

Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla

Sánchez, Aixa D.¹; Viviana Barrera²; Graciela E. Reybet³; M. Cristina Sosa^{1,4}

¹IBAC. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Ruta 151 Km 12,5. Río Negro; ²Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) INTA Castelar, Nicolas Repetto y de los Reseros s/n (1686), Hurlingham, Buenos Aires; ³Horticultura, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Ruta 151 km 12,5, Río Negro;

⁴mcrstinasosa10@gmail.com

Sánchez, Aixa D.; Viviana Barrera; Graciela E. Reybet; M. Cristina Sosa (2015) Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. Rev. Fac. Agron. Vol 114 (1): 61-70.

En Argentina, la “podredumbre basal” y el “mal de almácigos” causados por el complejo *Fusarium* spp. constituyen uno de los problemas más serios en cebolla. En este trabajo se estudió el uso de especies del género *Trichoderma* como agentes de control biológico (ACB) de *F. oxysporum*, causal del “mal de almácigos” en cebolla. Se identificaron y caracterizaron morfológica, cultural y fisiológicamente a 10 aislamientos de *Trichoderma* spp. del cepario de Fitopatología. Por secuenciación del gen TEF-1α se identificaron las especies de *Trichoderma harzianum* s.l. (7), *T. atroviride* (1), *T. koningiopsis* (1) y *T. longibrachiatum* (1). Los aislamientos nativos se compararon con una cepa de un biofungicida comercial (PHC™ T22, Root Shield/Plant Shield) en su capacidad antagonista de aislamientos de *F. oxysporum*. Se estudió *in vitro* el potencial antagonístico en cultivos duales y enfrentados. Además, se determinó la velocidad de crecimiento en placa y la tolerancia a metabolitos volátiles producidos por *Brassica oleracea*. Aislamientos nativos seleccionados de *Trichoderma* y el comercial se evaluaron en ensayos de eficacia de biocontrol *in vivo*: (i) en almácigo, aplicados sobre la semilla y (ii) en el trasplante, aplicados en raíces de plantines. *Trichoderma koningiopsis* (T13) y *T. atroviride* inhibieron en 50% al patógeno en cultivos duales. Sólo el crecimiento de *Trichoderma* sp. (T14) y del aislamiento comercial no fue afectado por los volátiles producidos por *Brassica oleracea*. En el bioensayo de almácigo, el tratamiento de *T. koningiopsis* (T14) sobre las semillas y como riego en suelo, consiguió el valor más alto de germinación de plántulas de cebolla (61%) y la mayor colonización de las raíces de cebolla. Este mismo tratamiento aplicado en las raíces sobre plantines de 120 días, produjo menor reducción de raíces afectadas de cebolla que con el aislamiento comercial.

Palabras Clave: *Allium cepa*, control biológico, mal de los almácigos, microorganismos antagonistas, patógeno de suelo

Sánchez, Aixa D.; Viviana Barrera; Graciela E. Reybet; M. Cristina Sosa (2015) Biocontrol with *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* causal of “damping off” in pre and post emergence in onion. Rev. Fac. Agron. Vol 114 (1): 61-70.

In Argentina, the “basal rot” and the “damping off” caused by the complex *Fusarium* spp., are one of the most serious problems in onion. In this work, we studied the use of species of the genus *Trichoderma* as agents of biological control (ACB) against *Fusarium oxysporum*, causal “damping off” in onion. Were identified and characterized morphological, cultural and physiologically to 10 native isolates of *Trichoderma* spp. of the Collection of Phytopathology. Identification of species was performed by sequencing of the TEF-1α gene: *T. harzianum* s.l. (7), *T. atroviride* (1), *T. koningiopsis* (1) and *T. longibrachiatum* (1). The native isolates were compared with an isolate of a commercial biofungicide (PHCTM T22, Root Shield/Plant Shield) in its antagonistic ability “in vitro” against isolates of *F. oxysporum* in dual and opposite cultures. In addition, was determined the speed of growth in plate and tolerance to volatile metabolites produced by *Brassica oleracea*. Commercial and selected native isolates of *Trichoderma* were evaluated in efficacy of biocontrol *in vivo*: (i) in nursery, applied on the seed, and (ii) applied in roots of seedlings. *Trichoderma koningiopsis* (T13) and *T. atroviride* inhibited the growth of *F. oxysporum* at the rate of 50% in dual cultures. Only the growth of *Trichoderma* sp. (T14) and of the commercial isolate not was affected by volatiles produced by *Brassica oleracea*. In the bioassay, the treatment of *T. koningiopsis* (T14) on seeds and irrigation into soil got the highest value of germination of onion seedlings (61%) and the greater colonization of roots. This same treatment applied to the roots on seedlings of 120 days, resulted in lesser reduction of affected roots of onion that the treatment by commercial isolate.

Key Words: *Allium cepa*, control biológico, damping off, antagonistic microorganisms, soil pathogen

Recibido: 01/04/2014

Aceptado: 21/04/2015

Disponible on line: 01/06/2015

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades constituyen una importante limitante en la producción en cebolla (*Allium cepa* L.), debido a que el cultivo es muy susceptible a hongos patógenos del suelo (Kiehr & Delhey, 2007). El complejo *Fusarium* spp., usualmente presente en las áreas de cultivo de cebolla es el problema más serio. La "podredumbre basal" y el "mal de almácigos" en pre y post-emergencia de cebolla son enfermedades causadas por *Fusarium* spp. (Abawi & Lorbeer, 1972; Taylor et al., 2013; Toit et al., 2003).

En Argentina, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* y *F. proliferatum* son los principales causales de "podredumbre basal" (Gatica & Oriolani, 1997; Salvalaggio & Ridao, 2013; Valdez & Marini, 2005). Sin embargo, en Estados Unidos, la densidad de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *cepae* se correlacionó con la incidencia de "mal de los almácigos" en plántulas de cebolla (Abawi & Lorbeer, 1972).

