50 °C durante 25 minutos. G) Calor seco a 50 °C durante 10 minutos. H) Calor seco a 45 °C durante 25 minutos. I) Calor seco a 45 °C durante 10 minutos.

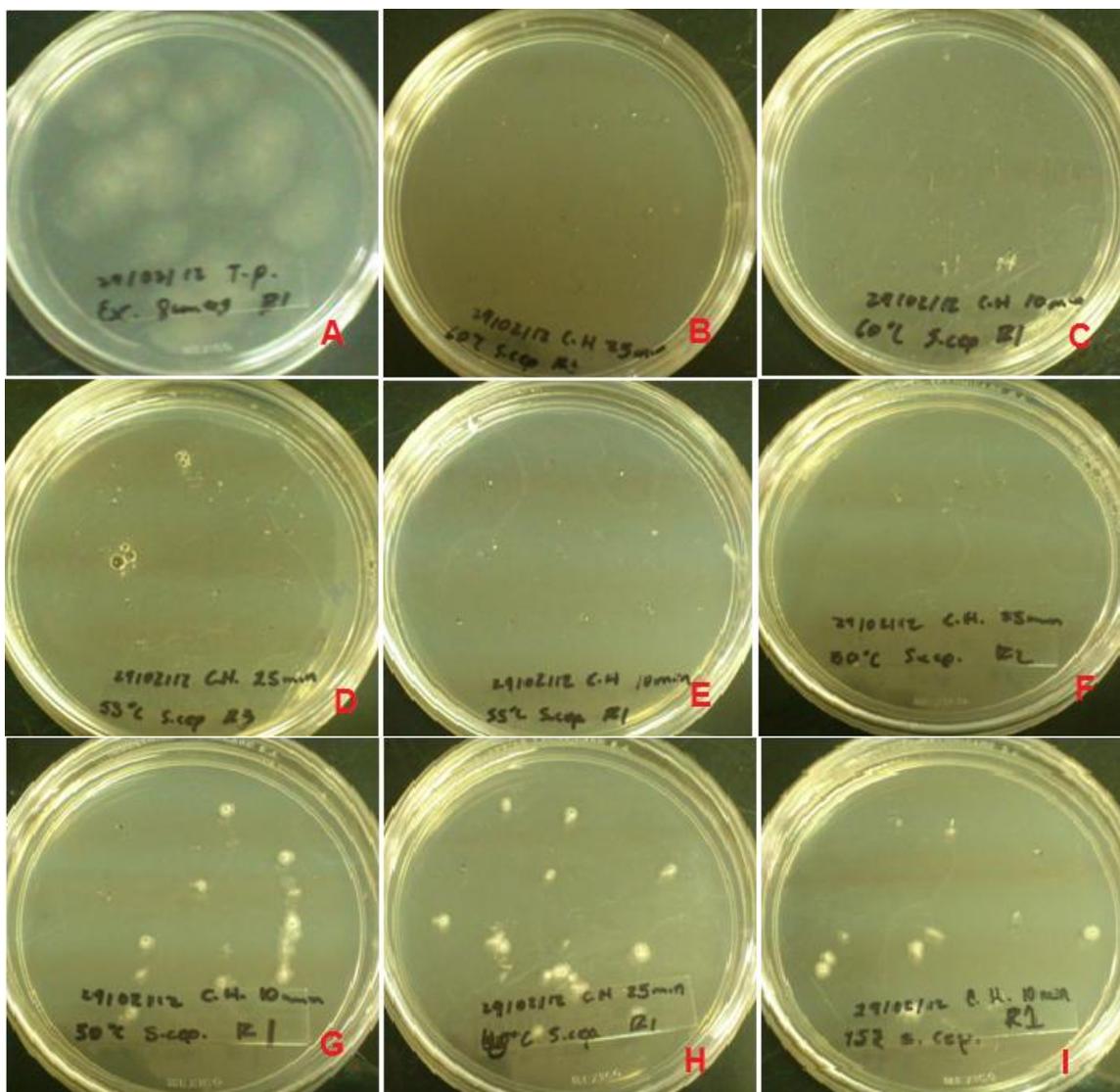


Figura 30. Capacidad de germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* después de haber sido tratados con: A) Testigo absoluto. B) Calor húmedo a 60 °C durante 25 minutos. C) Calor húmedo a 60 °C durante 10 minutos. D) Calor húmedo a 55 °C durante 25 minutos. E) Calor húmedo a 55 °C durante 10 minutos. F) Calor húmedo a 50 °C durante 25 minutos. G) Calor húmedo a 50 °C durante 10 minutos. H) Calor húmedo a 45 °C durante 25 minutos. I) Calor húmedo a 45 °C durante 10 minutos.

5.4. CONCLUSIONES

El calor húmedo a 55 °C (temperatura mínima), durante un periodo mínimo de 10 minutos inhibió la germinación de los micro esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk en un 100 %.

El calor seco a 55 °C (temperatura mínima), durante un periodo mínimo de 20 minutos inhibió la germinación de los micro esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk en un 100 %.

El calor húmedo (10 min) fue más efectivo que el calor seco (25 min) a 55 °C, ya que requirió 15 min menos para inhibir al 100 % de la germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.

Temperaturas inferiores a 55 °C con calor seco y húmedo fueron incapaces de inhibir al 100 % de la germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.

Temperaturas superiores a 55 °C con calor seco y/o húmedo inhibieron el 100 % de la germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.

5.5. LITERATURA CITADA

- Anónimo b. 2012. Esterilización por Calor Seco y Calor Húmedo. Manual de Laboratorio. (Disponible en: <http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/p07.pdf>).
- Arias, L. A. *et al.*, 2007. Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Agronomía Colombiana* 25(1), 131-141.
- Coley-Smith JR, Mitchel CM, Sansford EC, 1990. Long-term survival of *Sclerotinia* of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant pathology* 39, 58-69.
- Delgadillo S., F. 1998. Control Integrado de la Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en el Cultivo de Ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Doctorado, Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 86 p.
- Granados M., M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 105 p.
- McLean, K. L.; Stewart, A. 2000. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28: 115-122.
- Mesen, R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p.

Ulacio O., D. *et.al.* 2003. Materia Organica y Microorganismos Antagonistas como Estrategias de Manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. Y su Impacto en el Progreso de la Pudrición Blanca de en Ajo (*Allium sativum* L.). revista Mexicana de la Ciencia de Fitopatología. 21 (3): 346-354.

Santambrosio, E. y Ortega, M. 2009. Trabajo práctico No. 2. Cátedra de Biotecnología. Facultad Regional Rosario. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Tecnológica Regional. Santa Fe, Argentina. 6 p.

CAPITULO VI. EFICACIAS DE FUNGICIDAS EN MEZCLAS PARA EL CONTROL DE *Sclerotium cepivorum* Berk. EN CEBOLLA *IN VITRO*

6.1. INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una de las hortalizas de exportación más importantes para México y la pudrición blanca inducida por *Sclerotium cepivorum* Berk., causa pérdidas económicas importantes en las principales zonas productoras de cebolla y ajo de México. La incidencia de la enfermedad varía de una región a otra; en ajo la enfermedad aumenta en forma directamente proporcional a la densidad del inóculo (Delgadillo, 1998).

La pudrición blanca de la cebolla provoca pérdidas de hasta el 100 % y el problema es tan grave que obliga a los productores a abandonar la tierra por falta de estrategias de manejo adecuadas (Ponce, 2006).

El inóculo primario de *Sclerotium cepivorum* Berk. está constituido por los esclerocios, que se destacan por su gran longevidad, pues pueden permanecer viables en el suelo hasta por 20 años en ausencia de especies de *Allium* (Delgadillo, 1998).

Se han reportado niveles de inóculo muy disímiles como 1.5 a 9,000 esclerocios·Kg⁻¹ (Crowe *et al.*, 1980), las variaciones en la concentración de inóculo que se alcanza en los suelos productores de cebolla y ajo se atribuyen a diferencias ambientales del suelo tanto bióticas como abióticas, a las prácticas culturales, a la susceptibilidad diferencial de los distintos cultivares usados que les permite soportar diferentes niveles de inóculo.

La forma más común de control de *Sclerotium cepivorum* ha sido el uso de fungicidas, destacando los siguientes: procymidone, fluazinam y tebuconazole, cuya eficacia depende de la densidad y distribución del inóculo en el suelo y de la oportunidad, forma y frecuencia de aplicaciones. En México uno de los productos que a nivel experimental ha tenido alta efectividad en el control de la pudrición

blanca es el tebuconazole (Folicur 250 EW) (Delgadillo, 1998). Ortiz (1985), mencionado por García (2007), explicaron las dificultades inherentes al control de *Sclerotium cepivorum* y demostraron que la aplicación de Vinclozolin (Ronilan®) y PCNB, aunque estadísticamente fueron superiores a otros tratamientos, serían inaceptables por la baja producción. También Pérez *et al.* (2000), mencionan que el control de *Sclerotium cepivorum* ha sido difícil, los intentos de control empleando métodos químicos no han resultado del todo satisfactorios y tienen un elevado costo económico y ecológico. Sin embargo, aun se sigue recurriendo al uso de productos biocidas, como el bromuro de metilo, debido a que la nueva gama de productos generados recientemente, no ha cumplido las expectativas de control de la enfermedad. Otras moléculas empleadas son el propiconazol, y las más usadas en la actualidad son el azoxystrobin y el metil tiofanato.

