

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS DE UN
CAMPO DE CULTIVO DE AJO Y ANÁLISIS DE SU CAPACIDAD
ANTAGÓNICA CONTRA *Sclerotium cepivorum***

TESIS PRESENTADA POR EL BACHILLER:

RAMOS SALAS, RODRIGO SEBASTIAN

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

**ASESORA: DRA. MARÍA ROSARIO VALDERRAMA
VALENCIA**

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero
mucho ciencia devuelve a Él”.

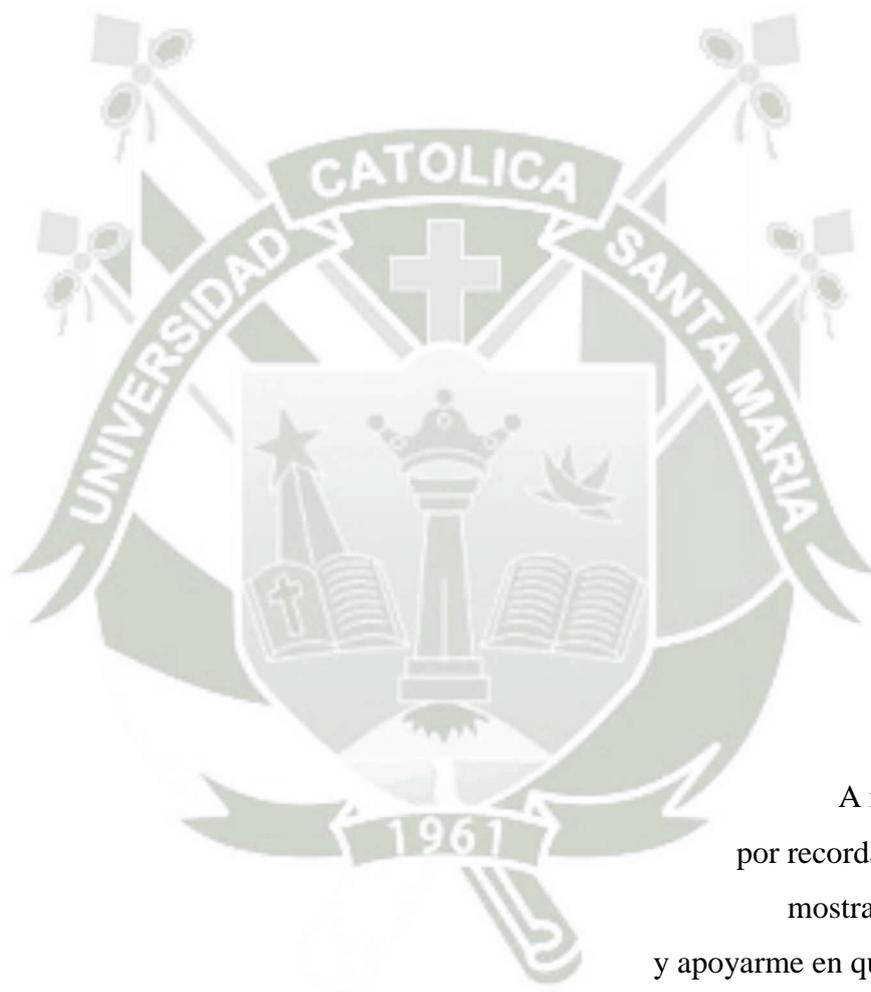
Louis Pasteur



“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento,
sino también en la destreza de aplicar los
conocimientos en la práctica”

Aristóteles

A mis queridos padres, Mónica y Wilmar,
por siempre apoyarme, exigirme y comprenderme
a lo largo de mis proyectos, estudios
y mi vida diaria.



A mis hermanos,
por recordarme como fui
mostrarme como soy
y apoyarme en quien quiero ser.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por siempre haberme protegido y guiado a lo largo de mi carrera y por haberme dado las lecciones que necesitaba en el momento adecuado en mi vida.

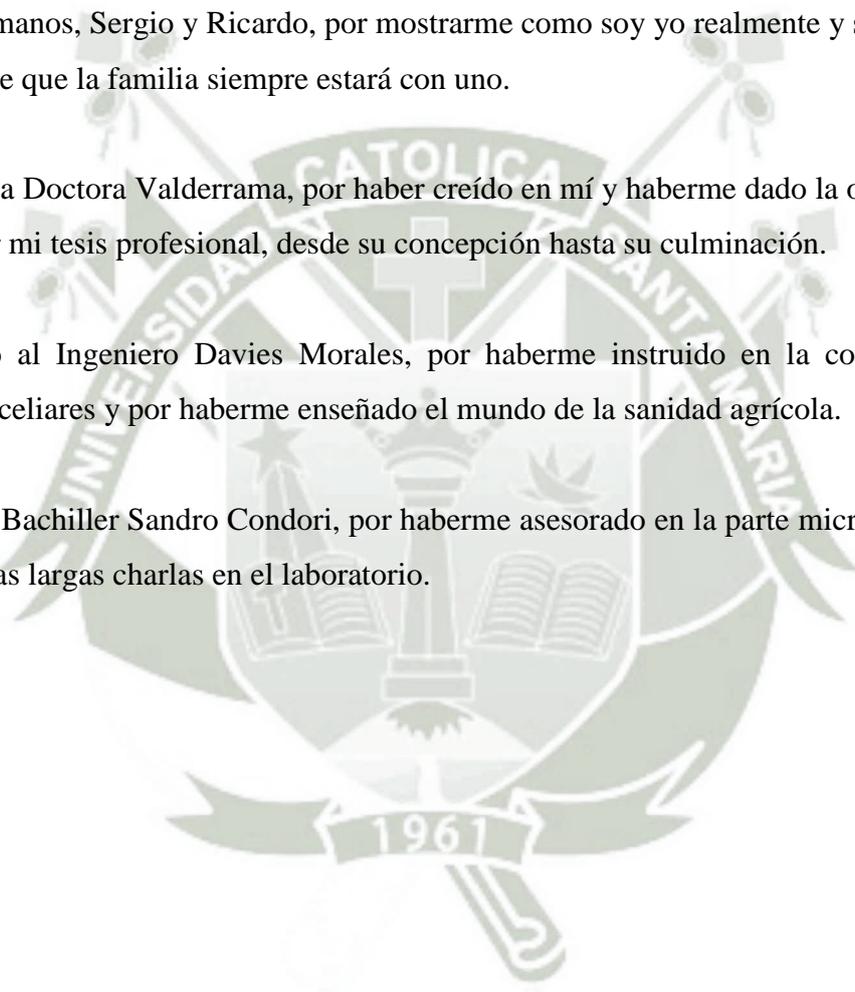
Les doy gracias a mis padres, Mónica y Wilmar, quienes siempre me apoyaron a lo largo de mi carrera, me comprendieron en mis momentos más difíciles y siempre impulsaron mi curiosidad ante el mundo que me rodea.

A mis hermanos, Sergio y Ricardo, por mostrarme como soy yo realmente y siempre ser un recuerdo de que la familia siempre estará con uno.

Gracias a la Doctora Valderrama, por haber creído en mí y haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis profesional, desde su concepción hasta su culminación.

Agradezco al Ingeniero Davies Morales, por haberme instruido en la conservación de hongos miceliares y por haberme enseñado el mundo de la sanidad agrícola.

Gracias al Bachiller Sandro Condori, por haberme asesorado en la parte microbiológica del trabajo y las largas charlas en el laboratorio.

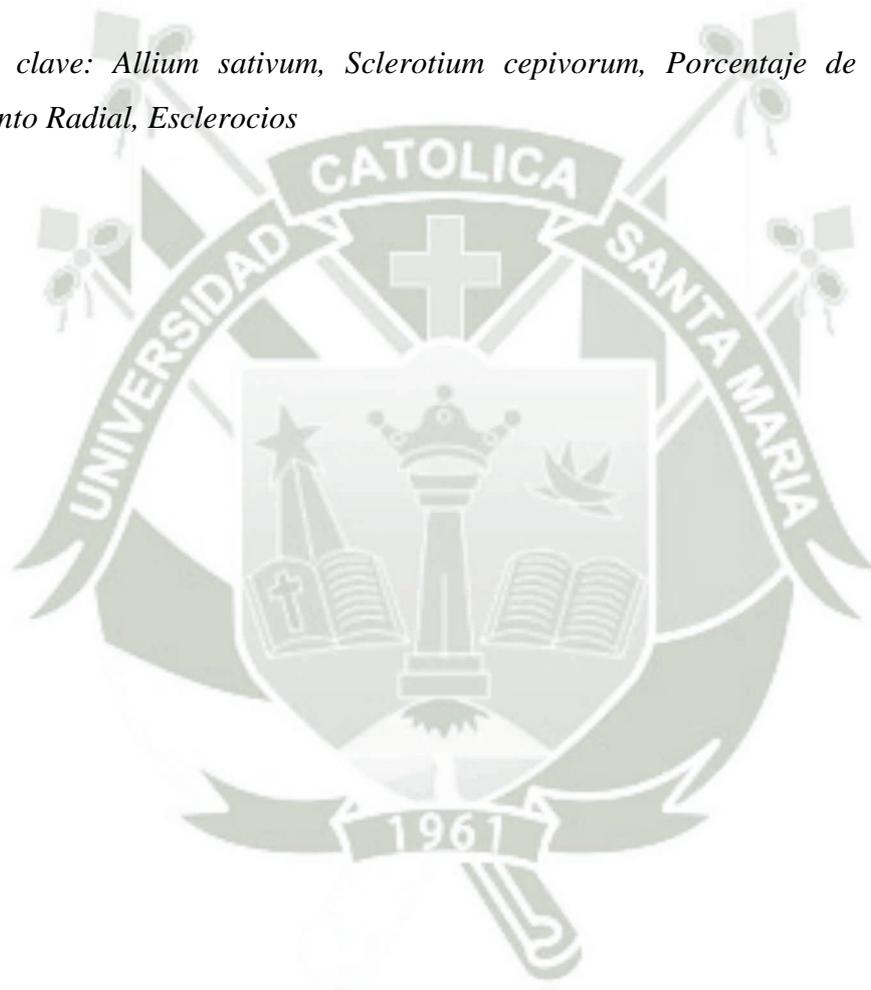


RESUMEN

En la presente investigación se evalúa la capacidad antagonica de microorganismos fúngicos aislados de tierras de cultivo de ajo, con la finalidad de identificar cepas con potencial biocontrolador para la enfermedad de la Podredumbre Blanca del ajo o Torbó. Para ello, primero se realizó la recolección de muestras de suelo y ajo en una tierra de cultivo. Se aisló los hongos filamentosos de las muestras recolectadas, obteniendo diferentes placas cultivadas de donde se aisló 22 colonias de hongos filamentosos; además, se realizó el aislamiento del patógeno de la Podredumbre Blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum*). A estas 22 colonias y al patógeno se les caracterizó su velocidad de crecimiento radial; dando como resultado que entre todos el hongo con la menor velocidad de crecimiento era el patógeno. Este requirió de 3 días para iniciar su crecimiento y presentó una gráfica exponencial en su crecimiento. Luego, se evaluó el antagonismo inicial con la finalidad de poder identificar a los microorganismos que presentasen mayores Porcentajes de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) contra el hongo *Sclerotium cepivorum*. Los resultados de esta prueba inicial se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Tuckey, dando como resultado un grupo de 8 hongos con los mayores valores de PICR. Del grupo generado se formaron subgrupos con características morfológicas macroscópicas similares, de los cuales se seleccionaron a las cepas 31, 1 y 3 como las más representativas de cada subgrupo. Con dicha cepas, se realizó una evaluación de antagonismo con 10 repeticiones, los resultados obtenidos luego de 7 días fueron PICR de 62.2, 63.1 y 79.1 para las cepas 31, 1 y 3 respectivamente. Estos resultados, al superar el 50%, evidencian la presencia de interacciones antagonicas por parte de las cepas evaluadas frente al hongo *Sclerotium cepivorum*; siendo la cepa 3 la que demuestra la mayor acción antagonica. Para evaluar diferencias significativas entre los resultados se hizo uso de la

prueba de Tuckey. Esta dio como resultado que el PICR de la cepa 3 era significativamente diferente a las cepas 31 y 1; pero, las cepas 31 y 1 era similares. También, se utilizó la prueba de parasitismo de esclerocios para las tres cepas evaluadas, a fin de observar la presencia de parasitismo. Los resultados de la prueba fueron una parasitación del 53.76%, 48.28% y 60.52% de esclerocios para las cepas 1, 31 y 3 respectivamente. Además, se identificó a las tres cepas que presentaron los mayores valores de PICR mediante observación morfológica e identificación molecular. Las cepas se identificaron como *Trichoderma viridescens* para la cepa 1, *Trichoderma harzianum* para la cepa 31 y *Trichoderma harzianum* para la cepa 3.

Palabras clave: Allium sativum, Sclerotium cepivorum, Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial, Esclerocios



ABSTRACT

In the present research is evaluated the antagonistic ability of fungi isolated from soils coming from garlic's farms, with the purpose of identify strains with antagonistic ability against the sickness of the White Rot. For that, first it was done the collection of soil and garlic samples coming from farms soils. Then, the isolation of the sample's filamentous fungi was performed getting as result different cultured plates. From this plates it was isolated 22 fungi colonies; also, it was isolated the sickness pathogen *Sclerotium cepivorum*. The radial growth speed was characterized for these 22 colonies, reveling that the pathogen *Sclerotium cepivorum* was the microorganism with the slowest radial growth speed, taking 3 days to start its growth and showing an exponential growth. The antagonistic ability evaluation was performed with the purpose of identify the microorganism with the highest Percentage Inhibition of Radial Growth (PIRG) against the fungi *Sclerotium cepivorum*. The results of this evaluation were statistically analyzed with the Tuckey test, giving as result a group of 8 fungi with the highest values of PIRG. From this group, it was generated sub-groups with similar morphological characteristics. The stains 31, 1 and 3 where selected as the most representatives of each sub-group. With these strains, a new antagonistic ability evaluation was performed, this time with 10 repetitions, the results after 7 days were PIRG of 62.2, 63.1 and 79.1; each one belonging to the strains 31, 1 and 3V. All this results surpasses the 50%, so they show the presence of antagonistic interaction against the fungi *Sclerotium cepivorum*, being the strain 3V the most efficient. To evaluate the presence of significant differences, it was performed Tuckey test. This turned out that the PIRG showed by the strain 3 was different from the strains 31 and 1; but, there was no difference between the strains 31 and 1. A test to evaluate the parasitic ability against sclerotia were performed, the purpose of this was to evaluate if the three

strains could parasitize the sclerotia of the fungi *Sclerotium cepivorum*. The results of this assay were a percentage of 53.76% showed by the strain 1, 48,28% showed by the strain 31 and 60.52% showed by the strain 3. The three strains with the highest values of PIRG were identified by the characterization of macroscopic and microscopic morphology and the use of Molecular identification techniques. The strains were identified as: *Trichoderma viride* (the strain 1), *Trichoderma harzianum* (the strain 31) and *Trichoderma harzianum* (the strain 3V).

Keywords: Allium sativum, Sclerotium cepivorum, Percentage Inhibition of Radial Growth, Sclerotia



INDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO I	5
MARCO TEÓRICO	5
1. AJO	5
1.1. Clasificación	5
1.2. Origen	5
1.3. Características de la planta	6
1.4. Zonas productoras	7
1.5. Importancia económica	8
1.6. Enfermedades del Ajo	8
1.6.2. Podredumbre blanda o bacteriosis (<i>Pseudomonas marginalis</i> o <i>Erwinia rhapontici</i> Burkholder)	9
1.6.3. Roya o Polvillo (<i>Puccinia porri</i> G. Wint)	10
1.6.4. Mancha Herrumbre (<i>Fusarium spp.</i>)	11
1.6.5. Podredumbre blanca o Torbó (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berkeley)	11
2. PODREDUMBRE BLANCA DEL AJO	12
2.1. Organismo Causal: <i>Sclerotium cepivorum</i>	13
2.2. Sintomatología	14
2.3. Epidemiología	15
2.4. Importancia	16
2.5. Métodos de control	17
3. <i>Sclerotium cepivorum</i>	19
3.1. Descripción Macroscópica y Microscópica	19
3.2. Crecimiento del microorganismo	20
3.3. Mecanismo de infección	22
4. CONTROL BIOLÓGICO	22

4.1.	Tipos de Control	23
4.2.	Características de un agente controlador	24
4.3.	Mecanismos de control	25
4.3.1.	Competencia exclusiva	26
4.3.2.	Antibiosis	26
4.3.3.	Hiperparasitismo	26
4.4.	Evaluación del Antagonismo	27
4.5.	Importancia	29
5.	GÉNERO <i>Trichoderma</i>	29
5.1.	Descripción Macroscópica y Microscópica	30
5.2.	Crecimiento del microorganismo	32
5.3.	Parasitismo	33
CAPÍTULO II		34
PARTE EXPERIMENTAL		34
1.	PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	34
2.	MATERIALES	35
2.1	Material biológico	35
2.2	Equipos	35
2.3	Instrumentos de laboratorio	35
2.4	Material de vidrio	36
2.5	Reactivos Químicos	36
2.6	Otros Materiales	36
3	METODOLOGÍA	37
3.1	Aislamiento de hongos filamentosos de la rizosfera y endófitos	37
3.1.1	Ubicación	37
3.1.2	Lugar de obtención de la muestra	37
3.1.3	Selección de las zonas de muestreo	38
3.1.4	Muestreo de tierra de rizosfera y plantas de ajo	38
3.1.5	Método de trampeo de esclerocios	39
3.2.	Aislamiento de hongos filamentosos	39
3.3	Aislamiento de microorganismos fúngicos	43
3.3.1	Aislamiento de microorganismos competitivos	43
3.3.2	Conservación de cepas puras	43

3.3.3	Identificación y conservación de <i>Sclerotium cepivorum</i>	44
3.4	Análisis de la capacidad antagonica	44
3.4.1	Cinética radial	44
3.4.2	Evaluación de antagonismo	45
3.3.3	Parasitación de esclerocios	46
3.4	Identificación	47
3.4.1	Identificación morfológica de los hongos con capacidad antagonica	47
CAPÍTULO III		49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		49
1.	AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS DEL SUELOS	49
1.1.	Método de dilución en placa	49
1.2.	Método de cultivo de triturado de raíz	51
1.3.	Método de cámaras húmedas	52
1.4.	Método de lavado de esclerocios	53
2.	AISLAMIENTO DE COLONIAS FÚNGICAS CON COMPORTAMIENTO ANTAGÓNICO	54
2.1.	Aislamiento de hongos filamentosos competitivos	54
2.2.	Aislamiento del patógeno <i>Sclerotium cepivorum</i>	56
3.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LAS CEPAS AISLADAS FRENTE AL PATÓGENO <i>Sclerotium cepivorum</i>	57
3.1.	Cinética radial de los hongos aislados	57
3.2.	Evaluación de la capacidad antagonica	62
4.	IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA CONTRA <i>Sclerotium cepivorum</i>	77
CAPITULO IV		79
CONCLUSIONES		79
RECOMENDACIONES		80
BIBLIOGRAFÍA		81
ANEXOS		86

Índice de Figuras

Figura 1. Corte longitudinal de un bulbo de <i>Allium sativum</i> o "diente" de ajo ⁽⁹⁾ (Fuente: E. H. Kehr, 2002)	7
Figura 2. Superficie Cosechada (Ha) y Producción (TM) entre los años 2000 y 2009. (Fuente: MINAGRI, 2011).....	8
Figura 3. Diente de ajo infectado por la enfermedad del moho azul. Se puede observar la presencia de micelio en la zona infectada ⁽¹²⁾ . (Fuente: Galdames, 2002)	9
Figura 4. Planta de ajo con pústulas rojas-anaranjadas, signo claro de la enfermedad de la roya ⁽¹²⁾ . (Fuente: Galdames, 2002).....	10
Figura 5. Bulbo del ajo con pérdida total de la raíz, ligero crecimiento miceliar y presencia de heridas de color oxido.....	11
Figura 6. Ajos infectados por la podredumbre blanca. Se puede observar la ausencia del sistema radicular y de tejido de las hojas de almacenaje. También se puede observar la presencia de esclerocios negros en la superficie junto con la tierra.	12
Figura 7. Cultivo del hongo <i>Sclerotium cepivorum</i> , se puede observar el micelio blanco inicial en la base y la presencia de esclerocios negros en el mismo.....	14
Figura 8. Síntomas de podredumbre blanca en un cultivo de ajo ⁽³⁾ (Fuente: Piccolo, 2007).....	15
Figura 9. Cultivo del hongo <i>Sclerotium cepivorum</i> en diferentes etapas de su crecimiento: A) El hongo inicialmente presenta micelio blanco. B) Empieza la formación de esferas blancas a partir del micelio. C) Transformación de las esferas blancas a los esclerocios de color negro. D) Esclerocios formados en toda la superficie de la colonia.	20
Figura 10. Tipos de control biológico ⁽³⁶⁾ . (Fuente: Roderik & Navajas, 2003).....	23
Figura 11. Antibiosis entre <i>Penicillium spp.</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ⁽³⁸⁾ . (Fuente: Case, 2015).....	27
Figura 12. Imagen microscópica de <i>Trichoderma spp.</i>	30
Figura 13. Esquema de un <i>Trichoderma spp.</i> (Fuente: Universidad Masaryk)	31
Figura 14. <i>Trichoderma spp.</i> cultivado en PDA (Potato Dextrose Agar)	32
Figura 15. Diagrama de Flujo del procedimiento experimental.....	34
Figura 16. Interacciones entre las colonias cultivadas en una placa Petri.....	54
Figura 17. Placas de cultivo, presentando un crecimiento invasivo, por parte de un hongo, frente a los demás.	56
Figura 18. Aislado de <i>Sclerotium cepivorum</i>	57
Figura 19. Alineamientos realizados para dos hongos del cepario.	60
Figura 20. Curva de crecimiento fúngico en placa (Radio vs Tiempo) (Fuente: Micología Online).....	61
Figura 21. Crecimiento radial observado en el hongo <i>Sclerotium cepivorum</i>	62
Figura 22. Resultados del "screening" de antagonismo.	63
Figura 23. Hongo N° 3. Presenta un crecimiento amplio y una alta conidiogénesis.	67
Figura 24. Hongo N° 31. Presenta un crecimiento discreto en forma de anillos concéntricos y una conidiogénesis limitada a los anillos.	67
Figura 25. Hongo N°1. Presenta un crecimiento amplio; pero, una conidiogénesis muy limitada.	68

Figura 26. Crecimiento en el tiempo del hongo N° 31.....	69
Figura 27. Crecimiento en el tiempo del hongo N° 3.....	70
Figura 28. Crecimiento en el tiempo del hongo N° 1.....	70
Figura 29. PICR de las cepas evaluadas en el día 7.	72
Figura 30. Tendencias para las cepas evaluadas respecto al tiempo	73
Figura 31. Imagen de los esclerocios parasitados.	75
Figura 32. Esclerocio colonizado visto desde el microscopio. Se puede observar la presencia de conidios en su superficie.....	76
Figura 33. Imágenes microscópicas de los hongos N° 3, N° 1 y N° 31 respectivamente..	78



Índice de Tablas

Tabla 1. Tabla de graduación del potencial biocontrolador en microorganismos según su capacidad antagonica presentada durante su evaluación de PICR ⁽⁴³⁾	46
Tabla 2. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en el aislamiento por dilución en placa.....	50
Tabla 3. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en el aislamiento por triturado de raíz.....	51
Tabla 4. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en cámara húmeda.....	52
Tabla 5. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en el aislamiento por lavado de esclerocios.....	53
Tabla 6. Lista del cepario obtenido con su respectivo código, proveniencia y tipo de conservación utilizado.	55
Tabla 7. Tabla resumen de las gráficas generadas durante la cinética radial.	58
Tabla 8. Resumen estadístico de los valores obtenidos durante el "screening" de antagonismo.....	64
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para el "screening" de antagonismo de los 22 hongos aislados.....	64
Tabla 10. Prueba de múltiples rangos según Tukey HSD para el "Screening" de antagonismo de los 22 hongos aislados.....	65
Tabla 11. Grupos de hongos generados mediante el test de Tukey HSD.....	66
Tabla 12. Porcentajes de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) para el día 7. ...	71
Tabla 13. Resumen estadístico de los PICR en el día 7.	71
Tabla 14. Prueba de Tuckey para la comprobación de diferencias significativas entre grupos.	72
Tabla 15. Análisis de varianza para las Cepas, Días e interacción Días*Cepas.....	74
Tabla 16. Resultados de la prueba de colonización de esclerocios.	76
Tabla 17. Resultados de Identificación molecular con su respectivo porcentaje de identidad.	78

INTRODUCCIÓN

La actividad agropecuaria es una de las principales actividades económicas desarrolladas en la Región Arequipa, teniendo una incidencia en el Valor Bruto de la Producción (VBP) Regional del 13.0% ⁽¹⁾. Dentro de la misma, en el área agrícola, existe una gran variedad de cultivos que se siembran; siendo los cinco cultivos con mayor área de siembra: la cebolla, el maíz chala, la papa, el ajo y la quinua. Dentro de estos cinco cultivos principales únicamente el ajo y la quinua son de alto valor económico, estando valorizado en S/.3.09 y S/. 5.22 por Kilogramo respectivamente en chacra ⁽²⁾.

Sin embargo, esta actividad presenta una serie de problemas a enfrentar como son: el escaso crédito, costos financieros elevados, deficiente investigación y tecnología, deterioro de los recursos naturales y del medio ambiente ⁽¹⁾.

En el cultivo del ajo, también se observa la incidencia de estos problemas en su desarrollo y posterior cosecha; siendo los principales problemas los costos financieros, falta de tecnología e investigación y la fuerte dependencia a pesticidas y agroquímicos. Todos estos problemas, se encuentran estrechamente relacionados a las frecuentes pestes y enfermedades que atacan al ajo. Estas son las responsables de los altos costos de producción del ajo así como de la dependencia a los agroquímicos. Las principales pestes y enfermedades que atacan al ajo son: Roya del ajo, mancha herrumbre (*Fusarium*), nematodos, ácaros del ajo y podredumbre blanca ⁽³⁾.

La podredumbre blanca del ajo causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* se trata de una enfermedad capaz de reducir del 80 al 100% de la cosecha, dependiendo de la densidad de esclerocios presente en la tierra ⁽⁴⁾. Pero, también se trata de una enfermedad altamente selectiva ya que la germinación de los esclerocios, que la diseminan, es estimulada por exudados producidos por las raíces de las especies del genero *Allium*. ⁽³⁾ Además, tienen una alta capacidad de supervivencia que permite a sus esclerocios mantenerse viables por más de 20 años en tierra si no se le combate de manera apropiada ⁽⁵⁾. Es debido a estas características que la podredumbre blanca del ajo, a comparación de otras enfermedades del ajo, representa un gasto constante para el agricultor. Los esclerocios que permanecen en la tierra, son un peligro latente para la cosecha en caso que esta llegue a debilitarse o presentar daños. Esta situación obliga al agricultor a invertir en combatir constantemente cualquier otra enfermedad o plaga que pueda debilitar la cosecha o incluso en el

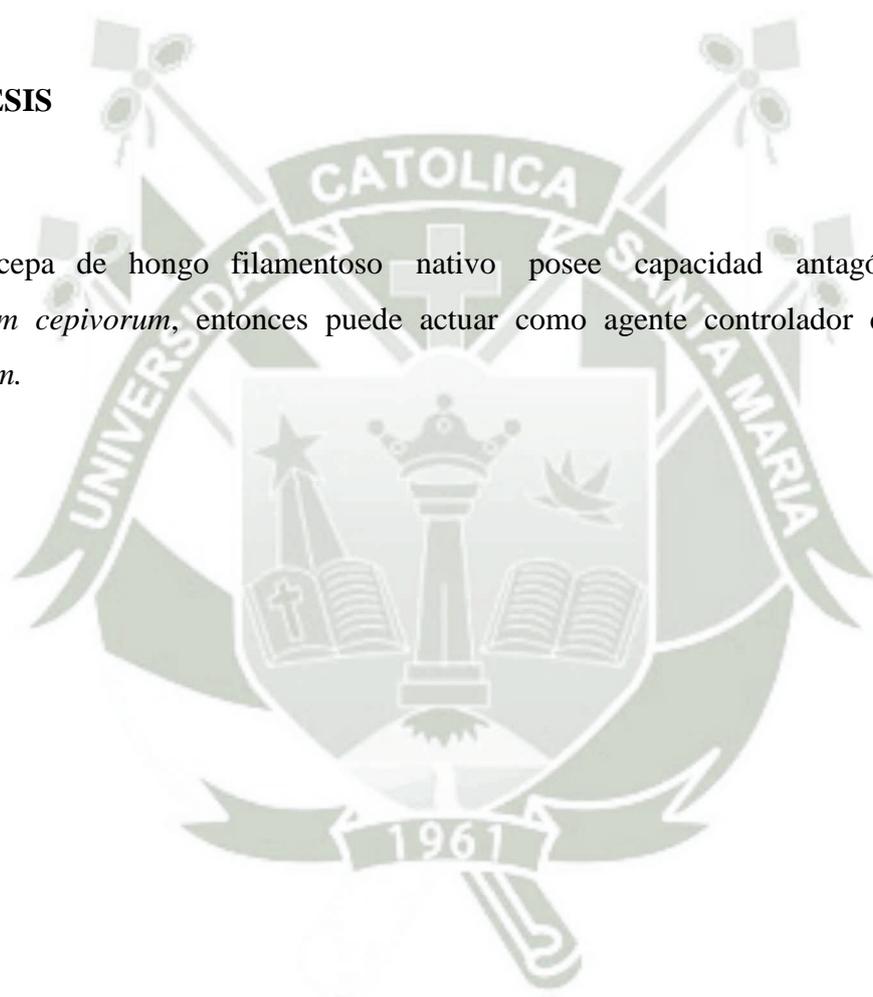
fortalecimiento de los bulbos del ajo en caso que el clima frío pueda favorecer a la activación de la enfermedad.