Debido que la semilla y el suelo constituyen la principal fuente de inóculo de *F. oxysporum* (Özer & Köycü, 2004), la protección del cultivo de cebolla por métodos químicos resulta ineficaz. En experiencias locales, se comprobó el efecto del repollo (*Brassica* sp.) aplicado en el suelo como biofumigante sobre la reducción (83%) de la población de *Fusarium oxysporum* (Iriarte et al., 2011). Un enfoque complementario para el manejo involucra el uso de microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos saprófitos que tienen potencial para inhibir el patógeno o para inducir mecanismos de defensa (De Boer et al., 1999; El Hassni et al., 2007; Obes et al., 2014; Yedidia et al., 1999). Entre estos agentes de control biológico (ACB), *Trichoderma* spp. se destaca por controlar a varios hongos de suelo que afectan a cebolla. *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* y *T. pseudokoningii* fueron informadas como las mejores especies antagonistas de la "podredumbre blanca" por *Sclerotium cepivorum* en cebolla (Clarkson et al., 2004; Leta & Selvaraj, 2013; McLean et al., 2005; Metcalf et al., 2004). *Botrytis allii* y *Aspergillus niger*, causales de "podredumbre del cuello" y "carbonilla" en cebolla, respectivamente, también fueron controladas por inmersión de plantines y pulverización con una mezcla de *T. harzianum* y *T. koningii* (El-Neshawy et al., 1999; Özer & Arin, 2014; Sayed et al., 2014).

En el mundo, existen algunos antecedentes sobre el biocontrol de *F. oxysporum* en cebolla. Rajendran & Ranganathan (1996) observaron una disminución en la incidencia de la "podredumbre basal" por *Fusarium* en ensayos a campo mediante el tratamiento combinado de semilla con *T. viride* y *Pseudomonas fluorescens*. Srivastava & Tiwari (2003) demostraron que el tratamiento con *T. viride* de la semilla, seguido de su aplicación a suelo, redujo el "mal de almácigos" en plántulas de cebolla. Coşkuntuna & Özer (2008), encontraron que el tratamiento de semilla con *T. harzianum*, redujo la incidencia de la "podredumbre basal" en el cultivo bajo condiciones de campo.

En este trabajo, teniendo en cuenta la importancia de encontrar métodos de control de *Fusarium oxysporum* en almácigo de cebolla, se propuso "Seleccionar aislamientos de *Trichoderma* spp. antagonistas de *Fusarium oxysporum* responsables de "mal de los almácigos" en pre y post-emergencia de cebolla".

MATERIALES Y MÉTODOS

Patógeno

Aislamiento e Identificación

Se utilizaron aislamientos de *Fusarium oxysporum* identificados morfo-biométrica y molecularmente en el Laboratorio José Crnko, INTA La Consulta, e incorporados a la Colección con el acrónimo LJC. Los aislamientos seleccionados se caracterizaron por su alta (LJC 10463) y moderada (LJC 10466) agresividad en bulbos y plántulas de cebolla (Abawi & Lorbeer, 1972; Southwood, 2010; Taylor et al., 2013; Valdéz et al., 2004). El origen de los aislamientos fue de bulbos de cebolla (*Allium cepa*) cv Valcatorce con "podredumbre basal" procedentes de dos sitios de producción de la Norpatagonia, Plottier (Alto Valle de Río Negro) y Viedma (Valle Inferior de Río Negro).

Las colonias se cultivaron en agar papa dextrosa (APD, Britania) a 28 °C durante 10 días. De las colonias se obtuvieron suspensiones de conidios, para lo cual se cosechó el micelio de la placa de Petri, se suspendió en agua destilada estéril, se filtró a través de algodón y se ajustó microscópicamente con cámara de Neubauer a 10⁶ conidios/mL. Ésta, fue la concentración mínima infectiva (CMI) que produjo el 100% de infección de las semillas del cv. Valcatorce, a los 14 días desde la inoculación (Caligiore Gei et al., 2014).

Antagonista

Se trabajó con aislamientos regionales monoconidiales de especies del género *Trichoderma* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCo y un aislamiento de *Trichoderma harzianum* obtenido desde un formulado comercial (PHCTM T2, Root Shield/Plant Shield).

Caracterización morfológica y cultural

Todos los aislamientos de *Trichoderma* se caracterizaron morfológica y culturalmente siguiendo la metodología propuesta por Samuels (2004) por los siguientes atributos: (I) presencia de pigmentos, (II) aspecto de la colonia, (III) formación de pústulas, (IV) morfología de filídes y conidios y, (V) formación de clamidosporas. Para ello, cada aislamiento se cultivó mediante la siembra de discos (3x3mm) de cultivo con 7 días de edad en placas de Petri en dos medios: (1) Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) y (2) Agar papa dextrosa natural (APDN) (Ridgway, 1912; Samuels, 2004). Esta prueba se realizó por triplicado y las placas se incubaron a 25 ± 1 °C con fotoperíodo de 12 horas de luz blanca/oscuridad. A las 72 horas, de cada aislamiento se realizaron 60 mediciones del largo y ancho de cada tipo de estructuras.

Identificación molecular

La identificación molecular de cada aislamiento se realizó en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA, INTA, Castelar). La extracción de ADN se realizó según el protocolo del kit comercial QIAGEN a partir de cultivos crecidos en placa (48 horas) en caldo papa dextrosa (CPD). La extracción de ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó un marcador de masa a efectos de cuantificar el ADN y un marcador de peso molecular. El segmento del gen TEF1-α que codifica al factor de elongación de la traducción de proteínas se amplificó usando los primers EF728 M 5'-CAT YGA

GAA GTT CGA GAA GG y EF2 5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador (Thermomixer Comfort) con el programa descrito por Samuels & Ismael (2009). Se determinó el peso de la banda amplificada, y se envió a secuenciar. La similitud u homología y el porcentaje de cobertura entre las secuencias obtenidas para cada aislamiento se hizo por análisis de BLAST, con las secuencias publicadas en la bases de datos de NCBI (Zhang *et al.*, 2000).

Criterios de selección de antagonistas

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron evaluados según las siguientes características:

Crecimiento a 21±1 °C

La velocidad de crecimiento de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. se evaluó *in vitro* siguiendo la metodología de Guigón-López *et al.* (2010). Para ello, se colocó un disco de agar de 3mm procedente de un cultivo de 48 hs, en el centro de una placa de Petri con agar papa dextrosa (APD, Britania). Las cajas se incubaron a 21±1°C en oscuridad. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por aislamiento. El diámetro de crecimiento se midió en milímetros a las 48 y 96 horas.