Por tanto sería de gran importancia para productores y asesores de cebolla realizar investigaciones en donde se proponga y evalúe la eficacia de mezclas de fungicidas de distintas familias químicas, que involucren distintos modos de acción, que ejerzan su efecto fungicida simultáneamente sobre *Sclerotium cepivorum* y ofrezcan un potencial mayor para controlar a *Sclerotium cepivorum* de manera excelente, y no solo probar mezclas de dos ingredientes activos, si no ir más allá, es decir mezclar 3 o 4 ingredientes activos diferentes. Es importante señalar que ya existen productos con tres ingredientes activos diferentes en el mercado y en desarrollo.

Lagunes (1994), indicó que las mezclas de plaguicidas se deben hacer cuando los componentes reúnan los requisitos siguientes: Diferentes modos de acción y diferentes rutas metabólicas, es decir, que tengan diferentes mecanismos metabólicos de resistencia.

Con base en lo anterior se realizó la presente investigación con el objetivo de evaluar la eficacia de mezclas de fungicidas de diferentes familias químicas para controlar a *Sclerotium cepivorum* Berk. agente causal de la pudrición blanca de la cebolla *In Vitro*.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Localización del sitio experimental

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

6.2.2. Origen del patógeno

Se utilizó un aislamiento de *Sclerotium cepivorum* obtenido a partir de plantas enfermas de una huerta comercial ubicada en el municipio de Cojumatlán de Regules, en el estado de Michoacán (Figura 31).

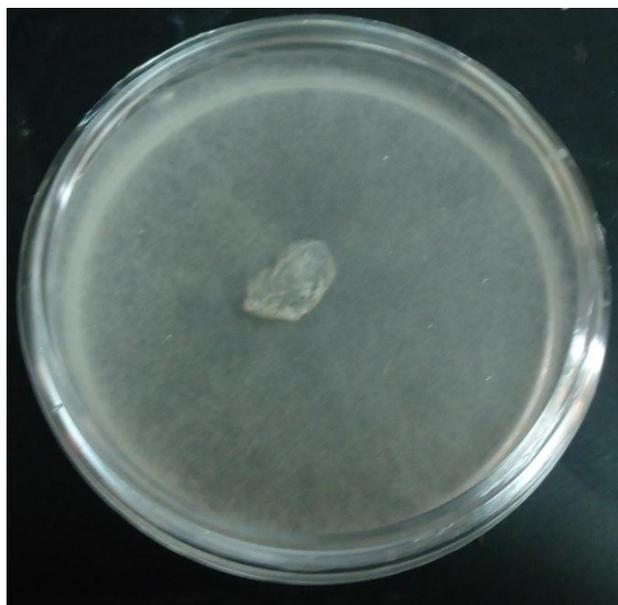


Figura 31. Cultivo puro de *Sclerotium cepivorum* 8 días después de la siembra.

6.2.3. Método de los discos de papel

El inóculo (micelio) de *Sclerotium cepivorum* se incrementó en 2 cajas Pétri con medio de cultivo PDA sólido. Bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar, se evaluaron dos dosis de cada mezcla de fungicidas (media y alta). Los

sensidiscos se realizaron de papel filtro marca Watman con un diámetro estándar de 0.5 cm los cuales se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 15 minutos (Alfonso y Sandoval, 2008).

Se colocó un disco (0.6 cm de diámetro) de micelio en activo crecimiento (colonia entre 7 y 14 días de edad) de *Sclerotium cepivorum* en el centro de la caja de Pétri de 9 cm de diámetro que contenía medio de cultivo PDA (Granados, 2004). El mismo día de la siembra se colocaron los sensidiscos (4 por caja), los cuales fueron sumergidos en una solución con la mezcla correspondiente a cada tratamiento por 5 minutos. Enseguida se incubaron se realizó por 7 días a una temperatura de 22 ± 3 °C, al séptimo día de incubación se observaron y se midió el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum*. Estas pruebas se realizaron por triplicado para cada tratamiento.

6.2.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar ($Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$) con tres repeticiones, un total de 14 tratamientos y 1 testigo. Cada tratamiento correspondió a una dosis diferente (media y alta) de las mezclas de productos fungicidas de diferentes grupos químicos.

6.2.5. Tratamientos

Los tratamientos para evaluar la efectividad biológica *In Vitro* de las mezclas de fungicidas químicos para el control de *Sclerotium cepivorum* Berk, agente causal de la pudrición blanca de la cebolla, *In Vitro* se indican en el cuadro 10.

Cuadro 10. Tratamientos evaluados para determinar la eficacia biológica *In Vitro* de las diferentes mezclas de fungicidas contra la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), agente causal de la pudrición blanca de la cebolla *In Vitro*.

Tratamientos		Dosis	
		ppm	mg de i.a. • L ⁺¹ de agua
1	Testigo inoculado		
2	Estrobirulina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Fenilpiridinilamida	1298.5	1400
3	Estrobirulina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Fenilpiridinilamida	2095	2250
4	Estrobirulina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1	973	975
5	Estrobirulina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1	1646	1350
6	Inimidazol + Triazol 3 + Estrobirulina 2	635.5	710
7	Inimidazol + Triazol 3 + Estrobirulina 2	965.7	1067.5
8	Anilinopirimidina + Triazol 3 + Estrobirulina 2	669.8	729.8
9	Anilinopirimidina + Triazol 3 + Estrobirulina 2	956	1036
10	Estrobirulina 3 + Benzimidazol 2 + Triazol 4	738	750
11	Estrobirulina 3 + Benzimidazol 2 + Triazol 4	1226	1250
12	Estrobirulina 3 + Pirimidina + Triazol 4	358	370
13	Estrobirulina 3 + Pirimidina + Triazol 4	656	680
14	Carboxamida	200	200
15	Carboxamida	300	300

6.2.6. Evaluación de las variables respuesta

Se evaluó el crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* para cada uno de los tratamientos a los 7 días después de haber iniciado el experimento.

6.2.7. Análisis de datos

Los datos de crecimiento radial micelial se sometieron a un análisis de varianza, en los casos donde hubo diferencias entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con el software SAS[®] para separar las medias de cada uno de los tratamientos.

Por otra parte, se determinó la eficacia de las mezclas de fungicidas como porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del micelio de *Sclerotium cepivorum* con respecto del testigo (López *et al.*, 2005); utilizando las medias de crecimiento micelial obtenidas a los 7 días después de haber iniciado el experimento, empleando la formula de Samaniego *et al.* (1989).

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde R_1 es el radio del crecimiento micelial del patógeno (testigo) y R_2 es el radio del crecimiento micelial del patógeno cuando se le realizó la aplicación de un tratamiento.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los datos de crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk, *In Vitro*, causante de la pudrición blanca de la cebolla, obtenidos a los 7 días después de haber sembrado el hongo en la caja de Pétri con medio de cultivo PDA y aplicado los tratamientos en la **evaluación 1 (08/03/12)**; se realizó un análisis de varianza, en donde se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Apéndice D; Apéndice 1). Dichas diferencias se verificaron al llevar a cabo un una comparación múltiple de medias de Tukey (0.05) Cuadro 11, en donde se observó que el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* fue menor y diferente estadísticamente en los tratamientos donde se aplicaron las mezclas de fungicidas, con respecto al testigo absoluto. Así mismo, se observó que los tratamientos 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 [Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 y 2095 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Inimidazol (635.5 y 965.7 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 y 956 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 y 1226 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 y 656 ppm) y carboxamida (300 ppm)], fueron los mejores tratamientos, ya que no permitieron el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum*, lo que significó en porcentajes de inhibición del crecimiento radial de 100 %, comparado con el testigo absoluto en donde *Sclerotium cepivorum* presentó un crecimiento micelial de 4.5 cm, lo que se tradujo en un control excelente de la enfermedad; lo antes mencionado se refleja gráficamente en las Figuras 32 y 33.

Cuadro 11. Comparación de medias de los datos de crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk y Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) en la evaluación 1 (08/03/12) para determinar la eficacia biológica de mezclas de fungicidas para el control del agente causal de la pudrición blanca en cebolla (*Sclerotium cepivorum*), *In Vitro*. 2012.

Tratamientos	Dosis	Crecimiento micelial (CM)	PICR
1 Testigo inoculado		4.5 A	-
2 Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida	(1298.5 ppm)	0 D	100
3 Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida	(2095 ppm)	0 D	100
4 Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1	(973 ppm)	1.1 B	75.5
5 Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1	(1646 ppm)	0.16 C	96.4
6 Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol	(635.5 ppm)	0 D	100
7 Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol	(965.7 ppm)	0 D	100
8 Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina	(669.8 ppm)	0 D	100
9 Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina	(956 ppm)	0 D	100
10 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2	(738 ppm)	0 D	100
11 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2	(1226 ppm)	0 D	100
12 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina	(358 ppm)	0 D	100
13 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina	(656 ppm)	0 D	100
14 Carboxamida	(200 ppm)	0 D	100
15 Carboxamida	(300 ppm)	0 D	100

PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial.

