UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILIS TOGA. 1948

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TESIS DE DIPLOMA

Caracterización de hongos asociados a la pudrición seca de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y evaluación de alternativas de control

Autor: Maireby Herrera Capote

Tutores: Dr C. Michel Leiva Mora

Msc. Mayra AcostaSuárez

Santa Clara

2013

A mis padres, a mi hermana, a mis abuelos, a mis primas, a mi tía Vilma, a mis amigos y a mis amigas, en fin, a todas esas personas maravillosas que han hecho de mí alguien mejor, a todos ustedes……

AGRADECIMIENTOS

Resulta muy oportuno tener el espacio para agradecer a todas esas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis de Diploma; que lejos de tener un único autor, pertenece más bien a todo un colectivo de autores, cada uno de ellos aportaron un poquito de su tiempo y otros su tiempo entero. Quiero agradecerles de todo corazón a los maravillosos tutores que tengo, Mayrita y Michel, sin ningún remordimiento digo que estoy aquí parada frente a ustedes gracias a ellos, gracias Mayrita por estos dos cursos de entrega incondicional, llevaré siempre de ti el recuerdo más lindo que se pueda llevar de una persona. Gracias mami, papi, Indi; por no cuestionar nunca mis métodos, alentarme día a día y ser ese puerto seguro que no conoce tormenta alguna y si esta se acerca ustedes la alejan. Gracias a las muchachitas del Laboratorio de Microbiología Aplicada y a todos los trabajadores del IBP que de una forma u otra me brindaron su apoyo y siempre me trataron como una de ellos. Gracias a mis amigos del alma Dayko, Neisy, Yeche, Daya, Frank, Legna, Orlay, Bia, Denyito, Yara, Liane, Isis, Yemny por levantarme y sostenerme en distintos momentos de mi vida haciendo suya mi felicidad. Gracias a mis compañeros de aula por los mejores cinco años de mi vida, olvidarlos sería imposible. Gracias a mis profesores, a Nela por su paciencia con todos nosotros y gracias a la vida por permitirme haberlos conocido y estar ahora mismo aquí, frente a ustedes, para decirles a todos GRACIAS, Gracias por existir y regalarme lo mejor de cada uno…….

Los querré siempre,

Maire

RESUMEN

La calidad fitosanitaria de la semilla de papa puede comprometerse por la presencia de microorganismos. El presente trabajo se propuso como objetivo: identificar los agentes causales de la pudrición seca de minitubérculos de papa y evaluar *in vitro* alternativas de control. En base a las características morfológicas y culturales, se identificaron los agentes causales. Asimismo, se evaluó la inhibición del crecimiento micelial de las especies identificadas, utilizando seis fungicidas mediante el método de difusión en medio de cultivo semisólido y se determinó la mínima concentración inhibitoria de los productos con mejores resultados mediante el método de dilución en medio de cultivo semisólido. Se determinó el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* Pers frente a los agentes causales de la pudrición seca y se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, así como las formas e intensidad del antagonismo. Se identificaron como agentes causales de la pudrición seca de los minitubérculos de papa, las especies *Fusarium* oxysporum y *Fusarium solani*. Todos los fungicidas, a excepción de Cuproflow SC 37,75, mostraron actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento micelial; siendo el Supreme EW 40 el más efectivo*. T. viride* mostró *in vitro* antagonismo físico e hiperparasítico frente a *F. oxysporum* y *F. solani;* así como una actividad antagónica de intensidad elevada. Los resultados de este trabajo permitieron identificar las especies asociadas con la pudrición seca de minitubérculos de papa; lo cual permitirá desarrollar alternativas de control más eficientes para mejorar la calidad fitosanitaria y lograr una mejor conservación.

Palabras clave: actividad antifúngica, biocontrol, enfermedades de la papa, *Fusarium*, postcosecha, *Trichoderma viride*

ABSTRACT

Phytosanitary quality of potato seed may be affected by microorganisms. The aim of this work was focused to identify the causal agents of minitubers dry rot and *in vitro* evaluation of controlling alternatives. Identification of causal agents was based on morphological and cultural characteristics. Mycelial growth inhibition of six fungicides against the causal agents was determined using agar diffusion method and Minimal Inhibitory Concentration was determined for the best product using dilution method. *In vitro* antagonism of *Trichoderma viride* Pers against dry rot causal agents was determined and percentage of radial growth inhibition was evaluated. *Fusarium* oxysporum and *Fusarium solani* were identified as the causal agents of potato minitubers dry rot. Except Cuproflow SC 37,75, all fungicides had inhibitory activity of mycelial growth and Supreme EW 40 was the most effective. *T. viride* showed *in vitro* antagonism (physical and hiperparasitic) against *F. oxysporum* and *F. solani;* with high antagonist intensity. With these results it was possible the identification of the causal agents of minitubers dry rot and new controlling alternatives may be developed to increase phytosanitary quality and better conservation.

Keywords: antifungal activity, biocontrol, diseases of Potato, *Fusarium*, postharvest, *Trichoderma viride*

INDICE

RESUMEN ……..4
ABSTRACT ……5

1. INTRODUCCIÓN.....10

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.1. Generalidades del cultivo de papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.1.1. Importancia alimentaria, económica y social ..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.2. Métodos de propagación de papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.2.1. Propagación por métodos tradicionales ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.2.2. Propagación por métodos biotecnológicos ..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.3. Pudrición seca o Fusariosis en papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.3.1. Sintomatología ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.3.2. Medidas de control ..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.4. Agente causal ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.4.1. Taxonomía del género ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.4.2. Ciclo de vida del agente causal ..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.5. Descripción de las principales especies de *Fusarium* asociadas a la Pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.5.1. Descripción cultural ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.1*. F. sambucinum* Fuckel ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.2. *F. solani* (Mart.) Sacc. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.3. *F. oxysporum* Schltdl. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.4. *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.5. *F. roseum* (Lk.) emend. Zinder & Hansen ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.6. *F. ventricosum* Appel & Wollenw. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.7. *F. graminearum* Schwabe ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.8. *F. incarnatum* (Rob.) Sacc. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.1.9. *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.5.2. Descripción morfológica ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.2.1. *F. sambucinum* Fuckel ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.2.2. *F. solani* (Mart.) Sacc. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.2.3. *F. oxysporum* Schltdl. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.2.4. *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. 20
2.5.2.5. *F. roseum* (Lk.) emend. Zinder & Hansen 20
2.5.2.6. *F. ventricosum* Appel & Wollenw. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.2.7. *F. graminearum* Schwabe ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.2.8. *F. incarnatum* (Rob.) Sacc. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.5.2.9. *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun ..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.6. Uso de fungicidas para el control de *Fusarium* spp. en papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.6.1. Métodos empleados para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* ... **¡Error! Marcador no definido.**
2.6.1.1. Difusión en agar ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.6.1.2. Dilución en agar ..... **¡Error! Marcador no definido.**

2.7. Uso de *Trichoderma* como agente biocontrolador de hongos del suelo .. **¡Error! Marcador no definido.**
2.7.1. El género *Trichoderma* ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.7.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma* ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.7.2.1. Competencia ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.7.2.2. Micoparasitismo ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.7.2.3. Crecimiento quimiotrófico ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.7.2.4. Reconocimiento ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2.7.2.5. Adhesión y enroollamiento 28
2.7.2.6. Actividad lítica 28
2.7.2.7. Antibiosis 29

3. MATERIALES Y MÉTODOS ..... **¡Error! Marcador no definido.**
3.1. Aislamiento, caracterización e identificación de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**
3.1.1. Caracterización cultural de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

3.1.2. Caracterización morfológica de las especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

3.2. Evaluación *in vitro* de la acción de fungicidas frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

3.3. Evaluación del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa..... **¡Error! Marcador no definido.**

3.3.1. Determinación de las formas de antagonismo de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

3.3.2. Intensidad del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4. RESULTADOS..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.1. Aislamiento, caracterización e identificación de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.1.1. Caracterización cultural de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.1.2. Caracterización morfológica de las especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.2. Evaluación *in vitro* de la acción de fungicidas frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.3. Evaluación del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.3.1. Determinación de las formas de antagonismo de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

4.3.2. Intensidad del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

5. DISCUSIÓN..... **¡Error! Marcador no definido.**

5.1. Aislamiento, caracterización e identificación de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

5.1.1. Caracterización cultural de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**
5.1.2. Caracterización morfológica de las especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

5.2. Evaluación *in vitro* de la acción de fungicidas frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

5.3. Evaluación del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa..... **¡Error! Marcador no definido.**
5.3.1. Determinación de las formas de antagonismo de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**
5.3.2. Intensidad del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa ..... **¡Error! Marcador no definido.**

6. CONCLUSIONES.....59

7. RECOMENDACIONES ..... **¡Error! Marcador no definido.**

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANEXOS

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los cultivos alimenticios más importantes tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. La producción mundial supera los 300 millones de toneladas (FAOSTAT, 2010); ocupa el cuarto lugar, después del trigo (*Triticum aestivum* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el maíz (*Zea mays* L.) (Qasim, 2013). La papa produce gran cantidad de sustancias alimenticias por unidad de superficie; la cual es tres veces mayor que los cereales (Coleman *et al*., 2001).

Por su valor nutritivo, se coloca como uno de los cultivos estratégicos más importantes para contribuir a solucionar los problemas del hambre y mal nutrición en el mundo (FAO, 2008). Con un impacto positivo en el bienestar social de la personas (Sarkar, 2008).