Tolerancia a Brassica

La compatibilidad o tolerancia a las sustancias volátiles emitidas por repollo (*Brassica oleracea*) aplicado como biofumigante se evaluó *in vitro* siguiendo el protocolo de Villapudua & Munneke (1987). Para esto, se procedió a sembrar un disco de agar con micelio de cada uno de los aislamientos en placas de Petri de 5 cm con 6 ml de APD. Las bases de placas sembradas, se colocaron enfrentadas a bocas de frascos de vidrio de 178 cm³ que contenían 26 ml de agua destilada estéril (ADE) y 2 gramos de repollo previamente secado en estufa a 35°C ± 2° y molido. El testigo consistió en frascos con ADE sin repollo. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. El diámetro de la colonia de cada antagonista, se midió en mm a los cinco días y el porcentaje de inhibición del crecimiento por los volátiles de repollo, se calculó en relación al testigo.

Antagonismo in vitro

La capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* spp. se evaluó *in vitro* para comprobar la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* LJC 10463.

Cultivos duales

En placas de Petri con APD (pH 6,5) se sembró en uno de los extremos un disco de agar (3mm) con micelio de un cultivo del posible antagonista y en el extremo opuesto un disco con micelio del patógeno. Las placas se incubaron en oscuridad a 21±1 °C. El estudio se realizó por triplicado siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Luego de 72 horas de crecimiento, se midió el diámetro mayor y menor de crecimiento de la colonia del patógeno y la zona de separación (Zi) entre las colonias del antagonista y el patógeno. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento de la colonia del patógeno % I= (radio mayor – radio menor / radio mayor) x 100 (Fernández Barbosa & Suárez Meza, 2009; Guigón López *et al.*,

2010).

Cultivos enfrentados

Se tomó un disco de micelio de un cultivo en activo crecimiento de *Trichoderma* sp. y se colocó en el centro de una placa de Petri con 20ml de APD. El mismo tratamiento se realizó con el patógeno. Posteriormente, se enfrentaron ambas placas, se sellaron y se colocaron en oscuridad a 21±1 °C. El estudio se realizó por triplicado para de cada uno de los aislamientos. El testigo consistió en un disco del patógeno enfrentado con una placa de Petri que contenía solamente APD. Luego de 72 horas, se midió el diámetro de la colonia del patógeno. Se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno en relación al testigo, donde % I= (diámetro Testigo – diámetro Tratamiento / diámetro Testigo) x 100 (Lillbro, 2005).

Crecimiento a 37 °C

Se determinó la capacidad de los aislamientos de *Trichoderma* sp. de crecer a la temperatura corporal humana (Druzhinina *et al.*, 2006). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por aislamiento. El diámetro de crecimiento se midió en milímetros cada 24 horas durante 96 horas.

Análisis estadístico

Dado el carácter multivariado de la variable respuesta en la capacidad antagonista de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. frente a *F. oxysporum* se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con fines descriptivos y de selección de los aislamientos más promisorios. Se realizó el análisis de varianza sobre cada variable respuesta y Test de Tukey para la comparación de medias con $\alpha = 0.05$, utilizando el programa Statistica 7.

Evaluación del biocontrol in vivo

Bioensayo I (siembra): Aislamientos nativos de *Trichoderma* spp., seleccionados según los resultados obtenidos *in vitro*, y el aislamiento de *T. harzianum* T4 (comercial) se evaluaron en ensayos de biocontrol *in vivo* frente a los aislamientos de *F. oxysporum* LJC 10463 y LJC 10466.

El bioensayo se realizó en almácigos de cebolla cv Valcatorce. En bandejas de 72 alvéolos se colocó suelo estéril, se inoculó 24 horas antes de la siembra con 1 ml de suspensión del patógeno a la CMI. La suspensión del antagonista (10⁴ conidios/mL) se aplicó dos veces: sobre la semilla de cebolla por inmersión durante 1 hora en agitación y luego de 24 horas de la siembra, en forma de riego para llegar a una concentración final de 10⁸ conidios/mL de *Trichoderma* sp, según metodología adaptada de Datnoff *et al.*, (1995). Las bandejas se mantuvieron en invernadero por 60 días. El testigo sano fueron semillas sembradas en suelo sin inocular con patógeno y sin tratar con antagonista. El testigo enfermo fueron semillas sin tratar con antagonista sembradas en suelo inoculado con el patógeno. Se usaron 12 alvéolos por tratamiento con 3 repeticiones. Al finalizar el ensayo, se determinaron: porcentaje de germinación final, largo de hoja y raíz de cada plántula y peso fresco total de plántulas de cada tratamiento, porcentaje de infección de raíces y de colonización por *Trichoderma* sp. según metodología descrita por Nemec *et al.* (1996).

Bioensayo II (trasplante): Un aislamiento de *Trichoderma* seleccionado en el bioensayo I

(precedente) y el aislamiento T.4 comercial se re-evaluó en plantines de cebolla frente al aislamiento más agresivo *F. oxysporum* LJC 10463, siguiendo la metodología adaptada de Ezziyyanni (2004). En macetas de 2,5 kg con suelo agrícola sin antecedentes del cultivo de cebolla, se inoculó el patógeno a la CMI. El antagonista se aplicó sobre las raíces de plantines de cebolla cv Valcatorce de 120 días de edad por inmersión en agitación suave durante 10' en una suspensión de 10^7 conidios/mL. Los testigos fueron plantines 1- sin tratar y sin inocular (testigo total); 2- con antagonista en suelo y sin inocular y 3- sin antagonista e inoculado con el patógeno (testigo enfermo). Se usaron 10 plantines por maceta, con 3 macetas por tratamiento. A los 60 días del trasplante, se determinó la incidencia de la enfermedad (González Rodríguez et al., 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antagonistas

Caracterización morfológica y cultural

Para los 11 aislamientos (10 regionales y 1 comercial) de *Trichoderma* se realizó la descripción de las colonias siguiendo la metodología de Samuels (2004).

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. en el medio SNA produjeron conidios en pústulas más o menos discretas, agrupadas en la mayoría de los casos y

dispersas únicamente en T15. Además, T4 (Comercial), T6, T7, T9, T10 y T11 presentaron hifas estériles. Los aislamientos en el medio APDN mostraron una amplia gama de pigmentos, que fueron desde incoloros a diversos tonos de verdes con diferentes formaciones de anillos de crecimiento (Tabla 1).