En nuestra localidad, esta enfermedad es combatida actualmente mediante el uso de fortalecedores para las raíces, como también con el uso de fungicidas como el trecubonazol. También se ha logrado evitar la diseminación de la enfermedad mediante el uso de semillas del ajo “chinito” en lugar de los dientes de ajo que pueden encontrarse contaminados por el hongo. Además de otros métodos como el lavado con hipoclorito de sodio (lejía) a los dientes de ajo que van a ser utilizados para el cultivo. Además de estos métodos, existen otros; pero, estos muchas veces no están sustentados por asesoramiento especializado. Todos estos métodos, a lo largo de la práctica empírica de nuestra agricultura, han tenido cierto nivel de éxito para el control de la enfermedad en los cultivos; sin embargo, en cada caso siempre se ha mantenido un riesgo común que permanece latente: los esclerocios en el suelo. En cada método que se ha empleado para el control de la enfermedad, no se ha atacado directamente a los esclerocios sino a una posible contaminación presente en el material vegetal. Incluso se ha usado agroquímicos, lo cual deja al cultivo ante la posibilidad de caer en la enfermedad por los esclerocios o de tener que depender de agroquímicos y fortalecedores que acarrear mayores costos.

Por este motivo, una de las opciones recomendada para un mejor control de enfermedades con menor costo e impacto, son los controladores biológicos. Pero, para la podredumbre blanca del ajo, no existen estudios realizados en nuestro país. Es por este motivo que este trabajo de investigación surgió con la finalidad de la búsqueda, estudio de capacidad y eficacia antagonica de microorganismos procedentes de nuestra localidad. Esto para un mejor control biológico de *Sclerotium cepivorum*, ya que este constituiría en una opción ecológica, eficiente y económica frente a fungicidas químicos que son cada vez más observados.

HIPÓTESIS

Si una cepa de hongo filamentoso nativo posee capacidad antagónica para el *Sclerotium cepivorum*, entonces puede actuar como agente controlador de *Sclerotium cepivorum*.



OBJETIVOS

1. Aislar hongos filamentosos endófitos y rizosféricos de la planta del ajo.
2. Aislar cepas de hongos filamentosos competitivos.
3. Evaluar la capacidad antagónica de hongos filamentosos nativos contra una cepa de *Sclerotium cepivorum*.
4. Caracterizar de forma microbiológica y molecular los hongos filamentosos que presenten capacidad antagónica.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. AJO

1.1. Clasificación

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta perteneciente al género *Allium* y su ubicación taxonómica según Stavělíková⁽⁶⁾ es la siguiente:

Clase: *Liliapsida*

Subclase: *Liliidae*

Superorden: *Lilianae*

Orden: *Amaryllidales*

Familia: *Alliaceae*

Subfamilia: *Allicideae*

Tribu: *Allieae*

Género: *Allium*

Especie: *Allium sativum*

Esta estimación acepta cerca de 750 especies en el género *Allium*. La propuesta más reciente para la clasificación se basa principalmente en secuencias de las regiones internas de ADN ribosómico nuclear, lo cual agruparía cerca de 780 especies en 15 subgéneros y 56 secciones⁽⁶⁾.

1.2. Origen

La zona de origen del ajo se identifica en la región montañosa de Asia central, desde donde se fue extendiendo hacia el este hasta alcanzar China. Posteriormente extendiéndose a Egipto, Europa y finalmente a América debido al comercio

español, causando que el cultivo llegase a zonas como Perú, México, Estados Unidos y otros más⁽⁷⁾.

Desde épocas remotas se ha conocido esta especie, existen descripciones de este cultivo en Egipto datados de 4000 a. c., y se le ha atribuido propiedades antisépticas, diuréticas, estimulantes de la secreción biliar y estomacal, vermífugo, vasodilatador y efecto contra la arterioesclerosis y trombosis.⁽⁷⁾

1.3. Características de la planta

El ajo, monocotiledónea de la familia de las *Alliaceae* es una especie perenne cultivada por propagación agámica debido a que los clones que se generan normalmente no poseen semilla botánica⁽⁸⁾.

Se trata de una planta herbácea que consta de un bulbo subterráneo conformado por “dientes” recubiertos por catáfilos blancos o morados que se encuentran unidos por la base a un tallo subterráneo. Dicho tallo es corto, comprimido y se encuentra cubierto por la base de las hojas que se forman desde la yema apical. Este tallo puede llegar a crecer hasta un metro de altura y en su extremo se genera una inflorescencia la cual puede presentar coloración rosada o verde que no llega a producir en la mayoría de casos semillas viables⁽⁷⁾. Las hojas de la planta son opuestas, enfundadas o tubulares en la base, con un poro que permite la emergencia de la lámina de las hojas siguientes. A partir del poro, la lámina es lanceolada y de sección angular, con cutícula muy cerosa. El conjunto de partes enfundadas de las hojas da origen al bulbo y a lo que se conoce como falso tallo del ajo. Los bulbos son estructuras formadas al final de la temporada, y son estos el órgano que se consume normalmente⁽⁹⁾.

El bulbo o diente de ajo se encuentra conformado por tres partes importantes de su estructura: las hojas secas protectoras que recubren al bulbo, las hojas de almacenaje y el primordio foliar. En el caso de las hojas de protección se trata de hojas externas, nacidas de las axilas de hojas jóvenes o internas, las cuales se secan para formar vainas cilíndricas con un poro pequeño en la punta y una pequeña hoja abortiva. En el caso del bulbillo, nacido a partir de las axilas de sus hojas

protectoras, primero se observa la hoja de almacenaje que contiene reservas de carbohidratos y abarca la mayor parte de la estructura del bulbillo o diente (Figura 1). Y finalmente se puede observar el eje de brotación conformado por un primordio foliar contenido dentro de la hoja de almacenaje. A partir de este primordio foliar se inicia la generación de la nueva planta de ajo, siempre y cuando se cumplan las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo ⁽⁹⁾.

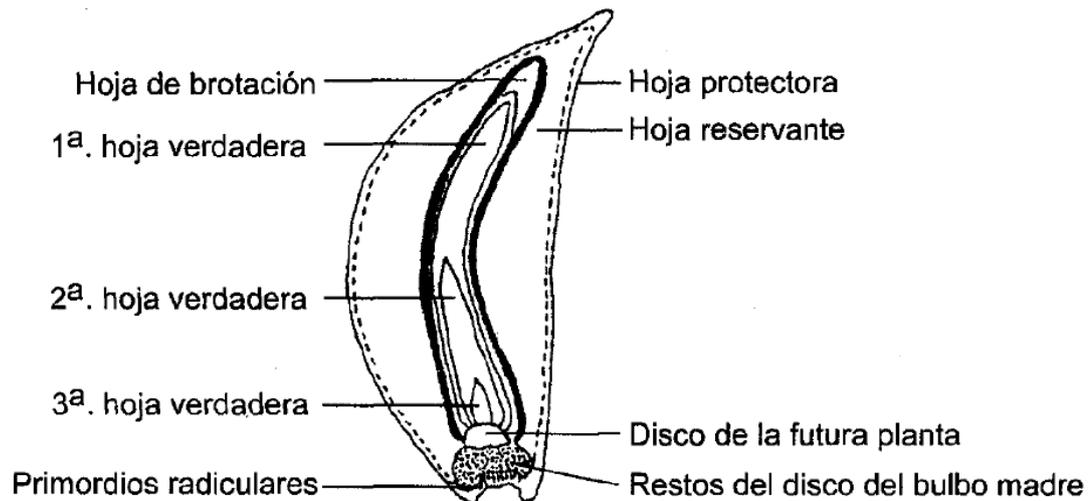


Figura 1. Corte longitudinal de un bulbo de *Allium sativum* o "diente" de ajo ⁽⁹⁾ (Fuente: E. H. Kehr, 2002)

La inflorescencia del ajo, cuando se forma, corresponde a una umbela protegida por una hoja modificada como bráctea o espátula y sustentada por un escapo o tallo, sección redonda, sólido, de 1m de largo, resultante de la elongación del entrenudo entre la última hoja y la espátula ⁽⁹⁾. Esta umbela está conformada por varias flores pequeñas de color rosado o verde que en su mayoría no logran generar una semilla viable ^(9,7).

1.4.Zonas productoras

En Perú la producción del ajo se concentra principalmente en la provincia de Arequipa con 14 TM/Ha, le sigue Lima (7 TM/Ha), Cajamarca (5 TM/Ha), La Libertad (9 TM/Ha), Junín (8 TM/Ha) y Ayacucho (5 TM/Ha) ⁽¹⁰⁾.

La superficie cosechada de ajo en el Perú oscila según los años, teniendo un pico máximo con 8610 hectáreas de ajo el año 2001, y un segundo pico de 7974 hectáreas en el año 2007⁽¹⁰⁾.

Evolución

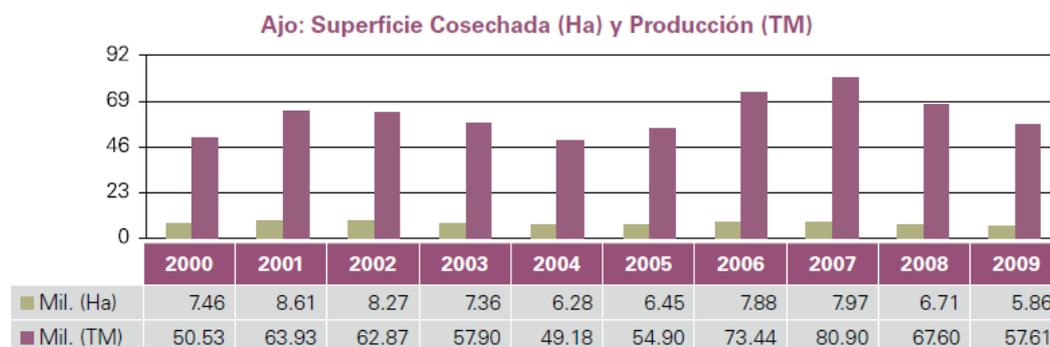


Figura 2. Superficie Cosechada (Ha) y Producción (TM) entre los años 2000 y 2009. (Fuente: MINAGRI, 2011)

1.5. Importancia económica

El Perú es el país que ha tenido el mayor volumen de producción de ajo dentro de los países pertenecientes a la Comunidad Andina (CAN) superando en 3 veces la producción de Venezuela. A su vez el Perú es un importante exportador de ajo siendo sus principales compradores Estados Unidos y China.

En aspectos de producción Mundial, el principal productor de ajo es China, siendo este el responsable de más del 80% de la producción mundial. Aunque al ser Asia Central la zona de origen, es concordante que China sea el mayor productor. A nivel Sudamericano el principal productor de Ajo es Brasil, seguido por Argentina y luego Perú⁽¹¹⁾.

1.6. Enfermedades del Ajo

La semilla del ajo, que viene a ser un bulbillo o diente de ajo, debido a su reproducción asexual y a su estructura, es un buen reservorio de microorganismos parásitos y saprofitos que pueden causar daños y problemas durante las diferentes fases del cultivo, almacenamiento y nuevas cosechas⁽⁷⁾. Estas enfermedades en su mayoría son causadas por hongos y en menor medida por nemátodos y virus.

Las principales enfermedades que pueden atacar al ajo son:

1.6.1. Podredumbre verde o Moho azul (*Penicillium spp.*)

Es una enfermedad causada por el microorganismo *Penicillium spp.* el cual se presenta normalmente en forma tardía durante la cosecha y el almacenaje. También se ha observado “decaimiento por *Penicillium spp.*” el cual es un ataque del hongo en etapas tempranas ⁽¹²⁾.

La enfermedad se caracteriza por la aparición de manchas amarillo-pálidas y hundidas, que se hacen evidentes al pelar los dientes, además de deshidratación de los bulbos y desarrollo de moho azul-verde en las lesiones (Figura 3). En campo se puede observar pudrición de la semilla, clorosis, marchitez y falta de crecimiento ⁽³⁾.



Figura 3. Diente de ajo infectado por la enfermedad del moho azul. Se puede observar la presencia de micelio en la zona infectada ⁽¹²⁾. (Fuente: Galdames, 2002)

1.6.2. Podredumbre blanda o bacteriosis (*Pseudomonas marginalis* o *Erwinia rhapontici* Burkholder)

La podredumbre blanda se trata de una enfermedad causada por una infección bacteriana en el cultivo. Esta enfermedad es causada por el microorganismo *Erwinia carotovora* la cual, al tratarse de una bacteria, necesita de climas cálidos para poder progresar adecuadamente.

Esta enfermedad se disemina normalmente por el riego, el suelo, restos vegetales, insectos e incluso por maquinaria de cosecha y almacenaje; pero la

condición principal para que surja la enfermedad es el ingreso del microorganismo al bulbo del ajo por medio de alguna lesión. Los síntomas de esta enfermedad es una podredumbre acuosa de color amarillo pardo a pardo, con desprendimiento de olores fuertes y exudado bacteriano ⁽³⁾.

1.6.3. Roya o Polvillo (*Puccinia porri* G. Wint)

Enfermedad del ajo que se caracteriza por pequeñas puntuaciones blancas sobre hoja y pseudotallos que posteriormente pasan a pústulas de color anaranjado. Esta enfermedad es causada por el microorganismo *Puccinia porri* que puede diseminarse por malezas en el cultivo.



Figura 4. Planta de ajo con pústulas rojas-anaranjadas, signo claro de la enfermedad de la roya ⁽¹²⁾. (Fuente: Galdames, 2002)

El hongo causante es capaz de sobrevivir al invierno como uredospora o teliospora. Debido a que la uredospora primeras es capaz de ser transportada por el viento a grandes distancias. Esta enfermedad puede presentar diferentes niveles de virulencia en distintas especies del genero *Allium*. Normalmente esta enfermedad ocurre con mayor incidencia en altos niveles de humedad relativa y baja frecuencia de lluvias debido a que la inmersión de las esporas reduce su viabilidad ⁽³⁾

1.6.4. Mancha Herrumbre (*Fusarium spp.*)

Enfermedad del ajo que se caracteriza por ser uno de los principales problemas en etapas iniciales del cultivo, como también lo es para muchas otras especies de plantas. Esta enfermedad es causada por el hongo *Fusarium spp.* el cual muchas veces puede encontrarse latente tanto en la semilla como en la tierra o puede transmitirse por el tipo de riego.

El hongo causante de esta enfermedad presenta sintomatología muy característica en la cual predomina el marchitamiento, falta de crecimiento o incluso expiración de las plántulas en edad temprana, clorosis en las hojas y finalmente un color pardo parecido al óxido presente en las raíces que paulatinamente van marchitándose. Además de ello se puede observar pústulas de color castaño rojizo como herrumbre en los bulbos. Estas lesiones pueden llegar a distribuirse en todo el diente siendo capaces de generar micelio y podredumbre seca conforme avanza la colonización del hongo en el diente de ajo ⁽³⁾



Figura 5. Bulbo del ajo con pérdida total de la raíz, ligero crecimiento micelial y presencia de heridas de color óxido.

1.6.5. Podredumbre blanca o Torbó (*Sclerotium cepivorum* Berkeley)

Esta enfermedad del ajo es una de las más importantes debido a que acarrea costos tanto de pérdida como de control de la misma. La enfermedad está

directamente relacionada con el suelo y únicamente se manifiesta cuando se cultivan *Alliums* en el campo infectado. Se pueden contagiar nuevos suelos de no tenerse el cuidado adecuado. A nivel mundial es una de las principales causas de pérdida de producción en tanto para ajo como para cebolla ⁽³⁾

El hongo causante de esta enfermedad es el *Sclerotium cepivorum* el cual se caracteriza por tratarse de un hongo que no se disemina normalmente por esporas. Este se disemina principalmente por estructuras denominadas esclerocios. Los síntomas que pueden presentar las plantas atacadas por esta enfermedad son clorosis de las hojas y una pudrición de la zona radicular de la planta, es común que el ajo atacado por esta enfermedad salga sin raíz cuando se le intente sacar de la tierra (Figura 6) ⁽³⁾.



Figura 6. Ajos infectados por la podredumbre blanca. Se puede observar la ausencia del sistema radicular y de tejido de las hojas de almacenaje. También se puede observar la presencia de esclerocios negros en la superficie junto con la tierra.

2. PODRDUMBRE BLANCA DEL AJO

La podredumbre blanca del ajo es una enfermedad que ataca únicamente a los cultivos del Género *Allium* y llega a ser de gran importancia a nivel mundial debido a las devastadoras consecuencias que puede llegar a ocasionar en los cultivos que infecta. Esta enfermedad del ajo es la principal causante de grandes pérdidas de producto a nivel mundial, así como también es una de las enfermedades a la que se le debe tener especial cuidado puesto que su propagación es mediante la misma

tierra de cultivo. De presentarse en alguna zona, permanecerá en la misma a menos que se tomen precauciones para su control. Esta enfermedad es causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* el cual debido a sus características, dificulta el control de la enfermedad. Además de ser un hongo que reacciona exclusivamente con las cosechas del género *Allium* debido a las secreciones que estos despiden a nivel radicular ⁽³⁾.

2.1. Organismo Causal: *Sclerotium cepivorum*

El hongo *Sclerotium cepivorum* (Berk.), también conocido como *Stromatinia cepivora* (Berk), es el hongo responsable de la enfermedad de la podredumbre blanca en el ajo. Se trata de un hongo miceliar imperfecto de la división de los Basidiomycota el cual fue reportado por primera vez en Inglaterra ⁽³⁾.

Entre las características de este microorganismo se observa la presencia de hifas con un diámetro de 9 a 18 μm y células de 30 a 100 μm de largo, siendo las apicales 3 a 4 veces más largas. Los esclerocios que forman este microorganismo son su principal método de reproducción. Tiene de 200 a 700 μm de diámetro y son mayormente esféricos. Estos se generan formando grupos en zonas donde hay material comprometido. También pueden observarse presencia de esclerocios secundarios nacidos de un esclerocio padre que tienen de 100 a 150 μm de diámetro y que son entre el 5 a 10% del total. Los conidios presentados por este hongo son esférico y de 1.6 a 3.4 μm de diámetro aunque no se observan mucho ⁽³⁾.

Los esclerocios generados por el hongo son los agentes causales principales en el campo ya que estos pueden permanecer durante más de 20 años en suelo y recién comenzar a perder un 10 % de su viabilidad. Considerándose que inicialmente la viabilidad de los esclerocios es del 90% ^(13,5,14). La estructura de los esclerocios es altamente resistente y debido a ello se tiene muchos problemas para su control, ya que puede permanecer inactivo por mucho tiempo y únicamente en presencia de compuestos generados por raíces de especies del género *Allium* vuelve a germinar para atacar al cultivo ^(5,14).



Figura 7. Cultivo del hongo *Sclerotium cepivorum*, se puede observar el micelio blanco inicial en la base y la presencia de esclerocios negros en el mismo.

2.2.Sintomatología

El cultivo puede verse atacado por la enfermedad en cualquier momento de su crecimiento, ciertos síntomas e incluso la aparición de la enfermedad pueden variar dependiendo del estadio del ajo en el que fue atacado. Los síntomas pueden ser notados unos 60 días luego de la siembra ^(4,3,15).

Los síntomas que aparecen al inicio de la enfermedad son: un crecimiento muy pobre de la planta y clorosis de las hojas más viejas que progresivamente va avanzando hasta el punto que la planta enferma perece. En el caso de la zona radicular, se puede observar un crecimiento miceliar lanoso y blanquecino que conforme va madurando empieza a generar esclerocios que cubren las zonas afectadas por la enfermedad. En el caso de que la enfermedad comenzase cuando las plantas estaban cerca del tiempo de cosecha, se puede ver una carencia total de síntomas en el ajo, pero dependiendo de las condiciones de almacenamiento la enfermedad puede surgir a pesar de encontrarse ya cosechado el producto ^(4,3,15).

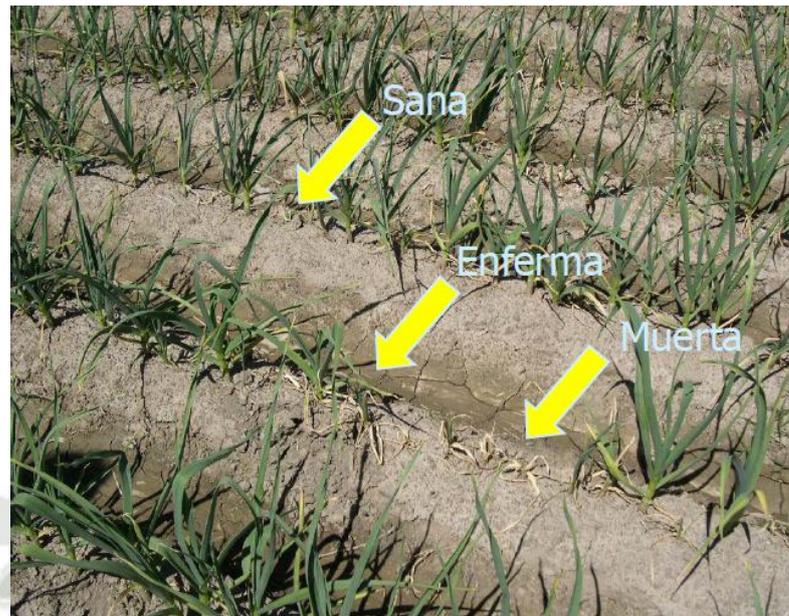


Figura 8. Síntomas de podredumbre blanca en un cultivo de ajo ⁽³⁾ (Fuente: Piccolo, 2007)

2.3.Epidemiología

La podredumbre blanca del ajo o Torbó presenta diferentes formas de diseminación a otros cultivos. Uno es mediante regadío según reporta Adams ⁽¹⁶⁾ en el cual el agua contaminada por esclerocios puede transportar la enfermedad a pesar que esta sea suministrada por aspersión. Otra forma de diseminación es mediante fuertes vientos y el transporte de tierra contaminada por el movimiento de materiales y equipo sin el uso de buenas prácticas agrícolas. Finalmente las vías más importantes para el contagio de cultivos son mediante el uso de material infectado, haciendo referencia a desechos de ajos que portasen la enfermedad y por descuido se entierran en las tierras de cultivo. Otra vía importante es el uso de semillas infectadas, y la presencia de los mismos esclerocios los cuales presentan una relación directa con la incidencia final en el campo.

Además de los métodos de contagio que tiene la enfermedad de la podredumbre blanca del ajo, también se puede observar la necesidad de ciertas condiciones en las cuales la enfermedad puede llegar a prosperar o que facilitan su permanencia en el suelo. En el caso del desarrollo de la enfermedad se observa un mayor crecimiento entre 15 a 24 °C, mientras que por otro lado la temperatura adecuada para la germinación de los esclerocios es un poco más fría y ubicándose entre los 10 a

20°C. En ambos casos anteriores se debe dejar claro que la humedad no presenta mayor diferencia; aunque en donde la enfermedad ha surgido se reporta presencia de humedad en el terreno y un pH oscilatorio entre 5 a 8 ^(3,15).

Otro factor importante en el desarrollo de la enfermedad en los cultivos, es la relación directa que se puede observar entre el inóculo inicial (el caso de la podredumbre blanca del ajo, es la densidad de esclerocios por gramo de suelo) y la incidencia que tendrá la enfermedad en el cultivo. Según Adams y Papavizas ⁽¹⁷⁾, para que pueda surgir una cantidad apreciable de la enfermedad en un cultivo sólo es necesaria una densidad de 5 esclerocios por gramo de tierra. Posteriormente según los estudios de Crowe et al ⁽¹⁸⁾ se pudo observar que experimentando con inóculos se podía observar de incidencias del 10 al 100% teniendo densidades del 0.001 a 0.1 esclerocios por gramo de suelo. Esto puede significar que conforme la enfermedad siga perdurando y progresando en un campo de cultivo sin la apropiada intervención para su control, los cultivos posteriores en la misma zona infectada pueden presentar una incidencia mayor. Esto se debe a que al momento de desenterrar ajos contaminados por la enfermedad, una porción de los esclerocios que se generan terminaran quedándose en la tierra y aumentando la densidad de esclerocios en este suelo ⁽⁴⁾.

2.4.Importancia

La importancia que tiene esta enfermedad radica en el peligro latente para el cultivo y el costo que acarrea para los agricultores que busquen cosechar ajo. Como se presentó en anteriores puntos, la enfermedad de la podredumbre blanca del ajo muestra características que la pueden presentar como una enfermedad resistente, de difícil detección en campo y que puede tener consecuencias muy fuertes para el cultivo. Esto lleva a concluir que para que los agricultores no sufran estas pérdidas, tienen que realizar métodos de control que en el mejor de los casos les costaría tiempo o sino aumentarían costos en su producción. En ambos casos el peligro que la enfermedad no se elimina en su totalidad y se tiene que seguir llevando una supervisión del cultivo previniendo que vuelva a aumentar la densidad de esclerocios en suelo como para volver a generar la enfermedad.

En diferentes partes del mundo se ha registrado pérdidas significativas en la producción de ajo, teniendo como responsable de esto a la podredumbre blanca. En el Reino Unido se tienen registros de pérdidas del 10% de la producción, mientras que en México y Brasil se ha llegado a registrar pérdidas del 100% de zonas de cultivo ⁽¹⁹⁾. En cambio a nivel nacional, es conocido por los agricultores que esta enfermedad se encuentra presente y dificulta mucho el cultivo del ajo, causando que en muchos casos sea necesario el tener “sobreproducciones” de ajo para poder cosechar una cantidad decente de producto o sino el verse obligados a utilizar fungicidas químicos o incluso renunciar totalmente a su cultivo debido a los costos totales de producción ⁽⁴⁾.

2.5. Métodos de control

Debido a la dificultad que se presenta para combatir este tipo de enfermedad en el cultivo de las especies de los *Allium*, durante muchos años se ha ido viendo y probando diferentes métodos de control para poder mantener las cosechas libres de la podredumbre blanca. Pero, como se ha podido observar, la columna principal que permite la expansión de la enfermedad y que está íntimamente relacionada con su incidencia en los cultivos son los esclerocios presentes en el suelo. debido a esto, se hace necesario que el método de control que vaya a ser utilizado tenga la capacidad de poder disminuir la densidad de esclerocios viables en suelo por medio de su destrucción ⁽⁴⁾.

Debido a esto, se han presentado diferentes métodos de control:

- **Sanitación:** Una forma de controlar la enfermedad es mediante el uso de semillas limpias y libres de la enfermedad; así como el uso de las buenas prácticas agrícolas las cuales tienen como finalidad el evitar lo más posible la expansión de enfermedades de una zona de cultivo a otro. Estos métodos de control sirven como forma de prevención de la enfermedad; pero llegan a ser inútiles para el tratamiento de un campo que ya ha sido infectado ⁽²⁰⁾.
- **Control cultural:** El control cultural consiste en la planificación del cultivo orientado a otras fechas que las usuales. Este método de control está

fundamentado en los requerimientos que tiene el hongo para poder atacar al cultivo. Consta en decidir cuándo es el inicio de la siembra en épocas donde la temperatura al ser mayor dificultaría el desarrollo de la enfermedad en los cultivos, permitiendo que estos puedan desarrollarse normalmente y que el porcentaje de incidencia sea menor. Este método de control, a pesar que llega a ser sencillo, es uno muy difícil de implementar debido a que se hace necesario el cultivar el ajo en épocas que no le corresponden. Causando a su vez que el producto baje en la calidad ya que se hace necesario tiempos fríos para una correcta maduración de los bulbos. En Arequipa la temperatura juega mucho en estos aspectos, debido a que las temporadas de frío, comunes en esta zona, permitan de todos modos el desarrollo de la enfermedad.⁽²⁰⁾.