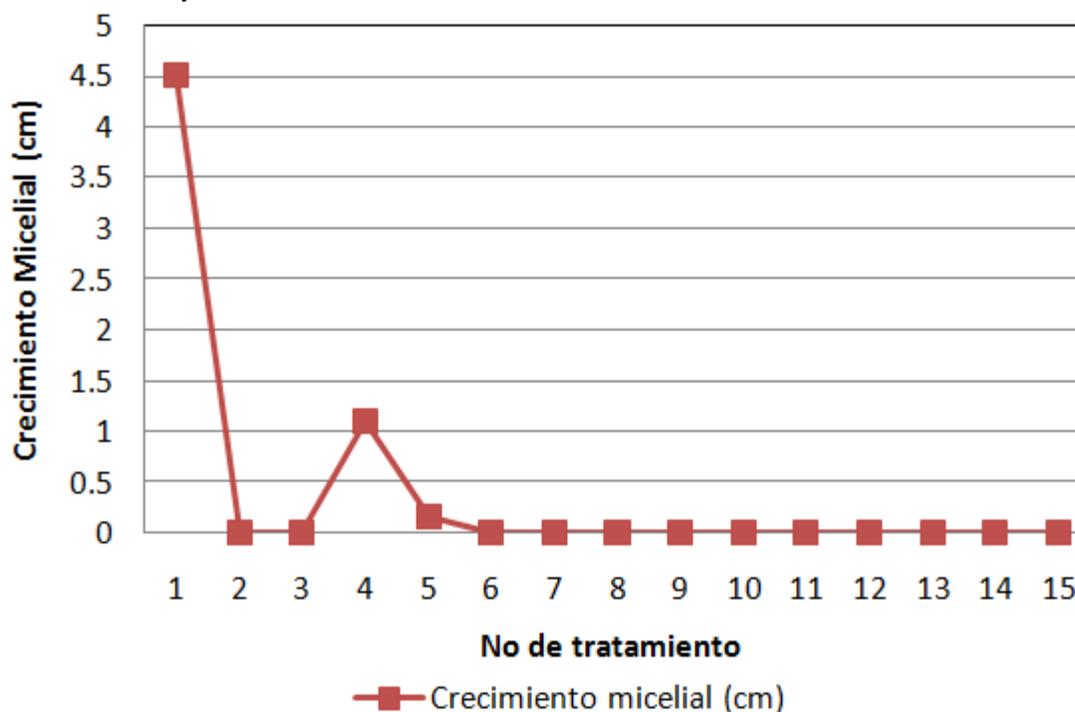


Figura 32. Crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación 1 (08/03/12) de la eficacia de las mezclas de fungicidas *In Vitro*. 2012.

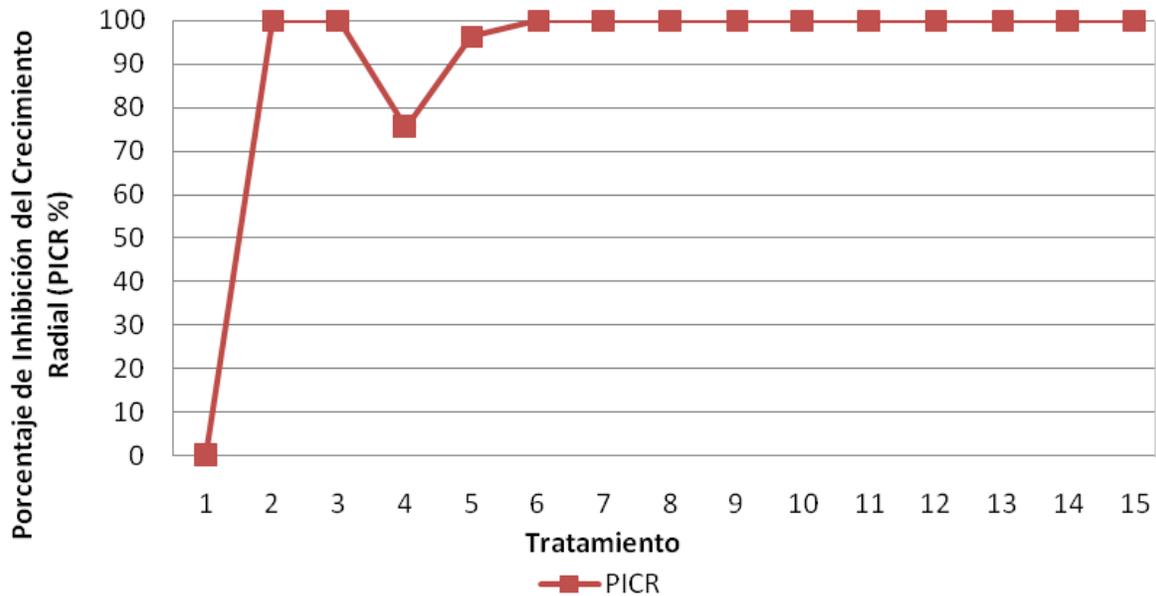


Figura 33. Porcentaje de inhibición (eficacia) del crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación 1 (08/03/12) en diferentes tratamientos a base de mezclas de fungicidas *In Vitro*. 2012.

El hecho de que los tratamientos 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 [Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 y 2095 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Inmidazol (635.5 y 965.7 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 y 956 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 y 1226 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 y 656 ppm) y carboxamida (300 ppm)] hayan mostrado un control excelente de *Sclerotium cepivorum In Vitro* se puede deber a que cada tratamiento a excepción del 14 y 15, estuvieron conformados por mezclas de fungicidas de distintas familias químicas, lo cual involucró a distintos modos de acción, que ejercieron su efecto fungicida simultáneamente sobre *Sclerotium cepivorum* y pudieron controlarlo de manera excelente.

En general, el excelente control de los tratamientos evaluados se debe a la mezcla de un fungicida de la familia de las Estrobilurinas, cuyo modo de acción es afectar la respiración mitocondrial en el complejo III (QoI-STAR), bloqueando el transporte de electrones entre el citocromo b y el citocromo c₁, previniendo así la formación

de ATP (Bayer, 2012)., y de un fungicida del grupo de los triazoles, cuyo modo de acción es la inhibición de la biosíntesis del ergosterol (demetilación del C14. Sitio 1) el cual es un componente de la membrana celular que se encarga de su integridad física, favorecer su crecimiento y división celular. Al inhibir la síntesis de este componente, los hongos detienen su desarrollo, se bloquea su esporulación y se evita su deseminación (HELM, 2012). Lo cual coincide con Delgadillo (1998), quien al estudiar el efecto de la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* con la aplicación de Tebuconazole (Folicur 250 EW), en ajo para controlar la pudrición blanca, observó redujo a 1.6 % la incidencia de la enfermedad, aumento el rendimiento 5,441 Kg.ha⁻¹ y disminuyó la densidad final de esclerocios después de la cosecha del ajo. Esta mezcla de un triazol + Estrobilurina fue la base en cada uno de los tratamientos, excepto los tratamientos 14 y 15.

La mezcla de un triazol + una estrobilurina fue la base en cada uno de los tratamientos, excepto los tratamientos 14 y 15. Esto concuerda con SYNGENTA (2012), quien menciona que la combinación de dos excelentes familias químicas, estrobilurinas y triazoles; permite controlar un amplio rango de enfermedades, teniendo actividad tanto sistémica como de contacto. Esta mezcla es ideal para el manejo de resistencia ya que combina dos compuestos de diferente clase química y diferente modo de acción. Lo anterior coincide con García (2008), quienes en trabajos distintos, encontraron que la mezcla de una estrobilurina y un triazol mostraron un control de bueno a excelente contra *Fusarium oxysporum* en céspedes de campos de Golf. La mezcla de las familias químicas antes mencionadas, fue reforzada con la adición de un fungicida de diferente familia química, lo cual incrementó la eficacia de los tratamientos.

Lo anterior coincide con Crafts (1961), quien dice que dos compuestos de diferente toxicidad, aplicados en forma de mezcla, pueden dar un efecto conocido como efecto aditivo, donde el efecto de la mezcla es igual a la suma de los efectos causados por los productos cuando se aplican por separado.

El hecho de que los tratamientos 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 [Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 y 2095 ppm),

Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Inimidazol (635.5 y 965.7 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 y 956 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 y 1226 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 y 656 ppm) y carboxamida (300 ppm)] hayan mostrado un control excelente de *Sclerotium cepivorum In Vitro*, también se debió a que los productos fungicidas no fueron expuestos a factores bióticos ni abióticos que pudieran haber ocasionado su degradación, como puede ocurrir en condiciones de campo. Esto concuerda con Coley-Smith (1990), citado por Granados (2005), quien menciona que en condiciones de campo se han probado infinidad de productos, pero ninguno ha dado resultados exitosos y que esto, en parte, es debido a la degradación de los fungicidas en el suelo, por acción de las poblaciones heterogéneas de microorganismos presentes en el.