Las características micromorfológicas de las estructuras reproductivas asexuales: fiálides, hifas y conidios se midieron (60 repeticiones/ aislamiento) desde los cultivos en SNA durante 72 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 12hs de luz y 12hs de oscuridad. Los 6 aislamientos de *T. harzianum* presentaron conidios de $3,46 \mu\text{m}$ (largo) x $2,88 \mu\text{m}$ (ancho) con una relación largo/ancho de 1,22; fiálides de $10,01 \mu\text{m}$ (largo) x $3,22 \mu\text{m}$ (ancho) x $2,51 \mu\text{m}$ (base) e hifas de $2,87 \mu\text{m}$. El aislamiento de *T. atroviride* tuvo conidios de $5,34 \mu\text{m}$ (largo) x $3,82 \mu\text{m}$ (ancho), con una relación largo/ancho de 1,41; fiálides de $10,68 \mu\text{m}$ (largo) x $3,32 \mu\text{m}$ (ancho) x $2,67 \mu\text{m}$ (base) e hifas de $2,94 \mu\text{m}$. El aislamiento de *T. koningiopsis* tuvo conidios de $4,74 \mu\text{m}$ (largo) x $3,06 \mu\text{m}$ (ancho), con una relación largo/ancho de 1,56; fiálides de $11,79 \mu\text{m}$ (largo) x $3,30 \mu\text{m}$ (ancho) x $2,62 \mu\text{m}$ (base) e hifas de $3,15 \mu\text{m}$. El aislamiento de *T. longibrachiatum* tuvo conidios de $4,60 \mu\text{m}$ (largo) x $2,96 \mu\text{m}$ (ancho), con una relación largo/ancho de 2; fiálides de $9,63 \mu\text{m}$ (largo) x $3,46 \mu\text{m}$ (ancho) x $2,14 \mu\text{m}$ (base) e hifas de $2,24 \mu\text{m}$. La mayoría de los aislamientos presentó clamidosporas intercalares o terminales y globosas o subglobosas. Los aislamientos *T. harzianum* T6, T7 y T11; *T. harzianum* (comercial) T4 y *T. longibrachiatum* T15 presentaron abundantes clamidosporas.

Tabla 1. Caracterización cultural de los aislamientos regionales y la cepa comercial de *Trichoderma* sp. *Crecimiento en APDN durante 72 horas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 12hs de luz y 12hs de oscuridad. Resultado de 3 repeticiones; ** Anillos: Anchos: $\geq 2,5 \text{ cm}$; Angostos: de $2,5$ a $1,5 \text{ cm}$; Muy angostos: $\leq 1,5 \text{ cm}$; ***Carta de color de Ridgway, 1912.

Aislamientos	Característica de la colonia*					
	Aspecto	Anillos**	Color***	Pigmentos	Olor	Exudados
T2	Aplanada	Angostos, en degradé	Lime green- Deep dull Bellow green	(-)		(++)
T6 y T7	Algodonosa	Anchos, bien marcados	Lime green- Jade green	(-)	(-)	(+)
T8	Aplanada	Poco evidentes	Dusky yellowish green	(-)	(-)	(-)
T9 y T10	Aplanadas	Anchos, no muy definidos	Shamrock green	(+)	(-)	(-)
T11	Algodonosa	Angostos	Rianette green- Varley's green	(-)	(-)	(+)
T13	Muy aplanada	Concéntricos, separados	Dark yellowish green Oural green	(-)	(-)	(-)
T14	Aplanada	Muy angostos y separados	Antique green	(-)	(-)	(-)
T15	Aplanada	Anchos y en degradé	Deep dull Bellow green	(-)	(-)	(-)
T4-Comercial	Aplanada	Anchos	Corsack green- Caliste green	(-)	(-)	(-)

Identificación molecular

La amplificación por PCR de la región TEF1 del ADN fue positiva en 10 de 11 aislamientos, generando en todos los casos un producto de entre 500 y 600 pares de bases. No se detectó producto amplificado para T 14.

Los aislamientos T2, T6, T7, T9 y T10 presentaron altos porcentajes de similitud con *Hypocrea lixii* (*Trichoderma harzianum*, Samuels, 2004); T8 con *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*); T11 con *Trichoderma harzianum*; T13 con *Trichoderma koningiopsis* y T15 con *Hypocrea orientalis* (*Trichoderma longibrachiatum*) (Tabla 2). Para el aislamiento T4 procedente del formulado comercial, se corroboró su identidad con *Hypocrea lixii* (*Trichoderma harzianum*, Samuels, 2004).

La identificación precisa de los distintos aislamientos de *Trichoderma* spp. es el primer paso para poder utilizarlas en el control biológico de patógenos (Sharma *et al.*, 2009). En este estudio, la combinación de técnicas morfológicas y moleculares permitió identificar con certeza las especies de 10 aislamientos regionales del cepario de la FCA, UNCO, de acuerdo a los nuevos sistemas de taxonomía. La mayoría de los aislamientos correspondió al clado *T. harzianum* s.l. (7/11) (Barrera V. com.pers., 2014), especie ampliamente citada en la bibliografía como ACB (Grondona *et al.*, 1997; Elad, 2000; Akrami *et al.*, 2012; Gomathinayagam *et al.*, 2012).

Criterios de selección de *Trichoderma* spp.**Crecimiento a 21°C**

De la evaluación del crecimiento de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. a 21°C en medio sólido, a las 96 h se evidenciaron claramente tres grupos. I) Crecimiento lento con diámetro de colonia de 4,5 cm: el aislamiento *T. cf harzianum* (comercial) T4 y el

aislamiento nativo *T. longibrachiatum* T15 II) Crecimiento medio con diámetro de colonia de 6,5 cm: los aislamientos de *T. harzianum* T9, T10 y T11; y III) Mayor crecimiento con 8,5 cm de diámetro: los aislamientos *T. harzianum* T2, T6 y T7, *T. atroviride* T8, *Trichoderma* sp T14 y *T. koningiopsis* T13, que llegaron casi a completar la placa. *T. koningiopsis* T13 presentó hasta un 51% más de velocidad de crecimiento a los cuatro días, comparándolo con el aislamiento *T. harzianum* (comercial) T4. Esto coincide con lo informado por Zunino (2004), que indica que existen diferencias significativas en la tasa de crecimiento individual de cepas de *Trichoderma* aisladas de la región y las comerciales.