La papa se propaga básicamente mediante tubérculos. Por ello numerosos microorganismos fitopatógenos pueden causar daños y disminuir su calidad. Esto provoca afectaciones en los rendimientos, la calidad comercial de los tubérculos y el intercambio de germoplasma sano. Entre los microorganismos causantes de pudriciones de los tubérculos de papa encontramos bacterias y hongos. En este último grupo se encuentra un complejo de especies del género *Fusarium*, algunas de las cuales causan la “Pudrición seca de los tubérculos”, con pérdidas que han sido superiores al 30 % de la cosecha (Martínez y Alemán, 2005).

En los programas de producción de semilla, la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro,* combinadas con el diagnóstico y el saneamiento de los principales patógenos, ha contribuido a incrementar su eficiencia y productividad (Igarza *et al*., 2012). En este sentido, el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de Villa Clara, conjuntamente con otras instituciones científicas, han desarrollado una tecnología para producción de Semilla Original de papa utilizando métodos biotecnológicos (Miranda, 1997).

Sin embargo, a pesar de los avances en el uso de la semilla de papa utilizando métodos biotecnológicos, han ocurrido pérdidas de minitubérculos en la cosecha y en la conservación

causados por daños o por la presencia de microorganismos patógenos del suelo (Jiménez-Terry *et al*., 2001).

Una de las principales limitantes en la conservación de los minitubérculos obtenidos por métodos biotecnológicos, radica en que no se conocen las especies de hongos asociadas a las pudriciones secas de los minitubérculos, pues no se han realizado estudios sobre sus caracteres morfológicos y culturales, lo cual limita el uso de alternativas de control eficientes.

Tomando en consideración la problemática anterior, el presente trabajo propone la siguiente hipótesis:

"Mediante la caracterización e identificación de las especies de hongos asociadas a la pudrición seca de minitubérculos de papa obtenidos por métodos biotecnológicos; es posible establecer una colección de microorganismos, que permita evaluar *in vitro* alternativas de control".

Para dar cumplimiento a la misma se propone como objetivo general: Identificar los agentes causales de la pudrición seca de minitubérculos de papa y evaluar *in vitro* alternativas de control, y como objetivos específicos:

1. Identificar las especies de hongos asociadas con la pudrición seca de minitubérculos de papa.
2. Determinar la actividad *in vitro* de fungicidas sobre el crecimiento micelial de hongos asociados con la pudrición seca de minitubérculos de papa.
3. Determinar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los hongos asociados con la pudrición seca de minitubérculos de papa.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del cultivo de papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) perteneciente a la familia Solanaceae, es originaria de los altos Andes en América del Sur. Su cultivo se inició en el área del Lago Titicaca cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. En estos países se encuentra la mayor variabilidad genética de especies silvestres y variedades cultivadas, con la existencia de más de 42 especies de *Solanum* en Bolivia (Huamán, 1997; Ochoa, 2001).

Es un cultivo que ha ganado considerable importancia en las últimas décadas. Aunque se originó en América, se cultiva en Europa, Asia y África. China es el mayor productor de este tubérculo (FAOSTAT, 2010). La papa se utiliza en la producción de semilla, para consumo fresco y el procesamiento industrial. Para maximizar su productividad, se deben favorecer los procesos que estimulan la formación y el almacenamiento de almidón en tubérculos (García y Salas, 2005; Aslam *et al*., 2011).

2.1.1. Importancia alimentaria, económica y social

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los cultivos alimenticios más importantes tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En cuanto al valor de la producción mundial que supera los 300 millones de toneladas (FAOSTAT, 2010), ocupa el cuarto lugar, después del trigo (*Triticum vulgare* Wuild.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el maíz (*Zea mays* L.).

La importancia económica de la papa se fundamenta en su elevada capacidad de producción de sustancias alimenticias por unidad de superficie, la cual es tres veces mayor que la de los cereales, lo que permite suplir de alimento a un elevado número de personas (Coleman *et al*., 2001).

En relación con el valor nutritivo de este cultivo: cada 100 gramos de papa fresca, representa un 78,0% de humedad, 2,1% de proteína, 18,5% de almidón, 1,0% de cenizas y 0,1% de grasas. Además, contiene minerales (560,0 mg de potasio, 50,0 mg de fósforo, 9,0 mg de calcio, 7,0 mg de sodio y 0,8 mg de hierro) y vitaminas (0,1 mg de Tiamina, 0,04 mg de Riboflavina, 20,0 mg de vitamina C y 1,5 mg de Niacina), lo cual coloca a la papa como uno de los cultivos estratégicos más importantes para contribuir a solucionar los problemas de alimentación en el mundo (FAO, 2008).

Tal vez ningún otro cultivo en la historia contemporánea, ha jugado un papel más importante en la seguridad alimentaria y la nutrición, con un impacto positivo en el bienestar social de la personas (Sarkar, 2008).

2.2. Métodos de propagación de papa

2.2.1. Propagación por métodos tradicionales

El tubérculo de la papa se considera como la semilla unitaria tradicional y su calidad refleja las condiciones en que se ha desarrollado el cultivo, incluyendo su estado fitosanitario. En muchos países, entre ellos Cuba, la imposibilidad de producir semilla básica de modo estable, ha incrementado la importación de ésta en cantidades significativas a partir de países productores como Francia, Holanda y Canadá; cada año se invierten de 10 a 12 millones de dólares para este fin (Lago, 1991).

La papa se propaga vegetativamente mediante tubérculos-semillas, lo que asegura la conservación de características varietales durante generaciones sucesivas. Sin embargo; debido a su forma de propagación asexual, está sometida a un alto riesgo de contaminación por virus, hongos y bacterias durante el período de cultivo y almacenamiento. También al emplear el material vegetativo por ciclos repetidos puede ocasionar degeneración del cultivo, por la acumulación de enfermedades, especialmente virales (Scherwinski y Luces, 2004).

2.2.2. Propagación por métodos biotecnológicos

El valor potencial del cultivo de tejidos en la producción de papa ha sido ampliamente reconocido a nivel mundial. Esta tecnología se emplea en muchos países para obtener semilla libre de patógenos con el consiguiente beneficio para los productores (Naik y Karihaloo, 2007; Hoque, 2010).

La propagación *in vitro* de papa es mediante el subcultivo de yemas axilares. Se pueden obtener tanto plantas *in vitro* como microtubérculos (Salas, 1995; Agramonte, 1999; Borda *et al*., 2001, Donnelly *et al.*, 2003, Gopal *et al*., 2004, Calderón *et al.,* 2008).

En el cultivo *in vitro* convencional, las plantas se propagan en recipientes cerrados en un entorno aséptico y con la presencia de un medio de cultivo sólido, semisólido o líquido. El medio de cultivo contiene, además, altas concentraciones de sacarosa como fuente de carbono, sales inorgánicas, vitaminas y otros aditivos en dependencia de la especie y de la técnica de cultivo (Aragón *et al*., 2009).

El empleo de plantas *in vitro* y microtubérculos en la producción de semilla de papa tiene ventajas con respecto a la semilla convencional ya que están libres de patógenos, se obtiene un

gran número de propágulos en cortos períodos de tiempo, se reducen los costos de labores agronómicas en el mantenimiento del germoplasma en campo. Además, pueden ser propagados en cualquier época del año, se facilita el intercambio de material genético sano y se reduce el riesgo de pérdidas genéticas, al evitar la mezcla del material vegetal por cruzamiento. Sin embargo; se requiere personal especializado, infraestructura y equipamiento, así como productos químicos de elevado costo (Pérez *et al*., 1998).

En la producción de semilla de papa por métodos biotecnológicos, en la siembra directa de plantas *in vitro* en campo, se producen pérdidas en la cosecha y en el traslado. Como consecuencia, se debe perfeccionar las atenciones culturales mediante un personal calificado, para disminuir las pérdidas de tubérculos-semillas causadas por la presencia de microorganismos fitopatógenos del suelo (Jiménez *et al*., 2001).

En condiciones tropicales como las nuestras, no es económicamente posible la obtención de semilla por métodos tradicionales, debido al corto invierno y a las grandes afectaciones virales; por lo que la única vía de producir semilla sana es mediante la micropropagación *in vitro.* Con este objetivo, desde inicios de los ’80 comenzaron los trabajos en el país y se introdujo la tecnología que se utilizaba en Francia y otros países desarrollados, que es el corte de esquejes. La dificultad fundamental que presentó esta tecnología fue su bajo coeficiente de multiplicación, debido a que las plantas procedentes de estos cortes producían un solo minitubérculo y fue muy trabajosa (Lago, 1991).

Teniendo en cuenta estos precedentes, el IBP conjuntamente con otras instituciones científicas del país, utilizando métodos biotecnológicos, han desarrollado desde 1994, una tecnología integral para la producción de Semilla Original de papa (Miranda, 1997).

Las pudriciones causadas por hongos tienen gran importancia en los programas de semillas biotecnológicas, por el elevado porcentaje que representan las pérdidas económicas producidas por estos; de ahí la necesidad de estudiar las enfermedades con sus respectivos agentes causales, que afectan a los tubérculos-semillas de papa obtenidos por métodos biotecnológicos.