- **Germinador de esclerocios:** El uso de estimulantes de germinación de esclerocios ha demostrado ser un buen método de control para campos infectados por ellos. Esto se debe a que durante su aplicación generan que los esclerocios despierten de su dormancia y germinen cuando el campo aún no está cultivado. Esta germinación de los esclerocios causa que estos no puedan encontrar ningún hospedero del cual puedan nutrirse para progresar y con ello llegan a perecer. Este método ha llegado a reportar una reducción del 90% de la viabilidad de los esclerocios en campo^(3,4,20,21,22).
- **Control químico:** Este método de control es el que comúnmente se suele usar con mayor frecuencia entre los agricultores para la mayoría de enfermedades y plagas. El control químico consta del uso de fungicidas que sean capaces de afectar a los esclerocios de la podredumbre blanca del ajo. Los productos recomendados para el tratamiento son: el trecubonazol, fludioxonil, y boscalid^(20,13,3,23,19,24).
- **Control biológico:** Este tipo de control hace referencia al uso de otros microorganismos u organismos que presenten algún tipo de efecto antagónico contra los esclerocios de la enfermedad. En este tipo de control vemos la implementación de métodos de control haciendo uso de hongos como *Trichoderma spp.* o de bacterias como es el caso de *Bacillus spp.*^(25,4,23,26,27,28,29,30,31).

3. *Sclerotium cepivorum*

El hongo *Sclerotium cepivorum* es el agente causal de la enfermedad de la podredumbre blanca del ajo. Es un hongo imperfecto de la división de los Basidiomicetos el cual, como se ha presentado en anterioridad, posee una serie de características que lo convierte como un agente patógeno resistente y específico para el cultivo del ajo. Este hongo fue descrito por primera vez en Inglaterra y en la actualidad los artículos más antiguos que describen a este hongo son los reportados por Mordue en 1976, ya con la denominación de *Sclerotium cepivorum*. Otra descripción más antigua del mismo microorganismo pero en la que es denominado como *Stromatinia cepivorum* es reportado por Whetzel en 1945.⁽³²⁾

3.1. Descripción Macroscópica y Microscópica

El hongo *Sclerotium cepivorum* fue descrito por Whetzel en 1945 detallando una serie de características macroscópicas y microscópicas que presenta el microorganismo cuando es cultivado in vitro en laboratorio. El hongo inicialmente al ser cultivado en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) presenta colonias de color blanco o ligeramente gris-café, con la generación de un micelio aéreo que puede presentar hifas tanto largas como cortas.⁽³²⁾

Las hifas generadas por el hongo presentan células con una pared fina y un denso contenido granular. Las dimensiones observadas son de 9 a 14µm de ancho y la punta de las hifas puede presentar entre 300 a 400 µm de largo; además de mostrar ramificaciones que pueden ser dicotómicas luego del primer septo. Las células subsiguientes a las apicales presentan dimensiones menores a estas, presentando 30 a 100 µm de largo además de ser más angostas conforme se van generando más ramificaciones⁽³²⁾.

Además de las hifas, el hongo *Sclerotium cepivorum* posee como estructura de reproducción a los esclerocios, los cuales son estructuras generadas en la superficie de la colonia de coloración negra, semiesféricos y con un ancho entre 200 a 500 µm. Estos esclerocios se encuentran compuestos por una corteza diferenciada que

posee una pared dura y pigmentada, un córtex angosto de 2 a 3 células, casi isidiométricas y de pared delgada, y una médula compuesta por hifas ramificadas entrelazadas. Estas hifas presentes dentro del esclerocio son de un grosor de 4 a 12 μm con paredes hialinas y moderadamente finas (0,5-1,5 μm)⁽³²⁾.

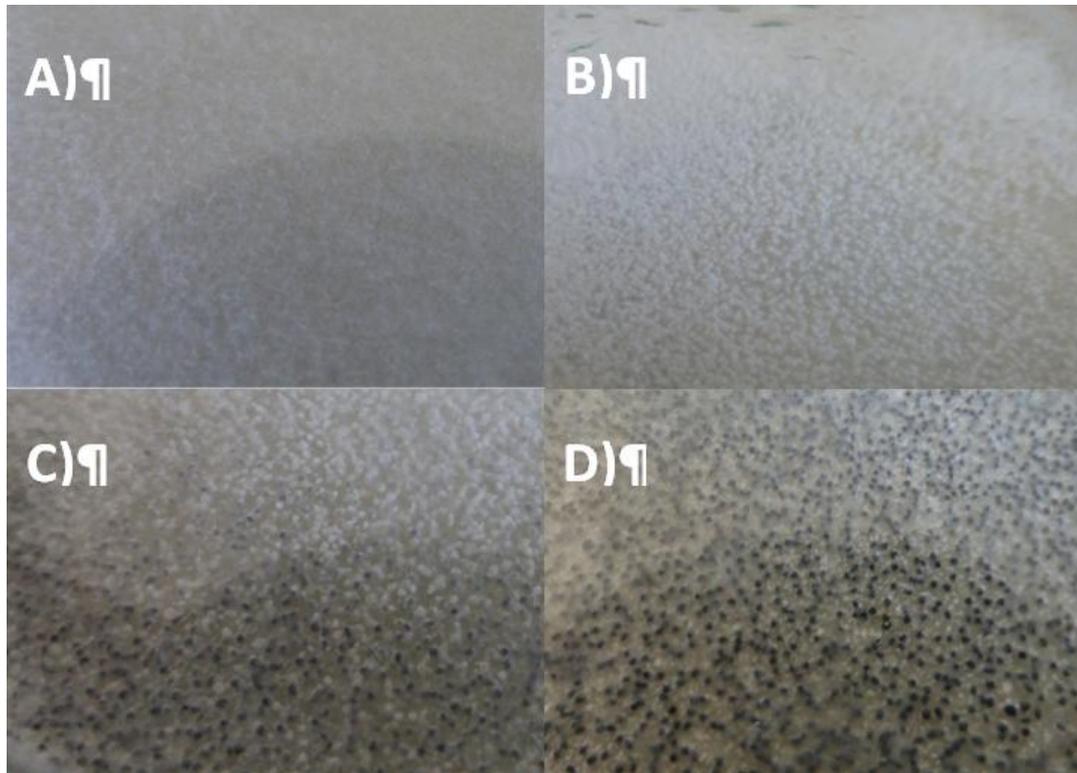


Figura 9. Cultivo del hongo *Sclerotium cepivorum* en diferentes etapas de su crecimiento: A) El hongo inicialmente presenta micelio blanco. B) Empieza la formación de esferas blancas a partir del micelio. C) Transformación de las esferas blancas a los esclerocios de color negro. D) Esclerocios formados en toda la superficie de la colonia.

3.2. Crecimiento del microorganismo

El tipo de crecimiento del hongo *Sclerotium cepivorum* es lento y depende mucho de la velocidad de germinación de los esclerocios ya que estos normalmente pueden entrar en un periodo de dormancia dependiendo del tiempo que han tenido para madurar. Esta dormancia puede ser rota por medio de un periodo de congelamiento a -22°C ⁽³⁾.

Los esclerocios del hongo, cuando germinan, lo hacen de forma eruptiva o micelológica. El proceso se da primero por la aparición de una protuberancia en la

superficie del esclerocio, de donde luego la cápsula que recubre al esclerocio se quiebra y empieza a liberar uno a más tapones grandes y densos de micelio; de donde las hifas surgen para comenzar a crecer y ramificarse ⁽⁴⁾. Este proceso únicamente sucede con el estímulo adecuado para los esclerocios, el cual es el estar en presencia de las sustancias volátiles como los sulfuros de n-propil y alil cisteína. Estos son producidos a partir de exudados de la raíz de las especies del género *Allium* y que están compuestos de sulfóxidos de alkyl y alkenyl-cisteína. Para poderse generar con éxito la estimulación con estos compuestos, el esclerocio necesita estar expuesto al menos por 15 minutos para comenzar a ser estimulado y encontrarse en un área de 10 cm de distancia y 30 cm de profundidad desde la raíz. La concentración de estos compuestos también debe ser media ya que la exposición a concentraciones de 2.5% de alil sulfuro genera una germinación del 100% mientras que una concentración del 20% reduce la germinación hasta un 47% ⁽⁴⁾

A pesar del estímulo que requieren los esclerocios para germinar, el hongo presenta diferencias entre su crecimiento óptimo in vitro y su crecimiento óptimo como parásito. Se ha reportado que una temperatura adecuada para el crecimiento del hongo es a 20°C, mientras que para que el hongo pueda generar la enfermedad y actuar como parásito en el bulbo del ajo se hace necesaria una temperatura entre 13°C a 18°C. ^(3,4,32).

Además de la temperatura, el *Sclerotium cepivorum* necesita de condiciones adecuadas de humedad y acidez para poder actuar exitosamente sobre un cultivo. En el caso de la humedad se ha observado que la tierra necesita presentar una cierta humedad continua lo cual se ve favorecido por la presencia de materia orgánica en el suelo ⁽³²⁾; sin embargo un exceso de humedad en suelo puede llegar a causar problemas para que la enfermedad se desarrolle. En los suelos secos (40% de humedad) la enfermedad lograba desarrollarse, mientras que suelos húmedos (60-80% de humedad) presentaban menor incidencia la enfermedad ⁽⁴⁾. En el caso de la acidez, el nivel adecuado es de pH 4.8 aunque se ha reportado que en suelos con infección se suelen observar la presencia de una acidez de 5 a 7 de pH, mientras que en tierras en las que hay una infección alta del cultivo se ha llegado a obtener resultados de pH 8 ⁽⁴⁾.

3.3. Mecanismo de infección

Una vez germinadas las hifas de *Sclerotium cepivorum*, estas comienzan a penetrar el tejido radicular del *Allium* que vayan a infectar mediante el uso de estructuras especiales conocidas como apresorios que tienen la función parasítica ⁽³²⁾.

Una vez el hongo haya logrado penetrar en el tejido, comienza a crecer intracelularmente e intercelularmente entre las células parenquimales, buscando de ese modo expandirse y ramificarse para posteriormente comenzar a desintegrar el tejido cortical; y finalmente invadir el tejido vascular y macerarlo. Durante esta maceración se inicia la producción de enzimas encargadas de la degradación de la pared celular, las cuales son principalmente poligaracturonasas (PG) y pectintranseliminadas. Además de la producción de estas enzimas, el hongo comienza a generar la fitotoxina (ácido oxálico) que actúa en sinergia con la enzima poligaracturonasa, puesto que la fitotoxina se encarga de quelar los iones Ca^{2+} y regular el pH del entorno hasta el punto óptimo para que se pueda dar la reacción enzimática. Obteniendo como resultado que en el tejido del hospedero se produzca una pudrición suave que es característica de la enfermedad de la podredumbre blanca ⁽⁴⁾.

4. CONTROL BIOLÓGICO

Se puede definir al control biológico de dos modos: como la forma de controlar plagas y/o enfermedades mediante el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de la plaga a niveles menores ⁽³³⁾ o como los intentos del ser humano en restablecer un ecosistema mediante la introducción de agentes vivos o productos bioquímicos para cambiar el balance en favor del hospedero ⁽³⁴⁾.

Para conseguir este control biológico, se hace uso de agentes depredadores, parasitarios o patogénicos que sean capaces de reducir la población objetivo. En el caso del control biológico de enfermedades, la finalidad es que se pueda evitar el proceso de la enfermedad o al menos se mantenga el cultivo en un nivel por debajo del nivel de daño económico ⁽³⁵⁾.

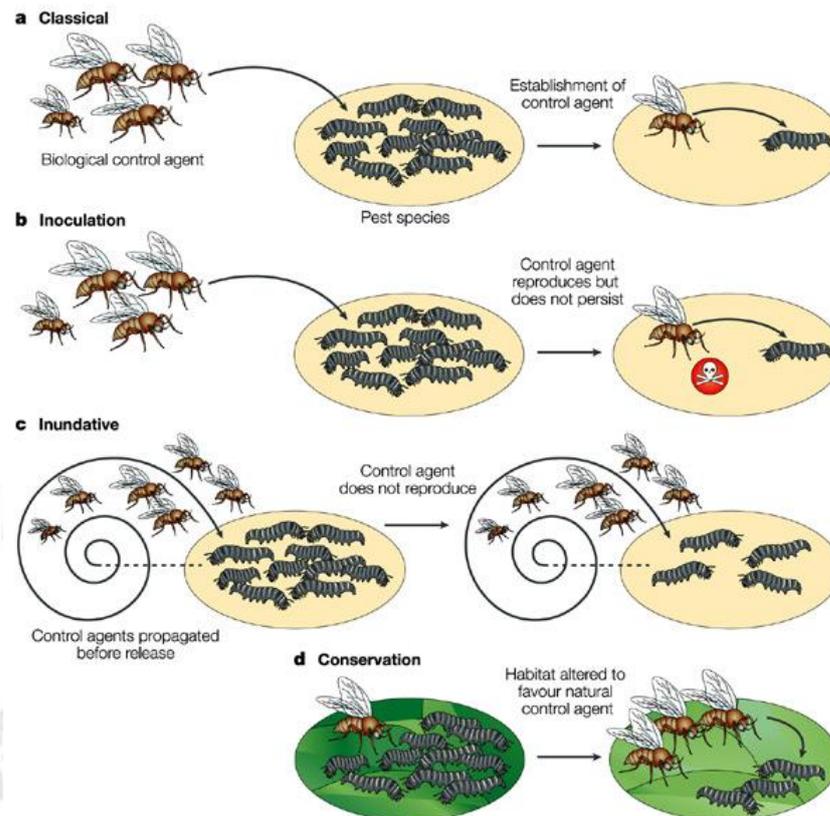


Figura 10. Tipos de control biológico ⁽³⁶⁾. (Fuente: Roderik & Navajas, 2003)

4.1. Tipos de Control

Dentro del área de los controladores biológicos, existen diferentes tipos de controles biológicos los cuales se diferencian por su objetivo, diseño, proyección y el tipo de agente controlador que se utiliza en su aplicación. Cada uno de estos tipos de control biológico ha ido naciendo conforme se ha ido desarrollando el área y progresando en el conocimiento de los mecanismos de los agentes controladores, de las enfermedades y las plagas en el ecosistema del cultivo ^(33,37).

Los tipos de controles biológicos son:

- **Control biológico clásico:** El control biológico clásico es aquel que se basa en la importación y liberación de nuevas especies depredadoras naturales; con la finalidad de reducir o controlar a una especie normalmente una

especie invasora, para así mantener un equilibrio en un ecosistema. Este método de control se caracteriza por aplicarse normalmente en sistemas ecológicos grandes y por tener resultados paulatinos, pero de una duración amplia y duradera ⁽³³⁾.

- **Control biológico aumentativo:** El control biológico aumentativo es aquel que se basa, al igual que el control biológico clásico, busca la importación y liberación de especies depredadoras naturales. Pero, hace uso de agentes controladores producidos, normalmente de forma comercial, para la supresión de plagas en zonas pequeñas como invernaderos o cultivos ⁽³³⁾.
- **Control biológico conservador:** El control biológico conservador consta de un método de control biológico basado en la modificación del ambiente o de las prácticas agronómicas utilizadas en un cultivo, con la finalidad de poder aumentar la eficacia de los enemigos naturales de las plagas a tratar. Este tipo de control biológico dentro del área es relativamente nuevo y sigue en etapas de investigación y experimentación, ya que es necesario un mejor conocimiento de las relaciones e interacciones de los agentes con sus ambientes, especialmente para casos de policultivos que es en lo que más se centra este tipo de control, para así poder diseñar un mejor sistema que pueda aumentar la eficacia de los controladores ⁽³⁷⁾.
- **Biopesticidas:** Los biopesticidas se trata de otro tipo de control biológico basado en la liberación en masa de enemigos naturales para ejercer un control sobre la población de las plagas o patógenos. En este tipo de control biológico no llega a persistir en grandes cantidades la población de agentes controladores. Este tipo de control biológico está más enfocado a la reducción de la población existente de una plaga o un patógeno durante un tiempo determinado ⁽³⁷⁾.

4.2. Características de un agente controlador

Para la aplicación de un control biológico a una zona de cultivo se hace indispensable que se pueda contar con un organismo el cual sea predador o

patógeno natural de una población objetivo que se desee reducir. Para que un controlador biológico pueda ser aplicado en un sistema ecológico, se hace necesario que el agente controlador posea ciertas características que le permitan adecuarse al tipo de control que se requiera.

Una de las características principales y necesarias para que un organismo pueda ser un agente controlador, es la capacidad de tener una interacción antagónica con la población a controlar, ya que de otro modo este no serviría para el objetivo principal del control biológico ⁽³⁷⁾. También el agente controlador debe ser un organismo el cual, a pesar de tener la capacidad de actuar como antagonista para el organismo objetivo, no sea ningún tipo de amenaza para la población que se busque proteger; ni que represente un impacto negativo para el ecosistema en donde este sería liberado ⁽³⁷⁾.

Además de las características principales que debe poseer un controlador biológico para poder actuar como tal y de manera correcta; el agente puede poseer otros tipos de características. Estas características secundarias tienen como función principal el poder apoyar y aumentar la eficacia del efecto controlador del agente sobre la población objetivo. Dentro de este tipo de características secundarias se puede desglosar capacidades como son: resistencias naturales del agente, mecanismos que le permitan perdurar en el ecosistema liberado, capacidad de subsistir dentro de un hospedero en relación simbiótica, la capacidad de fortalecer al organismo que se busca proteger, estimular las defensas del organismo protegido y el facilitar su desarrollo y fortalecimiento, y la capacidad de ejercer un mecanismo especial de antagonismo. Como puede ser un mecanismo de hiperparasitismo, competencia de nicho, secreción de metabolitos dañinos, etc. ⁽³⁴⁾

4.3.Mecanismos de control

Para que un organismo pueda actuar como un controlador biológico, una de las principales características que debe poseer es la capacidad de poder tener una relación antagónica con otro organismo específico que se busque regular. El antagonismo es como se denomina a un grupo de interacciones que pueden existir entre el agente controlador y el organismo a controlar dentro de las cuales se puede

contemplar las siguientes interacciones: la competencia entre los microorganismos en el ecosistema, antibiosis causada por la expulsión de sustancias perjudiciales para el organismo que se desee controlar o el hiperparasitismo que consta de la capacidad de parasitar a un organismo que también es un parásito ⁽³³⁾.

4.3.1. Competencia exclusiva

Se define como competencia exclusiva al principio ecológico que indica que las especies que se encuentran compitiendo por un mismo recurso de su entorno no pueden coexistir cuando todos los factores son constantes ⁽³⁴⁾. Este mecanismo de control es uno de los más importantes y trascendentes en los sistemas de control que emplean a microorganismos; debido a que, una competencia por un nutriente específico puede ayudar mucho a la especificidad del control biológico y, de este modo, tener la seguridad que el control será específicamente contra la población objetivo ⁽³⁴⁾.

4.3.2. Antibiosis

Se define como antibiosis a la interacción antagónica entre dos organismos donde el desenlace de la misma es el favorecimiento de uno en comparación con el otro lo cual es determinado por un compuesto bioactivo el cual afecta al organismo desfavorecido según Lazarovitis et al. ⁽³⁴⁾. Este tipo de mecanismo es un ejemplo de alelopatía que usualmente se aplica para describir a la interacción antagonista entre plantas a través de la producción de químicos fitotóxicos. Este tipo de mecanismos se puede dar de varias maneras como puede ser desde la producción de antibióticos como también la producción de proteínas que puedan limitar la disponibilidad de un nutriente escaso como puede ser el hierro en la tierra.

4.3.3. Hiperparasitismo

El mecanismo de hiperparasitismo hace referencia a la interacción entre dos organismos los cuales ambos son parásitos. En la interacción sucede un

parasitismo de parte de uno de los microorganismos que se le denominaría “hiperparásito” contra el otro organismo que actuaría como hospedero ⁽³³⁾.



Figura 11. Antibiosis entre *Penicillium* spp. y *Staphylococcus aureus* ⁽³⁸⁾. (Fuente: Case, 2015)

En este tipo de antagonismo se pueden ver casos como el del género *Trichoderma* en la cual es común que sus integrantes tengan este tipo de interacción con un amplio espectro de hongos, razón por la cual se le denominan normalmente micoparásitos. Para poder ejecutar esta interacción el género *Trichoderma* presenta características como son la generación de enzimas o la generación de estructuras secundarias que le permiten desempeñar esta función en el ecosistema del suelo ⁽³⁹⁾.

4.4.Evaluación del Antagonismo

Así como existen diferentes tipos de interacciones de antagonismo entre los microorganismos, también existen diferentes criterios de calificación para los niveles de antagonismo. Estos niveles pueden ser cualitativos o cuantitativos.

Cualitativamente, el antagonismo puede ser calificado mediante el uso de criterios observables de manera macroscópica o mediante el tipo de reacciones que se dan durante las interacciones.

Los criterios observables de manera macroscópica, presentados por Johnson et al.⁽⁴⁰⁾, son los siguientes:

- Zona de inhibición desarrollada entre dos colonias. El antagonista puede continuar, o no, su crecimiento. Si el crecimiento del antagonista se detiene puede significar un antagonismo mutuo.
- Después de encontrarse, las hifas del organismo problema comienza a decaer y desintegrarse, mientras que el antagonista puede continuar avanzando.
- Parasitismo de las hifas por parte del antagonista.
- Aplastamiento de las colonias del microorganismo problema en las zonas cerca del antagonista.
- Impedimento visible del crecimiento de la colonia del microorganismo problema, en comparación del control negativo.

Dentro de estos criterios también existen diferentes tipos de reacciones; tal y como las que son propuestas por Johnson et al⁽⁴⁰⁾:

- Los dos microorganismos crecen combinándose. (No existe el antagonismo)
- Un organismo es inhibido al contacto; la otra colonia continúa creciendo, igual o más lentamente, a través de la colonia inhibida.
- Inhibición mutua en contacto. E puede observar un pequeño espacio entre las dos colonias inhibidas.
- Inhibición de uno de los organismos a distancia. El antagonista continúa creciendo a través de la zona libre del medio.
- Inhibición mutua a distancia.

Para el caso de la cuantificación del antagonismo, se puede utilizar el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial; cuya fórmula es utilizada por Ezziyani et al⁽⁴¹⁾; Trigiano et al⁽⁴²⁾; Sajid & Bihar⁽⁴³⁾ y Astorga-Quirós et al.⁽⁴⁴⁾.

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

R_1 = Crecimiento Radial del Patogeno en el Testigo

R_2 = Crecimiento Radial del Patogeno en el Tratamiento

4.5.Importancia

Como señala Lazarovits et al. ⁽³⁴⁾, el control biológico es una función integral de todo sistema ecológico existente en el planeta; por consiguiente se podría considerar que el control biológico es una restauración del balance de un ecosistema con la finalidad de poder beneficiar a un organismos dentro del sistema.

El control biológico se ha ido presentando como una propuesta creciente para un nuevo tipo de agricultura. La presión de una sociedad creciente en el tiempo solicita una mayor producción; pero, con un rechazo al uso indiscriminado de pesticidas y daño al medio ambiente. Por otro lado, el desarrollo del control biológico en la agricultura, ofrece una variedad creciente de soluciones amigables con el ambiente, específicas y duraderas para los problemas de patógenos y pestes que amenazan la producción agrícola y también ofrece una mayor reducción de costos conforme el control va siendo aplicado.

5. GÉNERO *Trichoderma*

El género *Trichoderma* abarca un gran grupo de hongos miceliares y cosmopolitas. Este género, en el ecosistema del suelo, es un componente prevalente y capaz de crecer en un amplio rango de climas. Esta supervivencia se debe a la gran variedad existente en este género y también a la gran capacidad reproductiva y competitiva que presenta en la naturaleza ⁽⁴⁵⁾.

Los microorganismos de este género se caracterizan por atacar a diversa materia orgánica debido a su actividad degradativa originada por la variedad de enzimas y metabolitos secundarios que producen naturalmente. Gracias a estas características se ha logrado identificar una variedad de especies que son actualmente utilizadas en

el control biológico de campos de cultivo y que sirven como promotores de crecimiento para los cultivos ⁽⁴⁶⁾.

5.1.Descripción Macroscópica y Microscópica

Al género *Trichoderma* se le puede describir macroscópicamente como una colonia de crecimiento rápido, cuyo rango ideal de temperatura es de 25 a 30 °C. Para su caracterización se recomienda el uso de medios como el “Cornmeal Agar” o el agar PDA (Potato Dextrose Agar). En el primer medio de cultivo se puede observar al *Trichoderma* crecer como una colonia transparente, mientras que en el segundo se puede ver el crecimiento como el de una colonia blanca ⁽⁴⁶⁾.

El crecimiento miceliar del hongo puede ser inicialmente sumergido y conforme las colonias van madurando va apareciendo un crecimiento aéreo que puede ser floccoso, algodonoso, aracnoide o mate dependiendo de la cepa y el cultivo que se le ha dado. Además, la colonia presenta como característica un micelio vegetal incoloro, aunque en algunos casos se puede dar la secreción de metabolitos. El género también se caracteriza por despedir un aroma propio descrito como a coco o dulce ⁽⁴⁷⁾.



Figura 12. Imagen microscópica de *Trichoderma* spp.

La descripción microscópica del género *Trichoderma* se caracteriza por una conidiación difuminada o aglomerada generando pústulas que normalmente son de

una coloración verdosa; también pueden presentarse de color blanco, gris o café. El hongo presenta conidióforos que tienen un axis principal en intervalos regulares, normalmente con ramas sucesivas apicales y distales que progresivamente se van acortando y acercando. Estas ramificaciones son más o menos divergentes, solitarias, emparejadas o en verticilos. Cuando son verticilos muy repetitivos la estructura termina siendo una estructura piramidal altamente ramificada⁽⁴⁷⁾.

En las estructuras conidiogénicas, se puede observar la presencia de fiálides dispuestas normalmente en verticilos terminales divergentes en ramas del conidióforo. Se pueden observar la presencia de conidios y clamidosporas. Los conidios son unicelulares, verdes o incoloros, de pared lisa o rugosa; y estos se acumulan en las cabezas de las fiálides, a veces incluso, en sacos. Las clamidosporas se presentan usualmente y muchas veces abundan en el micelio sumergido, con paredes gruesas y con la presencia de pigmentación en algunos casos⁽⁴⁷⁾.

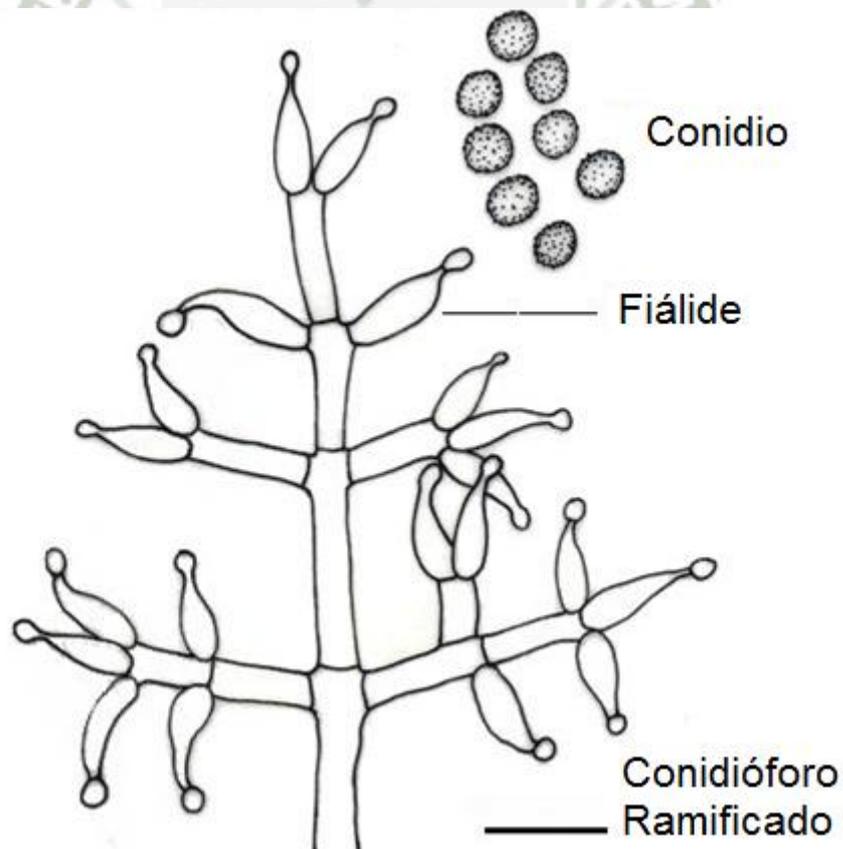


Figura 13. Esquema de un *Trichoderma* spp. (Fuente: Universidad Masaryk)

5.2. Crecimiento del microorganismo

En los requerimientos necesitados por los hongos del género *Trichoderma* se puede observar una serie de diferencias en su crecimiento ideal, las cuales varían entre las especies según su comportamiento y requerimientos. Uno de los requerimientos comunes en el género para un crecimiento es el medio de cultivo utilizado. En un medio pobre, como es el caso de los medios papa-zanahoria agar, las hifas tienden a ser tan finas que se destruyen con facilidad; en cambio, en un medio rico, como el PDA o cornmeal agar, se permite la generación de estructuras más sólidas y posibles de identificar con facilidad ⁽⁴⁷⁾.