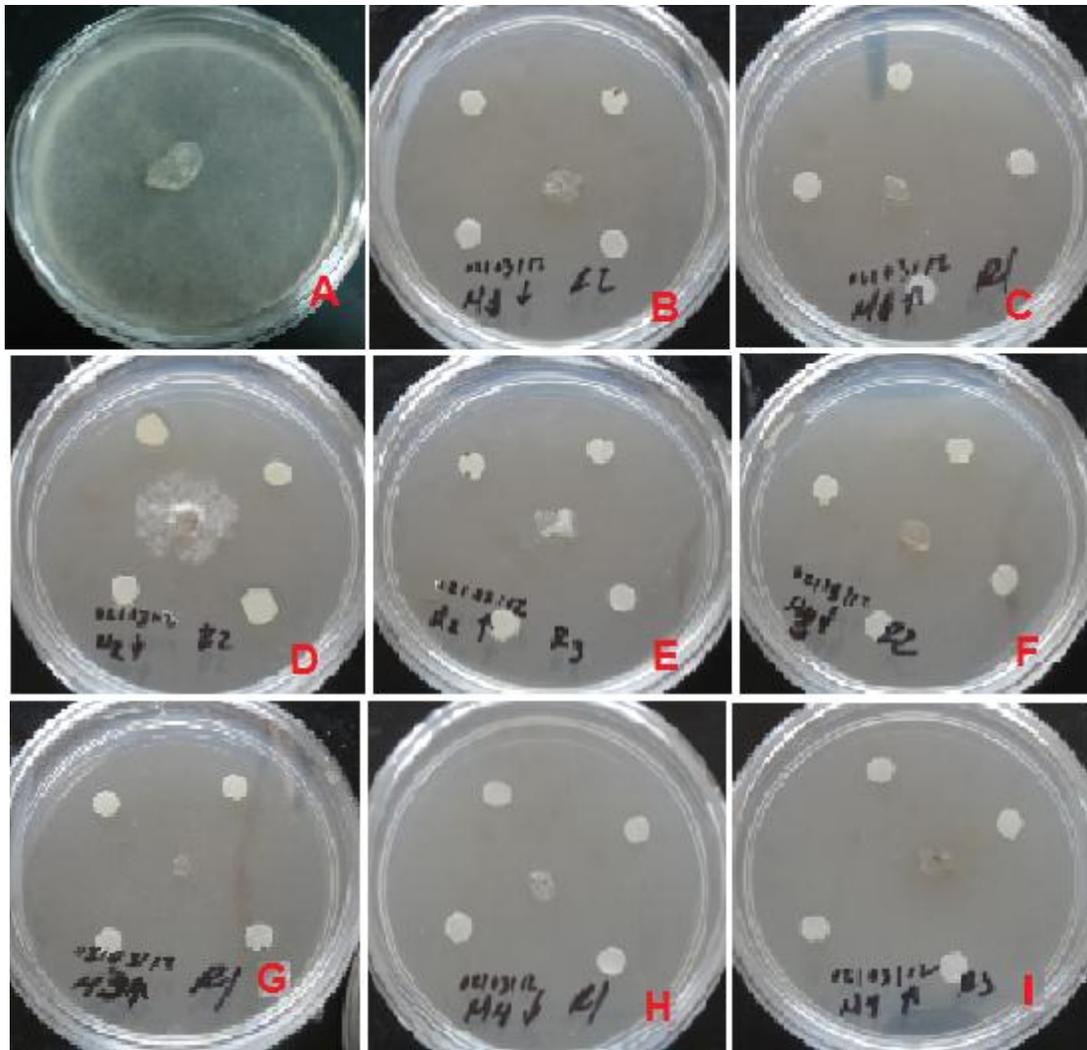


Figura 34 A. Crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk. después de haber sido tratado con: A) Testigo inoculado. B) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 ppm). C) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (2095 ppm). D) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (973 ppm). E) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm). F) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (635.5 ppm). G) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (965.7 ppm). H) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 ppm). I) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (956 ppm).

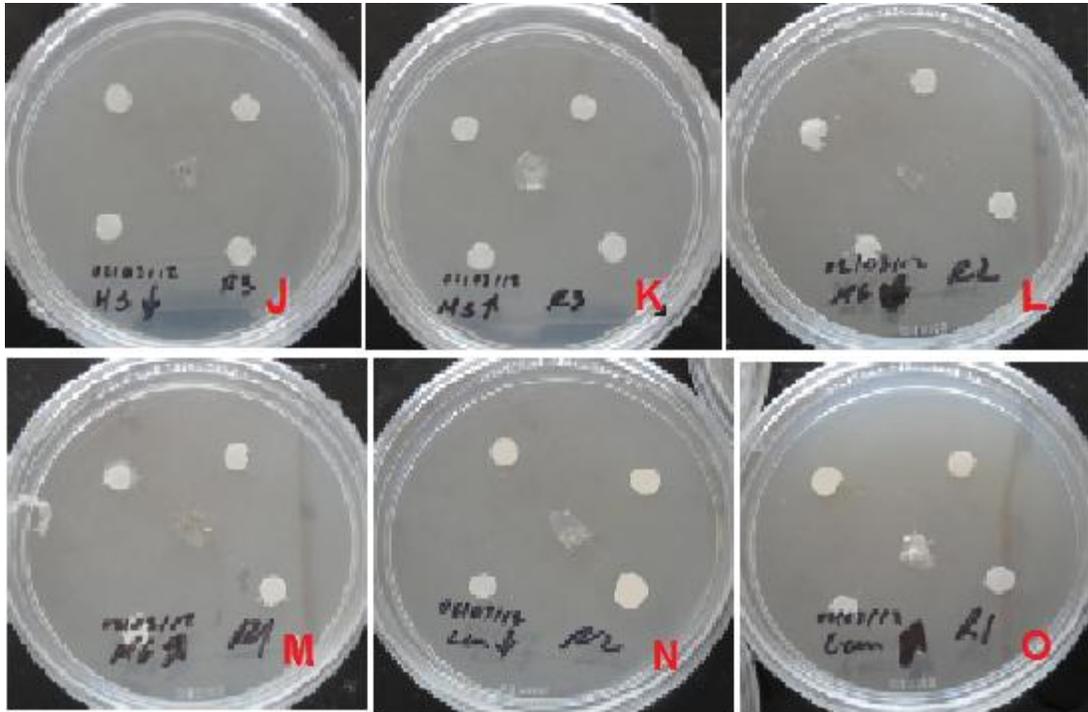


Figura 35 B. Crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk. después de haber sido tratado con: J) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738.5 ppm). K) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (1226 ppm). L) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 ppm). M) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm). N) Carboxamida (200 ppm). O) Carboxamida (300 ppm).

6.4. CONCLUSIONES

Fue posible crear una mezcla de fungicidas de diferentes familias químicas capaz de inhibir el crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* en un 100 % *In Vitro*.

Las mezclas Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 y 2095 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Imidazol (635.5 y 965.7 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 y 956 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 y 1226 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 y 656 ppm) y carboxamida (300 ppm), inhibieron por completo el crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum*, lo que significó en porcentajes de inhibición del crecimiento radial micelial de 100 %,

6.5. LITERATURA CITADA

- Bayer, 2012. www.bayer.com.mx. (Consultado en abril de 2010).
- Coley-Smith JR, Mitchel CM, Sansford EC, 1990. Long-term survival of *Sclerotinia* of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant pathology* 39, 58-69.
- Crowe, F. J.; HALL, D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74-78.
- Delgadillo S., F. 1998. Control Integrado de la Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en el Cultivo de Ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Doctorado, Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 86 p.
- García, A.C.de J. 2007. Reconsideración epidemiológica de estrategias para el manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-23 p.
- García, M., A. M. 2008. Determinación Morfológica, Molecular, Patogénica y Manejo de Enfermedades de Raíz y Cuello en Céspedes de Campos de Golf. Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 164 p.
- Granados M., M. 2005. Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 29 (2): 143-156. ISSN:0377-9424.
- Granados M., M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Centro de investigación en Protección de cultivos,

Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Agronomía Costarricense 105 p.

HELM. 2012. www.helm-méxico.com.mx. (Consultado en octubre de 2012).

Pérez, M. L.; Hernández, V. O.; Cantú, G. F.; Romero, R. A. 2000. Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo *Allium sativum* L. en la zona del Bajío, México. In XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. p. L67.

Ponce, H.V. 2006. Análisis temporal y espacial de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo, en condiciones del Bajío, México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-15 pp.

Syngenta. 2012. www.syngenta.com.mx. (Consultado en octubre de 2012).

CAPITULO VII. MANEJO QUÍMICO DE *Sclerotium cepivorum* Berk EN CEBOLLA EN INVERNADERO

7.1. INTRODUCCIÓN

La cebolla es una de las hortalizas de exportación más importantes para México; la producción de esta hortaliza ubica al país en el décimo tercer lugar mundial con 1.2 millones de toneladas, atrás de China y con casi dos veces lo que obtienen Argentina y Perú (650 mil toneladas). En relación con la cebolla, se observa un ritmo de crecimiento anual de 1.3 millones de toneladas; destacan Chihuahua (16%), Baja California (16%) y Tamaulipas (11%). Las exportaciones de cebolla a Estados Unidos también se duplicaron (de 112 mil a 205 mil toneladas de 2003 y 2011), mientras las ventas a Guatemala se triplicaron (de siete mil a 22 mil toneladas en el mismo periodo). (SIAP, 2012).

La cebolla como cualquier otra planta está expuesta al ataque de plagas y enfermedades, las cuales son una fuerte limitante en la producción. De acuerdo con Toledo (1998), la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berkeley) se encuentra dentro de las principales enfermedades que afectan a este cultivo.

La pudrición blanca de la cebolla provoca pérdidas de hasta el 100 % y obliga a los productores a abandonar la tierra por falta de estrategias de manejo adecuadas. Se han reportado niveles de inóculo muy disímiles como 1.5 a 9000 esclerocios•Kg⁻¹ (Ponce, 2006).