2.3. Pudrición seca o Fusariosis en papa

La fusariosis en la papa, está distribuida a nivel mundial. Esta enfermedad, es causada por un complejo de especies de *Fusarium* que afectan todas las fases de desarrollo del cultivo; desde la fase de cosecha de los tubérculos hasta la fase de almacenamiento de la semilla. Los campos infestados de *Fusarium* exhiben una gran variabilidad en tamaño de las plantas, así como fallas en la población. Esto retrasa y reduce la producción considerablemente (Asscheman *et al*., 1996).

En Cuba esta enfermedad es frecuente y causa anualmente pérdidas que han sido calculadas hasta en un 30 % de la cosecha (Martínez y Alemán, 2005).

2.3.1. Sintomatología

El tubérculo que se utiliza como semilla, se infesta durante el período de almacenamiento a través de heridas o daños mecánicos, o durante la siembra por medio de heridas que se provocan durante la operación del enterrado y el tapado. La superficie de corte en los tubérculos grandes que se fraccionan, son la vía de penetración más importante. Aproximadamente después de una semana de almacenamiento, las porciones de tubérculos fraccionados muestran lesiones de color castaño a negro, y después de dos semanas presentan depresiones o concavidades (López *et al*., 1995).

La pudrición por *Fusarium* puede ser acelerada ante la presencia de bacterias causantes de pudrición blanda. Cuando la infección es severa, las lesiones se unen, el fragmento de semilla se pudre, desde la superficie hacia dentro, y las yemas se van destruyendo a medida que la necrosis progresa (Asscheman *et al*., 1996).

El síntoma más frecuente en nuestro país, es una pudrición que comienza por el ombligo, se observa un oscurecimiento de la parte lesionada. El tejido de esa parte se seca y se vuelve esponjoso. En la superficie de la parte afectada aparecen pústulas blancas, rosadas, amarillentas y azul claras, en dependencia de las especies de *Fusarium* que prevalezcan. Los ataques pueden producirse además, por toda la superficie del tubérculo debido a heridas efectuadas al cosechar (López *et al*., 1995).

2.3.2. Medidas de control

Es importante que durante la siembra, los tubérculos no se fraccionen; porque las heridas son una de las principales vías de infección del patógeno. De ahí que haya que manipular cuidadosamente los tubérculos en las labores de siembra y cosecha, para prevenir los daños mecánicos que estos pudieran sufrir (Secor y Gudmestad, 1999).

En Cuba se produce la infección de los tubérculos fundamentalmente por los estolones, y aparece una gran proporción de tubérculos afectados en el campo antes de la cosecha, principalmente al morir el follaje debido a la senescencia; por lo tanto es preciso cosechar los tubérculos antes de que se desprendan de los estolones (López *et al*., 1995).

Además, es importante mantener oscuras las cámaras de almacenamiento para las papas de consumo; así como una buena aireación y extracción del CO_2 liberado durante la respiración (Martínez y Alemán, 2005).

La semilla de papa debe tratarse con formulaciones de fungicidas (en líquido o en polvo) antes de almacenarlas para que estén libes de enfermedades. Es recomendable, proporcionar una alta humedad y buena ventilación a comienzos del período de almacenamiento para facilitar la cicatrización de las heridas de las semillas de papa (Asscheman *et al*., 1996)

2.4. Agente causal

La pudrición seca de la papa es causada principalmente por *Fusarium sulphureum* Schlecht; *Fusarium solani* Mart.; *Fusarium oxysporum* Schlecht y *Fusarium avenaceum* Fr. Sacc. (Asscheman *et al*., 1996; López *et al*., 1997; Minter *et al*., 2001; Barrios *et al.,* 2001), aunque otros autores han identificado especies tales como *Fusarium ventricosum* Appel & Wollenw (Gerlach y Nirenberg, 1982) *Fusarium graminearum* Schwabe (Estrada y Gudmestad, 2010); *Fusarium incarnatum* Rob. Sacc. (Gerlach y Nirenberg1982); *Fusarium roseum* var. *sambucinum* (Chérif *et al*., 2000) y *Fusarium crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun (Leslie y Summerell, 2006).

2.4.1. Taxonomía del género

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1809, caracterizado por la presencia de esporas multiseptadas, fusiformes que crecen sobre estromas. Algunos años más tarde, en 1821 el género fue validado por Fries, quien lo incluyó en el orden *Tuberculariae*. Después Wollenweber y Reinking en 1935, publicaron un trabajo sobre *Fusarium*; en el cual estudiaron 1000 cepas del género y las organizaron en 16 secciones que contenían 65 especies, 55 variedades y 22 formas especiales (Summerell *et al.,* 2001).

La forma perfecta o de reproducción sexual (teleomorfo) de *Fusarium,* en las especies que la presentan, pertenecen al Reino *Fungi*, Phylum *Acomycota*, Subphylum *Pezizomycotina*, Clase *Sordariomycetes*, Subclase *Hypocreomycetidae*, Orden *Hypocreales*, Familia *Nectriaceae*, Géneros: *Nectria*, *Calonectria*, *Micronectriella y Gibberella*. Los estados sexuales, se caracterizan por producir sus ascosporas en ascocarpos en forma de peritecio (Luginbuhl, 2010).

La forma imperfecta o de reproducción asexual (anamorfo), donde no se conoce la fase sexual, se ubica taxonómicamente en el Reino *Fungi*, Phylum *Hongos anamorfos* (sinónimos de Fungi imperfecti u hongos mitospóricos), Clase *Deuteromycetes*, Orden *Moniliales*, Familia *Tuberculariaceae* y Género *Fusarium* (Roncal, 1993).

Según la bibliografía consultada, se puede concluir que en la naturaleza es más común encontrar a las especies de este género en su fase anamorfa; puesto que a muchas de ellas no se les conoce la fase teleomorfa. Por esta razón, uno de los principales caracteres utilizados en la identificación de estas especies radica en la morfología de los microconidios, macroconidios y clamidosporas.

2.4.2. Ciclo de vida del agente causal

Las especies de *Fusarium* que causan la pudrición seca de los tubérculos de papa, son habitantes del suelo y penetran a los tubérculos por heridas causadas durante la cosecha y

postcosecha o por enfermedades como el tizón tardío o daños ocasionados por plagas como nemátodos e insectos. Los inóculos provenientes de semillas son fuentes importantes para iniciar infecciones primarias y para que un patógeno sea introducido en nuevas áreas (Rekah *et al.,* 1999).

La temperatura óptima para la infección está en el rango de 10 a 20º C con altas humedades relativas. A temperaturas iguales o inferiores a 2º C la infección no ocurre. Cuando la temperatura oscila entre 18 a 22º C y la humedad relativa es alta, las heridas pueden cicatrizar de tres a cuatro días, si los tubérculos son lo suficientemente bien ventilados. Los tubérculos grandes que se cortan cuando van a ser sembrados, son más susceptibles a la enfermedad (Asscheman *et al*., 1996).

2.5. Descripción de las principales especies de *Fusarium* asociadas a la Pudrición seca de la papa

2.5.1. Descripción cultural

2.5.1.1*. F. sambucinum* Fuckel

(F. sulphureum Schlecht Sin: *F. trichothecioides* Wollenw)

El micelio aéreo es abundante, colonias algodonosas; de color rosado fuerte. La pigmentación puede ser color crema, salmón, rosa fuerte o rojo carmín, miel, café hasta pardo oscuro (Leslie y Summerell, 2006). Gerlach y Nirenberg (1982) consideran a los aislados con pigmentación rojiza, correspondientes a la especie *F. sambucinum*; asociado a chancro de plantas leñosas y a pudrición de frutos; mientras que a los aislados con tonos cremas y pardos, los consideran *F. sulphureum*; causante de pudrición seca en tubérculos de papa.

2.5.1.2. *F. solani* (Mart.) Sacc.

El micelio aéreo es escaso; por lo general es de color blanco y crema. Muchos cultivos no producen pigmentos en el agar; aunque han sido observados algunos pigmentos violetas o marrones (Leslie y Summerell, 2006).

2.5.1.3. *F. oxysporum* Schltdl.

El micelio aéreo puede ser escaso o abundante y varía en color, desde blanco a violeta pálido. Produce un pigmento en el agar, generalmente violeta o magenta oscuro; aunque algunos aislados no producen pigmentos en absoluto. Cuando crece en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), presenta una coloración que va desde el color amarillo hasta el naranja (Leslie y Summerell, 2006)

2.5.1.4. *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.

El crecimiento de las colonias varía de lento a relativamente rápido. Forma abundante micelio aéreo que varía desde el color blanco al rosado grisáceo, toma también un color amarillo pálido. El pigmento formado en los medios de cultivo de agar, es de color rosado grisáceo pero puede

aparecer de color marrón debido a la luz reflejada por la masa de esporas central. La morfología de la colonia es muy variable (Leslie y Summerell, 2006).

2.5.1.5. *F. roseum* (Lk.) emend. Zinder & Hansen

El micelio puede ser de color amarillo o rosado (Watanabe, 2002).

2.5.1.6. *F. ventricosum* Appel & Wollenw.

Las colonias son de crecimiento lento, alcanzando de 3,8- 4,2 cm de diámetro en diez días a 27 ± 2^0 C, en PDA. Presenta micelio aéreo más o menos abundante; a veces esparcido, afelpado. La coloración puede variar desde blanquecina, crema o verde pálido. La pigmentación adquiere tonos blanquecinos y cremas (Watanabe, 2002).

2.5.1.7. *F. graminearum* Schwabe

Hongo de crecimiento rápido y produce mucho micelio denso que varía de color: blanco, naranja pálido y amarillo. Los cultivos difunden pigmentos rojos en el agar. El pigmento es sensible al pH y puede cambiar de color rojo a amarillo (Leslie y Summerell, 2006).