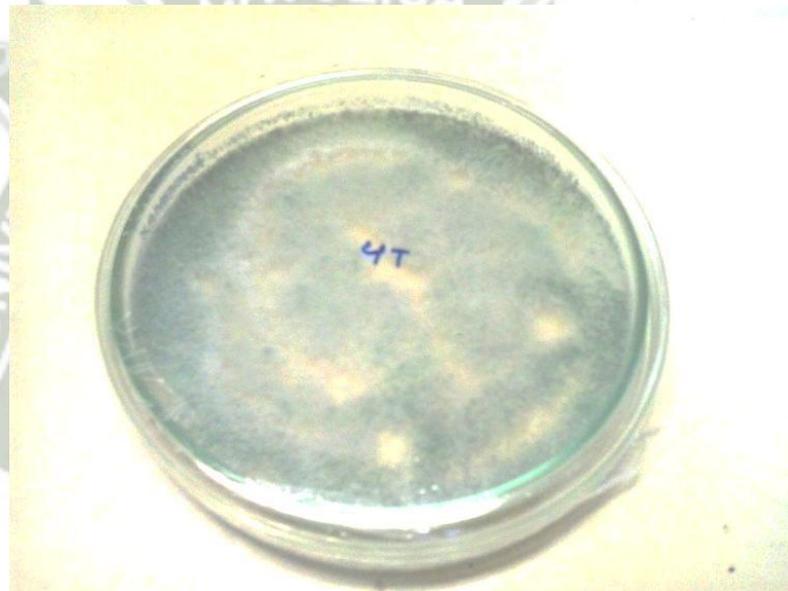


Figura 14. *Trichoderma* spp. cultivado en PDA (Potato Dextrose Agar)

Además del medio adecuado para el crecimiento del organismo y las funciones que se deseen que se cumplan con él, también se debe considerar la temperatura y fotoperiodo requerido por el hongo. Para la mayoría de los hongos del género se ha observado un requerimiento de 20 a 25°C de temperatura para un crecimiento adecuado; pero, a partir de los 30°C el hongo deja de crecer. Además, se hace necesario un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad para un óptimo desarrollo de la conidiogénesis; si no, el hongo puede llegar a no producir ninguna conidia o en muy baja cantidad ⁽⁴⁷⁾.

5.3.Parasitismo

El parasitismo es otro mecanismo importante que se utiliza con frecuencia en el control biológico. Es un mecanismo muy común que se observa en las interacciones del género *Trichoderma* frente a otras especies fúngicas. El hongo normalmente en el ecosistema del suelo, se suele observar como parásito de otros hongos; especialmente en estructuras colonizadas como son esclerocios. El hongo también se puede presentar como patógeno de hongos superiores como es el caso del moho verde en el cultivo de champiñones. Por este motivo, el género *Trichoderma* es muy apreciado como un controlador biológico, además de otros mecanismos que posee según especie que pueden otorgar mayores beneficios al cultivo.

Este mecanismo consta de un proceso en el que se percibe al hospedero u organismo objetivo y se direcciona el crecimiento hacia este. Cuando se realiza el contacto entre las hifas del hongo, se reconoce, se acopla, penetra y posteriormente sale ⁽⁴⁸⁾. Para que se pueda realizar este proceso, se incluye dentro del mecanismo de infección la participación de una serie de enzimas líticas que cumplen la función de degradar las estructuras protectoras del hospedero, de esta forma puede obtener el ingreso con mayor facilidad y posteriormente proseguir con la invasión del organismo huésped ⁽⁴⁹⁾.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

1. PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La planificación de la investigación se realizó tomando en consideración los cuatro objetivos específicos presentados en el trabajo de investigación. Para cada objetivo específico se diseñó una secuencia de metodologías, con la finalidad de cumplir con el mismo. Como se observa en la Figura 15, en un Diagrama de Flujo se organizó las diferentes metodologías propuestas por el trabajo de investigación, de manera secuencial o simultánea para la culminación de cada uno de los objetivos específicos propuestos.

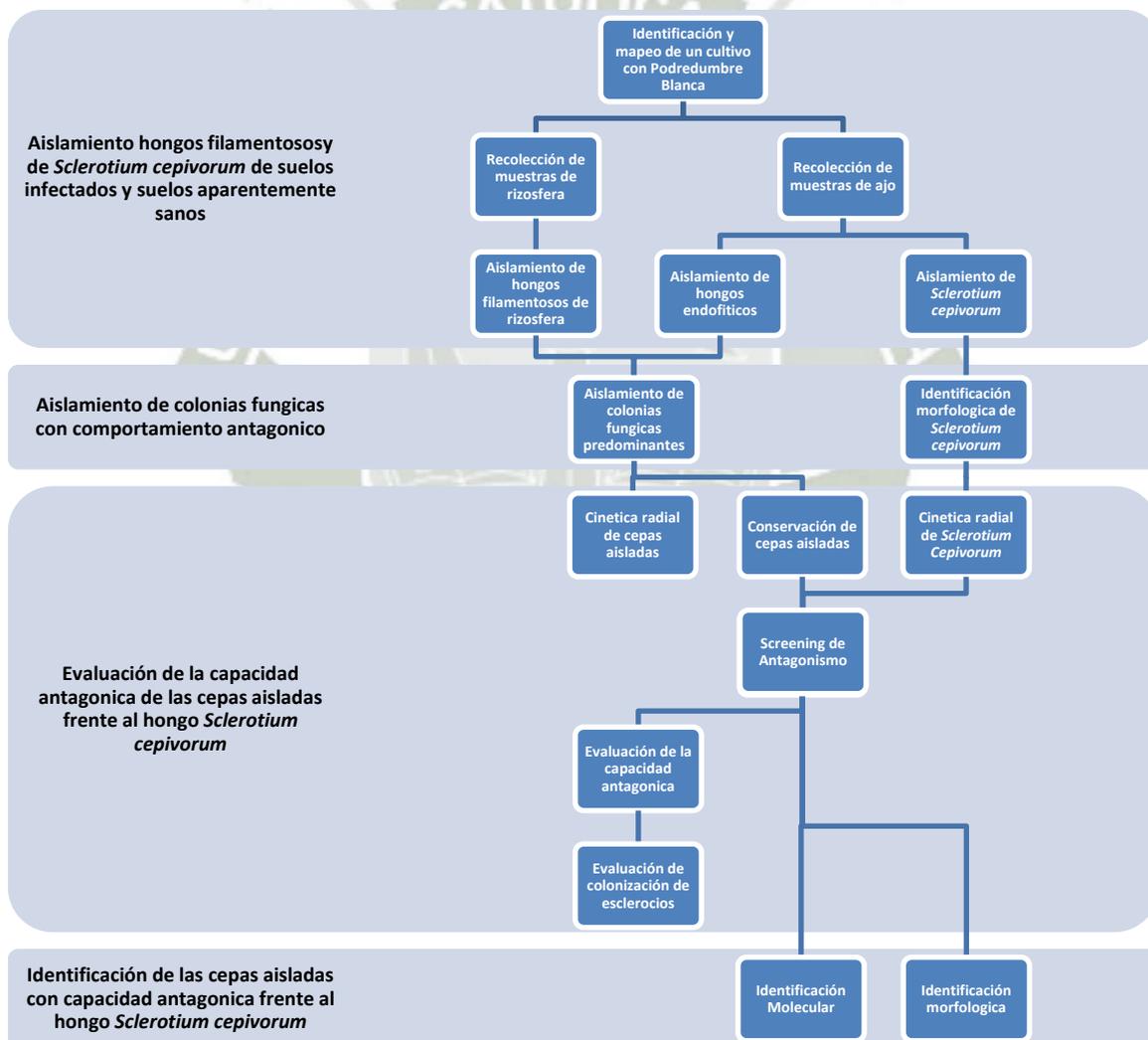


Figura 15. Diagrama de Flujo del procedimiento experimental

2. MATERIALES

2.1 Material biológico

Tierra Agrícola obtenida durante el muestreo realizado en la primera etapa de la investigación. Esta tierra debe ser perteneciente a la rizosfera de una planta de ajo.

Plantas de ajo obtenidas durante el muestreo realizado en la primera etapa de la investigación. Esta planta de ajo debe ser extraída con cuidado y procurando no perturbar su rizosfera ni su tejido radicular.

Esclerocios del patógeno de la Podredumbre Blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum*).

2.2 Equipos

- Autoclave Brinkman
- Balanza analítica Ohaus Pioner
- Esterilizadora JP Selecta 2000210
- Incubadora JP Selecta 2000210
- Microscopio Infinita Leo/LABOME

2.3 Instrumentos de laboratorio

- Asa de Digralsky
- Asas bacteriológicas
- Equipo de disección
- Mortero
- Pinzas de punta curva
- Pipetas pasteur descartables (1ml)
- Tubos Eppendorf
- Vernier de medición

2.4 Material de vidrio

- Balón de 1000ml
- Luna de reloj
- Matraz de 100ml
- Matraz de 250ml
- Placas Petri 100*15mm
- Placas portaobjetos
- Tubos de ensayo 13*100mm

2.5 Reactivos Químicos

- Agua desionizada
- Bacto-Agar - Difco ®
- Cloruro de Potasio (KCl) - (RA / PA)
- Etanol al 70%
- Extracto de levadura - Bacteriológica
- Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) - (RA / PA)
- Hipoclorito de sodio al 1.2%
- Nitrato de sodio ($NaNO_3$) - (RA / PA)
- Peptona - Bacteriológica
- Sílica gel con indicador
- Sulfato de Hierro ($FeSO_4 \cdot H_2O$) - (RA / PA)
- Sulfato de Magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) - (RA / PA)

2.6 Otros Materiales

- Alcohol comercial
- Algodón
- Azúcar comercial
- Azul de Lactofenol
- Banderas rojas 30*20cm
- Bolsas de Polietileno

- Cinta Adhesiva
- Estacas de Madera 2m de alto
- Hilo de Nylon
- Hoja de bisturí
- Malla de Nylon
- Mechero
- Pala de Jardinería
- Papel aluminio
- Papel Craft
- Papel filtro Whatman N°4
- Parafilm
- Sobres de papel Craft
- Recipiente plástico

3 METODOLOGÍA

3.1 Aislamiento de hongos filamentosos de la rizosfera y endófitos

3.1.1 Ubicación

El presente estudio se realizó en el laboratorio de genética de la Escuela Profesional de Biología en la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA) ubicada en Cercado, Arequipa (Perú) y en el laboratorio de investigación del CICA en la Universidad Católica de Santa María (UCSM) ubicada en Umacollo, Arequipa (Perú).

3.1.2 Lugar de obtención de la muestra

Los trabajos de muestreos se realizaron en campos de cultivo de ajo ubicados en Sachaca, Arequipa (Perú). Estos campos de cultivo se seleccionaron por medio de diálogo directo con el dueño de los mismos y presentación del proyecto de tesis como forma de control para el problema de la enfermedad de la podredumbre blanca presentada en sus cultivos.

3.1.3 Selección de las zonas de muestreo

Para la selección de las zonas de muestreo se realizó un reconocimiento de la zona como lo recomienda V. Hue et al ⁽⁵⁰⁾; esto se realizó con el motivo de poder identificar y delimitar zonas con diferentes condiciones y características percibibles desde la perspectiva del suelo.

Para el reconocimiento de la zona se hizo uso del servicio online Google Maps, para poder ubicar la locación de la zona de muestreo. Luego se complementó con la consulta verbal a jornaleros de dicha zona, para así poder identificar cada una de las zonas diferenciables dentro de la locación (Anexo 2).

Una vez obtenido un mapa delimitado con las zonas de interés para la investigación y las zonas en donde se pudo identificar la presencia de interferentes, se procedió a realizar una sectorización de la zona de interés mediante el empleo de una grilla según indica D. Pennock & T. Yates ⁽⁵¹⁾. La grilla se utilizó posteriormente para asignar números a cada uno de los sectores generados y luego seleccionar al azar veinte sectores donde se realizaría el muestreo.

3.1.4 Muestreo de tierra de rizosfera y plantas de ajo

Para el muestreo de tierra de rizosfera y plantas de ajo se realizó un único proceso, en el cual se recolectó una planta de ajo completa junto con tierra de su rizosfera. Este muestreo tuvo como razón la reducción de muestras totales a recolectar, además de poder preservar el ecosistema de la rizosfera por un periodo más prolongado en comparación de la separación de la planta de la tierra de su rizosfera y su ecosistema.

Para ello se recolectaron veinte muestras en total de los sectores seleccionados por aleatoriedad. Estas muestras constaron de un peso aproximado de 200 a 300g de suelo de rizosfera junto con la planta de ajo, las que posteriormente se

colocaron en bolsas de plástico limpias. Se llevó a laboratorio y se mantuvo en ambiente frío hasta su tratamiento ⁽⁵¹⁾.

3.1.5 Método de trampeo de esclerocios

El muestreo de microflora antagonista se realizó mediante el uso del trampeo de esclerocios utilizado por Granados & Wang ^(4,13), se hizo uso de esclerocios del hongo de la enfermedad (*Sclerotium cepivorum*).

Para ello se recolectó de un ajo enfermo, un total de 750 esclerocios del patógeno. Con estos esclerocios se confeccionaron 10 bolsas de malla de nylon conteniendo dentro de cada una 75 esclerocios. Estas bolsas con esclerocios se ataron con un hilo de nylon a una estaca de 2 metros de alto. La estaca llevaba como marca una bandera roja atada en la punta superior, mientras que las bolsas de esclerocios se ataron con un hilo de nylon cerca de la punta inferior de la estaca (Anexo 3). Se realizó una marca a una distancia de 15 cm desde la punta inferior de la misma; esta sirvió para poder tener una marca referencial al momento de enterrar las estacas ⁽¹³⁾.

Estando las estacas ensambladas, se procedió a enterrar las bolsas con esclerocios. Para ello se realizó un agujero en la tierra, en una ubicación lo más cercana posible a plantas de ajo. Se procuró que tuviese una profundidad aproximada de 15 cm para que de este modo la bolsa con esclerocios se pueda encontrar a una profundidad entre 10 y 20 cm desde la superficie; como lo reporta Granados & Wang ⁽¹³⁾. Posteriormente se enterró la estaca en el agujero y procurando que permanezca firme en su ubicación. Estas estacas con los esclerocios se dejaron durante un mes; luego se desenterraron para recuperar las bolsas con esclerocios y éstas sean trasladadas al laboratorio para su tratamiento inmediato.

3.2. Aislamiento de hongos filamentosos

Para el aislamiento de hongos filamentosos se realizó cuatro metodologías diferentes; ello con la finalidad de poder aislar el mayor número posible de

microorganismos presentes en las muestras recolectadas. Las metodologías empleadas fueron: el cultivo de dilución en placa, cultivo de triturado de raíz, cámara húmeda y lavado de esclerocios.

3.2.1 Dilución en placas

Este primer método se hizo según la metodología de dilución de placas presentada por Granados & Wang⁽¹³⁾, la cual tiene como objetivo el aislamiento de microorganismos presentes en la rizosfera de la planta de ajo. Para ello se tomó un gramo de la muestra de tierra de la rizosfera, previamente homogenizada y procurando evitar la presencia de rocas. Luego se mezcló el gramo de tierra con 9 ml de agua peptonada al 0.1% estéril y se agitó vigorosamente. A partir de esta primera dilución de 10^{-1} g/ml de concentración, se continuo realizando diluciones seriadas en tubos con 9 ml del agua peptonada al 0.1% estéril hasta llegar a la dilución de 10^{-4} g/ml de concentración. Todo el procedimiento de dilución seriada se ejecutó en la presencia de dos mecheros y en una cámara estéril.

Luego de haber realizado las diluciones seriadas consecutivas, se procedió a realizar la dilución en placa. Para ello se tomó placas Petri descartables y un balón con agar Cezapeck (Anexo 1) tibio suplementado con 1g de extracto de levadura, se fue agregando a cada placa Petri, estando en todo momento cerca de los mecheros, 1ml de la dilución 10^{-4} . Se agregó el agar Cezapeck tibio y se agitó suavemente para mezclar el contenido. Cada una de las placas se dejó gelificando en presencia de los mecheros y finalmente se sellaron con plastigraf. Se llevaron a incubación de 25°C hasta observar algún tipo de crecimiento. Por cada muestra se realizó tres placas de cultivo con la finalidad de poder obtener la mayor cantidad de microorganismos aislados.

3.2.2 Cultivo de triturado de raíz

Este método se realizó con la finalidad de poder aislar microorganismos endófitos presentes en la raíz de la planta de ajo. Para esto se siguió la metodología presentada por Hye Ji et al.⁽⁵²⁾. Se recolectó del bulbo de la planta

tres raíces intactas; luego se procedió a realizar una desinfección superficial de las mismas en presencia de dos mecheros y en un ambiente estéril. Para la desinfección de las raíces primero se les lavó y dejó reposar en etanol al 70% durante un minuto, posteriormente se lavó en una solución de hipoclorito de sodio al 1.2% (w/w) y finalmente se le dio tres lavados con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas las raíces de ajo, se las llevó a un mortero (desinfectado con etanol al 70% y flameado). Se trituró las raíces y el producto se llevó a un tubo con 9ml de agua peptonada 0.1% estéril. La mezcla del triturado con el agua peptonada se agitó vigorosamente y se repitió el cultivo por dilución presentado en la metodología de dilución en placas.

3.2.3 Cámaras húmedas

La metodología de cámara húmeda es una metodología típica del área de fitopatología expuesta por Agrios ⁽⁵³⁾. Esta consta en la conformación de un ambiente húmedo que propicie el surgimiento de organismos fúngicos parásitos presentes en un tejido vegetal infectado.

Para la ejecución de este método se seleccionó tres raíces del bulbo de la planta del ajo las cuales se desinfectaron con la misma secuencia de desinfección superficial presentada en la metodología de cultivo de triturado de raíz. Una vez realizada la desinfección superficial, las raíces desinfectadas se les laceró la superficie con la ayuda de un bisturí y se les colocó dentro de una placa Petri estéril. Finalmente las placas fueron colocadas dentro de un recipiente cerrado el cual lleva en el fondo papel o algodón húmedo. Se selló el segundo recipiente para mantener la humedad en el interior ⁽⁵³⁾ r.

3.2.4 Lavado de esclerocios

La metodología utilizada en este caso fue la técnica empleada por Granados & Wang ⁽¹³⁾ modificada. Esta metodología tuvo como objetivo el aislamiento de

cepas microbianas que hayan logrado colonizar los esclerocios dejados bajo tierra durante la metodología del trampeo de esclerocios.

Para la ejecución de este método se apertura las bolsas de esclerocios recolectadas. Los esclerocios obtenidos se colocaron en tubos Eppendorf con 1 ml de agua destilada estéril peptonada 0.1% estéril en presencia de un mechero y en un ambiente estéril. Posteriormente, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se agitó vigorosamente la mezcla de esclerocios con el agua peptonada. Posteriormente se tomó una alícuota de 0.5ml del lavado y se utilizó para realizar el cultivo en placas por dilución utilizado por Granados & Wang⁽¹³⁾.

3.2.5 Aislamiento de *Sclerotium cepivorum*

Para el aislamiento del patógeno, el hongo *Sclerotium cepivorum*, se hizo uso de la metodología presentada por Vimard et al.⁽⁵⁴⁾ con la modificación de la obtención inicial de esclerocios para el cultivo.

Para este aislamiento se obtuvo de un agricultor una planta de ajo infectado por la podredumbre blanca. Este ajo presentaba como signo característico la conocida “cenicilla” que cubría parcialmente el bulbo del ajo. Esta cenicilla en realidad es el cúmulo de esclerocios que cubren las zonas infectadas⁽³⁾. Posteriormente, se recolectaron con cuidado los esclerocios presentes en la superficie del bulbo del ajo y se colocaron en una luna de reloj. Estos fueron trasvasados a un matraz de 100ml con hipoclorito de sodio al 1% en presencia de dos mecheros y en una cámara estéril, en donde se realizó un lavado de 3 minutos para desinfectar la superficie de los esclerocios. Luego del lavado con hipoclorito, los esclerocios se llevaron a un nuevo matraz de 100ml con agua destilada estéril en donde se retiró los restos de hipoclorito de su superficie⁽⁵⁴⁾.

Habiendo realizado la desinfección superficial de los esclerocios, se recolectó del matraz de agua estéril los esclerocios lavados con la ayuda de una pinza cromada de punta curva y estos se sembraron en placas Petri con agar ajo (Anexo 1). Luego se dejaron en incubación a 20°C hasta que se observara algún crecimiento.

3.3 Aislamiento de microorganismos fúngicos

3.3.1 Aislamiento de microorganismos competitivos

Para el método de aislamiento de microorganismos competitivos se realizó un aislamiento por punción y se utilizó como criterio de selección la predominancia del microorganismo en el medio.

Como reportó Lazarovits et al. ⁽³⁴⁾ las características principales de los hongos utilizados como controladores biológicos son: antibiosis, competencia, parasitismo, depredación y estimulación de las defensas de las plantas. Características como la antibiosis, competencia y parasitismo permiten a los microorganismos prevalecer frente a otros dentro de un ecosistema; de modo que, en una placa de cultivo dichos microorganismos predominaran frente a los demás.

3.3.2 Conservación de cepas puras

Luego de haber obtenido la mayor cantidad posible de microorganismos aislados, se procedió a realizar una conservación de cada una de las cepas mediante la metodología de conservación de desecación en papel filtro presentada por Hunter-Cevera & Belt ⁽⁵⁵⁾ modificada.

Se preparó los materiales para la conservación. Se recortó papel filtro Whatman N°4 en cuadrados de 1.5 cm aproximados de lado y se llevó a esterilizar en una estufa a 170°C durante dos horas dentro de un sobre de papel aluminio. Una vez estériles los papeles filtro se llevaron junto con placas Petri de vidrio estéril en presencia de dos mecheros, además de las placas con las cepas aisladas. Se tomó las placas con las cepas aisladas y se recolectó una muestra con un asa bacteriológica con punta circular de una colonia. Luego la colonia recolectada se colocó encima de un cuadrado de papel filtro dentro de uno de los platos de la placa Petri y se extendió sobre el papel con la ayuda de un asa de Digrafsky. Una vez que estuvo untado el papel filtro con la colonia a

conservar, se guardó el papel filtro dentro de un sobre de papel craft estéril para luego ser colocado dentro de un recipiente con perlas de sílica gel indicadora cerrado para desecar los papeles filtros. Una vez desecados los papeles filtros, el recipiente completo se llevaría a frío ⁽⁵⁵⁾.

3.3.3 Identificación y conservación de *Sclerotium cepivorum*

Este método tiene la finalidad de poder tener la seguridad que el hongo aislado del ajo sea verdaderamente el hongo *Sclerotium cepivorum*. Para ello se tuvo que esperar hasta las últimas etapas de desarrollo del hongo y a su vez se fue observando las placas durante el crecimiento para determinar el tipo de crecimiento que poseían las colonias de la placa Petri.

Las características que se tuvo en consideración fueron el micelio blanquecino inicial del hongo y la aparición de esclerocios negros conforme las hifas iban envejeciendo. Los esclerocios generados debían de ser de un color negro y un tamaño menor al a cabeza de un alfiler. En caso de que el micelio creciese y presentase otros hongos como contaminantes, se realizaría un repique del hongo.

Para la conservación de los esclerocios, se eligió una conservación por frío. Como se presenta en la literatura referida en la investigación bibliográfica del presente trabajo, los esclerocios son estructuras altamente resistentes y su conservación en frío bastaría para que se puedan conservar el tiempo suficiente para la realización del presente trabajo de investigación ⁽³⁾.

3.4 Análisis de la capacidad antagónica

3.4.1 Cinética radial

La metodología de cinética radial está basada en la metodología utilizada por Astorga-Quiroz et al. ⁽⁴⁴⁾ para la evaluación del antagonismo. Astorga-Quiroz et al. utilizó una fórmula para la cuantificación de la capacidad antagónica de un microorganismo frente a otro, la misma que fue utilizada por Ezziyani et

al. ⁽⁴¹⁾. Dicha fórmula se basa en los crecimientos radiales de ambos hongos enfrentados. Es por ello que, un mayor conocimiento de las cinéticas radiales de cada uno de los hongos aislados, así como del patógeno, permitirán realizar una mejor interpretación y comprensión de la fórmula y sus resultados.

Para ello, se prepararon varias placas de medio PDA, el mismo medio que se utilizaría para realizar la prueba de evaluación de antagonismo. En cada placa se sembró lo más cercano a uno de los bordes de la placa y por triplicado, a cada una de las cepas de hongos aislados y el patógeno a enfrentar. Posteriormente, cada una de las placas sembradas se llevaría a incubación durante 14 días a una temperatura de 25°C. Durante este tiempo se realizaría diariamente el seguimiento del crecimiento radial hasta haberse cumplido los 14 días de la evaluación o que el hongo lograra colonizar toda la placa Petri.

3.4.2 Evaluación de antagonismo

La evaluación de antagonismo de hongos se realizó con la metodología reportada por Astorga-Quiroz ⁽⁴⁴⁾. Para ello se prepararon placas de agar PDA en las cuales se realizaría el enfrentamiento entre los hongos.

Antes de comenzar con el cultivo de los hongos, se dejó atemperando los hongos conservados junto con una placa con el hongo *Sclerotium cepivorum* aislado. Una vez atemperados los hongos, se comenzó a realizar su siembra (en presencia de dos mecheros) colocando discos colonizados con *Sclerotium cepivorum* en uno de los extremos de la placa y, después de tres días de haber estado en pre-incubación, en el extremo opuesto se sembró un pequeño corte del papel con el hongo conservado. Finalmente las placas sembradas se llevarían a incubación durante 14 días a una temperatura de 25°C y se les realizaría un seguimiento en los días 7 y 14. Estas siembras se realizarían por triplicado.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se medirían los radios de crecimiento de cada hongo en cada placa. Se utilizaría la fórmula utilizada por Astorga-Quiroz para poder calcular el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Radial (PICR) en cada uno de los enfrentamientos. Además, también se clasifico a cada uno de los hongos según su resultado de PICR en una escala utilizada por Ezziyyani et al. ⁽⁴¹⁾ en donde se clasifica la capacidad del hongo como antagonista dependiendo de su desarrollo en placa (Tabla 1).

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

$R_1 =$ Crecimiento Radial del Patogeno en el Testigo

$R_2 =$ Crecimiento Radial del Patogeno en el Tratamiento

Tabla 1. Tabla de graduación del potencial biocontrolador en microorganismos según su capacidad antagónica presentada durante su evaluación de PICR ⁽⁴¹⁾.

Grado	Capacidad antagónica	Potencial biocontrolador
0	Ninguna invasión de la superficie de la cepa patógena	Muy malo
1	¼ Invasión de la superficie de la cepa patógena	Malo
2	½ invasión de la superficie de la cepa patógena	Deficiente
3	Total invasión de la superficie de la cepa patógena	Bueno
4	Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella	Muy bueno

Con los porcentajes de inhibición de cada uno de los hongos, se seleccionaron los tres hongos con los porcentajes más altos. Con cada uno de estos hongos se repitió la prueba de antagonismo con diez repeticiones por cada hongo y con diez placas de control negativo. Finalmente se volvió a calcular los porcentajes de inhibición de cada uno de los hongos.

3.3.3 Parasitación de esclerocios

La prueba de colonización de esclerocios se utilizó como un método de cuantificación de la efectividad del parasitismo de los hongos seleccionados, frente a una población de esclerocios producidos in vitro. Esta metodología se basa en lo expuesto por Jhonson et al. ⁽⁴⁰⁾, que reporta que una forma de encontrar a hongos antagonistas es mediante el aislamiento de esclerocios

colonizados; en los cuales los hongos presentes son antagónicos para el hongo que le corresponda dichos esclerocios.