Este hongo se caracteriza por producir esclerocios que permanecen viables en suelo hasta por 20 años en ausencia del hospedante. Aunque se han utilizado diferentes tácticas para reducir la incidencia de esclerocios en el suelo, los que logran permanecer son suficiente para ocasionar una incidencia similar a donde no se aplica control sobre los esclerocios, ya que solo es necesario 0.1 esclerocios por gramo de suelo para ocasionar una incidencia del 100 % (Reyes, 2000).

El manejo de enfermedades de plantas ocasionadas por patógenos habitantes del suelo son verdaderos retos en la agricultura mundial que por su complejidad

requieren un trato más cuidadoso que en el caso de los patógenos de la aerobiota. El control de *Sclerotium cepivorum* es complicado debido a su alta capacidad de reproducción, elevada densidad de inóculo en suelos infestados y su gran longevidad (Delgadillo, 1998).

La forma más común de control de *Sclerotium cepivorum* ha sido el uso de fungicidas, destacando procymidone, fluazinam y tebuconazole, cuya eficacia depende de la densidad y distribución del inóculo en el suelo y de la oportunidad, forma y frecuencia de aplicaciones. En México uno de los productos que a nivel experimental ha tenido alta efectividad en el control de la pudrición blanca es el tebuconazole (Folicur 250 EW) (Delgadillo, 1998). Así mismo Ortiz (1985), mencionado por García (2007), explicaron las dificultades inherentes al control de *Sclerotium cepivorum* y demuestra que la aplicación de Vinclozolin (Ronilan®) y PCNB, aunque estadísticamente son superiores a otros tratamientos, serían inaceptables por la baja producción. Pérez *et al* (2000), explicaron que el control de *Sclerotium cepivorum* ha sido difícil, los intentos de control empleando métodos químicos no han resultado del todo satisfactorios y tienen un elevado costo económico y ecológico. Sin embargo, aun se sigue recurriendo al uso de productos biocidas, como el bromuro de metilo, debido a que la nueva gama de productos generados recientemente, no ha cumplido las expectativas de control de la enfermedad. Otras moléculas empleadas son el propiconazol, y las más usadas en la actualidad son el azoxystrobin y el metil tiofanato.

Por tanto sería de gran importancia para productores y asesores de cebolla realizar investigaciones en donde se proponga y evalúe la eficacia de mezclas de fungicidas de distintas familias químicas, que involucren distintos modos de acción, que ejerzan su efecto fungicida simultáneamente sobre *Sclerotium cepivorum* y ofrezcan un potencial mayor para controlar a *Sclerotium cepivorum* de manera excelente, y no solo probar mezclas de dos ingredientes activos, si no ir más allá, es decir mezclar 3 o 4 ingredientes activos diferentes. Es importante señalar que ya existen productos con tres ingredientes activos diferentes en el mercado y en desarrollo.

Lagunes (1994), indicó que las mezclas de plaguicidas se deben hacer cuando los componentes reúnan los requisitos siguientes: Diferentes modos de acción y diferentes rutas metabólicas, es decir, que tengan diferentes mecanismos metabólicos de resistencia.

Con base en lo anterior se realizó la presente investigación con el objetivo de evaluar la eficacia de mezclas de fungicidas de diferentes familias químicas para controlar a la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla en invernadero.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Localización del sitio experimental

La presente investigación se llevó a cabo en un invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada a 19° 29' y 98° 53' de latitud norte y longitud oeste, respectivamente; ubicado a una altitud de 2,250 msnm, temperatura media anual de 15 °C y precipitación de 644.8 mm, considerado como un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (García, 2008).

7.2.2. Origen del patógeno

Se utilizó un aislamiento de *Sclerotium cepivorum* obtenido a partir de plantas de cebolla enfermas con la pudrición blanca de una huerta comercial ubicada en el municipio de Cojumatlán de Regules, en el estado de Michoacán.

7.2.3. Preparación y cuantificación del inóculo

El hongo se sembró en 90 cajas Pétri con medio de cultivo PDA sólido. El micelio del hongo formó esclerocios en la periferia de la caja de Pétri a los 20 días (Figura

36); posteriormente se les dejó reposar por tres meses para después ser incorporados al suelo esterilizado con vapor que se utilizó para el experimento. La densidad de inóculo utilizada fue de $0.1 \text{ esclerocios} \cdot \text{g}^{-1}$ de suelo, la cual es capaz de causar 100 % de incidencia (Crowe *et. al.*, 1980).

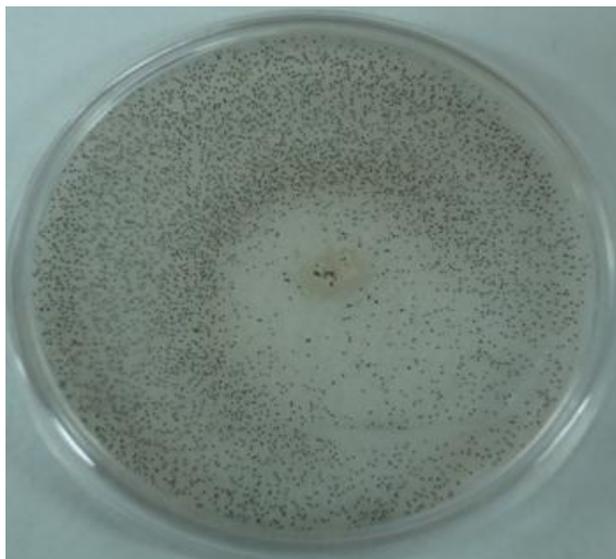


Figura 36. Incremento del inóculo de *Sclerotium cepivorum*.

7.2.4. Reaislamiento y comparación del hongo inoculado

De las plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) que indujeron síntomas de pudrición blanca, se procedió a realizar reaislamientos. Para lo anterior se tomó una muestra de las plantas afectadas, se cortaron en trozos de 0.5 cm de diámetro, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por 1.5 min, enseguida se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, se secaron con papel sanita esterilizado y finalmente se colocaron 5 trozos en cada caja Pétri con medio de cultivo PDA. El material fue incubado a temperatura ambiente de laboratorio (24 °C) bajo oscuridad total. A los 20 días se compararon sus características morfológicas con las del hongo inoculado (García, 2008).

7.2.5. Aplicación de los tratamientos

Se llevaron a cabo 4 aplicaciones de las diferentes mezclas de fungicidas como se indica a continuación **1)**. Al momento del trasplante (**10/11/11**), **2)**. 30 días después de la primera aplicación (**10/12/11**), **3)**. 30 días después de la segunda aplicación (**9/01/12**) y **4)**. 30 días después de la tercera aplicación (**08/02/12**). La aplicación de los fungicidas se realizó en “Drench”, con una aspersora manual de 5 L marca Pacto. Se utilizó un volumen de agua de 5.28 mL/planta, 158.4 mL/tratamiento; dando un total de 1500 L/ha.

7.2.6. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar ($Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$) con tres repeticiones, un total de 14 tratamientos y 1 testigo. Cada tratamiento correspondió a una dosis diferente (media y alta) de las mezclas de productos fungicidas de diferentes grupos químicos.

La unidad experimental quedó constituida por 10 plantas, teniéndose tres repeticiones por tratamiento, dando un total de 30 plantas (Figura 9), las cuales fueron trasplantadas en macetas de 2 L que contenían suelo con el inóculo de *Sclerotium cepivorum*, el cual se aplicó 5 días antes del trasplante. Todos los tratamientos (incluyendo el testigo) se regaron a diario y se mantuvieron en invernadero a una temperatura de 15-23 °C y a 80-85 % de H.R. con ayuda de nebulizadores. La fertilización se aplicó a través del sistema de riego, utilizando la fórmula de Steiner.

7.2.7. Tratamientos

Los tratamientos para evaluar la efectividad biológica de las mezclas de fungicidas químicos para el control de *Sclerotium cepivorum* en cebolla, corresponden a la dosis media y alta, sus nombres y dosis se indican en el cuadro 9.

Cuadro 12. Tratamientos evaluados para determinar la efectividad biológica de las diferentes mezclas de fungicidas en plantas de cebolla Var. Suprema contra la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) con 0.1 microesclerocios•g⁻¹ de suelo en invernadero. 2012.

Tratamientos		Dosis	
		ppm	mg de i.a. • L ⁻¹ de agua
1	Testigo inoculado		
2	Estrobirulina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Fenilpiridinilamida	1298.5	1400
3	Estrobirulina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Fenilpiridinilamida	2095	2250
4	Estrobirulina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1	973	975
5	Estrobirulina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1	1646	1350
6	Inmidazol + Triazol 3 + Estrobirulina 2	635.5	710
7	Inmidazol + Triazol 3 + Estrobirulina 2	965.7	1067.5
8	Anilinopirimidina + Triazol 3 + Estrobirulina 2	669.8	729.8
9	Anilinopirimidina + Triazol 3 + Estrobirulina 2	956	1036
10	Estrobirulina 3 + Benzimidazol 2 + Triazol 4	738	750
11	Estrobirulina 3 + Benzimidazol 2 + Triazol 4	1226	1250
12	Estrobirulina 3 + Pirimidina + Triazol 4	358	370
13	Estrobirulina 3 + Pirimidina + Triazol 4	656	680
14	Carboxamida	200	200
15	Carboxamida	300	300



Figura 37. Parcela experimental de cebolla de la variedad Suprema inoculadas con el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk con 0.1 microesclerocios•g⁻¹ de suelo en invernadero. 2012.