Tolerancia a Brassica

En el ensayo de selección de *Trichoderma* spp. por su tolerancia a las sustancias volátiles producidas durante el proceso de biofumigación con *Brassica oleracea* se detectó variabilidad en la respuesta. Los aislamientos de *T. harzianum* T4 (comercial) y *Trichoderma* sp. T14, se destacaron ya que su crecimiento no fue afectado por los gases emitidos por el biofumigante, y se consideraron tolerantes. El aislamiento *T. harzianum* T10 fue inhibido en sólo el 2% de su crecimiento mientras que el mayor efecto de inhibición se produjo sobre el crecimiento de *T. longibrachiatum* T15 y *T. harzianum* T2, con una reducción en el crecimiento entre el 32 y 26.4%, respectivamente. Galletti *et al.* (2008) informaron que aislamientos de *Trichoderma* sp. resultaron menos sensibles que los patógenos *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a la biofumigación por Brassicaceae. En este trabajo se detectaron al menos dos aislamientos tolerantes al efecto de los metabolitos volátiles, los cuales resultan promisorios a utilizar en un manejo integrado de la enfermedad.

Tabla 2. Origen e identificación molecular de los aislamientos regionales de *Trichoderma* sp. *Especie identificada por comparación de la secuencia del gen TEF 1- α amplificado de cada aislamiento, con la base de secuencias publicadas en GenBank.** y *** Cobertura en pares de bases y porcentaje de homología entre el aislamiento identificado y el publicado (cepa de referencia)

Aislamiento	Origen			Identificación*	Pares de Bases**	% de Homología***	Cepa de Referencia
	Órgano	Cultivo	Lugar				
T2	raíces	ajo	Cinco Saltos, 2007	<i>T. cf harzianum</i>	277/278	99	<i>Hypocrea lixii</i> ICL/38117
T6	raíces	lúpulo	Allen, 2007	<i>T. cf harzianum</i>	247/258	96	<i>Hypocrea lixii</i> Yz 2203
T7	raíces	lúpulo	Allen 2007	<i>T. cf harzianum</i>	327/328	99	<i>Hypocrea lixii</i> Yz 2203
T8	agua	drencher	Gral. Roca 2010	<i>T. atroviride</i>	489/491	99	<i>Hypocrea atroviridis</i> (<i>T. atroviride</i>) CTR 8150
T9	raíces	nogal	Chole Choel, 2009	<i>T. cf harzianum</i>	480/482	99	<i>Hypocrea lixii</i> SH 3204
T10	raíces	nogal	Chole Choel, 2009	<i>T. cf harzianum</i>	480/482	99	<i>Hypocrea lixii</i> SH 3204
T11	raíces	nogal	Chole Choel, 2009	<i>T. cf harzianum</i>	432/432	100	<i>Trichoderma harzianum</i>
T13	raíces	nogal	Chole Choel, 2009	<i>T. koningiopsis</i>	464/476	97	<i>Trichoderma koningiopsis</i> CIB T01
T14	agua	drencher	Gral. Roca, 2010	—			
T15	madera	Manzano	Gral. Roca, 2010	<i>T. longibrachiatum</i>	487/488	99	<i>Hypocrea orientalis</i> (<i>T. longibrachiatum</i>)
T4		Formulado comercial		<i>T. harzianum</i>	401/413	97	<i>Hypocrea lixii</i> SH 3204 y T22

Antagonismo *in vitro*

Cultivos duales

Al analizar el nivel de inhibición del crecimiento micelial en medio de cultivo sólido de *F. oxysporum* por los aislamientos de *Trichoderma* spp., no se encontró diferencias significativas a nivel estadístico ($p=0,05$). Se observó un efecto antagónico por parte de dos aislamientos: *T. harzianum* T11 y *T. koningiopsis* T13 que alcanzaron un porcentaje de inhibición del patógeno entre el 48 y 52 %, respectivamente. Ambos aislamientos tuvieron una rápida colonización del medio, alta tasa de crecimiento micelial y de esporulación. Los aislamientos *T. harzianum* T6, T7 y *T. atroviride* T8 inhibieron entre 30 y 40% el crecimiento del patógeno. Los demás aislamientos nativos y el comercial alcanzaron porcentajes de inhibición bajos, entre 20 y 25 %. El crecimiento muy rápido y la colonización de los sustratos, es una característica de *Trichoderma* spp. que indica competencia por sustrato y nutrientes, muy importante para el biocontrol de *Fusarium* spp. en la rizósfera (Ozbay & Newman, 2004). El aislamiento comercial de *T. cf harzianum* T4 mostró menor actividad antagónica en comparación con los aislamientos regionales. Estos resultados coinciden con lo informado por Elías et al. (1989), que comprobaron que los aislamientos nativos presentaron mayor antagonismo que el aislamiento comercial *T. harzianum* (T95) frente a *F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

Cultivos Enfrentados

La evaluación de los compuestos volátiles producidos por los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron algún nivel de inhibición de crecimiento micelial de *F. oxysporum*. El mayor porcentaje de inhibición, del 42% fue producido por *T. atroviride* T8, seguido por *T. cf harzianum* T2 con el 26%. El resto de los aislamientos entre los que se ubica el comercial, presentaron valores intermedios de 15 a 20%,

mientras que *T. cf harzianum* T7 fue la que produjo menor inhibición del patógeno (12 %).

Crecimiento a 37°C

El aislamiento identificado como *T. longibrachiatum* T15, citado como ACB en varios estudios, resultó tolerante a la temperatura corporal (37°C), alcanzando los 82 mm de diámetro en placas con APD a las 96 horas. En individuos inmunodeprimidos que estuvieron en contacto con *T. longibrachiatum*, se han detectado problemas respiratorios (Samuels, 2004). Por este motivo se considera que esta especie podría ser peligrosa como ACB.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales permitió diferenciar aislamientos que se destacaron en alguno de los criterios evaluados *in vitro*, tanto positiva como negativamente. En primera instancia se trabajó con los tres primeros ejes, ya que entre estos se acumula el 76,38 % de la variabilidad total contenida en las seis variables originales (28,93%; 25,09% y 22,36%, respectivamente).

Del análisis de la Figura 1, se destacan dos aislamientos: *T. koningiopsis* T13 y *T. atroviride* T8 que presentan el mayor crecimiento a 21°C en APD y el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* en cultivos duales así como baja tasa de crecimiento a 37°C y baja inhibición del crecimiento por biofumigación. Asimismo, T8 muestra un alto valor de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* en cultivos enfrentados.

Por otro lado, *T. longibrachiatum* T15 se separa del resto por presentar como atributos negativos el mayor crecimiento a 37°C y la mayor tasa de inhibición de crecimiento por los gases de la biofumigación.

El resto de los aislamientos y *T. harzianum* T4 (comercial) no presentan un comportamiento destacado en las variables explicadas anteriormente, ya que se ubican en el centro de los gradientes formados.