Para esta prueba se preparó tubos con medio Czapeck suplementado con extracto de levadura y se inoculó en ellos una azada del hongo con capacidad antagónica. Se realizó esto por cada hongo antagónico encontrado durante la evaluación del antagonismo. Posteriormente se llevó a una preincubación de 7 días y luego se le utilizó para inocular placas totalmente colonizadas de *Sclerotium cepivorum*. Placas donde el hongo ya haya generado esclerocios en toda su superficie. Luego de ello, se dejó las placas inoculadas al medio ambiente y con exposición de luz durante un mes. Finalizado este periodo se recolectó esclerocios de las placas con la ayuda de una tira de cinta adhesiva transparente. Mediante un aumento de 100x y 400x, se evaluó a cada uno de los esclerocios dando prioridad a la aparición de conidiogénesis en su superficie, ya que este hongo no genera o genera de manera muy rara conidios⁽³²⁾. Se evaluó en cada placa los porcentajes de esclerocios colonizados.

3.4 Identificación

3.4.1 Identificación morfológica de los hongos con capacidad antagónica

Para la identificación morfológica de los hongos con capacidad antagónica se utilizó la microscopía óptica. Para ello se recolectó una muestra de la colonia de cada uno de los hongos con la ayuda de una cinta adhesiva transparente y se agregó azul de lactofenol para una mejor observación de las estructuras del micelio.

En cada caso se observó puntos importantes en la identificación de hongos imperfectos como es el caso de: hifas, conidióforos, conidios, tipo de conidiogénesis, distribución de las estructuras, coloración y presencia de estructuras especializadas. Habiendo registrado cada una de las características anteriores se hizo uso de la clave de identificación de H. L. Barnett & B. B. Hunter⁽⁵⁶⁾ para la identificación hasta género de cada uno de los hongos.

3.4.2 Identificación molecular de los hongos con capacidad antagónica

Para la identificación molecular de los hongos se recurrió a un servicio de extracción y secuenciación de ADN por parte de la empresa ADN Uchumayo en donde se utilizó el marcador ITS3 para la secuenciación de cada hongo.

Una vez generada la secuencia de cada hongo con capacidad antagónica, se hizo uso del servidor del NCBI para comparar con una base de datos de secuencias pertenecientes a diferentes especies. Con ello se lograría obtener la identificación hasta el nivel de especie para cada uno de los hongos obtenidos.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos se evidenció el comportamiento de cada una de las cepas aisladas de la tierra de cultivo durante su desarrollo natural, así como durante el enfrentamiento con el patógeno de la enfermedad de la Podredumbre Blanca. Además, se logró calificar el potencial biocontrolador de cada uno de los hongos aislados según los resultados del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) obtenidos durante su evaluación. Las cepas con los mayores valores de PICR se les identificó hasta género mediante el uso de la identificación morfológica, y hasta especie mediante la identificación molecular.

1. AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS DEL SUELOS

Luego de recolectar las muestras de tierra de rizosfera y de *Allium sativum* de la zona seleccionada, y llevarlas adecuadamente a un ambiente frío para su posterior e inmediato tratamiento, se procedió a realizar cada una de las metodologías de aislamiento propuestas para el trabajo de investigación. Como resultado, cada una de las placas cultivadas obtenidas a partir de cada metodología, tuvieron una interpretación específica respecto a la naturaleza de los microorganismos aislados y en qué nivel del ecosistema de la planta se encontrarían desarrollándose.

1.1. Método de dilución en placa

Con el empleo de esta metodología se obtuvo diferentes placas cultivadas, así como una gran variedad de microorganismos a partir de las muestras de suelo.

Dentro de dichas placas se pudo observar la presencia de diferentes microorganismos. Para los objetivos del presente trabajo de investigación se le dio mayor importancia a los microorganismos fúngicos miceliares. Estos, según su naturaleza, al cabo de 7 a más días llegan a crecer y ocupar la mayoría del área superficial, e incluso aérea, de la placa. Debido a ello, una vez pasado los 7 días de incubación, se realizó en cada una de las placas cultivadas el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de microorganismos fúngicos miceliares. Esto se

realizó para poder observar la población de hongos miceliares capaces de desarrollar en el medio sintético suministrado. Los datos recopilados se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en el aislamiento por dilución en placa

Placa	Conteo de placas (UFC)			Promedio
	N°1	N°2	N°3	
N°1	3	3	6	4
N°3	4	6	4	5
N°4	2	2	5	3
N°5	3	3	4	3
N°6	3	3	1	2
N°7	4	3	3	3
N°12	4	5	4	4
N°20	3	2	2	2
N°21	6	3	4	4
N°37	1	2	2	2
N°50	3	1	0	1
N°51	1	6	1	3
N°57	5	3	6	5
N°58	3	4	4	4
N°62	4	5	7	5
N°64	5	2	2	3
N°68	4	1	3	3
N°70	2	5	4	4
N°72	3	5	5	4
N°73	1	2	3	2

Como se observa en los resultados del conteo de colonias en placa, en cada uno de los casos se puede determinar la presencia de colonias fúngicas miceliares. Esto significa que a pesar del continuo tratamiento de la tierra con fungicidas, como es el caso de la zona de muestreo y es corroborado con el dialogo directo con los jornaleros; la tierra aún conserva la presencia de flora microbiana. El conteo demuestra una baja cantidad de UFC de hongos en suelo; sin embargo, según lo reportado por Balser et al. ⁽⁵⁷⁾, esta es una característica común de los suelos agrícolas. Esta baja cantidad se debe al continuo trabajo de labrado que impide un adecuado desarrollo y colonización de las hifas en el ecosistema del suelo.

1.2.Método de cultivo de triturado de raíz

En el caso de las placas cultivadas con el método de cultivo de triturado de raíz, se pudo observar la presencia de una baja cantidad de microflora bacteriana endófito en el cultivo. En el caso de las colonias fúngicas miceliarias, como se observa en la Tabla 3, se pudo observar que los microorganismos fúngicos presentes endófitamente en la planta eran mucho más bajos incluso que la población bacteriana encontrada.

Tabla 3. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en el aislamiento por triturado de raíz

Placa	Conteo de placas (UFC)			Promedio
	N°1	N°2	N°3	
N°1	0	0	0	0
N°3	0	0	0	0
N°4	0	0	0	0
N°5	0	0	0	0
N°6	0	0	0	0
N°7	0	0	0	0
N°12	2	1	1	1
N°20	0	0	0	0
N°21	0	0	0	0
N°37	0	0	0	0
N°50	0	0	0	0
N°51	0	0	0	0
N°57	0	0	0	0
N°58	0	0	0	0
N°62	0	0	0	0
N°64	0	0	0	0
N°68	0	0	0	0
N°70	0	0	0	0
N°72	0	0	0	0
N°73	0	0	0	0

Ante estos resultados, los hongos con bajo crecimiento fueron descartados. La razón de esto fue que, al no poder sobresalir en un ambiente de competencia, el hongo muy probablemente carece de las características expuestas por Lazzarovitis et al. ⁽³⁴⁾: competitividad, antibiosis y parasitismo. Estas características son las que

permitirían a un microorganismo el ejercer interacciones antagónicas frente a otros y, por medio de esto, poder sobresalir ante la competencia de un ecosistema natural del suelo.

1.3. Método de cámaras húmedas

Al igual que el método de cultivo de triturado de raíz, el método de las cámaras húmedas se utilizó con la finalidad de aislar la mayor cantidad posible de microorganismos fúngicos miceliares; que se pudieran encontrar presentes de manera endófitas en las muestras de ajo recolectada.

Tabla 4. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en cámara húmeda

Placa	Promedio
N°1	Negativo (-)
N°3	Negativo (-)
N°4	Positivo (+)
N°5	Negativo (-)
N°6	Negativo (-)
N°7	Negativo (-)
N°12	Positivo (+)
N°20	Negativo (-)
N°21	Negativo (-)
N°37	Negativo (-)
N°50	Negativo (-)
N°51	Negativo (-)
N°57	Negativo (-)
N°58	Negativo (-)
N°62	Negativo (-)
N°64	Negativo (-)
N°68	Negativo (-)
N°70	Negativo (-)
N°72	Positivo (+)
N°73	Negativo (-)

En este caso, como se observa en la Tabla 4, dieron nuevamente resultados bajos para la obtención de colonias fúngicas con potencial biocontrolador o colonias fúngicas del patógeno de la podredumbre blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum*).

Estos resultados, observados en la Tabla 4, se ven apoyado por los resultados obtenidos de la metodología del cultivo del triturado de raíz (Tabla 3). Esta prueba previa nos confirmaba la baja población (o inexistencia) de colonias de hongos fúngicos presentes endófitamente en las muestras de ajo recolectada. A su vez también, para el caso de la ausencia del patógeno en las raíces empleadas para el método de las cámaras húmedas, se puede sustentar su ausencia por medio de la sintomatología clásica de la Podredumbre Blanca del ajo propuesta por Piccolo ⁽³⁾, en la cual se explica que la enfermedad ataca únicamente al bulbo y al pseudotallo del ajo durante infecciones en etapas tardías de la planta; mientras que las infecciones en etapas tempranas causan una pudrición inmediata comprometiendo severamente el tejido del sistema radicular y el bulbo del ajo.

1.4. Método de lavado de esclerocios

El último método empleado para el aislamiento de microorganismos con potencial biocontrolador fue el método de lavado de esclerocios; el cual está basado en la técnica empleada por Granados & Wang ⁽¹³⁾ la cual sustenta que los esclerocios pueden ser utilizados a modo de “carnada” para poder captar microorganismos que sean capaces de parasitarlos y, por ende, consumirlos. Esto a su vez se encuentra sustentado en lo expuesto por Johnson et al. ⁽⁴⁰⁾, que reportan que un alto porcentaje de los organismos aislados de esclerocios son activamente antagonistas.

Tabla 5. Unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en el aislamiento por lavado de esclerocios

Placa	Conteo de placas (UFC)			Promedio
	Nº1	Nº2	Nº3	
Nº1	7	4	2	4
Nº2	1	1	1	1
Nº3	1	10	1	4
Nº4	1	4	4	3
Nº5	1	6	9	4
Nº6	5	3	5	4
Nº7	4	0	4	3
Nº8	10	9	16	12
Nº9	2	1	6	3

El resultado obtenido en las placas mediante el uso de este método (Tabla 5), fue mucho mayor en comparación a los demás métodos. Se pudo ver un mayor crecimiento de colonias fúngicas y una mayor invasión de la superficie de la placa por parte de las mismas colonias. Además también se pudo observar con mayor claridad la presencia de interacciones entre las mismas colonias dentro de la placa del cultivo. Como se puede ver en la Figura 16, en la placa hay la presencia de “puntos verdes” surgiendo del micelio blanco del otro hongo mientras que se va generando un halo de micelio aplastado alrededor de los mismo. Este tipo de antagonismo esta reportado por Johnson et al. ⁽⁴⁰⁾ entre los criterios de antagonismos que pueden presentarse.

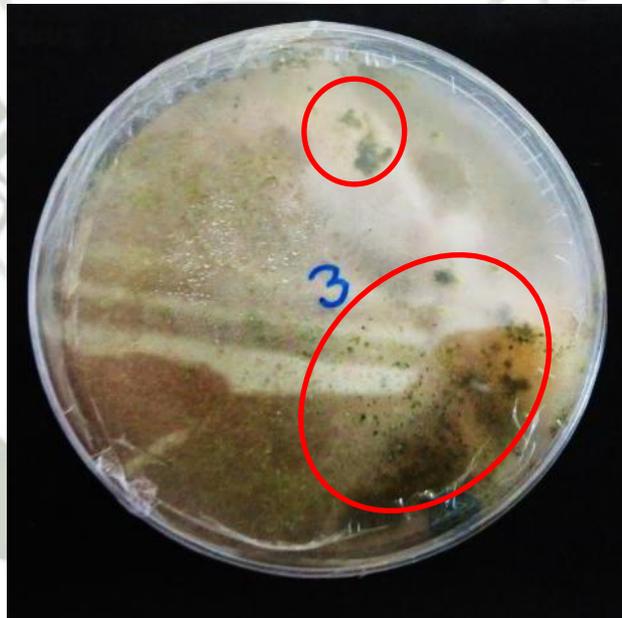


Figura 16. Interacciones entre las colonias cultivadas en una placa Petri.

2. AISLAMIENTO DE COLONIAS FÚNGICAS CON COMPORTAMIENTO ANTAGÓNICO

2.1. Aislamiento de hongos filamentosos competitivos

Luego de haber finalizado todas las metodologías de aislamiento de los hongos perteneciente a la rizósfera y hongos endófitos, se procedió a realizar el aislamiento de las cepas de hongos que dentro de los cultivos presentasen un comportamiento competitivo frente a los demás hongos.

A partir de las placas obtenidas de cada una de las metodologías utilizadas en la primera etapa del trabajo experimental, se pudo obtener una gran cantidad de cepas de hongos aparentemente distintas entre sí y con un comportamiento distinto. Para ello se seleccionaron las cepas que presentasen interacciones antagónicas con los demás microorganismos presentes, tomando como referencia lo expresado por Jhonson et al. ⁽⁴⁰⁾ de modo que se pudiera generar un cepario inicial con el cual se realizaría los análisis de PICR de cada uno de ellos.

Tabla 6. Lista del cepario obtenido con su respectivo código, proveniencia y tipo de conservación utilizado.

Numero	Código	Método	Conservación
SC	SC	Aislamiento de <i>S. cepivorum</i>	Frio
001	P(T50)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
002	P(4T)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
003	P(4T)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
004	P(RT12)1H	Raíz Triturada	Papel filtro desecado
006	P(T7)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
007	P(5)2H	Lavado de esclerocios	Papel filtro desecado
008	P(7T)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
009	P(R70)1H	Cámara húmeda	Papel filtro desecado
010	P(T62)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
013	P(T64)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
014	P(T64)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
015	P(T58)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
016	P(7T)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
017	P(4T)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
019	P(T7)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
021	P(62T)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
023	P(T51)1H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
029	P(62T)2H	Dilución en placas	Papel filtro desecado
030	P(3)2H	Lavado de esclerocios	Papel filtro desecado
031	P(0)2H	Lavado de esclerocios	Papel filtro desecado
033	P(2)2H	Lavado de esclerocios	Papel filtro desecado
036	P(68R)1H	Cámara húmeda	Papel filtro desecado

Como se puede observar en la Tabla 6, se logró obtener un total de 23 cepas de hongos, contando el patógeno de la enfermedad de la podredumbre blanca del ajo.

A cada una de estas se les asignó un código, el cual consta primero de una letra P, haciendo referencia a que la cepa se logró purificar, un número y/o iniciales que hacen referencia a la zona y método de aislamiento utilizado (T=dilución de tierra, RT=raíz triturada, R=raíz en cámara húmeda) y finalmente un número seguido de la letra H (Hongo) que hace referencia al primer (1) o segundo (2) muestreo realizado, siendo el segundo muestreo el aislamiento por lavado de esclerocios.

La mayoría de los aislados obtenidos fueron a partir de la primera metodología del cultivo de dilución en placa, seguido por el método de lavado de esclerocios. Esto se justifica puesto que en el primer método no se ve presente ningún tipo de filtro para la captación de hongos, más allá de su presencia en suelo y capacidad de progresar en medio sintético. Según Balser et al. ⁽⁵⁷⁾ la población microbiana total de un suelo no se puede aislar totalmente, ya que en muchos casos estos microorganismos necesitan nutrientes especiales para su desarrollo; mientras que, según Johnson et al. ⁽⁴⁰⁾, en el método de lavado de esclerocios se encuentra la condición de que los microorganismos presentes muy probablemente han sido capaces de colonizar los esclerocios.

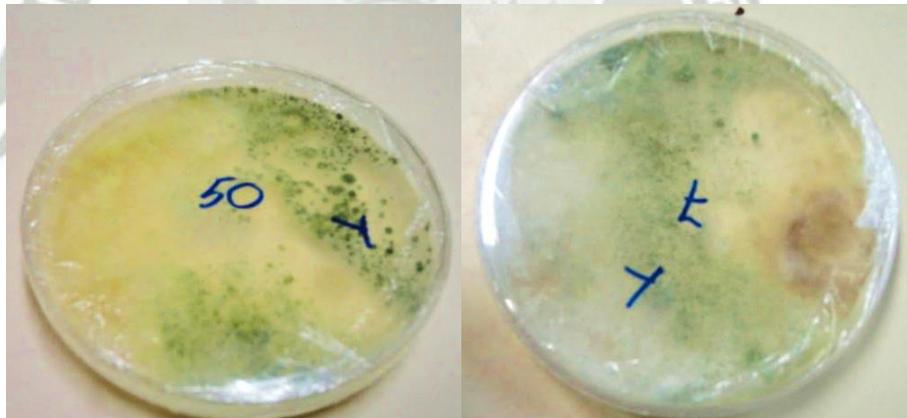


Figura 17. Placas de cultivo, presentando un crecimiento invasivo, por parte de un hongo, frente a los demás.

2.2. Aislamiento del patógeno *Sclerotium cepivorum*

Además de la generación de placas con aislados de diferentes colonias de hongos obtenidos a partir de los hongos endófitos y rizosférica de la planta; también se logró el aislamiento del patógeno de la podredumbre blanca (*Sclerotium cepivorum*) mediante el uso de la técnica de Vimard et al. ⁽⁵⁴⁾ con modificaciones. El

resultado de ello fue la generación de una colonia blanquecina que con el tiempo generó esclerocios negros en la superficie del agar. Confirmando que se trataba efectivamente del hongo *Sclerotium cepivorum* según la caracterización presentada por Whetzel & Mordue⁽³²⁾ así como la presentada por Barnett & Hunter⁽⁵⁶⁾.



Figura 18. Aislado de *Sclerotium cepivorum*.

3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LAS CEPAS AISLADAS FRENTE AL PATÓGENO *Sclerotium cepivorum*

3.1. Cinética radial de los hongos aislados

Una vez obtenido el cepario de los hongos con comportamiento antagónico, se procedió a realizar la cinética radial de cada uno de ellos. A la vez se realizó la cinética radial para el hongo *Sclerotium cepivorum*. Esta etapa inicial para la evaluación de la capacidad antagónica de las cepas aisladas, se realizó para observar diferencias en las velocidades de crecimiento que pudieran generar un posible ruido al emplear la fórmula PICR en comparación con la velocidad de crecimiento del hongo *Sclerotium cepivorum*.

Como se puede observar en la Tabla 7, durante el análisis de la cinética radial de los microorganismos, se puso en evidencia diferentes comportamientos presentes

durante el crecimiento. Se puede observar, mediante la fórmula generada para la gráfica y su respectivo R^2 , que en todos los casos las gráficas lograron obtener un buen ajuste con el tipo de alineación que se le asignó, ya que el mínimo R^2 reportado fue el de 84%; siendo este el perteneciente a la gráfica del hongo *Sclerotium cepivorum*. Así mismo también se pudo observar las velocidades de crecimiento entre los hongos por medio de las pendientes reportadas. Estas pendientes expresadas en el tiempo significarían una mayor o menor velocidad dependiendo de si son mayores o menores respectivamente.

Tabla 7. Tabla resumen de las gráficas generadas durante la cinética radial.

Numero	Formula de la gráfica	Inicio (h)	Alineación	R^2 (%)
SC	$Y=-0.140937+0.0000526772X^2$	96	Exponencial	84.4651
001	$Y=-0.495453+0.039289X$	24	Lineal	98.1501
002	$Y=-0.628132+0.0517434X$	24	Lineal	97.2405
003	$Y=-0.376031+0.050136X$	24	Lineal	99.2019
004	$Y=-0.519989+0.0256533X$	24	Lineal	99.1064
006	$Y=-0.120542+0.0180014X$	24	Lineal	95.1413
007	$Y=-0.570566+0.0196703X$	24	Lineal	96.7226
008	$Y=-0.904245+0.051222X$	24	Lineal	99.0114
009	$Y=-0.411145+0.0265426X$	24	Lineal	98.983
010	$Y=-0.196901+0.0114319X$	24	Lineal	99.3113
013	$Y=-0.263973+0.0109112X$	48	Lineal	98.6782
014	$Y=-0.354271+0.0165269X$	24	Lineal	93.3919
015	$Y=-0.138239+0.00510587X$	48	Lineal	97.5926
016	$Y=-0.856031+0.0485249X$	24	Lineal	99.6438
017	$Y=-1.09201+0.0528433X$	48	Lineal	98.7043
019	$Y=-0.661937+0.0514224X$	24	Lineal	99.0556
021	$Y=-0.558169+0.031322X$	24	Lineal	98.4063
023	$Y=-3.40485+1.15444\ln(X)$	24	Logarítmica	94.2926
029	$Y=-0.254881+0.0107619X$	24	Lineal	96.0308
030	$Y=-11.9793+4.05507\ln(X)$	24	Logarítmica	87.7527
031	$Y=-11.9964+3.92442\ln(X)$	24	Logarítmica	96.1011
033	$Y=-0.458448+0.0257001X$	24	Lineal	98.4301
036	$Y=-0.723156+0.0252437X$	48	Lineal	99.0076

Finalmente, otro de los datos de importancia en las gráficas obtenidas de las cinéticas radiales, fueron el tipo de alineación que se les asignó y el inicio de su crecimiento, entendiéndose por inicio el momento en el que se pudo detectar un crecimiento cuantificable por primera vez en el tiempo.

El inicio del crecimiento del hongo, para el presente trabajo de investigación se le consideró de gran importancia ya que fue según este dato que se modificó la técnica de evaluación de PICR presentada por Astorga et al. ⁽¹⁴⁾. Originalmente la técnica implica que se debe de introducir a los hongos en el enfrentamiento en placa; sin embargo, para el caso del hongo *Sclerotium cepivorum* se observa que el tiempo de inicio de su crecimiento es después de 72 horas. Esto significaría que, en comparación de otros hongos que presentan una alta velocidad de crecimiento y un inicio a las 24 horas, los resultados obtenidos de PICR podrían no presentar resultados reales para el caso de la podredumbre blanca del ajo. Según Granados ⁽⁴⁾, Granados & Wang ⁽¹³⁾, Rojas et al. ⁽⁵⁾ y Astorga-Quirós et al. ⁽⁴⁴⁾, para el control de dicha enfermedad se hace necesaria la presencia de antagonismos como el parasitismo o la antibiosis, ya que el esclerocio en condiciones de campo se encuentra presente y en una densidad ya establecida en la tierra y se necesita reducir esta misma densidad mediante la destrucción de los esclerocios.

En cuanto a la alineación que presentó cada hongo analizado, se pudo observar que la mayoría de estos presentaban una naturaleza lineal. Sin embargo, también hubo cuatros casos en los cuales la alineación de la gráfica fue logarítmica y en otro caso exponencial.

La mayor parte de los hongos del cepario presentaron una alineación lineal. Esta alineación lineal, según propone Tariq ⁽⁵⁸⁾, corresponde a la etapa de crecimiento lineal de los microorganismos fúngicos en placa. Durante esta etapa del desarrollo del hongo se puede observar una velocidad de crecimiento constante, la cual permite al hongo desarrollarse y tener una gráfica lineal.

Los hongos 23, 30 y 31 presentaron una alineación logarítmica, lo cual demuestra que su velocidad de crecimiento a lo largo del análisis, se vio afectada de manera descendente, causando de este modo que la gráfica tomara la forma de una curva tendiendo a una estabilización. Según lo propuesto por Tariq ⁽⁵⁸⁾, este tipo de curvas pueden significar que el hongo entra en un estado de desaceleración que, como se observa en la Figura 20, representa la etapa del crecimiento fúngico en placa en la cual el hongo puede estar llegando a los límites de la placa y/o sobresaturándose de metabolitos que causan que este sufra la desaceleración.

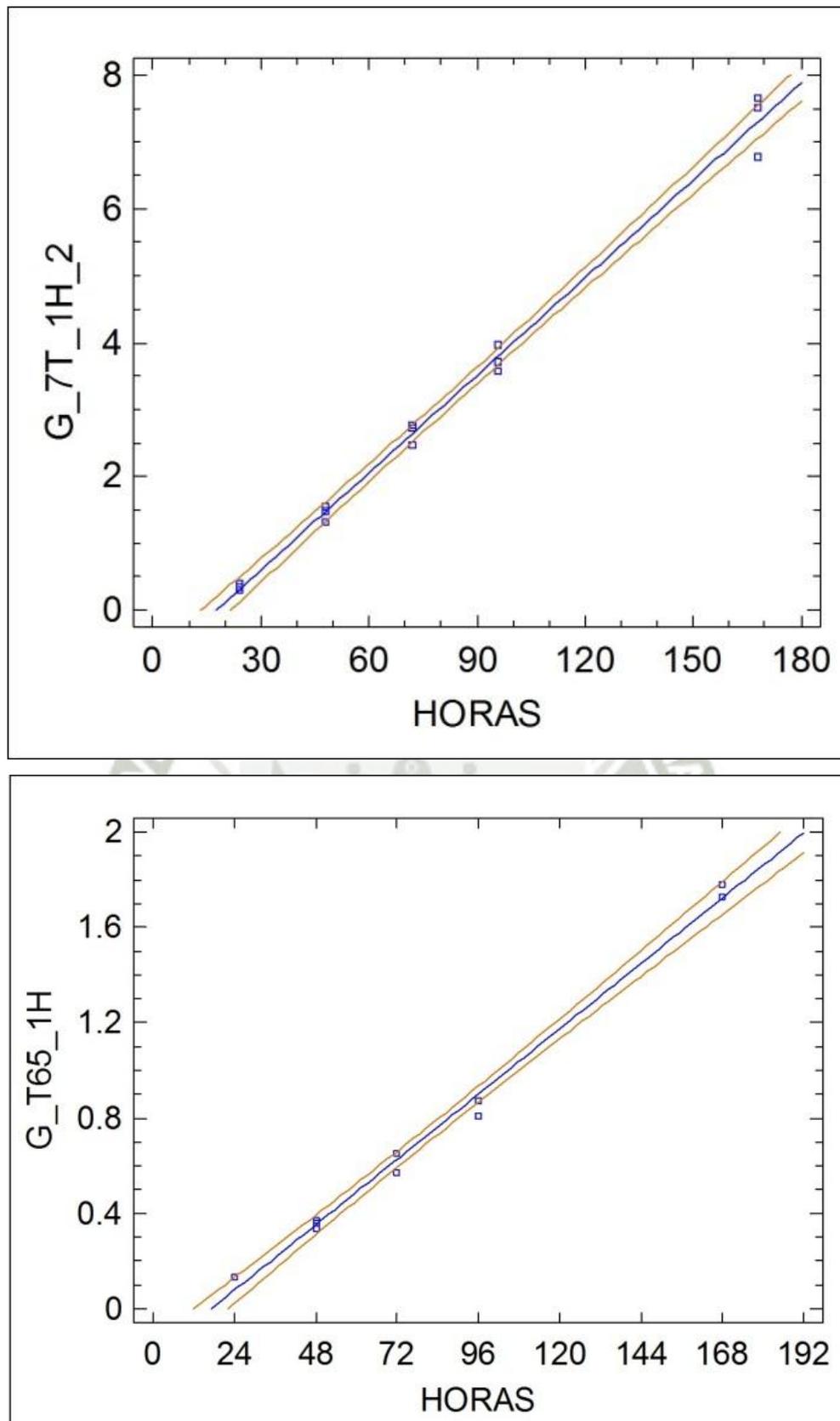


Figura 19. Alineamientos realizados para dos hongos del cepario.

Para el caso de la gráfica exponencial que se obtuvo durante el análisis, esta le perteneció al patógeno *Sclerotium cepivorum*. La Figura 21 muestra una curva generada de modo ascendente, lo cual significa que a lo largo del análisis el hongo presentó un aumento en su velocidad de crecimiento. Esta velocidad de crecimiento demuestra, según Tariq ⁽⁵⁸⁾, que el hongo se encontró en un estado exponencial mucho más pronunciado a comparación de los otros hongos. Este fenómeno que ha sucedido en el hongo *Sclerotium cepivorum* se ve explicado por la naturaleza de los esclerocios que funcionan como su unidad reproductiva. Los esclerocios del hongo *Sclerotium cepivorum* necesitan despertar de una dormancia antes de poder iniciar su desarrollo. Además, según lo propuesto por Granados ⁽⁴⁾, estos pueden presentarse como esclerocios viables y no viables. Estas características presentes en los esclerocios hace que la germinación de los mismos no sea simultánea causando que a lo largo del tiempo los esclerocios con mayor estimulación empiecen a germinar primero y luego los de menor. Causando de este modo la expansión de la fase exponencial que se puede observar en la Figura 21.