2.5.1.8. *F. incarnatum* (Rob.) Sacc.

Las colonias son de crecimiento rápido, alcanzando de 6,0- 8,0 cm de diámetro en ocho días a 27 ± 2 ^{0}C, en PDA. El micelio aéreo es abundante, algodonoso, de color blanquecino al inicio, después ocráceo, miel, café y finalmente bronce. La pigmentación puede ser crema, salmón; cambiando gradualmente a color ocráceo, avellana, café y finalmente pardo oscuro; nunca están presentes los tonos rojo, vino, violáceos o azules (López y López, 2010).

2.5.1.9. *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun

Suele crecer rápidamente. Presenta micelio aéreo denso, que cubre un diámetro de 9cm de la Placa de Petri en aproximadamente cuatro días. La mayoría de los aislados producen pigmentos de color rojo en el agar (Leslie y Summerell, 2006).

2.5.2. Descripción morfológica

2.5.2.1. *F. sambucinum* Fuckel

Sin: *F. bactridioides* Wollenw

F. sulphureum Schlecht

F. sambucinum Fucked var. *trichothecioides* (Wollenw) Bilai

F. roseum Lk. Emend. Snyd. & Hans. var. *sambucinum* (Fucked) Snyd. & Hans.

Teleomorfo: *Gibberella pulicaris* (Fr. ex. Fr.) Sacc.

Los esporodoquios se forman solo en algunos aislados. De coloración crema, salmón o naranja. Los conidióforos surgen de las hifas lateralmente, en el micelio aéreo; son simples al inicio, después ramificados pero esparcidos, irregulares, a veces verticilados, generalmente terminan entre dos a cuatro células conidiógenas (Leslie y Summerell, 2006).

Las células conidiógenas son monolocales, cilíndricas, subcilíndricas, de 14-18 x 3,8-4,5 µm. Los microconidios están ausentes. Los macroconidios presentan de tres a cinco septos. Presenta clamidosporas no muy abundantes, terminales, raramente laterales e intercaladas en hifas y conidios; globosas a subglobosas, de 6-12 µm, de paredes lisas; simples o dispuestas en pares, cadenas o grupos (López y López, 2010).

2.5.2.2. *F. solani* (Mart.) Sacc.

Teleomorfo: *Nectria haematococca* Berk. & Br.

Los conidióforos surgen lateralmente en las hifas del micelio aéreo, pueden ser simples al inicio y después ramificados y esparcidos; los esporodoquios son irregulares y ramificados, a veces verticilados, a menudo abundantes y pueden ser de color crema, azul o verde (Watanabe, 2002).

Las células conidiógenas son monolocales; las del micelio aéreo son muy largas y delgadas, de 15-40 x 2,0-3,0 µm. Los microconidios son abundantes, formados en falsas cabezas; pueden no poseer septos o tener solo un septo, y en ocasiones dos; pueden ser ovales, elípticos, a veces reniformes, de 8-22 x 3,2-5,3 µm (López y López, 2010).

Los macroconidios pueden ser desde cilíndricos a ligeramente curvos; con cinco a seis septos, ocasionalmente siete; de 22-68 x 4.2-6 µm; con la célula apical ligeramente curvada y la célula basal pedicelada. Presenta clamidosporas más o menos abundantes, terminales o intercaladas en hifas y conidios, de pared lisa u ornamentada, globosas a subglobosas, simples o dispuestas en pares, cadenas o grupos (Summerell, 2006).

En los medios PDA y PSA esta especie se puede confundir fácilmente con *F. ventricosum,* particularmente si no se exponen a la luz, ya que no siempre se forman los esporodoquios que la caracterizan, y los macroconidios del micelio aéreo presentan semejanzas a los de esta especie en cuanto al número de septos, tamaño y forma de las células basal y apical (López y López, 2010).

2.5.2.3. *F. oxysporum* Schltdl.

Sin: *F. bulbigenum* Cooke & Massee

F. vasinfectum Atkinson – Bull

F. tracheiphilium E. F. Smith – Bull

F. dianthi Prill & Delacr.

F. lini Bolley

F. orthoceras Appel & Wollenw.

F. conglutinans Wollenw.

F. angustum Sherb.

F. bostrycoides Wollenw. & Reinking.

F. oxysporum Schlecht var. *redolens* (Wollenw.) Gordon

Teleomorfo: No conocido

Los esclerocios son pequeños; de color marrón pálido, azul o violeta; pueden llegar a ser abundantes. Los esporodoquios son abundantes en algunos aislados y en otros son esparcidos. *F. oxysporum* produce en el agar, pigmentos de color violeta al mangenta oscuro; aunque algunos aislados no producen pigmentos. Las células conidiógenas son monofiálides cortas (Leslie y Summerell, 2006).

Los microconidios se forman en falsas cabezas; pueden ser ovales, elípticos, a veces reniformes; presentan de uno a dos septos y miden de 4-24 x 2,0-4,6 µm. Los macroconidios son falciformes, presentan generalmente de tres a cinco septos; de 18-62 x 2,2-6,0 µm; aguzados hacia ambos extremos; con la célula apical aguda y ligeramente encorvada y la célula basal muy pedicelada (López y López, 2010).

Los conidióforos primarios surgen lateralmente de las hifas en el micelio aéreo; pueden ser simples o ramificados; los conidióforos secundarios son irregulares y verticilados (Watanabe, 2002). Las clamidosporas son generalmente abundantes; formadas en hifas y conidios; pueden ser terminales o intercaladas; de 7-11 µm; de pared lisa u ornamentada; globosas y subglobosas; dispuestas en pares, cadenas cortas y ocasionalmente en grupos (López y López, 2010).

2.5.2.4. *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.

Teleomorfo: *Giberella avenacea* Cook.

Sinónimo común. *Fusarium avenaceum* ssp. *avenaceum*

Los esporodoquios son abundantes, de color naranja pálido a marrón, en forma de una masa de esporas central. Para la identificación de las especies, se deben utilizar siempre macroconidios formados en esporodoquios, en medio de cultivo con inclusión de hoja de clavel. Los macroconidios son largos y delgados, de paredes delgadas, de rectas a ligeramente curvadas (Watanabe, 2002).

La célula apical de los macroconidios es larga y se dobla en un punto. Las células basales son generalmente dentadas y presentan cinco septos; pero pueden observarse macroconidios con tres o cuatro septos. Los microconidios se producen escasamente por algunos aislados, pero son variables en forma, tamaño y septación (presentan de uno a dos septos). El micelio aéreo está generalmente separado. Las células conidiógenas son monofiálides y polifiálides. No se producen clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006)

2.5.2.5. *F. roseum* (Lk.) emend. Zinder & Hansen

Los conidióforos pueden ser hialinos, simples, cortos, con una masa de esporas en el ápice. Los macroconidios son hialinos, tienen forma de luna o bote, con la célula apical curvada, de cuatro a seis septos (24,5-45 µm); los microconidios son hialinos, cilíndricos y presentan hasta cuatro septos (5-17,1 µm). Los conidióforos son por lo general hialinos, simples, cortos o provenientes de hifas ordinarias, y producen una masa de esporas en el ápice. Las dimensiones de los

conidios son variadas en los distintos aislados estudiados. Las clamidosporas son de color marrón, globosas, en cadena de tres (Watanabe 2002).

2.5.2.6. *F. ventricosum* Appel & Wollenw.

Sin: *F. solani* (Mart.) Appel & Wollenw. var. *ventricosum* (Appel & Wollenw) Joffe.

Teleomorfo: *Nectria ventricosa* C. Booth.

No forma esporodoquios. Los conidióforos que surgen lateralmente de las hifas en el micelio aéreo, son simples al inicio, septados, con una célula conidiógena apical muy larga. Las células conidiógenas son monolocales, cilíndricas, con un collarete distintivo, atenuándose hacia el ápice, muy largas, de 25-55 x 2,0-3,0 µm. Los microconidios y macroconidios están formados en falsas cabezas, con poca distinción entre ellos; de 10-50 x 3,5-8,0 µm de ancho y de 25-55 x 2,0-3,0 µm de largo. Las clamidosporas son frecuentemente globosas o subglobosas (López y López, 2010).

2.5.2.7. *F. graminearum* Schwabe

Teleomorfo: *Gibberella zeae*

Sinónimo común *Fusarium graminearum*

Según López y López (2010), los esporodoquios son a menudo escasos, pero si están presentes, son de color naranja pálido; se forman a partir de un estroma ovoide y papilado. La temperatura óptima para que se formen los esporodoquios es de 29° C, y requiere alta humedad relativa e incidencia de luz UV. Los macroconidios son relativamente delgados, en forma de hoz de 2.5 x 35-63 µm, puede contener entre cinco a seis septos, se caracterizan por tener una célula basal bien desarrollada. Con microconidios ausentes.

Según Leslie y Summerell (2006), los esporodoquios varían en color desde rojo-marrón hasta naranja y son producidos lentamente (30 días aproximadamente). Las clamidosporas son abundantes, de rápida formación y globosas. Estas estructuras pueden encontrarse solitarias, en grupos y en cadenas.

La mayoría de las especies aisladas forman una cantidad abundante de peritecios en la naturaleza, liberando las ascosporas que causan enfermedades en las partes aéreas de las plantas, tales como la fusariosis en la espiga de trigo, en cebada, en avena, en arroz salvaje; podredumbre en tallo y mazorca de maíz y en los granos del sorgo (López y López, 2010).