7.2.8. Parámetro de medición de la efectividad biológica

Se evaluó la incidencia de la pudrición blanca ocasionada por el hongo *Sclerotium cepivorum* (No. de plantas que muestren el síntoma típico de la enfermedad con respecto al No. total de plantas muestreadas) en las 10 plantas de cebolla de cada repetición.

Nota: Solamente se determinara la incidencia debido a que la pudrición blanca, de la cebolla (*Sclerotium cepivorum*) es una enfermedad sistémica y las plantas que presenten síntomas (daño bajo o medio) finalmente morirán, por eso se justifica solo evaluar la incidencia.

7.2.9. Método de evaluación

Se considerará el número de plantas que muestren síntomas típicos de la enfermedad (marchitez y/o muerte) con respecto al número total de plantas muestreadas, y se expresarán en porcentaje.

7.2.10. Tipo y frecuencia del muestreo

Se efectuaron 6 evaluaciones a los 20, 40, 60, 80, 100 y 120 DDAT días después de la primera aplicación de los fungicidas para determinar el porcentaje de control de la enfermedad.

7.2.11. Análisis de datos

Los porcentajes de incidencia se sometieron a un análisis de varianza, en los casos donde hubo diferencias entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con el software SAS® para separar las medias de infección de cada uno de los tratamientos.

Por otra parte, la eficacia biológica de los tratamientos se obtuvo con la fórmula Abbott (1925):

$$\% \text{ Ef} = \frac{Cd - Td}{Cd} \times 100$$

Donde:

% Ef= Eficacia biológica.

Cd=Incidencia en la parcela testigo después de la aplicación.

Td= Incidencia en la parcela tratada después de la aplicación.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Evaluación de la incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en cebolla y eficacia de los tratamientos en invernadero

Se llevaron a cabo varios análisis de varianza con los datos de porcentaje de incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en cebolla, en invernadero, obtenidos en la evaluación 1 (30/11/11), evaluación 2 (20/12/11), evaluación 3 (9/01/12), evaluación 4 (29/01/12), evaluación 5 (18/02/11) y evaluación 6 (9/03/12), en donde se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Apéndice E; Apéndice 1-6). Las diferencias se corroboraron al llevar a cabo una comparación de medias de Tukey (0.05) (Cuadro 13), en donde se observó que la incidencia de *Sclerotium cepivorum* Berk fue menor y diferente estadísticamente en los tratamientos donde se aplicaron las mezclas de fungicidas, con respecto al testigo, el cual presentó un porcentaje de incidencia de 93.3 % en la última evaluación (120 DDAT) (Cuadro 14). Así mismo se observó que los tratamientos 6, 7 y 9 [Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Inmidazol (635.5 ppm), Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Inmidazol (965.7 ppm) y Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilino pirimidina (956 ppm)], fueron los mejores en el control de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), ya que mostraron incidencias de 0 % y eficacias de control de 100 %. Posteriormente, los tratamientos 3, 5, 13 y 15 [Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamidas (2095 ppm), Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm) y Carboxamida], fueron estadísticamente el segundo grupo que mejor controló la enfermedad, ya que permitieron un porcentaje de incidencia bajo y fue de 3.3, 10.0, 6.66 y 10.0 % respectivamente, traducándose en eficacias de 96.4, 89.2, 92.8 y 89.2 % respectivamente, 120 días después del trasplante y/o después de 4 aplicaciones (Figura 38).

Cuadro 13. Comparación de medias de los datos de incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en las evaluaciones 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12) en cebolla inoculadas y tratadas con diferentes mezclas de fungicidas en invernadero. 2011-2012.

Tratamientos	Eval.1	Eval.2	Eval.3	Eval.4	Eval.5	Eval.6
	(20 DDAT)	(40 DDAT)	(60 DDAT)	(80 DDAT)	(100 DDAT)	(120 DDAT)
1 Testigo inoculado	0 A	13.3 A	26.6 A	56.6 A	93.3 A	93.3 A
2 Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridina (1298.5 ppm)	0 A	0 B	0 B	16.6 B	36.6 B	36.6 B
3 Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridina (2095 ppm)	0 A	0 B	0 B	0 B	3.3 CD	3.3 CD
4 Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (973 ppm)	0 A	0 B	0 B	3.3 B	13.3 BCD	13.3 BCD
5 Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm)	0 A	0 B	0 B	3.3 B	10.0 CD	10.0 CD
6 Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (635.5 ppm)	0 A	0 B	0 B	0 B	0.0 D	0.0 D
7 Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (965.7 ppm)	0 A	0 B	0 B	0 B	0.0 D	0.0 D
8 Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 ppm)	0 A	0 B	0 B	3.3 B	13.3 BCD	13.3 BCD
9 Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (956 ppm)	0 A	0 B	0 B	0 B	0.0 D	0.0 D
10 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 ppm)	0 A	0 B	0 B	6.6 B	26.6 BC	26.6 BC
11 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (1226 ppm)	0 A	0 B	0 B	3.3 B	16.6 BCD	16.6 BCD
12 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 ppm)	0 A	0 B	0 B	0 B	13.3 BCD	13.3 BCD
13 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm)	0 A	0 B	0 B	0 B	0.0 D	6.6 CD
14 Carboxamida	0 A	0 B	0 B	3.3 B	23.3 BCD	23.3 BCD
15 Carboxamida	0 A	0 B	0 B	0 B	10.0 CD	10.0 CD

Cuadro 14. Eficacia biológica de mezclas de fungicidas para el control de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en las evaluaciones 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12), en cebolla Var. Suprema, en invernadero. 2011-2012.

Tratamientos	Eval.1	Eval.2	Eval.3	Eval.4	Eval.5	Eval.6
	(20 DDAT)	(40 DDAT)	(60 DDAT)	(80 DDAT)	(100 DDAT)	(120 DDAT)
1 Testigo inoculado	-	-	-	-	-	-
2 Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridina (1298.5 ppm)	0	100	100	70.5	60.7	60.7
3 Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridina (2095 ppm)	0	100	100	100	96.4	96.4
4 Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (973 ppm)	0	100	100	94.1	85.7	85.7
5 Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm)	0	100	100	94.1	89.2	89.2
6 Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (635.5 ppm)	0	100	100	100	100	100
7 Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inmidazol (965.7 ppm)	0	100	100	100	100	100
8 Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (669.8 ppm)	0	100	100	94.1	85.7	85.7
9 Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (956 ppm)	0	100	100	100	100	100
10 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 ppm)	0	100	100	88.2	71.4	71.4
11 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (1226 ppm)	0	100	100	94.1	82.1	82.1
12 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 ppm)	0	100	100	100	85.7	85.7
13 Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm)	0	100	100	100	100	92.8
14 Carboxamida	0	100	100	94.1	75.0	75.0
15 Carboxamida	0	100	100	100	89.2	89.2

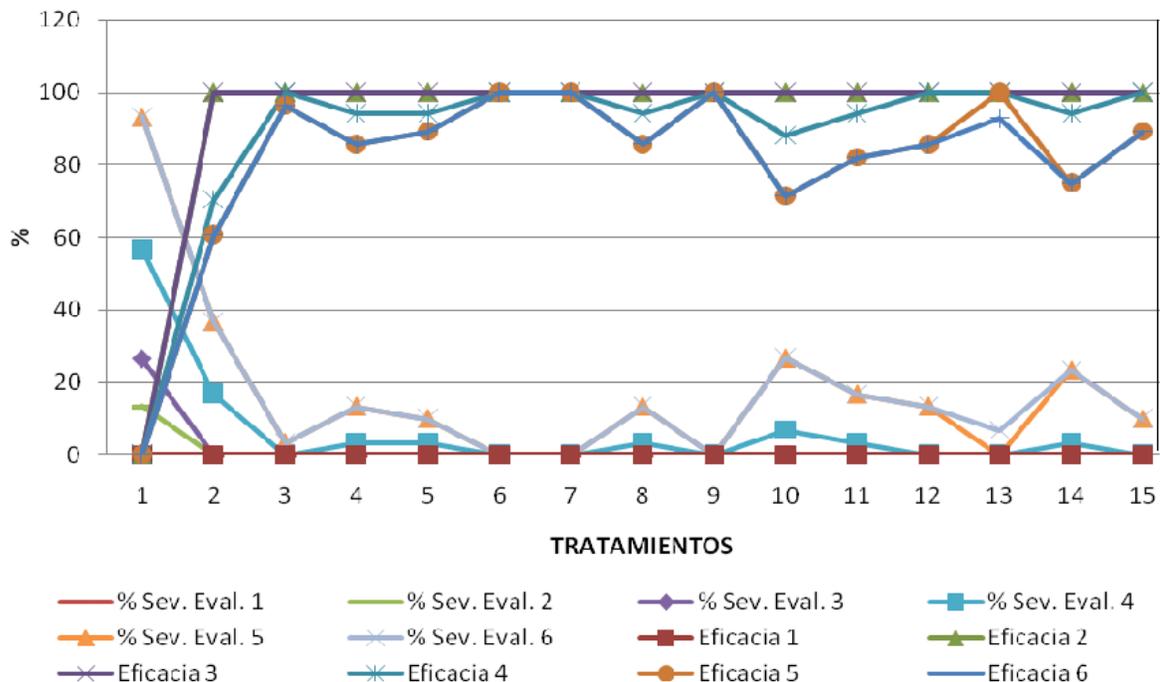


Figura 38. Porcentaje de incidencia y eficacia biológica de las mezclas de fungicidas para el control de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en las evaluaciones: 1 (30/11/11), 2 (20/12/11), 3 (9/01/12), 4 (29/01/12), 5 (18/02/11) y 6 (9/03/12), en cebolla Var. Suprema, en invernadero. 2011-2012.