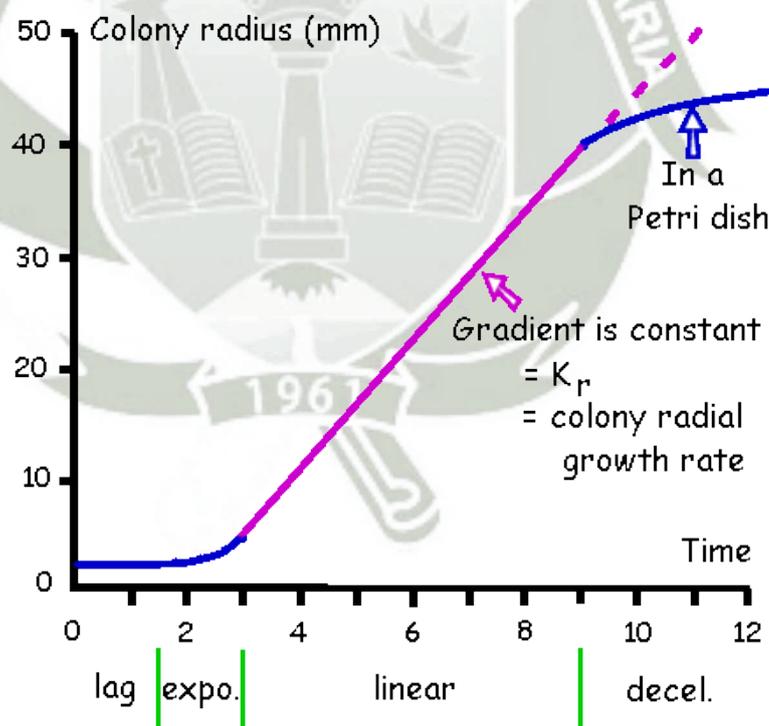


Figura 20. Curva de crecimiento fúngico en placa (Radio vs Tiempo) (Fuente: Micología Online)

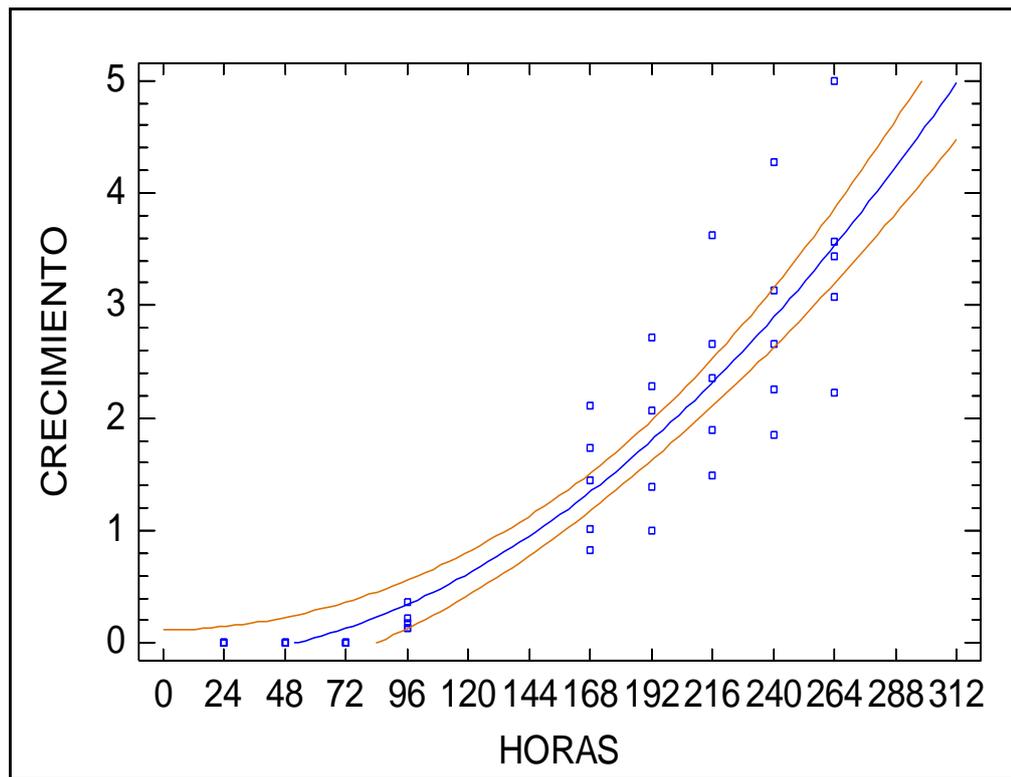


Figura 21. Crecimiento radial observado en el hongo *Sclerotium cepivorum*

3.2. Evaluación de la capacidad antagonista

Para la evaluación de la capacidad antagonista de los hongos aislados frente al patógeno *Sclerotium cepivorum*, se realizó inicialmente una prueba de “screening” de todos los hongos aislados contra *Sclerotium cepivorum* en diferentes placas y por triplicado. El objetivo fue determinar de este modo cuales son los hongos que presentarían alguna capacidad antagonista frente a *Sclerotium cepivorum*.

La prueba inicial de screening contó con los 22 hongos aislados obtenidos en las etapas iniciales del trabajo de experimentación. A cada uno se le realizó un enfrentamiento por triplicado contra el hongo *Sclerotium cepivorum* y se tomó las medidas de cada repetición al cabo de un tiempo de incubación de 7 días. Los resultados obtenidos al cabo de este tiempo se expresaron en una gráfica de caja bigotes (Figura 22), en donde se puede observar más claramente la separación entre los distintos resultados obtenidos.

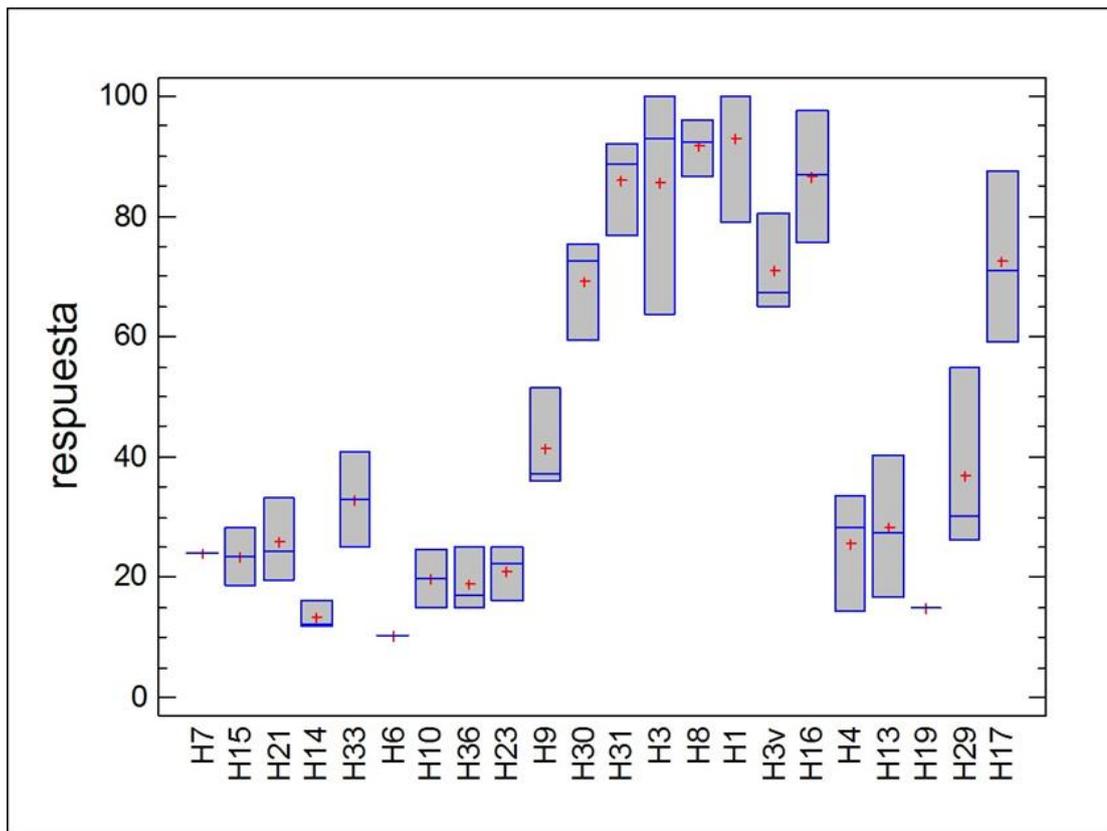


Figura 22. Resultados del "screening" de antagonismo.

En la Figura 22 se puede observar con mayor claridad que, entre los resultados de todos los hongos, se diferencian dos grupos de hongos separados por su valor de PICR. Uno que está conformado por hongos cuyos valores se encuentran sobre el 50% de PICR y el otro conformado por hongos con valores menores al 50%. Este tipo de separación demuestra que un grupo, el que logró superar el 50%, presenta algún tipo de capacidad antagónica frente al hongo *Sclerotium cepivorum*. La razón de esto es que, al ser capaz de invadir más de la mitad de la placa demuestra que puede superar al patógeno en aspectos de expansión en un mismo tiempo.

Para verificar la presencia de un comportamiento diferencial, se utilizó un análisis de varianza. Esto se puede observar en la Tabla 8 y la Tabla 9, por cada cepa de hongo enfrentado durante la evaluación.

Se demuestra en la Tabla 9, al momento de realizar el análisis de varianza entre grupos (entendiéndose los grupos como cada uno de los hongos con sus respectivas repeticiones), que existe comportamientos diferenciales entre el porcentaje de

inhibición. Con dicho resultado se puede afirmar que entre los 22 hongos evaluados existen diferencias de comportamiento; más no se puede afirmar si todos son diferentes entre ellos o si existen agrupaciones entre los 22 hongos que presenten resultados estadísticamente similares. Debido a ello se aplicó la prueba de Tuckey HSD

Tabla 8. Resumen estadístico de los valores obtenidos durante el "screening" de antagonismo.

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
H7	1	24.08+/-28.09		24.08	24.08
H15	2	23.45+/-19.86	6.7119	18.71	28.20
H21	3	25.75+/-16.21	7.0177	19.48	33.33
H14	3	13.34+/-16.21	2.3649	11.85	16.07
H33	2	33.02+/-19.86	11.1631	25.13	40.91
H6	1	10.23+/-28.09		10.24	10.24
H10	2	19.90+/-19.86	6.9481	14.99	24.82
H36	3	18.86+/-16.21	5.331	14.79	24.90
H23	3	21.11+/-16.21	4.5914	16.10	25.12
H9	3	41.60+/-16.21	8.5872	36.06	51.50
H30	3	69.14+/-16.21	8.4505	59.52	75.35
H31	3	85.85+/-16.21	8.0282	76.76	91.98
H2	3	85.61+/-16.21	19.1491	63.88	100.00
H8	3	91.71+/-16.21	4.8327	86.52	96.08
H1	3	92.96+/-16.21	12.1883	78.89	100.00
H3	3	71.00+/-16.21	8.3398	64.99	80.52
H16	3	86.67+/-16.21	11.0509	75.52	97.62
H4	3	25.45+/-16.21	9.9256	14.41	33.63
H13	3	28.22+/-16.21	11.7443	16.88	40.33
H19	1	14.80+/-28.09		14.80	14.80
H29	3	37.00+/-16.21	15.4756	26.24	54.74
H17	3	72.65+/-16.21	14.2347	59.25	87.60

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para el "screening" de antagonismo de los 22 hongos aislados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre cepas	48820.1	21	2324.77	22.21	0.0000
Intra cepas	3663.52	35	104.672		
Total (Corr.)	52483.7	56			

Tabla 10. Prueba de múltiples rangos según Tukey HSD para el "Screening" de antagonismo de los 22 hongos aislados.

	<i>Media</i>
H6	10.23+/-28.09 ^a
H14	13.34+/-16.21 ^a
H19	14.8+/-28.09 ^a
H36	18.86+/-16.21 ^a
H10	19.90+/-19.86 ^a
H23	21.11+/-16.21 ^a
H15	23.45+/-19.86 ^a
H7	24.08+/-28.09 ^{ab}
H4	25.45+/-16.21 ^a
H21	25.75+/-16.21 ^a
H13	28.22+/-16.21 ^a
H33	33.02+/-19.86 ^{ab}
H29	37.00+/-16.21 ^{ab}
H9	41.60+/-16.21 ^{abc}
H30	69.14+/-16.21 ^{bcd}
H3	71.00+/-16.21 ^{cd}
H17	72.65+/-16.21 ^{cd}
H2	85.61+/-16.21 ^d
H31	85.85+/-16.21 ^d
H16	86.67+/-16.21 ^d
H8	91.71+/-16.21 ^d
H1	92.96+/-16.21 ^d

Se observó en la Tabla 10, como el test de Tukey ordenó a todos los hongos a los que se les realizó la evaluación de "screening" de antagonismo de menor a mayor valor de PICR. Además, a cada uno de los hongos se les asignó un grupo indicado por un superíndice con diferentes letras: a, b, c y d. Estos grupos están conformados por los hongos que no presenten diferencias significativas entre ellos, pero los separa de los demás que sí presentan diferencias significativas. En la Tabla 11, estos grupos dividen a los hongos colocándolos en grupos con hongos "similares" desde la perspectiva de su PICR. A su vez estos grupos ayudan a identificar a los hongos que presentan el mayor PICR y son similares entre ellos; dándonos de este modo una tabla más sencilla para la selección de los mejores hongos para realizar la prueba final de antagonismo.

Tabla 11. Grupos de hongos generados mediante el test de Tukey HSD

Grupos	N° del hongo
Grupo A	4,6,7,9,10,13,14,15,19,21,23,29,33,36
Grupo B	7,9,29,30,33
Grupo C	3,9,17,30
Grupo D	1,2,3,8,16,17,30,31

Una vez conformados los grupos de hongos por el test de Tukey HSD, como se diseñó en la metodología del trabajo de investigación, se seleccionaron las tres mejores cepas obtenidas. Con ellas se procedió a realizar una nueva evaluación del PICR con 10 repeticiones por hongo y a su vez con una mayor cantidad de placas de control. Pero como se observa en la Tabla 10 y la Tabla 11, el grupo con los mayores valores de PICR es el grupo D. Este dio como resultado un total de 8 hongos con alto valor PICR, lo cual excedía con creces el número de hongos previstos para la realización de la prueba. Debido a este número tan alto de candidatos con un alto valor de PICR, se optó por realizar una separación dentro del mismo grupo mediante la observación morfológica de las colonias obtenidas a modo que se pudiera reducir el número de candidatos.

Como se puede apreciar en la Figura 23, la Figura 24 y la Figura 25; una vez observada cada una de las morfologías presentadas por los hongos del Grupo D, se logró distinguir tres formas destacables entre ellas:

- Una de las morfologías que presentaron los hongos fue la de un crecimiento expandido, con una amplia proliferación de biomasa miceliar y con una amplia conidiogénesis de color verde. La cepa más representativa de este grupo fue el hongo N°3.
- La segunda de las morfologías que se presentaron entre los hongos del grupo D fue la de un crecimiento más discreto, con una proliferación de biomasa miceliar igualmente discreta que generaba la apariencia de un crecimiento con forma de anillos concéntricos alrededor del punto de punción de siembra. En cuanto a la conidiogénesis, fue como el caso del

primer grupo pero limitada a las zonas de los anillos. La cepa más representativa de este grupo fue el hongo 31.

- Por último la tercera de las morfologías que se presentaron entre los hongos del grupo D fue la de un crecimiento expandido y una generación de biomasa micelial muy parecida a la del primer grupo, pero con una conidiogénesis mucho menor a la del primero. Dando como resultado la apariencia de colonias blancas con una ligera pigmentación verde por parte de la baja población de conidios. La cepa más representativa de este grupo fue el hongo 1.



Figura 23. Hongo N° 3. Presenta un crecimiento amplio y una alta conidiogénesis.



Figura 24. Hongo N° 31. Presenta un crecimiento discreto en forma de anillos concéntricos y una conidiogénesis limitada a los anillos.

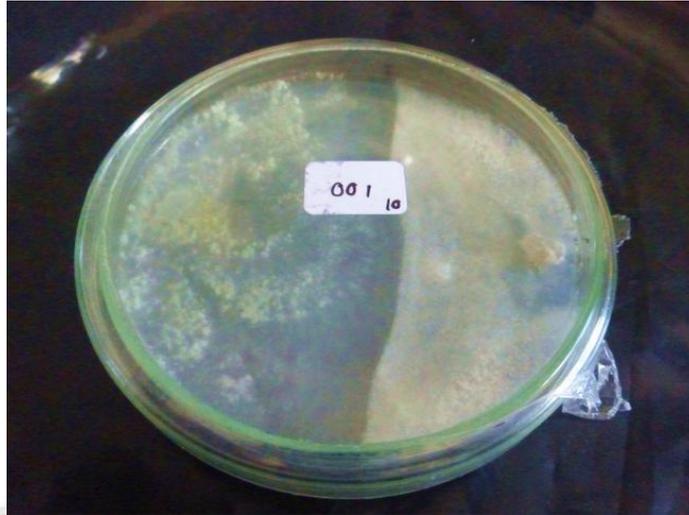


Figura 25. Hongo N°1. Presenta un crecimiento amplio; pero, una conidiogénesis muy limitada.

Con esta nueva diferenciación otorgada a los hongos del grupo D, se pudo obtener los tres hongos a enfrentar en la nueva evaluación de PICR como se planteó en el trabajo.

Una vez seleccionados los hongos para la nueva evaluación de PICR, se procedió a realizar la misma metodología nuevamente, con la diferencia de 10 repeticiones por hongos y 7 placas de control del patógeno de la podredumbre blanca del ajo. Además, se realizó un seguimiento diario a cada una de las placas a lo largo de 7 días, registrando en cada caso el radio del patógeno y el hongo evaluado.

Al cabo de los 7 días, los datos obtenidos de cada uno de los hongos enfrentados se recopilaron y se expresaron por medio de una gráfica de dispersión para poder observar el comportamiento de cada uno frente al patógeno *Sclerotium cepivorum*. Esto se puede observar en la Figura 26 para el hongo N° 31, la Figura 27 para el hongo N°1 y la Figura 28 para el hongo N°3. Se determinó los promedios de todas las repeticiones de los hongos y se les graficó durante el tiempo (días) para poder tener una mejor visión de cómo se fueron desarrollando cada uno de los microorganismos.

Como se puede observar en las gráficas, en cada uno de los enfrentamientos, hay un comportamiento parecido en cuanto al desarrollo de sus radios de crecimiento entre

los hongos evaluados. Las gráficas del patógeno a lo largo del tiempo demuestra una etapa de crecimiento durante los cuatro primeros días, pero este crecimiento se ve frenado y adopta una tendencia descendiente entre el día 4 y el día 7. Según Johnson et al. ⁽⁴⁰⁾; Ezziyyani et al. ⁽⁴¹⁾ y Astorga-Quirós et al. ⁽⁴⁴⁾; esta interacción puede significar la presencia de un antagonismo por parasitismo.

Al cabo de los 7 días se observó un desarrollo normal entre los hongos; pero, pero también se observó una clara competencia entre los mismo. Esta competencia se evidencia en todos los casos mediante la aparición de un momento en el que los hongos se encontraron; pero mostraban radios distintos, siendo el del hongo evaluado siempre el mayor. Según Johnson et al. ⁽⁴⁰⁾ este resultado demuestra un antagonismo por competencia. Sin embargo, la competencia no explica la aparición de las pendientes descendientes en la Figura 27 y la Figura 28. Para poder explicar este tipo de interacción entre los organismos, según Lazarovitis et al. ⁽³⁴⁾, se debe suponer que existe la presencia de un parasitismo por parte del hongo evaluado.

Una vez recopilados todos los radios de las colonias evaluadas y del hongo *Sclerotium cepivorum*, se calculó los PICR para cada una de las placas de enfrentamiento. En la Tabla 12 se reportan cada uno de los valores de PICR calculados en placa.

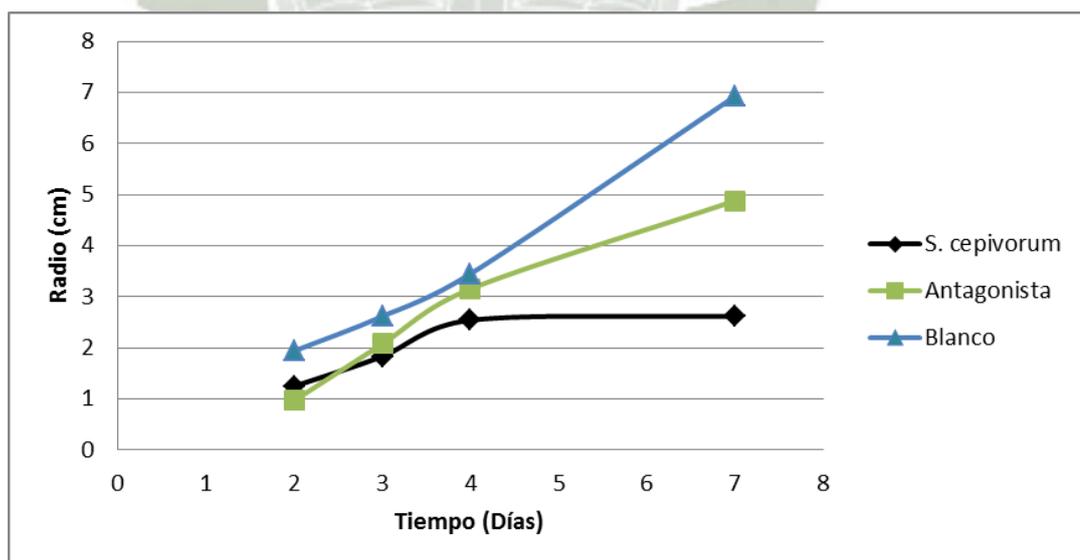


Figura 26. Crecimiento en el tiempo del hongo N° 31.

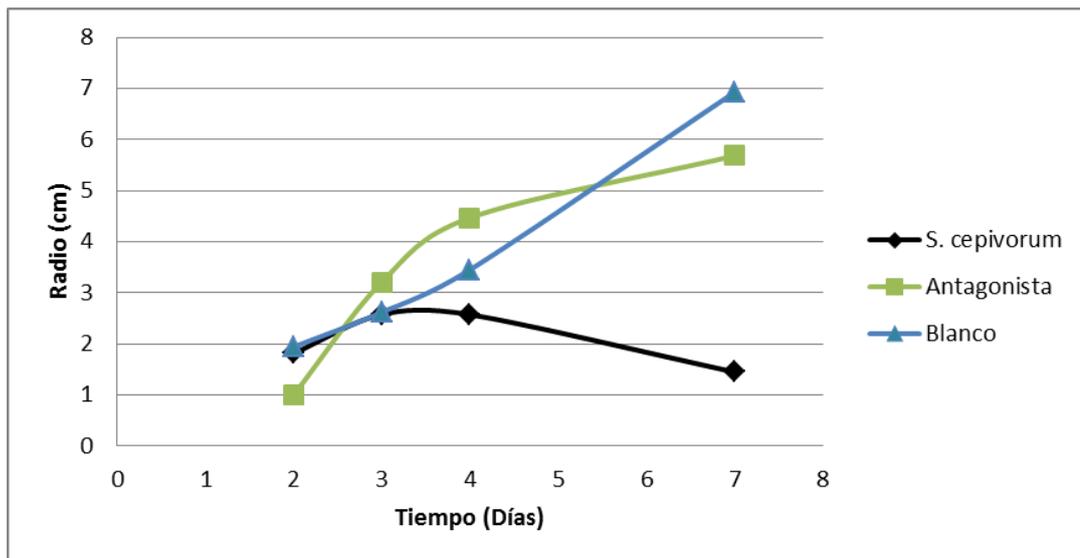


Figura 27. Crecimiento en el tiempo del hongo N° 3

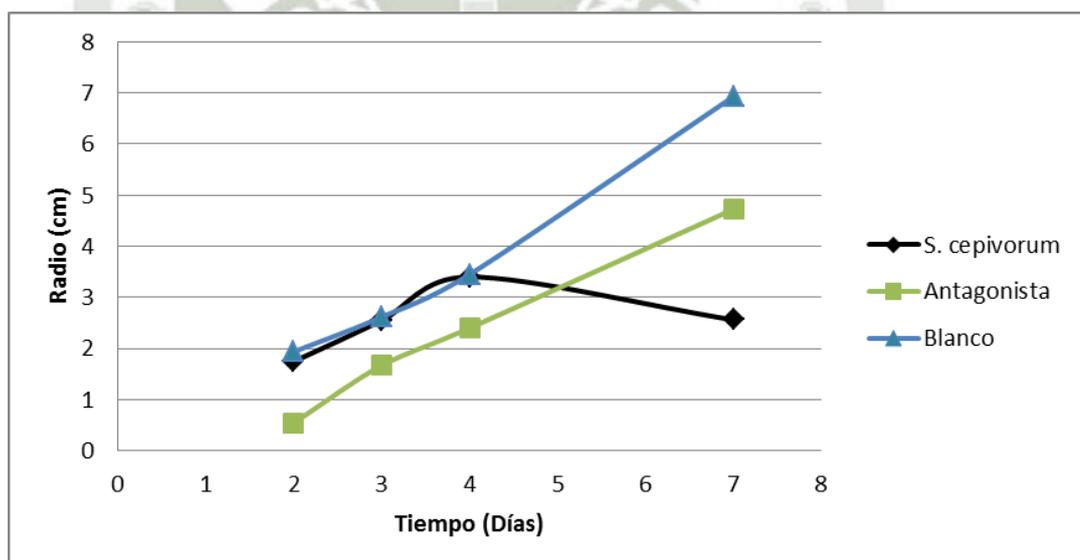


Figura 28. Crecimiento en el tiempo del hongo N° 1

Como se puede ver en el resumen estadístico de la Tabla 13, los promedios de las cepas 31 y 1 son aparentemente similares entre sí por su cercanía. En cambio, el promedio de la cepa 3 presenta una gran diferencia a las otras. Esto puede significar que, entre las 3 cepas evaluadas, la cepa 3 es la que presenta un mejor potencial biocontrolador. Esto se denota con mayor claridad en la gráfica de caja y bigotes de la Figura 29.

Tabla 12. Porcentajes de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) para el día 7.

Tabla de PICR		
1	3	31
53.9071	59.7987	88.3324
62.0224	63.4376	81.0545
53.8782	64.9971	74.1522
53.9648	52.6364	81.4877
69.4447	55.6688	71.1775
68.2317	64.5061	71.4085
73.9500	64.4484	79.8127
67.6830	78.9752	71.1775
61.4448		82.5852
57.4882		90.0941

Tabla 13. Resumen estadístico de los PICR en el día 7.

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado
C31	10	62.2015	7.34574	53.8782	73.95	20.0718	0.259844
C1	8	63.0585	7.8842	52.6364	78.9752	26.3388	1.1108
C3	10	79.1282	6.97175	71.1775	90.0941	18.9166	0.302589
Total	28	68.4916	10.7521	52.6364	90.0941	37.4577	0.664491

Para verificar estos resultados, se procedió a realizar un análisis estadístico de los resultados; de modo, que se puede comprobar la existencia de diferencias significativas entre estas 3 cepas. Al igual que los trabajos presentados por Kamala & Indira⁽⁵⁹⁾; Sajid & Moqdad⁽⁴³⁾; Muthukumar et al.⁽⁶⁰⁾ y Hernández et al.⁽⁶¹⁾; el método estadístico a utilizar para la diferenciación entre valores de diferentes cepas fue la prueba estadística de Tuckey HSD.

En la Tabla 14 se presenta los resultados obtenidos luego de haber realizado la prueba de Tuckey. Según los resultados obtenidos, la prueba dio como positiva a la hipótesis alternativa para las comparaciones entre las cepas C31-C3 y las cepas C1-C3. Según la prueba entre dichas cepas existen diferencias significativas entre sus promedios de PICR. En cambio, para el caso de la comparación de las cepas C31-C1 se puede observar que se acepta la hipótesis nula, dando como resultado que entre dichas cepas no existe diferencia significativa.