2.5.2.8. *F. incarnatum* (Rob.) Sacc.

Sin: *Pseudofusarium fusarioideum* Matsushima

P. semitectum (Berk. & Rav.) Matsushima.

Teleomorfo: No conocido

Los esporodoquios están ausentes. Los conidióforos surgen lateralmente de las hifas en el micelio aéreo; son simples al inicio, irregulares y ramificados después. Las células conidiógenas

pueden ser monolocales y multilocales, cilíndricas o subcilíndricas, usualmente con proliferación simpodial. Los microconidios están ausentes.

Los macroconidios son desde rectos hasta lanceolados, presentan de tres a cinco septos, de 7-50 x 2,3-6,0 µm, atenuados hacia ambos extremos, con la célula apical recta y muy atenuada, y la célula basal ligeramente papilada. En algunos aislados los macroconidios son ligeramente curvos a falciformes, con la célula apical algo curvada y muy aguda. La forma de los macroconidios es muy variable de un aislado a otro, por lo que la especie puede ser confundida en ocasiones con *F. equiseti*, especialmente cuando se cultiva en medios ricos en carbohidratos como PDA y PSA.

Las clamidosporas están esparcidas, generalmente intercaladas en las hifas; solitarias, en pares, o formando cortas cadenas, globosas o subglobosas, de pared lisa, de 6-10 µm, unicelulares o bicelulares (López y López, 2010).

2.5.2.9. *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun

Forma sexual. Desconocido.

Sinónimo Común**.** *Fusarium cerealis.*

La mayoría de los aislados producen esporodoquios de color naranja pálido a marrón oscuro, abundantes en medio de cultivo con inclusión de hojas de clavel, pero también se pueden formar directamente en el agar, que se agregan juntos en una masa visible de esporas en el centro del cultivo. Esta masa de esporas se vuelve marrón con el tiempo, y pueden tener zonaciones en forma de anillos si se incuba en alternancia de luz y oscuridad.

Los macroconidios son abundantes, de longitud media, con una gruesa pared, con el lado dorsal más curvado que el lado ventral, presentan por lo general cinco septos, y normalmente son más anchos en el punto medio. La delimitación de macroconidios de *F. crookwellense* se ha estudiado con cierto detalle mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. No se producen microconidios.

Las clamidosporas son moderadamente abundantes, pero se forman lentamente (cuatro a seis semanas); se ubican en hifas aéreas, en la superficie del agar, o en hifas sumergidas; también se pueden formar en las células de los macroconidios; aparecen en cadenas y agrupadas; prevalecen las paredes lisas en relación con las verrugosas. En algunas especies se pueden formar agregados de hifas (Leslie y Summerell, 2006)

2.6. Uso de fungicidas para el control de *Fusarium* spp. en papa

Un agente antifúngico es una sustancia tóxica que se emplea para impedir el crecimiento o eliminar los hongos perjudiciales para las plantas, los animales o el hombre; en este contexto se les refiere comúnmente como fungicidas (Carlile *et al*., 2005).

El concepto de fungicida en un laboratorio, se refiere al agente que disminuye en un 99.9% las colonias a partir de un inóculo de subcultivo puro, expresado habitualmente como MFC o Concentración Mínima del Fungicida (Tapia, 2009).

Los fungicidas son una herramienta importante dentro de cualquier cultivo por lo cual se debe tener conocimiento de las propiedades de cada uno de ellos. Las características que se deben tener en cuenta son: su toxicidad, naturaleza química, campo de aplicación, dosis a aplicar; así como el modo de acción sobre el patógeno (Quevedo, 2012).

Según su modo de acción, pueden catalogarse en fungicidas protectores y fungicidas erradicadores. Los fungicidas protectantes, también llamados de contacto, se aplican antes de que lleguen las esporas de los hongos a la superficie del hospedante. Actúan solamente en la superficie de la planta donde el fungicida ha sido depositado y evitan que las esporas germinen y penetren las células vegetales. Por ello, se recomienda cubrir la mayor parte de la planta con este tipo de productos (Carlile *et al.,* 2005).

Los fungicidas erradicadores, conocidos como sistémicos o sistemáticos, se aplican para el tratamiento de la planta ya enferma por hongos fitopatógenos. Son absorbidos a través del follaje o de las raíces y se movilizan por toda la planta. Otros productos sistémicos, conocidos como fungicidas translaminares tienen la capacidad de moverse del lado superior de la hoja al inferior, pero no de hoja a hoja. Los fungicidas sistémicos afectan varias etapas de la vida del hongo (Lucas, 2002).

En otra clasificación de los fungicidas según su modo de acción están los compuestos de baja especificidad bioquímica y los compuestos de alta especificidad bioquímica. Los agentes de bajas especificidad bioquímica son aquellos que actúan sobre varios componentes o procesos celulares, mientras que los de alta especificidad bioquímica actúan sobre una única célula, componente o proceso celular (Carlile *et al*., 2005).

Según Quevedo (2012), dentro de los antifúngicos del alta especificad bioquímica se encuentran los ácidos carboxílicos, heteroaromáticos y fenilamidas que van a inhibir la síntesis de ácidos nucleicos; los benzimidazoles, thiohatos, fenillcarbamatos, benzamidas y feniluras que inhiben la mitosis y la división celular; las estrobilurinas, pirimidinas y carboxamidas que son inhibidores de la respiración; las anilopirimidinas, acidos enopiranuronico, el hexopiranosil y el glucopiranosil van a inhibir la síntesis de aminoácidos y proteínas; el grupo de los triazoles, los imidazoles, las pirimidinas y las piperazinas son también inhibidores pero de la biosíntesis de esteroles en la membranas.

Otro modo de acción de los antifúngicos de alta especificidad bioquímica, consiste en que pueden inducir la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs), tal es el caso del miconazol, que tiene este efecto en especies de levaduras susceptibles (Thevissen *et al.,* 2007).

Los fungicidas de baja especificidad, sin embargo, tienen una ventaja sobre los fungicidas de alta especificidad. Esto últimos a menudo pierden gran parte de su eficacia dentro de unos años, mientras que los fungicidas de baja especificidad no. La eficacia de los fungicidas de alta especificidad, es generalmente debido a la interacción con una sola enzima fúngica y una sola mutación; lo que puede provocar, con su uso sostenido, resistencia en el hongo (Carlile *et al*., 2005).

En el mudo, el fungicida que más se recomienda para el control de la fusariosis en papa, es el tiabendazole (TBZ). Este es un compuesto sistémico con acción protectante y curativa; se absorbe a través de las hojas y raíces; su traslocación es principalmente acropétala (Khalil *et al*., 2013). Sin embargo; en muchas razas de *F. sambucinum* se ha encontrado resistencia al mismo (Desjardins *et al*. 1993; Holley and Kawchuk 1996; Platt 1997)

El fundazol o benomyl es un fungicida preventivo, curativo, de acción sistémica. Está recomendado para el control de *Fusarium* Link*, Colletotrichum* Corda*, Pyricularia* Sacc., *Helminthosporium* Link*, Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet*,* los Mildios y *Macrophomina* spp*.* Este producto se absorbe por las hojas y raíces de las plantas tratadas y actúa interfiriendo la síntesis del ADN (Quevedo, 2012). El benomyl se emplea en la desinfección de semillas de papa contra *Rhizoctonia solani* Khün (Lista Oficial de Plaguicidas Autorizados, 2010). Este fungicida se ha utilizado con éxito en el control de *F. solani,* agente causal de la pudrición de la raíz del quimbombó, bajo condiciones de casas de cultivo (Zahoor *et al.,* 2012).

El Silvacur combi es en fungicida sistémico; de efecto preventivo, curativo y erradicante. Su mecanismo de acción sobre el patógeno consiste en la inhibición de la biosíntesis del ergosterol. Esta recomendado para el control de *Fusarium, Alternaria solani* Sor.*, Pyricularia* y *Richosporium* spp. (Lista Oficial de Plaguicidas Autorizados, 2010).

El cuproflow es un fungicida protectante y curativo que inhibe la germinación de las esporas. Se recomienda su uso contra enfermedades fúngicas del follaje de aguacate, frutabomba, mango, cacao, cafeto, cítricos, hortalizas, forestales, papa infestada por *A. solani*, plátano y tabaco (Lista Oficial de Plaguicidas Autorizados, 2010).

En Cuba no ha sido recomendado ningún fungicida para la prevención o erradicación de la fusariosis en papa.

2.6.1. Métodos empleados para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro*

Existen varias métodos para medir la actividad antifúngica *in vitro,* entre ellos se encuentran el método de dilución en caldo y el método de difusión en disco.

2.6.1.1. Difusión en agar

El método de difusión en agar fue estandarizado por Bauer en 1966 (Hadacek y Greger, 2000). El principio del método radica en el uso de una dosis constante de fungicida en un disco de papel aplicado sobre la superficie del agar; en el cual ha sido cultivado el hongo en cuestión. Se forma así un gradiente de concentración del fungicida, y la sensibilidad del hongo está indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento micelial alrededor del disco que contiene el fungicida.