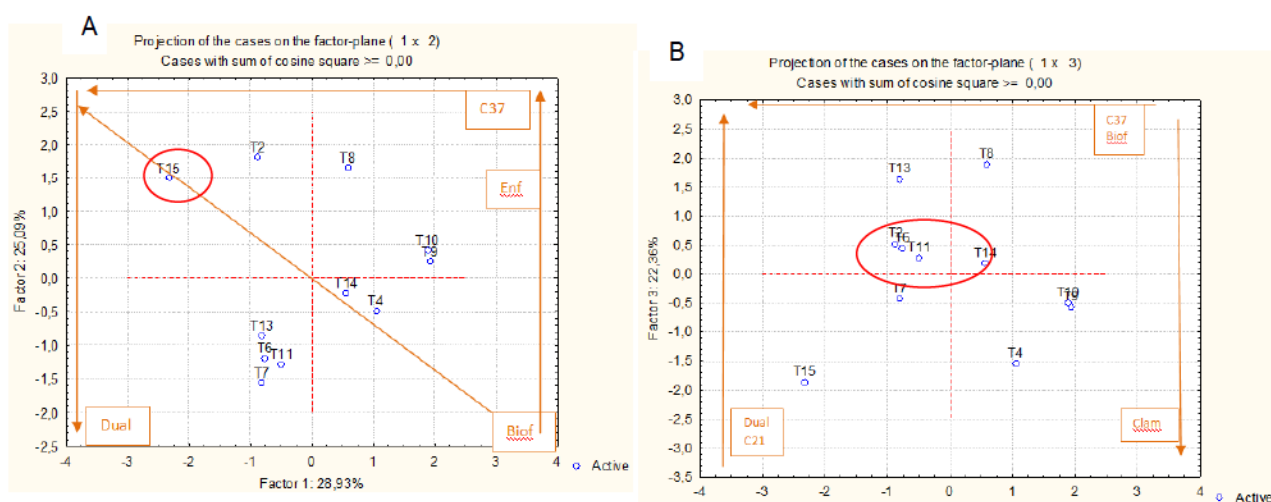


Figura 1. Análisis de componentes principales de *Trichoderma*. Representación de individuos sobre tres ejes. A. Eje 1 y 2; B. Eje 1 y 3. C37: crecimiento a 37 °C, C21: crecimiento a 21 °C, Biof: Biofumigación en frasco Clam: abundancia de clamidosporas; Dual: porcentaje de inhibición en cultivos duales; Enf: porcentaje de inhibición por volátiles en cultivos enfrentados.

Evaluación del biocontrol *in vivo*

Bioensayo I

De la etapa *in vitro* se seleccionaron dos aislamientos regionales *T. atroviride* T8 y *T. koningiopsis* T13. En la evaluación de eficacia de control de *F. oxysporum* en pre y post emergencia, a los 60 días desde la siembra se observó que *T. koningiopsis* T13 se destacó frente al aislamiento LJC10466. Con este tratamiento aplicado sobre semilla y en riego del almácigo, se obtuvo el mayor porcentaje de germinación (61%) de plántulas, mayor media de largo de raíces, peso fresco de la muestra y porcentaje de colonización de raíces (Fig. 2). La incidencia del testigo enfermo alcanzó al 91,7%. Los resultados obtenidos en este ensayo coinciden con lo demostrado por Srivastava & Tiwari (2003), que con el tratamiento de *T. viridae* sobre semilla de cebolla lograron disminuir la incidencia en la "caída de almácigos".

Bioensayo II

En este ensayo se simuló el trasplante de almácigo a campo, inoculando el aislamiento de *F. oxysporum* de mayor agresividad LJC10463 al suelo y aplicando inmediatamente a *T. koningiopsis* T13 o *T. harzianum* T4. El testigo enfermo presentó el 41% de incidencia de plántulas con muerte de raíces o lesiones en las mismas causadas por *F. oxysporum*. En ningún caso, *Trichoderma* spp. afectó a los plántulas. Al comparar el efecto de los tratamientos a los 60

días del trasplante sobre la incidencia de plantas con el sistema radicular afectado por *F. oxysporum*, se observó que el aislamiento comercial *T. harzianum* T4 produjo una reducción del 25% de la incidencia en relación al testigo enfermo, destacándose sobre el aislamiento nativo *T. koningiopsis* T13. (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con lo informado por Quiroga-Rojas *et al.* (2012), que obtuvieron resultados similares al inocular 48 horas antes al patógeno que al antagonista; sin embargo obtuvieron hasta un 70% de control al inocular al antagonista 8 días antes que al patógeno. Por otra parte, *T. koningiopsis* T13 se destacó por su capacidad de colonizar las raíces de los plántulas de cebolla; en este sentido, Druzhinina *et al.*, 2011 y Vinalea *et al.*, 2008, señalan que la capacidad de colonizar la rizósfera es una característica deseada en un posible biocontrolador porque aumenta su competencia con el patógeno. Varios autores han observado que con semilla tratada con *T. harzianum* o *Trichoderma* sp. hubo disminución en la incidencia de "podredumbre basal" y de "podredumbre de raíces" en cebolla (Cervantes Díaz, 2009; Coşkuntuna & Özer, 2008). Ya se ha observado que la eficacia de biocontrol de los aislamientos seleccionados por características *in vitro*, no necesariamente correlacionan con los resultados *in vivo*. Sin embargo, los resultados obtenidos en el bioensayo I permitieron realizar una preselección de un aislamiento con potencial antagónico.