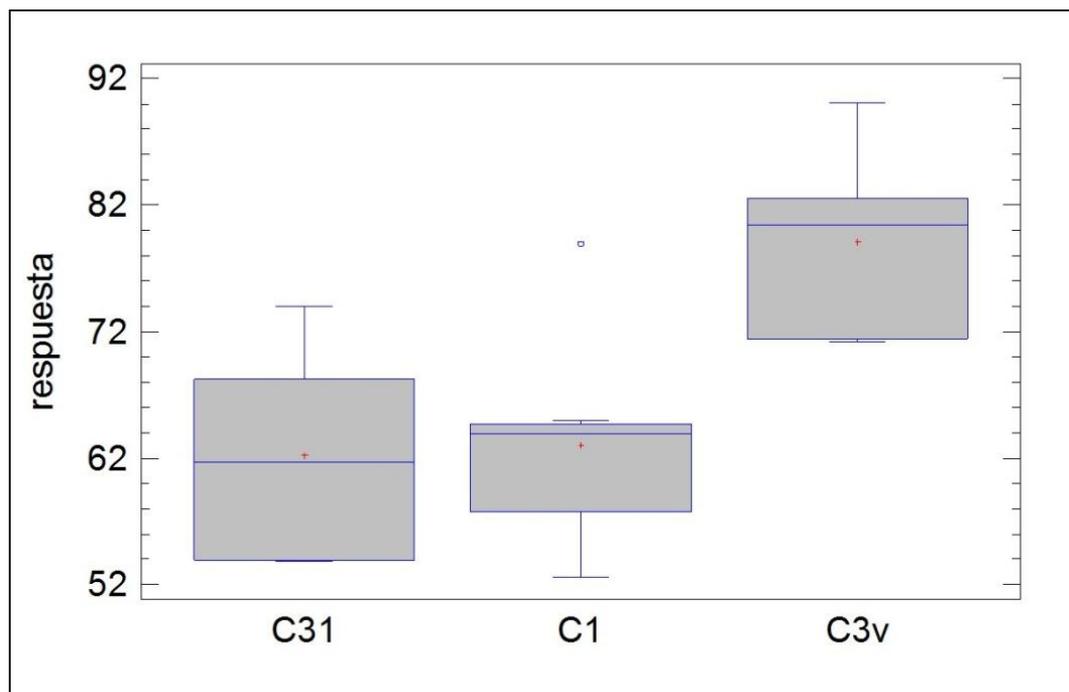


Figura 29. PICR de las cepas evaluadas en el día 7.

Los resultados obtenidos por el análisis estadístico se pueden contrastar con los trabajos presentados por Muthukumar et al ⁽⁶⁰⁾. Los resultados que reportó para cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* se ubicaron en un rango entre 52.6-80.0 y 54.1-88.0 respectivamente. Estos resultados se ubican entre los mismos rangos de cada una de la cepas evaluadas en el presente trabajo de investigación, tal y como reporta la Tabla 13. Esto podría significar que las cepas evaluadas podrían tratarse de cepas de *Trichoderma viride* o *Trichoderma harzianum*; o en todo caso presentar un nivel de antagonismo equivalente al de estos microorganismos.

Tabla 14. Prueba de Tuckey para la comprobación de diferencias significativas entre grupos.

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C31	10	62.2015	X
C1	8	63.0585	X
C3	10	79.1282	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
C31 - C1		-0.857048	7.20072
C31 - C3	*	-16.9267	6.7889
C1 - C3	*	-16.0697	7.20072

Ante tales resultados y ante la falta de documentación actualizada de la observación del desarrollo de colonias enfrentadas del día 7 al día 14 de incubación; se decidió en el presente trabajo de investigación el realizar el aporte del seguimiento de las cepas evaluadas hasta el día 14 de incubación.

Los valores promedio de los resultados de PICR por día en cada hongo evaluado se pueden observar en la Figura 30, en donde se puede observar su comportamiento a través del tiempo (7, 8, 9, 10, 11 y 14 días). En esta gráfica se puede observar claramente cómo, a pesar de la completa colonización de la superficie de la placa, los valores de PICR siguieron aumentando.

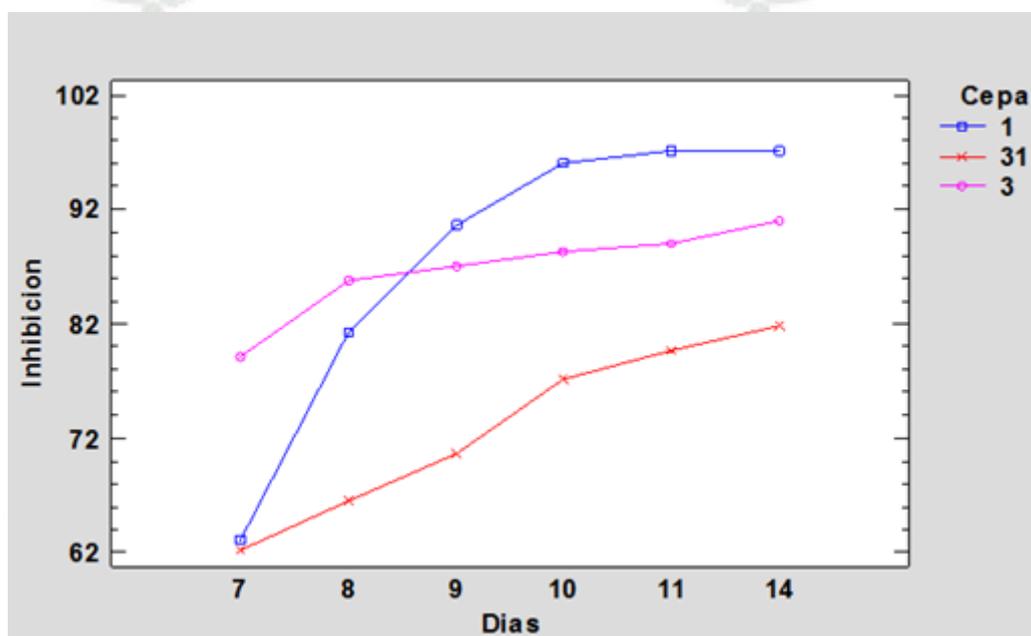


Figura 30. Tendencias para las cepas evaluadas respecto al tiempo

Como se puede observar en la Figura 30, las tres cepas demostraron comportamientos distintos pero igualmente ascendentes entre todas. En el caso del hongo 1 se puede observar en la gráfica un aumento claro en su PICR entre los días 7 a 10; mostrando una pendiente mucho más pronunciada en comparación de los hongos 31 y 3. Además, el hongo 1 posee los valores más altos de PICR entre los tres hongos. Para el caso del hongo 31 se pudo observar valores iniciales similares a los del hongo 1, pero su PICR en los últimos días fue mucho menor en comparación del mismo. Finalmente el caso del hongo 3 se observa valores PICR cercanos a los valores que presentó el hongo 1, pero con la diferencia de tener los valores iniciales

de PICR mucho más altos en comparación de los demás. Esto puede demostrar una posible capacidad de competencia mayor en comparación de los demás hongos.

Una vez obtenidos los valores del PICR de cada una de las repeticiones de los hongos durante los días, se hizo una prueba de ANOVA entre todos los valores obtenidos para observar la existencia de una diferencia significativa. Como se puede observar en la Tabla 15, la prueba dio como **positiva** a la hipótesis alternativa con un valor P 0.0000, demostrando que existen diferencias significativas entre las cepas evaluados (valor $p=0.0001$). Así como también en la respuesta a través de los días (valor $p=0.0000$). Además se observa que la interacción cepas-días es estadísticamente significativa (valor $p=0.0000$), lo cual se puede interpretar indicando que existen diferencias a través del tiempo entre las diferentes cepas enfrentadas con el hongo *Sclerotium cepivorum*.

Tabla 15. Análisis de varianza para las Cepas, Días e interacción Días*Cepas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Cepa	7681.8	2	3840.9	14.57	0.0001
ERROR(Repeticiones)	6591.08	25	263.643	24.30	0.0000
Días	9483.65	5	1896.73	174.83	0.0000
Días*Cepa	2328.94	10	232.894	21.47	0.0000
ERROR(Días)	1356.16	125	10.8493		
Total (corregido)	26734.0	167			

3.3.Prueba de Colonización de esclerocios

Como última prueba para evaluar la capacidad antagónica de los hongos evaluados contra el patógeno de la podredumbre blanca del ajo, se realizó la prueba de colonización de esclerocios la cual tiene por objetivo la observación de la capacidad parasitaria, evidenciada durante la prueba de evaluación de PICR, frente a los esclerocios del hongo *Sclerotium cepivorum*. En esta metodología se expusieron placas totalmente colonizadas por el patógeno que ya desarrollaron esclerocios en toda su superficie.

En la Figura 31 se aprecia que, los hongos evaluados presentaron una capacidad parasitaria observable a simple vista en la placa. Pero, además al ser observados desde la perspectiva de un microscopio, se pudo observar la presencia de hifas con

conidios generados alrededor del esclerocio. Estos conidios generados demuestran la existencia de un hongo colonizador y que ha logrado desarrollarse en el esclerocio. Según la descripción del hongo⁽³²⁾, la existencia de conidios en el hongo *Sclerotium cepivorum* es una característica muy rara.



Figura 31. Imagen de los esclerocios parasitados.

También, como se puede observar en la Tabla 16, se realizó un conteo de la cantidad de esclerocios colonizados en comparación de los esclerocios totales. Para ello se recolectó una pequeña cantidad de esclerocios de la placa infectada y se llevó al microscopio para observar qué número de esclerocios se presentaban intactos y qué número se encontraba con la presencia de hifas y conidiogénesis a su alrededor. El resultado fue que en los tres casos se pudo observar la presencia de 53.76% de esclerocios colonizados para el hongo N°1, 48.28% de colonización para el hongo N°31 y 60.52% de colonización para el hongo N°3. Estos resultados pueden compararse con la de otras pruebas de colonización de esclerocios reportadas por Ayers & Adams⁽⁶²⁾ en donde se reportó resultados entre aproximadamente un 40-50% de esclerocios parasitados por parte del hongo *Sporidesmium sclerotivorum*, en donde también se observó la presencia de conidias o conidióforos en la superficie de los esclerocios.

Tabla 16. Resultados de la prueba de colonización de esclerocios.

<i>N° de Cepa</i>	<i>Repetición</i>	<i>N° de esclerocios</i>	<i>Esclerocios colonizados</i>	<i>% de Colonización</i>	<i>Media</i>
1	1	20	10	50	53.76
	2	36	21	58.33	
	3	17	9	52.94	
31	1	19	12	48	48.28
	2	30	7	36.84	
	3	18	18	60	
3	1	12	12	66	60.52
	2	13	13	54.17	
	3	17	17	60.71	

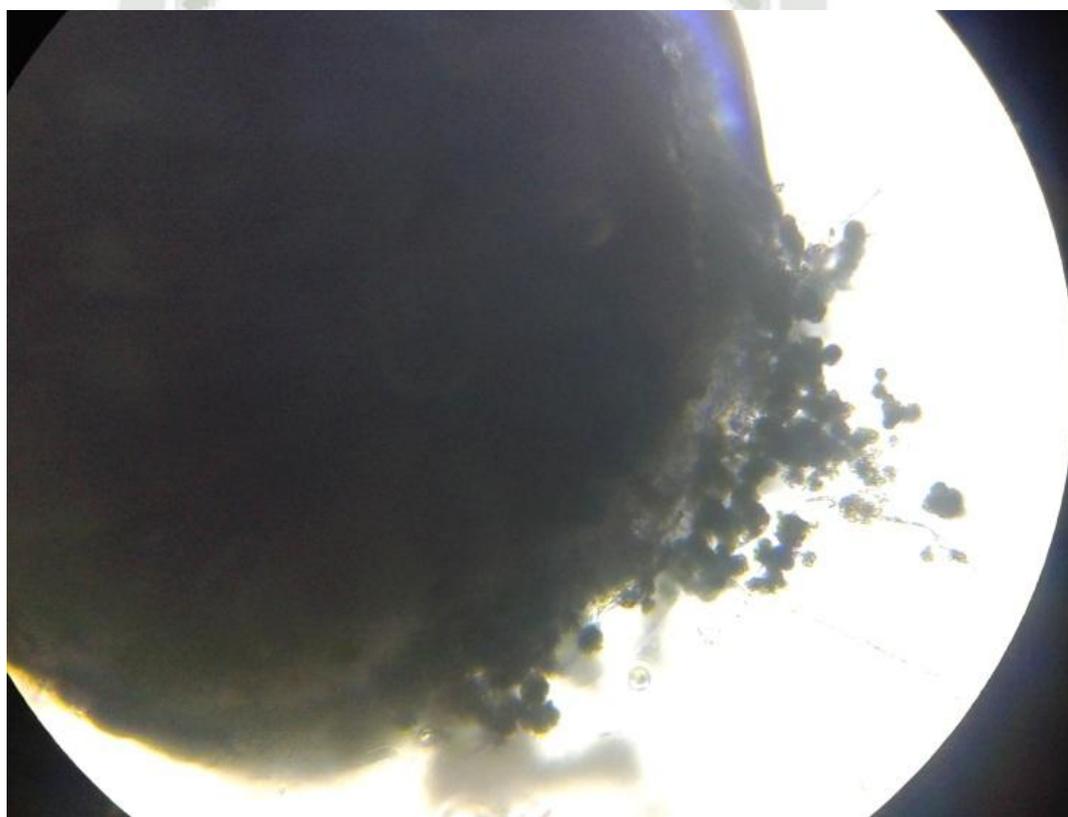


Figura 32. Esclerocio colonizado visto desde el microscopio. Se puede observar la presencia de conidios en su superficie.

Esta colonización demuestra dentro de la tabla de Ezziyani ⁽⁴¹⁾ y según lo reportado por Jhonson ⁽⁴⁰⁾ la presencia de un antagonismo muy fuerte, ya que el hongo ha sido capaz de desarrollarse en el hongo del patógeno y, además, fue capaz de esporular encima del mismo.

4. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA CONTRA *Sclerotium cepivorum*

La etapa de identificación de los hongos con capacidad antagónica contra *Sclerotium cepivorum*, que se realizó al mismo tiempo que la evaluación de PICR de 10 repeticiones, consistió en dos etapas para la identificación de los hongos a evaluar.

Se realizó una observación de la morfología del hongo evaluado, para ello se tomó muestras y se observaron a través de un microscopio en los aumentos de 40X y 100X. Las características observadas fueron similares para los tres hongos.

- El hongo presentó conidióforos hialinos, multiseptados más no verticilados y con la presencia de fiálides solas o en grupos.
- Presenta conidios del tipo fialosporas, hialinas, ovoides y distribuidas en grupos a partir de su fiálides.
- El tipo de crecimiento de la colonia fue rápida, con generación de micelio blanquecino que, dependiendo de su exposición a la luz, tornaba más rápidamente a verde.
- También se denotó en las colonias un olor dulce proveniente de cada una de ellas.

Teniendo todas estas características del hongo se recurrió a la clave de identificación provista por Barnett & Huntter ⁽⁵⁶⁾ en la cual se llegó a la identificación del género *Trichoderma sp.* para las tres cepas evaluadas. Así mismo mediante las imágenes microscópicas y las imágenes provistas en la misma clave se pudo corroborar. Para el caso del crecimiento influenciado por la luz y el olor dulce proveniente de las placas se corroboró mediante la descripción de Gams & Bissett ⁽⁴⁷⁾.

Para el caso de la identificación de cada una de estas cepas a nivel de especie, se hizo uso del servicio de identificación molecular provisto por la empresa ADN Uchumayo la cual reportó las secuencias obtenidas (Anexo 9) por medio de los primers ITS1 con lo cual, mediante el uso de la herramienta BLAST provista por la página NCBI se pudo llegar a las siguientes identificaciones.

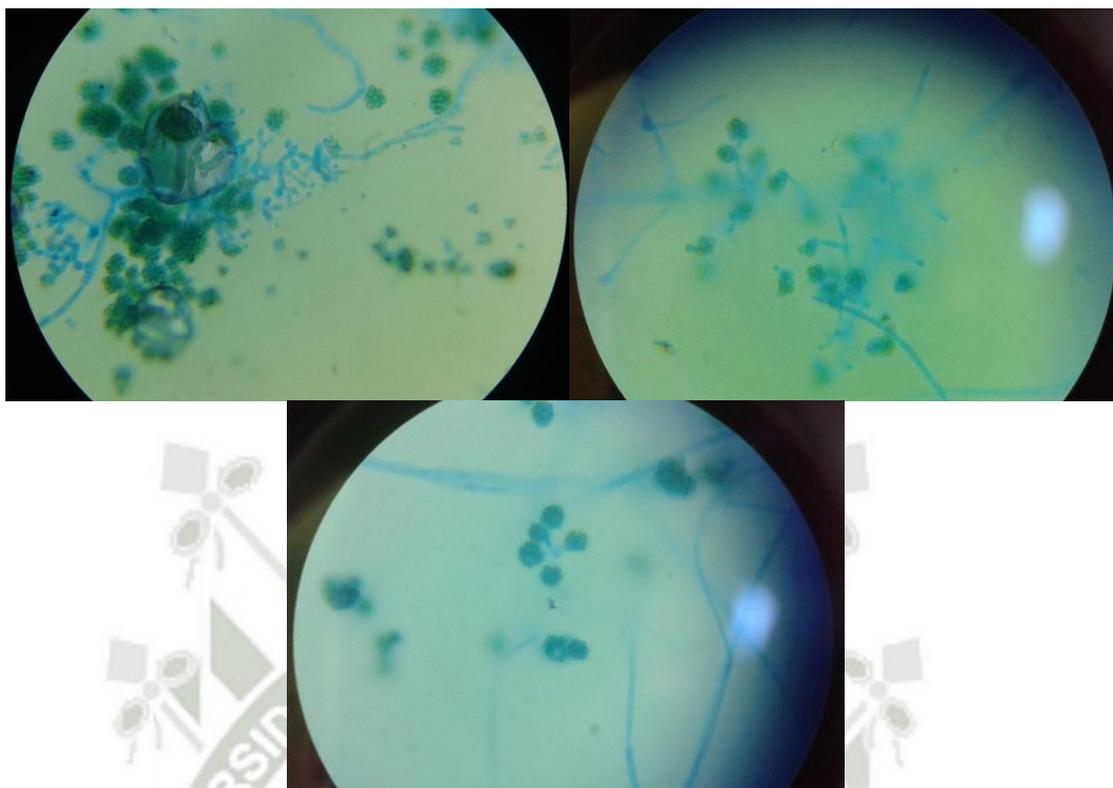


Figura 33. Imágenes microscópicas de los hongos N° 3, N° 1 y N° 31 respectivamente.

Tabla 17. Resultados de Identificación molecular con su respectivo porcentaje de identidad.

N° de Cepa	Identificación	Identidad
1	<i>Trichoderma viridescens</i>	99%
31	<i>Trichoderma harzianum</i>	99%
3	<i>Trichoderma harzianum</i>	100%

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

1. Se aisló a partir de 20 muestras de suelo, 22 cepas de hongos filamentosos, entre los cuales se aisló tres hongos filamentosos de suelo que presentaron capacidad antagónica contra el hongo *Sclerotium cepivorum*. Los cuales, presentaron el comportamiento de un agente controlador del hongo *Sclerotium cepivorum* con valores de PICR del 62.20% (cepa N°31), 63.10% (cepa N°1) y 79.13% (cepa N°3) para el día 7 y 81.75% (cepa N°31), 97.16% (cepa N°1), y 91.05% (cepa N°3) para el día 14.
2. Se aisló mediante las metodologías de diluciones en placas y el lavado de esclerocios una cantidad total de 19 hongos para la evaluación de su PICR; mientras que, las metodologías del cultivo de triturado de raíz y cámara húmeda solo aisló 3 hongos para la evaluación.
3. Se evaluó la capacidad antagónica de los hongos aislados contra *Sclerotium cepivorum*. El resultado obtenido fue un grupo de hongos antagónicos, entre los cuales los más representativos fueron los hongos N° 31, N° 1 y N° 3 cuyo código es P(0)2H, P(T50)1H y P(4T)1H respectivamente, su procedencia es la rizosfera del ajo y fueron obtenidos por el método de lavado de esclerocios (cepa N°31) y dilución en placa (cepa N°1 y cepa N°3).
4. Se identificó hasta nivel de especie a los hongos N° 31, N° 1 y N° 3, siendo su identificación la siguiente: *Trichoderma harzianum* para el hongo N° 31, *Trichoderma viridescence* para el hongo N° 1 y *Trichoderma harzianum* para el hongo N° 3.

RECOMENDACIONES

PRIMERO.-

Realizar las pruebas en campo para los tres *Trichodermas* obtenidos para su evaluación y determinación de su porcentaje de control de la enfermedad en campo.

SEGUNDO.-

Ejecutar estudios para la generación de un formulado para los *Trichodermas* aislados, a modo que se pueda optimizar su capacidad como controlador biológico y su porcentaje de control en el campo.

TERCERO.-

Desarrollar una caracterización más profunda a los *Trichodermas* obtenidos, a modo que se pueda disponer de estos datos para un futuro diseño de producción de biomasa del mismo con la finalidad de actuar como un producto biofungicida.

CUARTO.-

Realizar una investigación más profunda respecto a las poblaciones con capacidad antagonista presentes tanto en suelos sanos como suelos enfermos, tomando en consideración la proveniencia, características del suelo y cultivo de donde provengan.

BIBLIOGRAFÍA

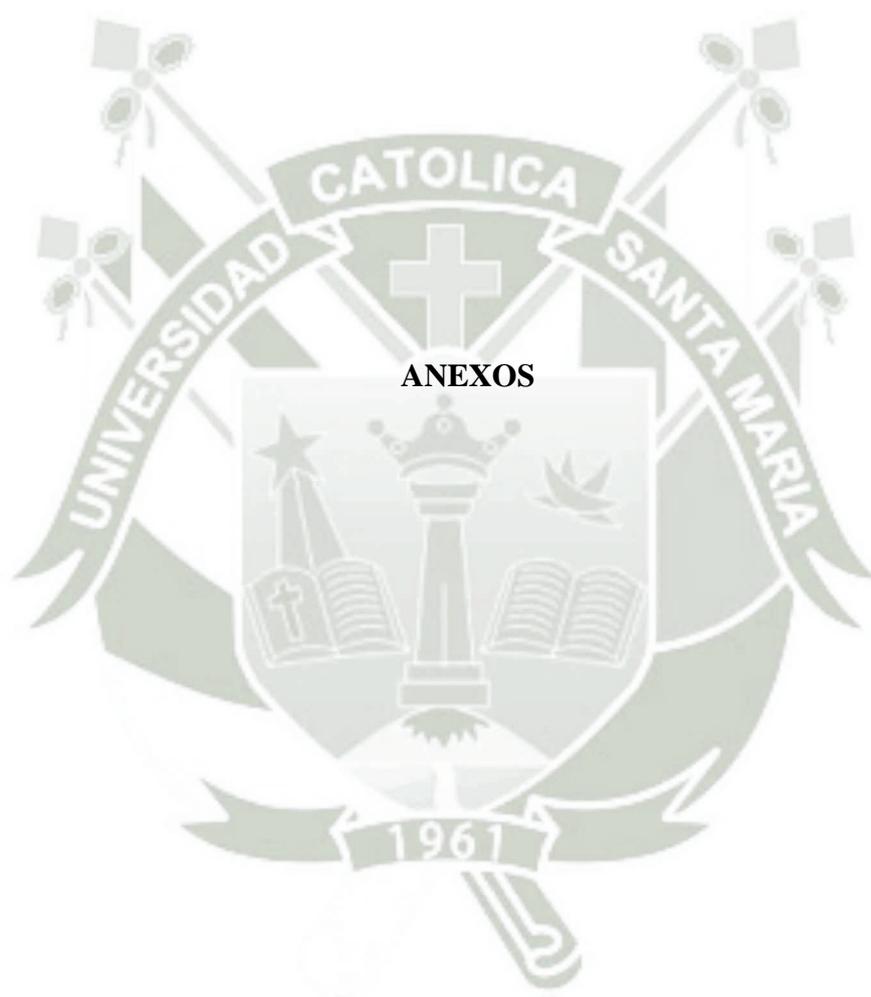
1. Baldarrago Pastor R. Avance de Actividades y Logros 2014. Informe Anual. Arequipa: Gobierno Regional de Arequipa, Gerencia Regional de Arequipa; 2014.
2. Gerencia Regional de Agricultura de Arequipa. Arequipa: avance de siembras y cosechas campaña agrícola 2014-2015. Informe Anual. Arequipa: Gobierno Regional de Arequipa, Area de Información Agraria; 2015.
3. Piccolo RJ. Enfermedades micológicas y bacterianas del ajo (*Allium Sativum*). Artículo de Dibulgación. La Consulta: INTA, EEA La Consulta; 2007.
4. Granados MdM. Pudrición Blanca de la Cebolla: una enfermedad difícil de combatir. *Agronomía Costarricense*. 2005 Marzo; 29(2).
5. Rojas V, Ulacio D, Jiménez MA, Perdomo W, Pardo A. Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium Cepivorum* Berk. y la Pudrición Blanca en ajo. *Bioagro*. 2010 Julio; 22(33).
6. Stavělíková H. Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection - Information. *Horticultural Science*. 2008; 35(3).
7. Torrez Lozano E. Metodología para la propagación masiva de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) libre de enfermedades, mediante cultivo de tejidos. Tesis posgrado. Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía; 2012.
8. López Quintero L, Escobar Velásquez H, Parra Fuentes M. Establecimiento de plántulas in vitro de clones de ajo peruano (*Allium sativum* L.). *Mutis*. 2014 Junio; 4(1).
9. Kehr M. E. Descripción, requerimientos climaticos y ecofisiología de la especie. In Avedaño F. L, González A. MI, Peralta A. JM, Seguel B. I, editors. Cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) para la zona sur de Chile. Temuco: INIA-Chile; 2002. p. 10-24.
10. Dirección de Agronegocios. AJO. Lima: Ministerio de Agricultura, Dirección General de Competitividad Agraria; 2011.
11. Consorcio ASECAL S.L. y Mercurio Consultores S.L. Asistencia Técnica para los Planes Operativos por Producto. Informe final. Lima: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo; 2007.
12. Galdames G. R. Principales enfermedades de la zona sur. In Avedaño F. L, Gonzáles A. MI, Peralta A. JM, Seguel B. I, editors. Cultivo del ajo "*Allium sativum* L." para la zona sur de chile. Temuco: INIA-Chile; 2002. p. 75-89.
13. Granados MdM, Wang A. Efecto de biocontroladores aislados en fincas productoras de cebolla sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*). *Agronomía Costarricense*. 2008 Enero; 32(1).

14. Astorga Quiróz K, Zúñiga Vega C, Rivera Méndez W. Aislamiento e identificación de patógenos de la estirpe silvestre del ajo (*Allium sativum* L.). Tecnología en marcha. 2014 Enero; 27(1).
15. Borges Pereira R, Oliveira Rodriguez V. Podridao branca do alho e da cebola. NossoAlho. 2013 Abril.
16. Adams PB. A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil. Plant Disease Reporter. 1979; 63(5).
17. Adams PB, Papavizas GC. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease severity. Phytopathology. 1971; 61(10).
18. Crowe FJ, Hall DH. Soil temperature and moisture effects on sclerotium germination and infection in onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. Phytopathology. 1980; 70(1).
19. Zewde T, Fininsa C, Sakhuja PK, Ahmed S. Association of white rot (*Sclerotium cepivorum*) of garlic with environmental factors and cultural practices in the North Shewa highlands of Ethiopia. Crop Protection. 2007 Octubre; 26(10).
20. Ehn B, Ferry A, Turini T, Crowe F. California Garlic & Onion Research Advisory Board. [Online].; 2012 [cited 2015 Diciembre 28. Available from: <http://www.cagarlicandonion.com/resources/newsletter/download-asset/id/195/recv/21>.
21. Davis RM, Hao JJ, Romberg MK, Nuñez JJ, Smith RF. Efficacy of germination stimulants of *Sclerotium cepivorum* for management of white rot of garlic. Plant Disease. 2007; 91(2).
22. Hovius MHY, McDonald MR. Management of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in onions of organic soil with soil-applied diallyl sulfide and di-N-propyl disulfide. Plant Pathology. 2002; 24.
23. Melero Vara JM, Prados Liger AM, Basallote Ureba MJ. Comparison of physical, chemical and biological methods of controlling garlic white rot. European Journal of Plant Pathology. 2000; 106.
24. Delgadillo Sánchez F, Zavaleta Mejía E, Osada Kawasoe S, Arévalo Valenzuela A, González Hernández VA, Nieto Angel D, et al. Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). Revista Fitotecnia Mexicana. 2002 Octubre; 25(4).
25. Ulasio Osorio D, Zavaleta Mejía E, Pedroza Sandoval A. Strategies for management of *Sclerotium cepivorum* Berk. in garlic. Journal of Plant Pathology. 2006; 88(3).
26. McLean KL, Stewart A. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonist. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 2000; 28.