El diámetro del crecimiento micelial obtenido dependerá de los siguientes factores: la sensibilidad del hongo al producto, del volumen que absorba el disco; de la capacidad de difusión del fungicida, del tamaño y fase de crecimiento del inóculo en ese medio, del grosor de la capa del agar, su pH y composición, de la temperatura, la velocidad de crecimiento y duplicación del hongo (Doughar, 2006; Sánchez *et al.,* 2007 y Al-Bayati, 2009).

Este método es muy conveniente debido a su gran simplicidad y bajo costo económico. Su desventaja radica en que es imposible medir la cantidad de fungicida que difunde en el medio de agar. Por otra parte, no permite discriminar qué compuestos de los aplicados al medio, son los que poseen la actividad antifúngica y no es recomendada para evaluar microorganismos de crecimiento lento (Klančnik *et al.,* 2010).

El ensayo de difusión posee como desventaja sobre el de dilución, que resulta menos económico en lo referido a tiempo y recursos necesarios. En la dilución, la concentración de los componentes del medio puede ser definida y se conoce con exactitud la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) (Hadacek y Greger, 2000).

Es más confiable la dilución que la difusión en agar, debido a que brinda la posibilidad de realizar una rápida determinación de la actividad antifúngica. Sin embargo; se requiere de grandes cantidades de muestras para su uso (Klančnik *et al.,* 2010).

2.6.1.2. Dilución en agar

El método de dilución fue descrito por Rideal y Walker en 1905 y fue estandarizado para evaluar el crecimiento micelial de fragmentos fúngicos por Espinel *et al.,* (1995). El mismo, permite determinar la MIC de forma visual y describir los efectos de componentes naturales o sintéticos sobre las hifas de un hongo (Benson, 1998). A su vez, puede ser empleado para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un producto antifúngico frente a determinado cultivo de un microorganismo.

Esta metodología se basa en la preparación de placas de Petri con agar; que serán las réplicas para cada concentración del fungicida a evaluar (Amadi *et al.,* 2010). Luego se inoculan en cada una de las placas las suspensiones miceliales de los aislados en estudio. Las muestras se evalúan después de un período de incubación y se determina la MIC del fungicida frente al microorganismo ensayado (Adewusi y Afolayan, 2009 y Salas *et al.,* 2010).

El ensayo depende enteramente de los compuestos presentes en el medio de cultivo y que sus concentraciones sean homogéneas. Resulta ventajoso su empleo, debido a que aporta datos precisos acerca de la MIC (Hadacek y Greger, 2000).

2.7. Uso de *Trichoderma* como agente biocontrolador de hongos del suelo

2.7.1. El género *Trichoderma*

Los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de agentes fitopatógenos. Entre las especies más estudiadas y utilizadas como control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma* Pers., debido a su eficaz control, gran capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre el crecimiento y la nutrición de los cultivos agrícolas y como inductor de resistencia sistémica en la planta frente a diferentes patógenos (Harman, 2004 y Cervantes, 2007).

Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los hongos fitopatógenos. Entre estos se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Mientras mayor cantidad de mecanismos posea un aislamiento de *Trichoderma*, más eficiente y duradero será el control sobre el agente fitopatógeno que se desee controlar; aspectos que no poseen los plaguicidas químicos (Infante *et al.*, 2009).

Trichoderma se ubica taxonómicamente según Villegas (2005) en el Reino *Fungi*, División *Mycota*, Subdivisión *Eumycota*, Clase *Hyphomycetes*, Orden *Moniliales*, Familia *Moniliaceae* y Género *Trichoderma*.

2.7.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma*

En el efecto biocontrolador de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos dianas. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Lorenzo, 2001).

Otros autores han sugerido distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen, además de los mencionados, el crecimiento quimiotrófico (Chet y Inbar, 1994), el reconocimiento, adhesión y enrollamiento (Pérez, 2004), actividad lítica (Haram *et al.,* 1996), entre otros.

2.7.2.1. Competencia

La competencia, constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la

cantidad o el espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo puede variar acorde con las características del agente de control biológico y con características tales como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahmad y Baker, 1987; Hjeljord y Tronsmo, 1998).

La competencia por nutrientes puede ser por compuestos nitrogenados; también compiten por iones cloruro, fósforo, potasio, hierro; así como por carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas) (Eveleigh *et al*., 1986 y Stefanova *et al*., 1999).

2.7.2.2. Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Melgarejo y Sagasta, 1989; Lorito *et al*., 1990, Díaz, 1994 y Ulloa, 1996).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico (Carsolio *et al*., 1999), lo cual conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

El micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente estudiado, Chet *et al*. (1998) citados por Pérez 2004). No obstante, existen aspectos del mismo que no están totalmente esclarecidos. Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas. El desarrollo de cada etapa depende de las características de los hongos involucrados, de la naturaleza bioecológica del antagonista y de las condiciones ambientales. Chet y Benhamou (1998), explican detalladamente cada una de estas etapas, para el caso de las especies de *Trichoderma*.

2.7.2.3. Crecimiento quimiotrófico: El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico (Chet y Inbar, 1994). En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico.

2.7.2.4. Reconocimiento: Las investigaciones realizadas a lo largo de muchos años con un número considerable de cepas de *Trichoderma* y de especies de hongos fitopatógenos han

demostrado que estas son efectivas sólo contra patógenos específicos. El conocimiento de esta especificidad condujo a la idea de que el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y el hospedante es un evento esencial que precede al proceso antagonista (Chet y Benhamou, 1998). Esto es un elemento a tener en cuenta para la aplicación práctica de este hongo, y para la búsqueda de nuevos aislamientos más adaptados y eficaces, para desarrollar un proceso de mejora continua de la actividad biocontroladora.

El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular, Barondes (1981) citado por Chet *et al*. (1998). La producción de lectinas se ha investigado en *R. solani* y *S. rolfsii*. En todos los casos se encontraron evidencias directas, de que las lectinas están involucradas en el micoparasitismo (Chet e Inbar, 1994 y Pérez, 2004).

2.7.2.5. Adhesión y enrollamiento: Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de estas, todo esto está mediado por procesos enzimáticos (Pérez, 2004). Según Chet y Elad (1983), citado por Martínez *et al.,* (1994), la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

2.7.2.6. Actividad lítica: Ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haram *et al.,* 1996). Por los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante. La actividad enzimática en *Trichoderma* ha sido estudiada extensamente, así como las posibles funciones que muestra el micoparasitismo.

Las especies de *Trichoderma* tienen un elevado potencial parasítico con una actividad metabólica muy particular, que les permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos (Sandoval y Lopéz, 2002).

Trichoderma libera muchos metabolitos, dentro de ellos enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas), que participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas de *Trichoderma*, que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno. Misaghi (1984) y Adams (1990) citados por Díaz (1994), plantearon que el micoparasitismo finalmente termina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante. El citoplasma restante está principalmente rodeando

las hifas invasoras, mostrando síntomas de disgregación, lo que disminuye la actividad patogénica del mismo.

Desde el punto de vista práctico, las enzimas se tienen en cuenta como criterio en la selección de aislamientos. Elad *et al.,* (1983) encontraron que los aislamientos de *Trichoderma* eficaces en el control de patógenos vegetales eran capaces de producir glucanasas, quitinasas y proteasas, por lo que recomendaron que los aislamientos de *Trichoderma* spp. pueden ser seleccionados como agentes de control biológico en base a su capacidad de producir estos complejos enzimáticos.

Por los resultados que se han obtenido hasta el momento, se ha llegado a la conclusión que la producción del factor inhibidor en *Trichoderma* depende más del aislamiento que de la propia especie. Aspecto este, que reafirma una vez más la búsqueda constante de nuevos aislamientos de este antagonista (Díaz, 1994).

2.7.2.7 Antibiosis: Es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Vero y Mondito, 1999).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas "antibióticos" (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Al inicio se estimó que la actividad inhibidora de aislamientos de *Trichoderma* sobre otros hongos se debía solo a compuestos no volátiles. Dennis y Webster (1971), fueron los pioneros en esta temática, con la realización de los trabajos más completos acerca de la función de los antibióticos producidos por hongos del género *Trichoderma* sobre patógenos de las plantas. Ellos relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma* spp. con compuestos no volátiles, entre los que se encontraban uno identificado como trichodermina y otros metabolitos peptídicos.

En investigaciones posteriores Webster y Lomas (1964) citados por Díaz (1994), determinaron que *Trichoderma* sp. produce dos antibióticos más: gliotoxina y viridina. Más tarde Oliver y Germain citado por Martínez (1998), informaron que *T. harzianum* Rifai produce numerosos antibióticos como son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

Posteriormente, Dennis y Webster (1971), detectaron que la actividad antibiótica de algunos aislamientos se debía también a la producción de compuestos volátiles, y notaron que los aislamientos más activos poseían un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista. Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático (Martínez, 1994).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba; durante el período comprendido entre Septiembre 2011 a Abril 2013.

Medios de cultivo

Para la caracterización de los hongos filamentosos y la evaluación de alternativas para su control, se utilizaron los medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA) (AES); Caldo Papa Dextrosa (PDB) (Difco) y Agar nutrientes especiales (SNA) (Nirenberg, 1976); compuesto por (Glucosa: 0,2 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 $g.L^{-1}$; KCL: 0,5 $g.L^{-1}$; KNO_3: 1 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4: 1 $g.L^{-1}$; Agar: 20 $g.L^{-1}$; agua: 1 L; todos a pH 5,6± 0,2.