El hecho de que la mezcla 6 y 7 [Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Imidazol (635.5 y 965.7 ppm)], así como la mezcla 9 [Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilino pirimidina (956 ppm)] hayan mostrado un control excelente de la enfermedad, se puede deber a que estas mezclas incluyen fungicidas de distintas familias químicas que poseen diferentes modos de acción ya que las Estrobilurinas tienen acción curativa y erradicativa, la cual está dada por la inhibición del proceso germinativo de la espora y del crecimiento del micelio una vez establecida la enfermedad, ya esta familia de fungicidas que afecta la respiración mitocondrial en el complejo III (QoI-STAR), bloqueando el transporte de electrones entre el citocromo b y el citocromo c₁, previniendo así la formación de ATP (Bayer, 2012).

Aunado a esto, se encuentra el hecho de la presencia de un triazol, cuyo mecanismo de acción actúa en el metabolismo de los hongos, inhibiendo la biosíntesis del ergosterol (demetilación del C14. Sitio 1) el cual es un componente de la membrana celular que se encarga de su integridad física, favorecer su

crecimiento y división celular. Si la síntesis de este componente es inhibida los hongos detienen su desarrollo, se bloquea su esporulación y se evita su deseminación (HELM, 2012).

Adicionalmente el triazol 3 a diferencia de otros fungicidas triazoles dispone de un mecanismo de acción suplementario dentro de la biosíntesis del ergosterol (reacomodo de las dobles ligaduras. Sitio 2), por esta razón su nivel de riesgo de resistencia es menor (HELM, 2012). Lo cual coincide con Delgadillo (1998), quien al estudiar el efecto de la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* en con la aplicación de Tebuconazole (Folicur 250 EW), para controlar la pudrición blanca en el cultivo de ajo, observó que el Tebuconazole redujo a 1.6 % la incidencia de la enfermedad, aumento el rendimiento 5,441 Kg.ha⁻¹ y disminuyó la densidad final de microesclerocios después de la cosecha del ajo. Así mismo Fullerton (1995), mencionado por Ponce (2006), encontraron que la aplicación al suelo de Tebuconazole antes de sembrar provee altos niveles de control durante la temporada, en Costa Rica, Bonilla (1993) citado por Granados (2004), probó con éxito el cyproconazol (Alto), por lo que se llevó a cabo su registro e inscripción y es en la actualidad el producto que se utiliza con mayor frecuencia. En cuanto al grupo de los Inmidazoles, estos actúan inhibiendo la formación de las membranas celulares del hongo, en la medida que inhibe la biosíntesis del ergosterol (Bayer, 2012). Y al grupo de las Anilinopirimidinas poseen un nuevo modo de acción, que impide la secreción de enzimas del hongo, y bloquea la asimilación de nutrientes, deteniendo por lo tanto, el tubo germinativo y el crecimiento celular, siendo destruida la célula. La inhibición de la actividad enzimática ha sido puesta en evidencia sobre poligalactosas, celulasas y proteinasas (Soto, 2003).

Así mismo , los tratamientos 3 y 5 [Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (2095 ppm) y Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm)], que estadísticamente se encontraron dentro del segundo grupo de tratamientos que mejor controló la enfermedad, se debió a que estas mezclas además de contener una Estrobilurina y un triazol, contenían un fungicida del grupo de los Benzimidazoles, cuyo modo de acción es a traves de la formación de

un complejo carbendazima, con la tubulina, que es una proteína estructural de los microtubulos que forman las fibras del huso mitótico. En consecuencia, este producto bloquea la mitosis, pero unicamente muestra afinidad por la tubulina de organismops fungosos (Soto, 2003). Sin embargo el tratamiento 3 fue reforzado con un fungicida del grupo de las Piridinamidas, cuyo modo de acción es protector, residual y algo sistémico. Evita la germinación de esporas, la penetración de las hifas, el crecimiento y esporulación al desactivar la fosforilación oxidativa mitocondrial (Orozco, 2008).

El buen control encontrado en los tratamientos 13 y 15 [Estrobilurina 3 + Pirimidina + Triazol 4 (656 ppm) y Carboxamida], pertenecientes al segundo grupo de tratamientos que mejor controló la enfermedad se debió a que el tratamiento 13, además de contener fungicidas del grupo de las Estrobilurina s y triazoles, se reforzó con un fungicida del grupo de las Pirimidinas cuyo modo de acción es inhibir la síntesis del Ergosterol, provocando la acumulación de moléculas precursoras del Ergosterol dentro del citoplasma causando envenenamiento celular (GOWAN, 2011).

Al respecto Stewart & Fullerton (1991); Corbaz (1994); Davis, (1994), Citado por Delgadillo (1998), mencionaro que los fungicidas de los grupos triazoles y Piridinamida, han mostrado buenos resultados en el control de la pudrición blanca.

El hecho de que no todos los tratamientos no hayan tenido resultados exitosos se debe en parte a la degradación de los fungicidas en el suelo por acción de las poblaciones heterogeneas de microorganismos presentes en el. De acuerdo con Coley-Smith (1990) citado por Granados (2005), existen productos que son mas resistentes a la degradación microbiana. Lo anterior coincide con Anónimo (2012), quien menciona que la degradación en suelos que contienen plantas es muy diferente a la que se produce en aquellas que no las contienen, las exudaciones que producen y los restos de raíces muertas proporcionan energía y nutrientes capaces de sostener una intensa actividad bacteriana provocando una rápida mineralización de los plaguicidas en esta zona de raíces, que además es la zona más aireada del suelo.

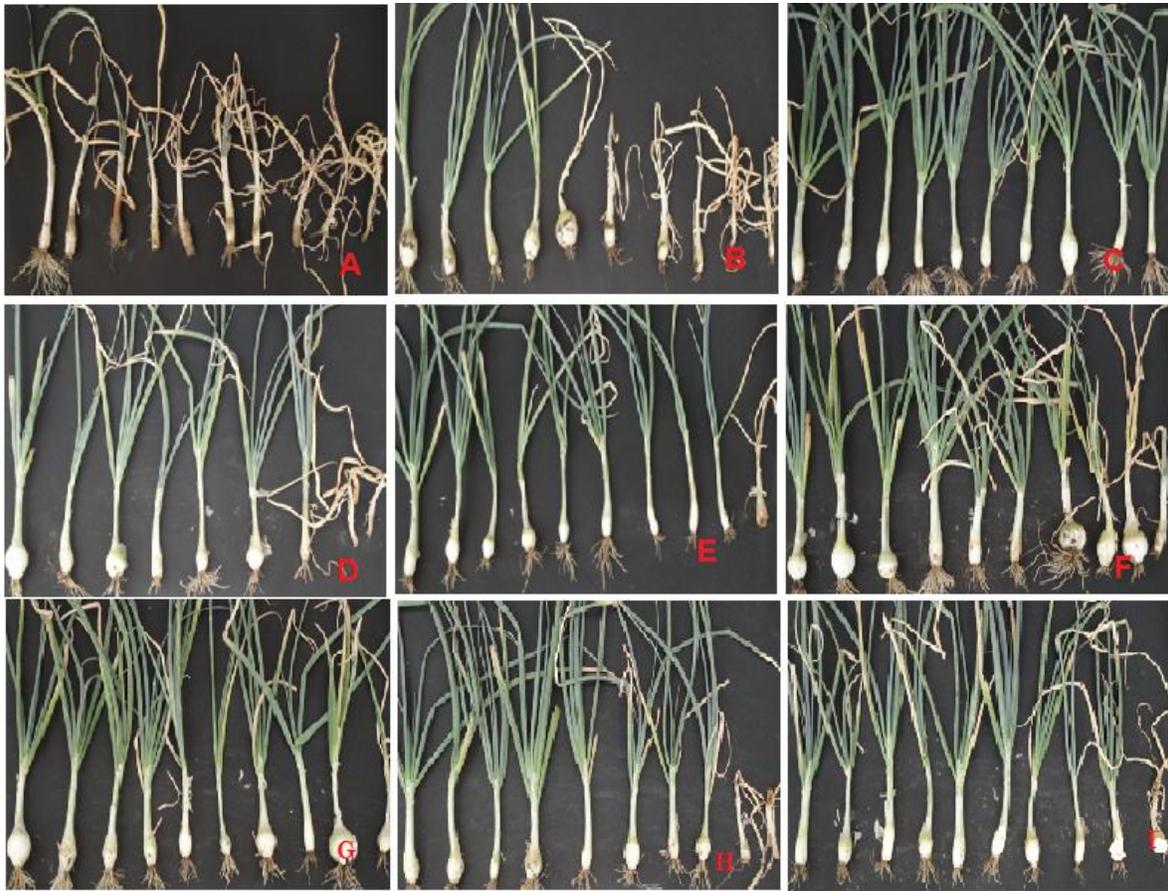


Figura 39 A. Daño mostrado por *Sclerotium cepivorum* en la evaluación 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012, tratadas con: A) Testigo inoculado. B) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (1298.5 ppm). C) Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamida (2095 ppm). D) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (973 ppm). E) Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm). F) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inimidazol (635.5 ppm). G) Estrobilurina 2+ Triazol 3 + Inimidazol (965.7 ppm). H) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilino pirimidina (669.8 ppm). I) Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilino pirimidina (956 ppm).