27. Avila Miranda ME, Herrera Estrella A, Peña Cabrales JJ. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white rot under field conditions. *Soil Biology & Biochemistry*. 2006; 38.
28. Abd-El-Moity TH, Shatla MN. Biological control of white rot disease of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology Z*. 1981; 100.
29. Backhouse D, Stewart A. Interactions between *Bacillus* species and sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Soil Biology & Biochemistry*. 1989; 21(1).
30. Ulacio Osorio D, Zavaleta Mejía E, García Espinosa R, Delgadillo Sánchez F, Pedroza Sandoval A, Martínez Garza A. Materia orgánica y microorganismos antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su impacto en el progreso de la Pudrición Blanca en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2003; 21(3).
31. Clarkson JP, Payne T, Mead A, Whipps JM. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology*. 2002; 51.
32. MycoBank. MycoBank. [Online]. [cited 2015 Noviembre 29. Available from: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=14773&Fields=All>.
33. Van Driesche RG, Abell K. Classical and Augmentative Biological Control. In Jorgensen SE, Fath B. *Encyclopedia of Ecology*. Amherst: Elsevier B.V.; 2013. p. 575-582.
34. Lazarovitis G, Turnbull A, Jhonston-Monje D. Plant Health Management: Biological Control of Plant Pathogens. In Van Alfen NK. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. California: Elsevier; 2014. p. V4:388-400.
35. Gurr GM. Biological Control Models. In Jorgensen ES, Fath B. *Encyclopedia of Ecology*. Amsterdam: Elsevier B. V.; 2008. p. 403-408.
36. Roderik GK, Navajas M. Genes in new environments: genetics and evolution in Biological Control. *Nature Reviews*. 2003 Noviembre; 4.
37. Wratten SD. Conservation Biological Control and Biopesticides in Agricultural. In Jorgensen SE, Fath B. *Encyclopedia of Ecology*. Amsterdam: Elsevier B. V.; 2008. p. 744-747.
38. Case CL. Biology 240. [Online]. [cited 2015 Noviembre 29. Available from: <http://accounts.smccd.edu/case/biol240/antibiosis.html>.
39. Olmedo Monfil V, Casas-Flores S. Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Amsterdam: Elsevier

- B. V.; 2014. p. 429-453.
40. Jhonson LF, Curl EA, Bond JH, Fribourg HA. Methods for Studying Soil Microflora-Plant Disease Relationships. Segunda ed. United States of America: Burgess Publishing Company; 1960.
41. Ezziyani M, Pérez Sánchez C, Requena ME, Rubio L, Candela ME. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 2004; 26.
42. Trigiano RN, Windham MT, Windham AS. Plant Pathology - Concepts and Laboratory Exercises. Segunda ed.: Taylor & Francis Group; 2008.
43. Sajid Salahuddin AS, Bihar Moqdad AA. Study of antagonistic capability of *Trichoderma harzianum* isolates against some pathogenic soil borne fungi. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 2014; 5(1).
44. Astorga-Quirós K, Meneses-Montero K, Zúñiga-Vega C, Brenes-Madriz J, Rivera-Méndez W. Evaluation of antagonism of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* against three garlic pathogens. *Tecnología en Marcha*. 2014 Abril; 27(2).
45. Kredics L, Hatvani L, Naeimi S, Körmökzi P, Manczinger L, Vágvölgyi C, et al. Biodiversity in the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. In Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Amsterdam: Elsevier B. V.; 2014. p. 3-24.
46. Sandle T. *Trichoderma*. In Batt CA. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Amsterdam: Elsevier B. V.; 2014. p. 644-646.
47. Gams W, Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In Kubicek CP, Harman GE. *Trichoderma & Gliocladium*. London: Taylor & Francis; 2002. p. 3-31.
48. Smith JL, Collins HP, Crump AR, Bailey VL. Management of Soil Biota and their Processes. In Eldor A. P. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Amsterdam: Elsevier B. V.; 2015. p. 539-572.
49. Pankhurst CE, Lynch JM. Biocontrol of Soil-born Diseases. In Hillel D. *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Amsterdam: Elsevier B. V.; 2005. p. 129-136.
50. Hue NV, Uchida R, Ho MC. Sampling and Analisis of Soils and Plant tissues. In Silva JA, S. Uchida R. *Plant Nutrient Managment in Hawaii's Soils*. Hawaii: University of Hawaii; 2000. p. 23-30.
51. Pennock D, Yates T. Soil Sampling Designes. In Carter MR, Gregorich EG. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. London: Taylor & Francis; 2006. p. 25-38.

52. Ji SH, Anand Gururani M, Chun SC. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. 2014 Enero; 169(1).
53. Agrios GN. *Fitopatología*. Segunda ed.: Limusa S. A.; 1995.
54. Vimard B, Leggett ME, Rahe JE. Rapid Isolation of Sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from Muck Soil by Sucrose Centrifugation. *Phytopathology*. 1986; 76(4).
55. Smith D, Kolkowsky J. Fungi. In Hunter-Cevera JC, Belt A. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. San Diego: Academic Press Inc.; 1996. p. 101-132.
56. Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. Cuarta ed.: APS Press; 1998.
57. Balsler TC, Wixon D, Mortiz LK, Lipps L. The Microbiology of Natural Soils. In Dixon GR, Tilston EL. *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. London: Springer Science; 2010. p. 27-58.
58. Tariq V. Fungi Online. [Online].; 2014 [cited 2015 Diciembre 4. Available from: http://www.fungionline.org.uk/5kinetics/4solid_media.html.
59. Kamala T, Indira S. Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *Biotech*. 2011; 3(1).
60. Muthukumar A, Eswaran A, Sanjeevkumas K. Exploitation of *Trichoderma* species on the growth of *Pythium aphanidermatu* in Chilli. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011; 42.
61. Hernández Cástillo FD, Flores Flores W, Castillo Reyes F, Gallegos Morales G, Castro Del Angel E. Antibiosis In vitro of *Trichoderma* strains metabolic extract on mycelial growth and reproductive capacity of *Fusarium oxysporum* isolated from Pepper Plants (*Capsicum annum* L.). *British Biotechnology Journal*. 2014 Marzo; 4(4).
62. Ayers WA, Adams PB. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *sclerotium* species by *sporidesmium sclerotivorum*. *Can. J. Microbiology*. 1979; 25.
63. Dirección General de Seguimiento y Evaluación de Políticas. Valor Bruto de la Producción Agropecuaria -VBP. Informe Mensual. Arequipa: Ministerio de Agricultura y Riego, Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias; 2014.
64. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo. Plan operativo del producto ajo. Informe del Proyecto. Lima: Miniesterio de Comercio Exterior y Turismo; 2004.



Anexo 1**Medio PDA (Potato Dextrose Agar)**

Extracto de papa	4g
Glucosa	20g
Agar	18g
Agua Destilada	1000ml
Esterilización	121°C x 15 min.

Medio Ajo (Potato Dextrose Agar)

Ajo	300g
Agar	18g
Agua Destilada	1000ml
Esterilización	121°C x 15 min.

Medio Czapeck (Potato Dextrose Agar)

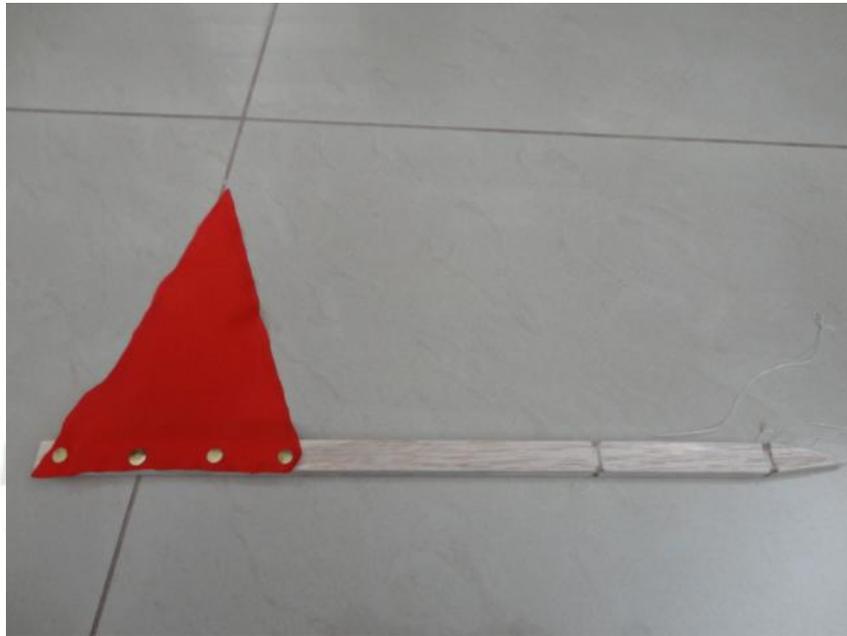
NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g
KCl	0.5g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01g
Sacarosa	30g
Extracto de levadura (opcional)	1g
Agar	18g
Agua Destilada	1000ml
Esterilización	121°C x 15 min.

Anexo 2



Mapas de la zona de muestreo

Anexo 3



Estaca con bandera para el muestreo por Trampeo de esclerocios



Bolsas de esclerocios atadas a la estaca para el Trampeo de esclerocios

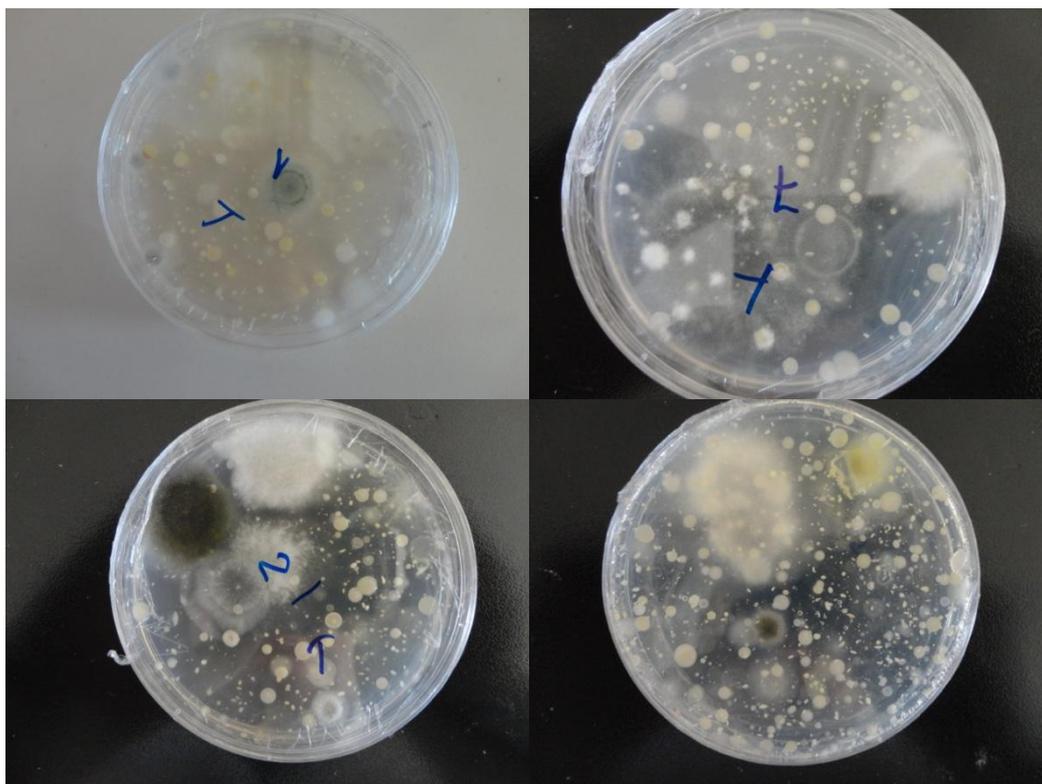


Siembra de las estacas para el Trampeo de esclerocios

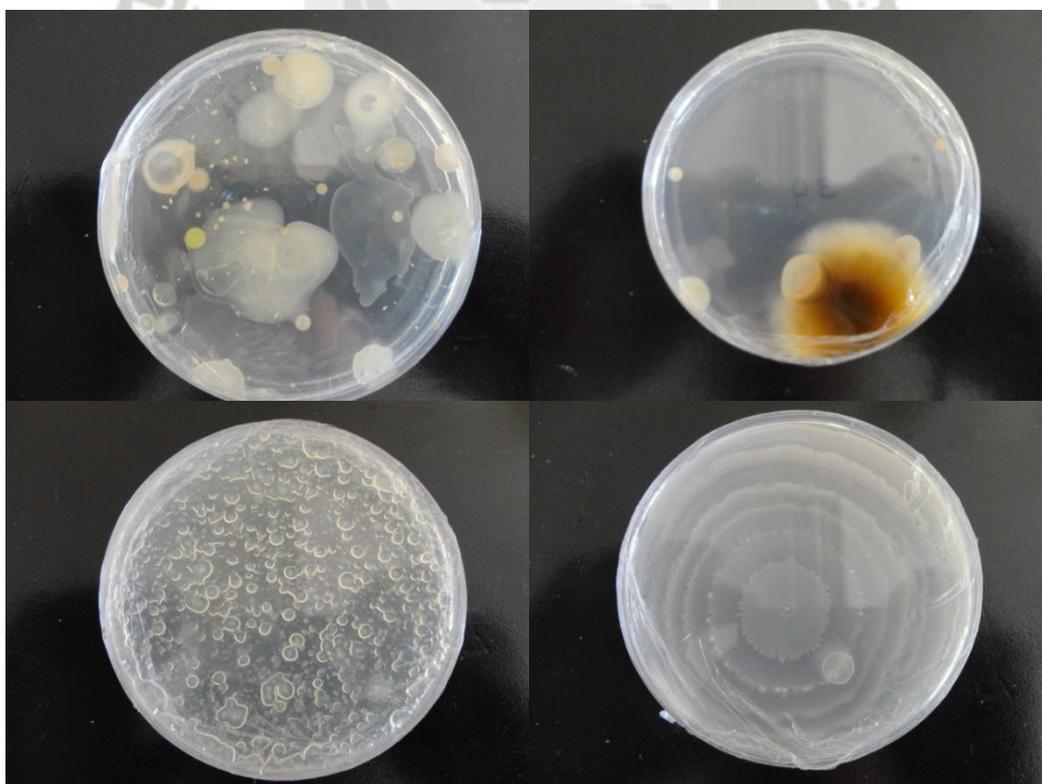


Recuperación de las bolsas con esclerocios al cabo de 1 mes

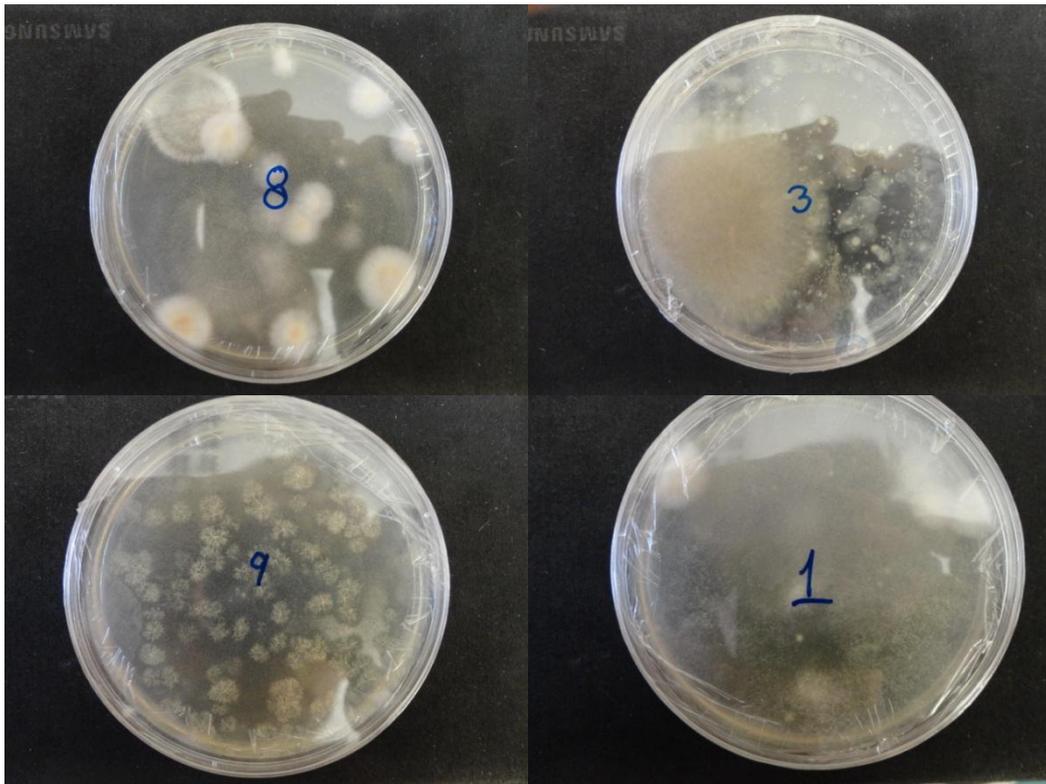
Anexo 4



Aislamientos de tierra por dilución en placa



Aislamientos de triturado de raíz



Aislamiento por dilución en placa con lavado de esclerocios



Raíces con micelio en cámara húmeda

Anexo 5



Ajo infectado con infectado con esclerocios



Esclerocios recolectados



Desinfección superficial de los esclerocios

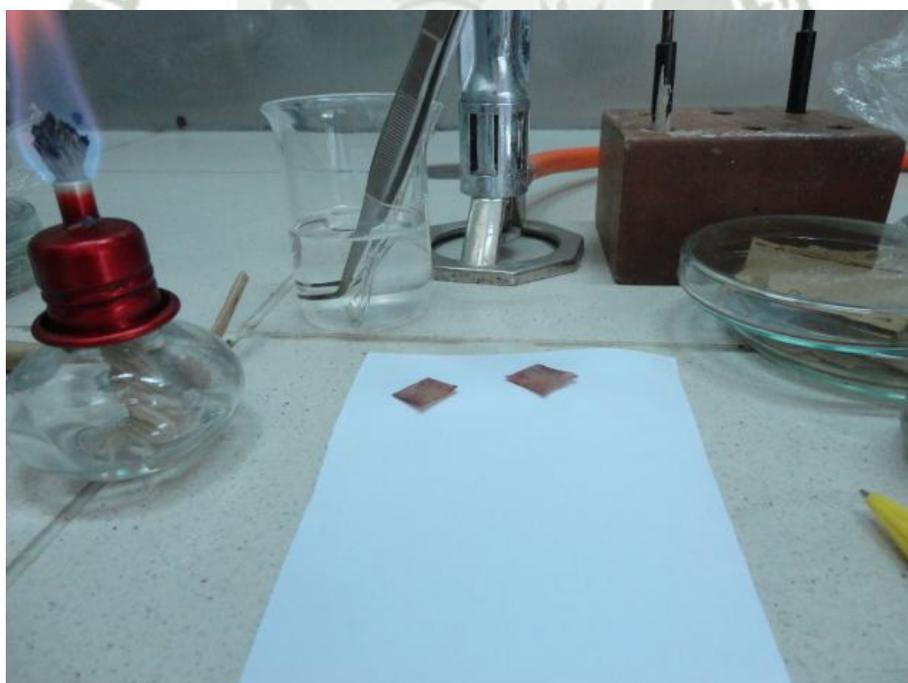


Hongo *Sclerotium cepivorum* aislado

Anexo 6

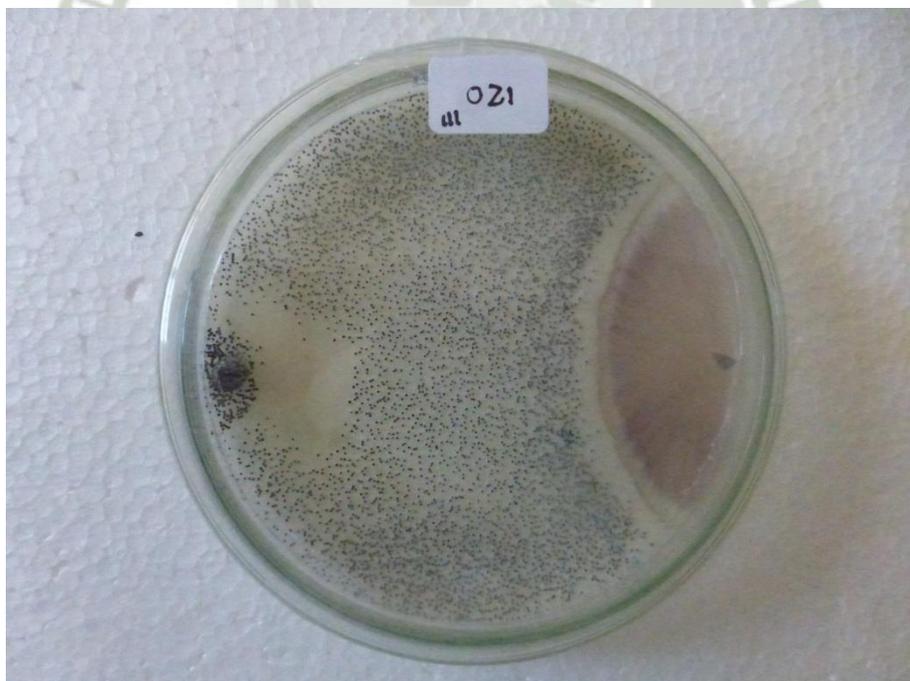


Conservación por desecación e papel filtro

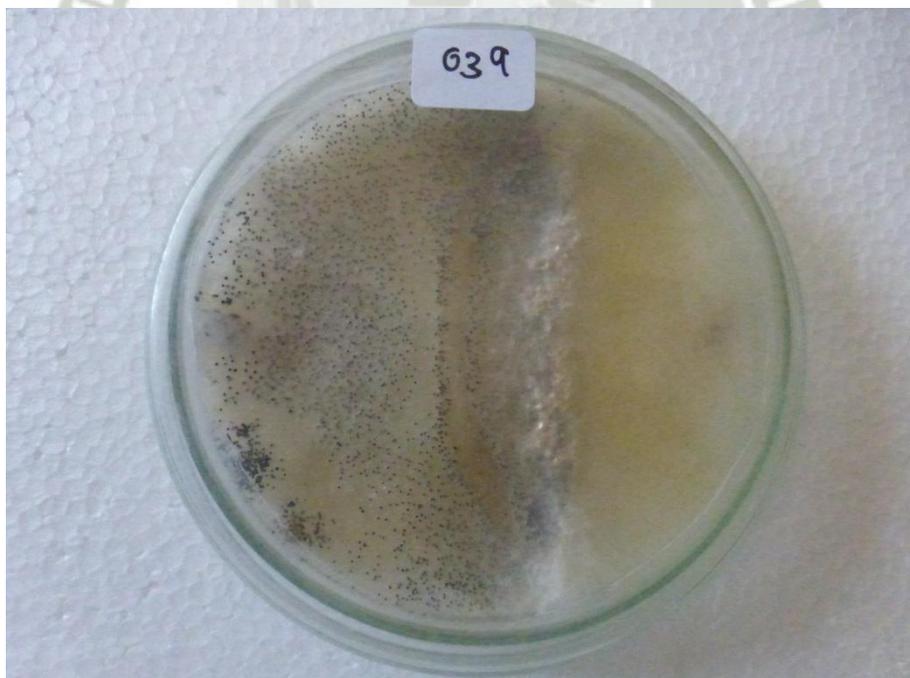
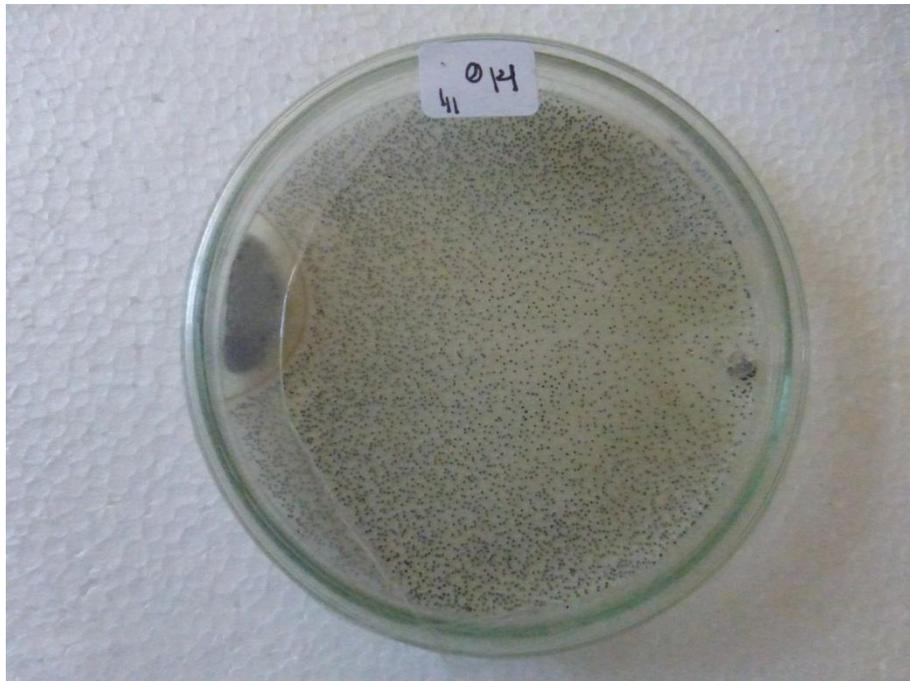


Papeles filtros impregnados con un hongo

Anexo 7



Enfrentamientos de hongos evaluados contra *Sclerotium cepivorum*



Enfrentamientos de hongos evaluados contra *Sclerotium cepivorum*

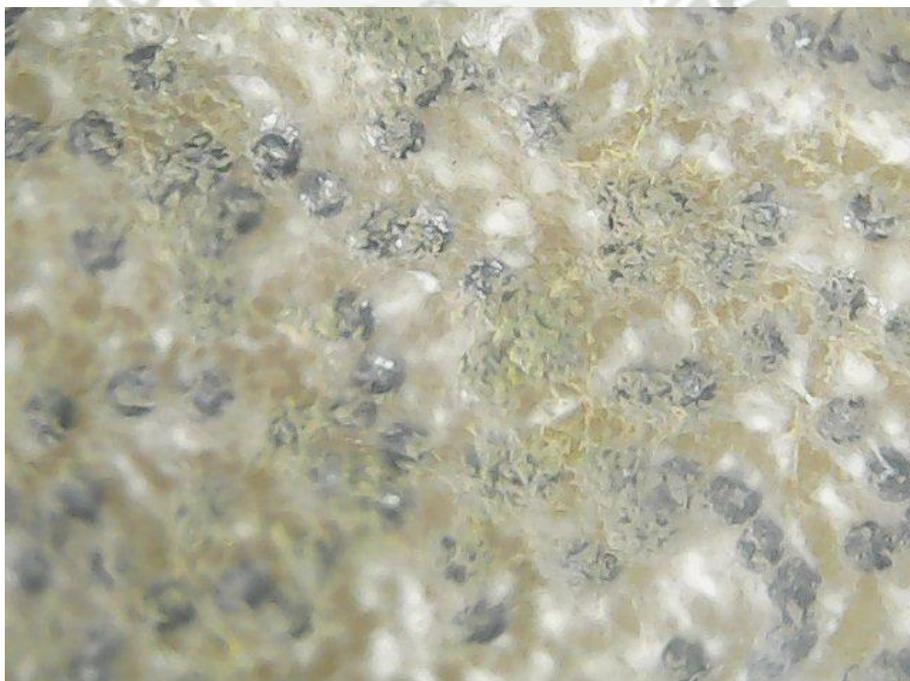


Enfrentamientos de hongos evaluados contra *Sclerotium cepivorum*

Anexo 8



Esclerocios sanos y esclerocios colonizados (vistos desde un estereoscopio)



Esclerocios sanos y esclerocios colonizados en placa (vistos desde un estereoscopio)

Anexo 9

Secuencias de la identificación molecular

>14_1HONGO-RODRI_ITS1F TRIM QUALITY: 20

ACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAAccataCCAAACTGTTGCCTC
GGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCCG
CGGAGGGACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTTC
TTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGaagaACGCAGCGAAAtGcgaTAAGTAATGTGA
ATTGCagaATTcactGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAG
TATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTcAACCCCTCGAACCCCTC
CGGGGGTCCGGCGTtggggAtCGGGAACCCctacgacggGATCCCGGCCCCGAAA

>15_3HONGO-RODRI_ITS1F TRIM QUALITY: 20

CCCAAACCCAATGTGAAcattaCCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCC
CCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCA
AAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTC
TCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCgaAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTGGCATcgaTGAAGAACGCAGcGAAATGCACTTAagCATAT
CAATAAGCGGAGGAaaatAT

>16_31HONGO-RODRI_ITS1F TRIM QUALITY: 20

ACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCT
CGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCC
GCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTTTTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTA
TAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCG
TCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCC
TCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGC
CTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGCGTCCA
CAGCCGTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA
ATACCCGCTGAACTTAAGCATATC