Esterilización

Todos los medios de cultivos fueron esterilizados mediante calor húmedo en autoclave (Modelo AC3701) a 121ºC y 1,2 atm de presión durante 20 minutos. La cristalería y el instrumental fueron esterilizados mediante calor seco en estufa (Modelo HC62A) a 180ºC durante dos horas.

Todas las manipulaciones de los aislados de hongos filamentosos fueron realizadas en un equipo de flujo laminar vertical (Modelo FASTER Bio 60).

Incubación

La incubación de los aislados de hongos filamentosos se realizó en una incubadora (Modelo: Memmert) a 28ºC y oscuridad constante.

Preparación de suspensiones miceliales

Para todos los ensayos donde se utilizaron suspensiones miceliales como inóculo inicial, estas se prepararon siguiendo el protocolo que se describe a continuación: en tubos (Eppendorf) de 1,5mL de capacidad con agua desionizada estéril, se inocularon cinco discos de micelio de 5mm de diámetro de cada aislado de *Fusarium* procedentes de colonias crecidas en medio de

cultivo (PDA). Estos se removieron en agitador vortex (Modelo: Heidolph Top Mix 94 323) a razón de 9rpm para obtener una suspensión de micelios uniformes. Posteriormente se determinó su concentración; para ello se utilizó una cámara de Neubauer mediante la observación al microscopio óptico (Modelo: Olympus, aumento 400x) y se ajustó a una concentración en el orden de aproximadamente (10^5 fragmentos de micelios o conidios. mL^{-1}) con agua desionizada estéril.

Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 18,0 para Windows. Se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilk. Los datos que no siguieron distribución normal se procesaron mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis; así como la prueba de U de Mann Whitney. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p<0,05$.

3.1. Aislamiento, caracterización e identificación de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa

Aislamiento de hongos filamentosos

Tubérculos de papa de la variedad Grettel con síntomas de pudrición seca fueron lavados con agua corriente por 15 minutos, luego con agua desionizada estéril, después se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y finalmente se enjuagaron con agua desionizada estéril. Las porciones desinfectadas se colocaron en cámara húmeda. Estas se incubararon a 28ºC y oscuridad constante por siete días. Con un asa, se tomaron fragmentos de micelio utilizando un estereoscopio (Modelo Carl Zeiss) con 10x de aumento.

3.1.1. Caracterización cultural de las especies de hongos asociadas a la pudrición seca de la papa

Caracterización cultural de las colonias

Se tomaron discos de micelio de 6mm de diámetro provenientes de colonias crecidas en medio de cultivo (PDA) y se inocularon en placas de Petri de cristal de 70 mm de diámetro con el mismo medio de cultivo. Las placas se incubaron a 28ºC y oscuridad constante durante 10 días. Para la caracterización cultural de la colonia se evaluaron las siguientes variables: velocidad de crecimiento, color de la colonia, color del reverso, textura superficial, presencia de líquido transpirado y pigmentación del medio de cultivo.

3.1.2. Caracterización morfológica de las especies de hongos asociadas a la pudrición seca de la papa

Caracterización morfológica de las estructuras de reproducción y clamidosporas

Se utilizó el medio de cultivo Agar Nutrientes Especiales (SNA) vertido en placas Petri de cristal de 50mm de diámetro. Se colocó un fragmento de papel de filtro estéril de 1 cm^2 sobre la superficie del medio una vez que este se solidificó. Se tomaron discos de micelio de 4 mm de diámetro provenientes de colonias crecidas en el medio de cultivo PDA y se inocularon encima del papel de filtro. Las placas fueron incubadas a 28ºC con alternancia de 8 horas de luz fluorescente y 16 horas de oscuridad durante 10 días.

También se prepararon microcultivos por el método de Riddel (1950); así como preparaciones directas al microscopio clínico (Aumento 400x) para observar las características de las hifas, estructuras de reproducción y clamidosporas. Para completar la caracterización morfológica y la identificación de los aislados de *Fusarium,* se utilizaron los siguientes documentos: Atlas de hongos del suelo y las semillas (Watanabe, 2002); Manual de laboratorio de *Fusarium* de Leslie y Summerell (2006) y Manual de especies de *Fusarium* fitopatógenas de Cuba, Guía para su aislamiento e identificación (López y López, 2010). Las fotografías de las estructuras de reproducción fueron tomadas con una cámara digital (Modelo: CANON A 630, aumento desde 80-640X).

3.2. Evaluación *in vitro* de la acción de fungicidas frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

En este estudio se evaluó la inhibición del crecimiento micelial de las especies de *Fusarium,* previamente identificadas, para determinar la influencia de fungicidas en su control. Para ello se utilizaron diferentes métodos de evaluación de actividad antifúngica. Uno de ellos fue el método de difusión en medio de cultivo sólido; para esto se usaron seis fungicidas que se prepararon a concentración recomendada por la lista oficial de Plaguicidas autorizados (2010) en condiciones de campo.

1. Orius 25 EW (Tebuconazol 20%), a la concentración de 250 $g.L^{-1}$

2. Supreme 400 EW (Tebuconazol 13,3%+Procloraz 26,7% EW), a la concentración de 400 g. L^{-1}
3. Silvacur combi CE 30 (Tebuconazol 22,5%+Triadimenol 7,5%) a la concentración de 300 g. L^{-1}
4. Benomyl 50 WP (Carbendazim) a la concentración de 2 g.L^{-1}
5. Cuproflow SC 37,75 a la concentración de 377,5 g.L^{-1}
6. Score CE 25 (Difenoconazol) a la concentración de 250 g. L^{-1}

Las soluciones de los fungicidas se prepararon en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad y se esterilizaron mediante filtración con membranas de 0,22 µm. Se emplearon discos de papel de filtro cualitativo Whatman 1 (Whatman International Ltd Maidstone England) de 6 mm de diámetro previamente esterilizados. Los discos fueron embebidos a 15 µL de los fungicidas durante cinco minutos. Se incluyeron placas con discos impregnados con agua desionizada estéril para ser usadas como controles.

Se utilizaron Placas de Petri de cristal de 90 mm de diámetro. A cada placa se le vertió 15 mL del medio de cultivo PDA y se colocaron en una superficie niveladora, hasta lograr una capa de tres a cuatro milímetros de espesor. Se utilizaron ocho réplicas para cada especie de *Fusarium*. Se adicionó 1mL de suspensiones miceliales de las especies en las Placas de Petri, y se diseminaron sobre la superficie del medio con espátula de Drigalsky. Se dejó secar la placa durante 10 minutos y luego se colocaron discos impregnados con las concentraciones de los fungicidas citadas anteriormente. Las placas fueron incubadas a 28ºC y oscuridad constante durante 48 horas. Se midió (en mm), el halo de inhibición del crecimiento micelial de los hongos agentes causales de la pudrición seca en minitubérculos, frente al fungicida a las 48 horas de inoculados.

Para determinar la susceptibilidad de los agentes causales de la pudrición seca de la papa, frente a los fungicidas con mejores resultados en la inhibición del crecimiento micelial, se evaluó a partir de la determinación de su MCI por el método de dilución en medio de cultivo PDA. Se siguió el protocolo descrito por Cruz-Martín *et al*. (2006) que se describe a continuación. Se ensayaron concentraciones decrecientes de este fungicida en diluciones seriadas dobles.

Se prepararon dos repeticiones de cada concentración. Además, se incluyeron placas de Petri con medio de cultivo PDA libres del fungicida para ser usadas como controles de crecimiento.

Los inóculos utilizados fueron suspensiones de micelio de cada especie; con una micropipeta (Modelo: GILSON AG 59706), fueron adicionados 3,5 µl de inóculo sobre la superficie del agar (Placas de Petri de 90mm Ø).

Las placas de Petri fueron señalizadas por el reverso para determinar la orientación de los puntos a inocular. El punto No1 correspondió a la especie no identificada, el No 2 y 4

correspondió a la especie *Fusarium solani*, el No 3, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 a la especie *Fusarium oxysporum*. En placas de Petri con PDA se inocularon los controles de crecimiento. Se ensayaron las siguientes concentraciones: No1: 200 $g.L^{-1}$, No.2: 100 $g.L^{-1}$, No.3: 50 $g.L^{-1}$, No.4: 25 $g.L^{-1}$, No.5: 12,5 $g.L^{-1}$, No.6: 6,25 $g.L^{-1}$, No.7: 3,125 $g.L^{-1}$ y No.8: 1,523 $g.L^{-1}$ distribuidas en PDA; luego se inocularon las suspensiones miceliales de los aislados.

Posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que la humedad de los inóculos fue absorbida dentro del agar, se invirtieron y se incubaron a 28ºC en la oscuridad. Las evaluaciones se realizaron a las 120h; en estas se comprobó el crecimiento micelial de las colonias del hongo en los controles. Finalmente, se tomó como MCI, la menor concentración del fungicida que inhibió completamente el crecimiento fúngico.

3.3. Evaluación del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Para la evaluación se utilizó la cepa CCIBP-*Trich*3 (*Trichoderma viride* Pers) procedente de la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Se empleó la técnica del cultivo dual en placas Petri de cristal de 90mm de diámetro con 20 mL de medio de cultivo PDA. Se colocó en un extremo de la placa de Petri un disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno *Fusarium* y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con micelio del antagonista *Trichoderma viride* a 5 cm de separación entre ellos (Howell, 2003), esto se realizó para cada especie identificada. Se inoculó en placas de Petri un disco de agar (inóculo) con el antagonista y el patógeno, los cuales correspondieron a los controles; posteriormente, los cultivos se incubaron a 28ºC, y oscuridad constante durante 5 días. Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas y se midió el crecimiento radial del micelio de los hongos, acorde con lo referido por (Fernández y Suárez, 2009).