Figura 39 B. Daño mostrado por *Sclerotium cepivorum* en la evaluación 6 (09/03/12), en cebolla, en invernadero. 2011-2012, tratadas con: J) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (738 ppm). K) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Benzimidazol 2 (1226 ppm). L) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (358 ppm). M) Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm). N) Carboxamida. O) Carboxamida.

7.4. CONCLUSIONES

Es posible crear una mezcla de fungicidas de diferentes familias químicas que sea capaz de permitir una incidencia de 0 % de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), obteniendo así eficacias de 100 %.

La dosis baja y alta de Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Inmidazol (635.5 y 965.7 ppm), y la dosis alta de Estrobilurina 2 + Triazol 3 + Anilinopirimidina (956 ppm) permitieron una incidencia de 0 % inducidas por *Sclerotium cepivorum* Berk en invernadero, lo que se tradujo en eficacias de 100 %.

Las dosis altas de Estrobilurina 1 + Triazol 1 + Benzimidazol 1 + Piridinamidas (2095 ppm), Estrobilurina 1 + Triazol 2 + Benzimidazol 1 (1646 ppm), Estrobilurina 3 + Triazol 4 + Pirimidina (656 ppm) y Carboxamida, permitieron incidencias de 3.3 a 10.0 % inducidas por *Sclerotium cepivorum* Berk en invernadero, lo que se tradujo en eficacias de control de 89.2 a 96.4 %.

7.5. LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2012. Disponible en: http://aguas.igme.es/igme/publica/libro28/pdf/lib28/3_degra.pdf
- Bayer, 2012. www.bayer.com.mx. (Consultado en abril de 2010).
- Coley-Smith JR, Mitchel CM, Sansford EC, 1990. Long-term survival of *Sclerotinia* of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant pathology* 39, 58-69.
- Crowe, F. J.; Hall, D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74-78.
- Delgadillo S., F. 1998. Control Integrado de la Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en el Cultivo de Ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Doctorado, Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 86 p.
- García, A.C.de J. 2007. Reconsideración epidemiológica de estrategias para el manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-23 p.
- García, M., A. M. 2008. Determinación Morfológica, Molecular, Patogénica y Manejo de Enfermedades de Raíz y Cuello en Céspedes de Campos de Golf. Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 164 p.
- GOWAN MEXICANA. 2011. www.gowanmexicana.com. (Consultado en octubre de 2012).
- Granados M., M. 2005. Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 29 (2): 143-156. ISSN:0377-9424.

Granados M., M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Centro de investigación en Protección de cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Agronomía Costarricense 105 p.

HELM. 2012. www.helm-méxico.com.mx. (Consultado en octubre de 2012).

Orozco S., M. 2008. MODOS DE ACCIÓN DE FUNGICIDAS. INIFAP. Mazatlán, Sinaloa, México. (Disponible en: [http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/extranet/\\$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/extranet/$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf)).

Pérez, M. L.; Hernández, V. O.; Cantú, G. F.; Romero, R. A. 2000. Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo *Allium sativum* L. en la zona del Bajío, México. In XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. p. L67.

Ponce, H.V. 2006. Análisis temporal y espacial de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo, en condiciones del Bajío, México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 1-15 pp.

Reyes, P.N. 2000. Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk. Y su relación con ARN de cadena doble. Maestría. Depto. De Parasitología Agrícola. UACH. Chapingo, México. 1-8 pp.

SIAP-SAGARPA. 2012. Producción agrícola anual por cultivo, superficie y producción. <http://www.sagarpa.gob.mx/siap/estadísticas.htm>. (Consultado octubre, 2012).

Syngenta. 2012. www.syngenta.com.mx. (Consultado en octubre de 2012).

Toledo, B.A. 1998. La cebolla cultivada en fertirrigación. Tesis profesional. Depto. De Parasitología agrícola. UACH. Chapingo, México. 1-41 pp.

APÉNDICE

APENDICE A. Salidas del análisis de varianza del Crecimiento Radial Micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la prueba de antagonismo *In Vitro* por bioantagonistas.

Apéndice 1. Análisis de varianza de la variable crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación: 1 (26/01/12), para determinar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca en cebolla, *In Vitro*. 2012.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	5	20.71	4.14	89.34	<0.0001
Error	18	0.83	0.04		
Total	23	21.55			
C.V.	13.5				

Apéndice 2. Análisis de varianza de la variable crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación: 2 (28/01/12), para determinar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca en cebolla, *In Vitro*. 2012.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	5	64.46	12.89	195.54	<0.0001
Error	18	1.18	0.06		
Total	23	65.65			
C.V.	11.08				

Apéndice 3. Análisis de varianza de la variable crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación: 3 (30/01/12), para determinar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca en cebolla, *In Vitro*. 2012.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	5	166.88	33.37	426.95	<0.0001
Error	18	1.40	0.07		
Total	23	168.29			
C.V.	8.54				

Apéndice 4. Análisis de varianza de la variable crecimiento radial micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk en la evaluación: 4 (01/02/12), para determinar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial debido a *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp. 2 y *Pseudomonas* sp. para el control de la pudrición blanca en cebolla, *In Vitro*. 2012.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	5	166.88	33.37	426.95	<0.0001
Error	18	1.40	0.07		
Total	23	168.29			
C.V.	8.54				

APENDICE B. Salidas del análisis de varianza del porcentaje de incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en invernadero.

Apéndice 1. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 1 (30/11/11) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	6	0	0	.	.
Error	14	0	0		
Total	20	0			
C.V.	.				

Apéndice 2. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	6	495.23	82.53	2.17	0.1095
Error	14	533.33	38.09		
Total	20	1028.57			
C.V.	86.4				

Apéndice 3. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	6	895.23	149.2	2.61	0.0652
Error	14	800.0	57.14		
Total	20	1695.23			
C.V.	54.73				

Apéndice 4. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	6	4457.14	742.85	12.0	<0.0001
Error	14	866.66	61.90		
Total	20	5323.80			
C.V.	31.17				

Apéndice 5. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	6	11657.14	1942.85	45.33	<0.0001
Error	14	600.0	42.85		
Total	20	12257.14			
C.V.	16.97				

Apéndice 6. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de los bioantagonistas en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	6	11657.14	1942.85	45.33	<0.0001
Error	14	600.0	42.85		
Total	20	12257.14			
C.V.	16.97				

APENDICE C. Salidas del análisis de varianza del porcentaje de germinación de los microesclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk, para la determinación de la efectividad biológica del tratamiento físico: calor húmedo y calor seco en el control de la pudrición blanca, *In Vitro*.

Apéndice 1. Análisis de varianza de la variable porcentaje de germinación de los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk, después de haber sido expuestos a pruebas de calor (húmedo o seco) a diferentes temperaturas, para la fecha de evaluación 1 (06/03/12).

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	16	1094.15	68.38	129.17	<0.0001
Error	34	18.0	0.52		
Total	50	1112.15			
C.V.	15.79				

APENDICE D. Salidas del análisis de varianza del Crecimiento Radial Micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk, para determinar la eficacia biológica de mezclas de fungicidas para el control del agente causal de la pudrición blanca en cebolla (*Sclerotium cepivorum*), *In Vitro*.

Apéndice 1. Análisis de varianza de la variable Crecimiento Radial Micelial de *Sclerotium cepivorum* Berk, en la evaluación 1 (08/03/12), para determinar la eficacia biológica de mezclas de fungicidas para el control del agente causal de la pudrición blanca en cebolla (*Sclerotium cepivorum*), *In Vitro*.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	14	57.81	4.12	1858.26	<0.0001
Error	30	0.06	0.002		
Total	44	57.87			
C.V.	12.26				

APENDICE E. Salidas del análisis de varianza del porcentaje de incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) en cebolla, para determinar la efectividad biológica de las diferentes mezclas de fungicidas en plantas de cebolla Var. Suprema contra la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) con 0.1 microesclerocios•g⁻¹ de suelo en invernadero. 2012.

Apéndice 1. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 1 (30/11/11) en cebolla en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	14	0	0	.	.
Error	30	0	0		
Total	44	0			
C.V.	.				

Apéndice 2. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	14	497.77	35.55	16.00	<.0001
Error	30	66.66	2.22		
Total	44	564.44			
C.V.	167.7051				

Apéndice 3. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	14	1991.11	142.22	9.14	<.0001
Error	30	466.66	15.5		
Total	44	2457.77			
C.V.	221.85				

Apéndice 4. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	14	8897.77	635.55	16.82	<.0001
Error	30	1133.33	37.77		
Total	44	10031.11			
C.V.	95.37				

Apéndice 5. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	14	23480.00	1677.14	22.87	<.0001
Error	30	2200.00	73.33		
Total	44	25680.00			
C.V.	49.40				

Apéndice 6. Análisis de varianza de la variable incidencia de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), para la fecha de evaluación 2 (20/12/11) en cebolla en invernadero.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Prob F
Tratamientos	14	22911.11	1636.50	21.66	<.0001
Error	30	2266.66	75.55		
Total	44	25177.77			
C.V.	48.89				