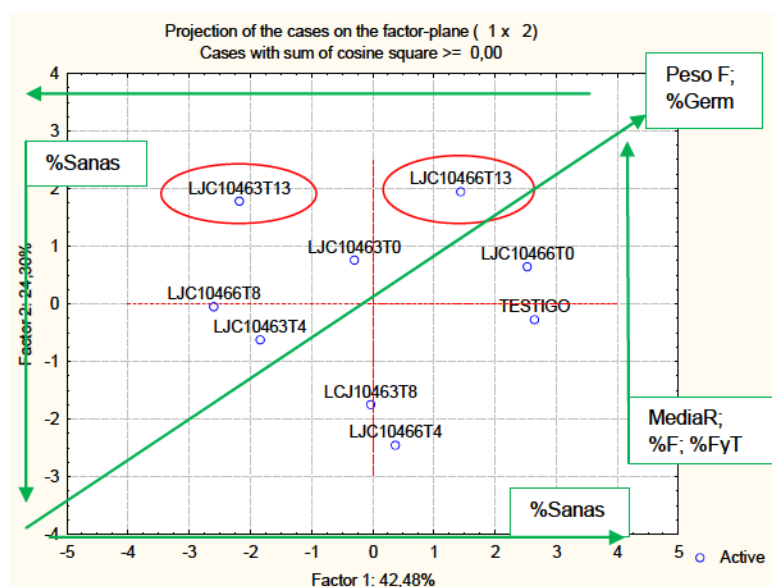


Figura 2. Análisis de componentes principales del bioensayo. %Sanas: representa el porcentaje de plántulas sin síntomas de la enfermedad en el sistema radicular observadas bajo lupa; %T: porcentaje de plántulas con presencia de *Trichoderma* spp en la raíz; %FyT: porcentaje de plantas con presencia de la enfermedad y de *Trichoderma* spp. en el sistema radicular; % Germ: porcentaje de plantas sobre el total de semillas sembradas, al final del ensayo; Media R: promedio del largo de raíces; Media H: promedio del largo de hojas; Peso F: peso fresco del total de plántulas por tratamiento. Cada una de las flechas indica un gradiente, que va en sentido de menor a mayor según corresponda a cada uno. Los recuadros que posee cada uno de ellos son las variables que lo conforman.

Tabla 3. Evaluación de *Trichoderma* sp. en el control de *Fusarium oxysporum* al momento de transplante de cebolla.
 *Letras iguales no presentan diferencias significativas entre sí según Tukey $p=0,05$

Tratamiento	Incidencia (%)	Reducción de la enfermedad (%)
<i>F. oxysporum</i> (LJC10463)	41,4 d*	-
<i>T. koningiopsis</i> (T13)-LJC10463	34,8 c	15,9
<i>T. koningiopsis</i> (T13)	0 a	0
<i>T. cf harzianum</i> (T4)-LJC10463	30,8 b	25,6
<i>T. cf harzianum</i> (T4)	0 a	0
Testigo sano	0 a	0

CONCLUSIONES

En este estudio, se identificaron a nivel de ADN a aislamientos de las especies de *Trichoderma harzianum* s.l., *T. atroviride*, *T. koningiopsis* y *T. longibrachiatum*, que fueron caracterizados morfológicamente. El mayor número de aislamientos correspondió a *T. harzianum* s.l.. Las especies nativas identificadas han sido citadas por diferentes autores por su potencial como agentes de biocontrol, salvo *T. longibrachiatum* T15, especie que se descartó como posible agente de control biológico por su potencial patogenicidad en humanos.

Se observó variabilidad en la caracterización de los atributos de los aislamientos de *Trichoderma* spp. utilizados para la selección de aquellos potenciales biocontroladores. Entre los aislamientos de rápido crecimiento en placa, *T. harzianum* T11 y *T. koningiopsis* T13 alcanzaron los más altos porcentajes de inhibición de *F. oxysporum* en medio sólido (48 y 52 %, respectivamente). *T. atroviride* T8 produjo metabolitos volátiles que inhibieron en 42% a *F. oxysporum*.

Un método combinado entre el uso de la biofumigación y microorganismos antagonistas, se puede plantear con los aislamientos *T. harzianum* T4 (aislamiento comercial) y *Trichoderma* T14, tolerantes al efecto biofumigante.

Los aislamientos *T. koningiopsis* T13 y *T. atroviride* T8 se seleccionaron y evaluaron en bioensayos frente a *F. oxysporum*, ya que reunieron la mayor cantidad de atributos positivos. En la evaluación de la eficacia de biocontrol desde la siembra, *T. koningiopsis* se destacó en la disminución de incidencia de "mal de almácigos", mientras que cuando se evaluó en el trasplante de plántulas de 2 meses, presentó menor control, aunque colonizó las raíces de cebolla. Así, se demuestra la capacidad de los aislamientos nativos en el control de la enfermedad en etapas tempranas del ciclo del cultivo, destacando la capacidad de colonización de las raíces. Sin embargo, se deben continuar con más experiencias locales, ampliando la estrategia de obtención de aislamientos desde suelos supresivos, ajustando el momento de aplicación del antagonista y de evaluación hasta el fin de ciclo del cultivo de la cebolla, para su uso en un manejo integrado de las enfermedades causadas por *F. oxysporum*.

BIBLIOGRAFÍA

Abawi, G. & J. Lorbeer. 1972. Several aspects of the ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae. *Phytopathology* 62: 870-876.

Akrami, M., M. Sabzi, F. Baghbani Mehmandar & E. Khodadadi. 2012. Effect of seed Treatment with *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* species for controlling *Fusarium* rot of common bean. *Annals of Biological Research* 3: 2187-2189.

de Boer, M., I. van der Sluis, L.C. van Loon & A.H.M. Bakker. 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology* 105: 201-210.

Caligiore Gei, P.F., J.G. Valdez, R.J. Piccolo & C.R. Galmarini. 2014. Influence of *Fusarium* spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion. *Tropical Plant Pathology* 39 (1): 19-27.

Cervantes- Díaz L., J.V. Moreno Castro, A. Pulido-Herrera, C. Ceceña Durán, D. González Mendoza & O. Grimaldo Juárez. 2009. Uso de *Trichoderma* sp. para el biocontrol de la pudrición radicular en cebolla (*Allium cepa* L.). X Simposio Internacional y V Congreso Nacional de Agricultura Sostenible. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp 1-5.

Clarkson, J.P., A. Mead, T. Payne & J.M. Whipps. 2004. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology* 53: 353-362.

Coşkuntuna, A. & N. Özer. 2008. Biological control of onion basal rot disease using *Trichoderma harzianum* and induction of antifungal compounds in onion set following seed treatment. *Crop Protection* 27: 330-336.

Datnoff, L., S. Nemec & K. Pernezny. 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control* 5: 427-431.

Druzhinina, I., A. Kopchinskiy & C. Kubicek. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.

Druzhinina, I., V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz, C.M. Kenerley, E. Monte, P.K. Mukherjee, S. Zeilinger, I.V. Grigoriev & C.P. Kubicek. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology* 9: 749-759.

El Hassni, M., A. El Hadrami, F. Daayf, M. Chérif, E. A. Barka & I. El Hadrami. 2007. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environmental and Experimental Botany* 59: 224-234.

El-Neshawy, S., N. Osman & K. Okasha. 1999. Biological control of neck rot and black mould of onion. *Journal Egyptian of Agricultural Research* 77: 125-137.

Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential

modes of action. Crop Protection 19: 709-714.

Elías, R., O. Arcos & G. Arbeláez. 1989. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Agronomía Colombiana 6: 25-30.

Ezziyyani M., C. Pérez Sánchez, A. Sid Amhed, M. E. Requena & M.E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de Pimiento (*Capsicum annum* L.). Anales de biología 26: 35-45.

Fernández Barbosa, R. & C. Suárez Meza. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Sch. f.sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 62: 4743-4748.

Galletti, S., E. Sala, O. Leoni, L. Burzi Pier & C. Cerato. 2008. *Trichoderma* spp. tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in Biofumigación. Biological Control 45: 319-327.

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

Gomathinayagam, S., S.A. Persaud & M. Rekha. 2012. Comparative study of biological agents, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for controlling brown spot disease in rice. Journal of Biopesticides, 5 (Supplementary): 28-32.

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

Grondona, I., R. Hermosa, M. Tejada, M. Gomis, P. Mateos, P. Bridge, E. Monte & I. García Acha. 1997. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. Applied and Environmental Microbiology 63: 3189-3198.

Guigón-López, C., V. Guerrero-Prieto, F. Vargas-Albores, E. Carvajal-Millan, G. Ávila-Quezada, L. Bravo-Luna, M. Ruocco, S. Lanzuise, S. Woo & M. Lorito. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28: 87-96.

Iriarte, L.E., M.C. Sosa & G.E. Reybet. 2011. Efecto de la biofumigación con repollo sobre el control de *Fusarium oxysporum* en suelo. Revista de Investigaciones Agropecuarias 37: 231-237.

Kiehr, M. & R. Delhey. 2007. Estrategias para el manejo de cebolla en el sur argentino. AgroUNSur Año IV, 7: 5-10.

Leta, A. & T. Selvaraj. 2013. Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Trichoderma* Species for the Control of Onion White Rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.). Journal Plant Pathology Microbiology 4:159.

Lillbro, M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain – a comparison of mode of action of several yeast species. Master Thesis for the Agriculture Programme, Animal Science, Department of Microbiology. 21pp.

McLean, K.L., J. Swaminathan, C.M. Frampton, J.S. Hunt, H.J. Ridgway & A. Stewart. 2005. Effect of formulation on the rhizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. Plant Pathology 54: 212-218.

Metcalf, D.A., J.J.C Dennis & C.R. Wilson. 2004.

Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. Plant Disease 88: 287-291.

Nemec S., L.E. Datnoff & J. Strandberg. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plants roots diseases of vegetables and citrus. Crop Protection 15: 735-742.

Obes Corrêa, B., J. Tavares Schafer & A. Bittencourt Moura. 2014. Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean. Biological Control 72: 71-75.

Özer, N. & L. Arin. 2014. Evaluation of fungal antagonists to control black mold disease under field conditions and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion following seed and set treatment. Crop Protection, 65: 21-28.

Özer, N., & N.D. Köycü. 2004. Seed-borne fungal diseases of onion, and their control. En: Fruit and Vegetable Diseases. Springer Netherlands. pp. 281-306.

Ozbay N. & S.E. Newman. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. Pakistan Journal of Biological Sciences 7: 478-484.

Quiroga- Rojas L.F., N. Ruiz-Quñones, G. Muñoz-Motta & M.D. Lozano-Tovar 2012. Microorganismos rizoféricos, potenciales antagonistas de *Fusarium* sp. causante de la pudrición radicular de Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims). Acta Agronómica 61: 265-272.

Rajendran, K. & K. Ranganathan. 1996. Biological Control of Onion Basal Rot (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*) by Combined Application of Fungal and Bacterial Antagonists. Journal of Biological Control 10: 97-102.

Ridgway, R. 1912. Color standards and color nomenclature. Washington, DC. 43pp.

Sayed, A.A., A.A. Abd-El- Razik, T.M. Abd-El-Rahman & M.I. Eraky. 2014. Influence of certain carbon and nitrogen sources on antagonistic potentiality of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* against *Botrytis allii* the incitant of onion neck rot. Journal of Phytopathology and Pest Management 1: 9-16.

Salvalaggio, A.E. & A. del C. Ridao. 2013. First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Rot on Garlic and Onion in Argentina. Plant Disease 97: 556.

Samuels, G.J. 2004. *Trichoderma* a guide to identification and biology. 36 pp.

Samuels, G. J. & A. Ismaiel, 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtii*: two new *T. hamatum*-like species. Mycologia 101: 142-156.

Sharma, K., A. Kumar Mishra & R.S. Misra 2009. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. Journal of Phytopathology 157: 51-56.

Southwood, M.J. 2010. Evolution and detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* in onion. Dissertation presented for the Degree of Doctor of Philosophy in Agriculture at Stellenbosch University. 170 pp.

Srivastava, K.J. & B.K. Tiwari, 2003. Nursery disease management in onion with biocontrol and plant products. NHRDF News Letter 23: 5-8.

STATISTICA 7. <http://www.statsoft.com/>

Taylor, A., V. Vagany, D.J. Barbara, B. Thomas, D.A.C Pink, J.E. Jones & J.P. Clarkson. 2013. Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion

cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathology* 62: 103-111.

Toit, L.J.D., D.A. Inglis, G.Q. Pelter & L.J. Du Toit. 2003. *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease* 87: 750.

Valdez, J. & G. Marini. 2005. Prueba de cultivares argentinos de cebolla por su tolerancia a pudrición basal. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. A.A.F., Villa Carlos Paz, Córdoba. pp. 470.

Valdez J., M. Makuch & G. Marini. 2004. Patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* spp en plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Horticultura Argentina* 23:90.

Vinalea, F., K. Sivasithamparamb, E.L. Ghisalberti, R. Marraa, S.L. Wooo & M. Lorito. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Review Article. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10.

Villapudua-Ramirez, J. & D.E. Munnecke. 1987.

Effect of Solar heating and soil amendments of Cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* and other organisms. *Disease Control and Pest Management* 78: 289-295.

Yedidia, I., N. Benhamou & I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.

Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner & W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computer Biology* 7:203-214.

Zunino, G. 2004. Evaluación de tres productos de control biológico comerciales a base de *Trichoderma* spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. *in vitro* con énfasis en pruebas de control de calidad. Tesis de grado Facultad de Ingeniería Agronómica. Zamorano, Honduras. 19pp.