La competencia por nutrientes y espacio se valoró comparando la velocidad del crecimiento. Para esto, se midieron los radios de crecimiento del patógeno (RCP) y del antagonista (RCA) con la ayuda de un calibrador “Pie de rey” según recomienda Suárez *et al*. (2008). Conjuntamente, se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Ezziyyani *et al*. (2004) PICR = (R1 – R2)/R1 x 100, donde R1 es el radio del patógeno control y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

Radio de Crecimiento Antagonista (RCA)

Radio de Crecimiento Patógeno (RCP)

Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR).

3.3.1. Determinación de las formas de antagonismo de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Para evaluar las formas de antagonismo se siguieron los criterios sugeridos por Davet *et al*., (1981).

A. Antagonismo físico: las hifas de los dos hongos forman un relieve en la zona de contacto
B. Antagonismo químico: las hifas dan origen al fenómeno de lisis en la zona de contacto
C. Antagonismo hiperparasitario: las hifas del antagonista recubren las del parásito entrelazando o entrecruzándose con estos y ocupando el espacio vital
D. Antagonismo físico-químico: las hifas de los dos hongos no alcanzan a tomar contacto, dando origen a un espacio vacío

3.3.2. Intensidad del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Para evaluar la intensidad del antagonismo se siguieron los criterios sugeridos por Davet *et al*., (1981).

++ Intensidad de antagonismo elevado (evidente, el patógeno es inhibido en el crecimiento más del 25%

+ Intensidad de antagonismo intermedio (el patógeno es inhibido en el crecimiento menos del 25%)

- Intensidad de antagonismo escasa (el patógeno no es inhibido en el crecimiento por el antagonista

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento, caracterización e identificación de especies de hongos asociadas a la pudrición seca de la papa

Aislamiento de hongos filamentosos

Se obtuvieron un total de diez aislados de hongos filamentosos procedentes de minitubérculos de papa de la variedad Grettel, con síntomas de pudrición seca. Los mismos, mostraron características similares a las descritas para el género *Fusarium.*

4.1.1. Caracterización cultural de las especies de hongos asociadas a la pudrición seca de la papa

Caracterización cultural de las colonias

El primer aislado obtenido, mostró colonias que alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 4 días. Se observó en las colonias de este aislado un micelio aéreo de textura algodonosa de color blanco, de reverso blanco a amarillo claro. No se observó pigmentación del medio de cultivo, aunque se determinó la presencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias (figura 1).

Figura 1. Características culturales de la colonia del primer aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

El segundo aislado, presentó colonias que alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 8 días. Prevaleció la presencia de un micelio aéreo de textura afelpada de color rosado con bordes blancos, de reverso rosado claro con bordes blancos. No se observó pigmentación del medio de cultivo ni la existencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias (figura 2).

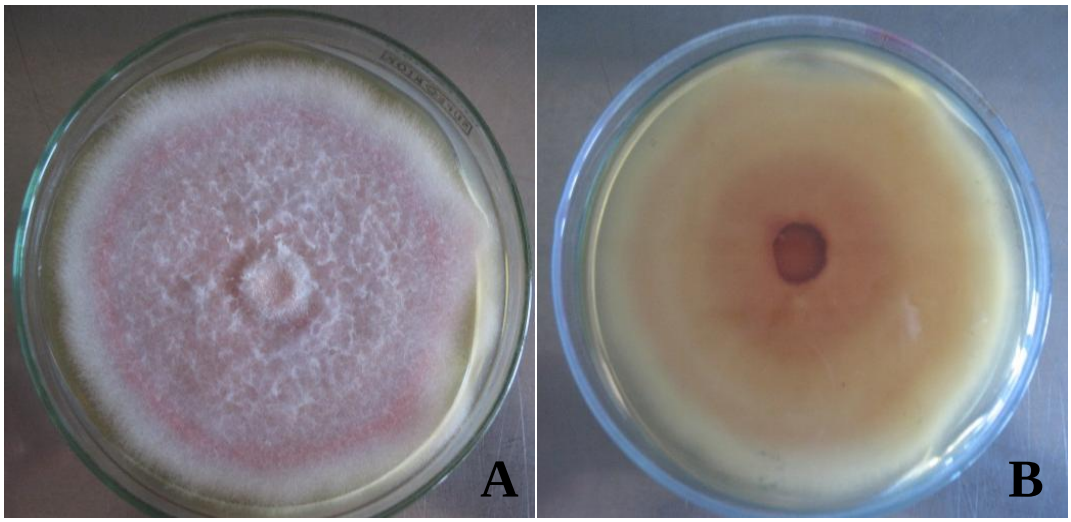


Figura 2. Características culturales de la colonia del segundo aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Las colonias del tercer aislado, alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 8 días. Asimismo, se apreció la presencia de micelio aéreo abundante de color púrpura y una textura afelpada. El reverso de las colonias mostró un color púrpura oscuro. No se observó pigmentación del medio de cultivo ni la presencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias evaluadas (figura 3).

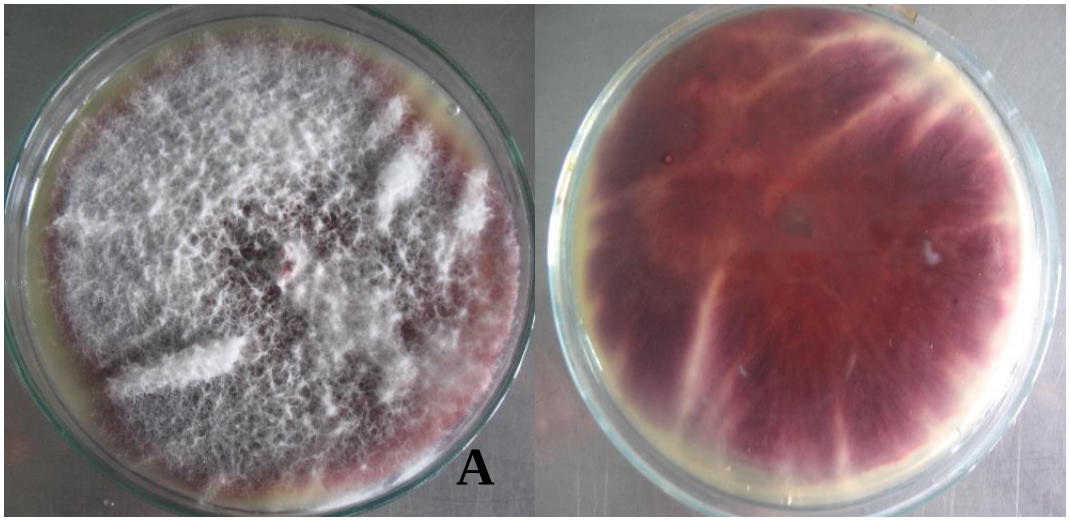


Figura 3. Características culturales de la colonia del tercer aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Las colonias del cuarto aislado alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 9 días. Se observó además la presencia de micelio aéreo de color anaranjado claro y textura afelpada. El reverso de las colonias fue de color amarillo claro con zonas rojizas. No se observó la pigmentación del medio de cultivo ni la presencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias evaluadas (figura 4).

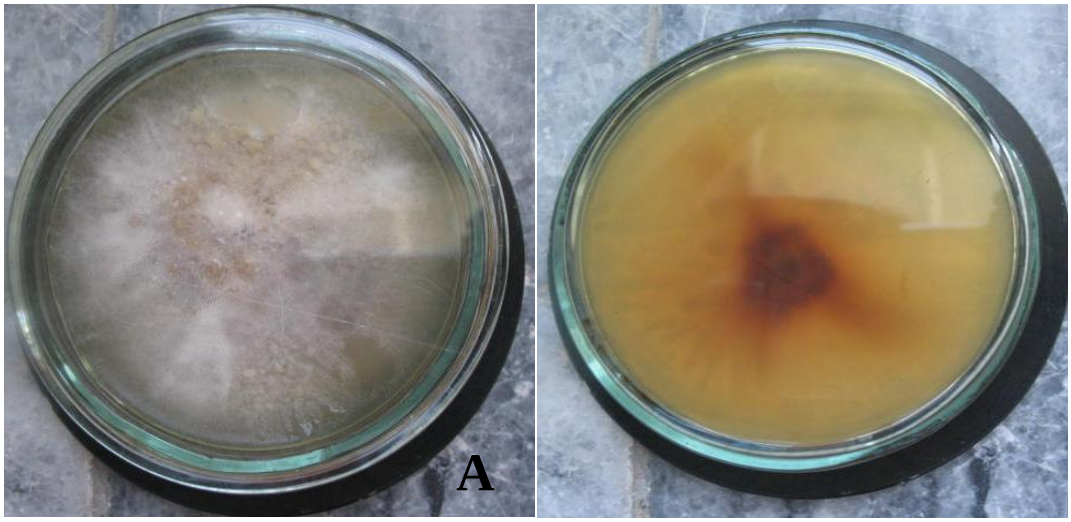


Figura 4. Características culturales de la colonia del cuarto aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Las colonias del quinto aislado alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 9 días. Se observó un micelio aéreo escaso, de color violáceo claro y el reverso violáceo claro. No se

apreció pigmentación del medio de cultivo ni la presencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias evaluadas (figura 5).

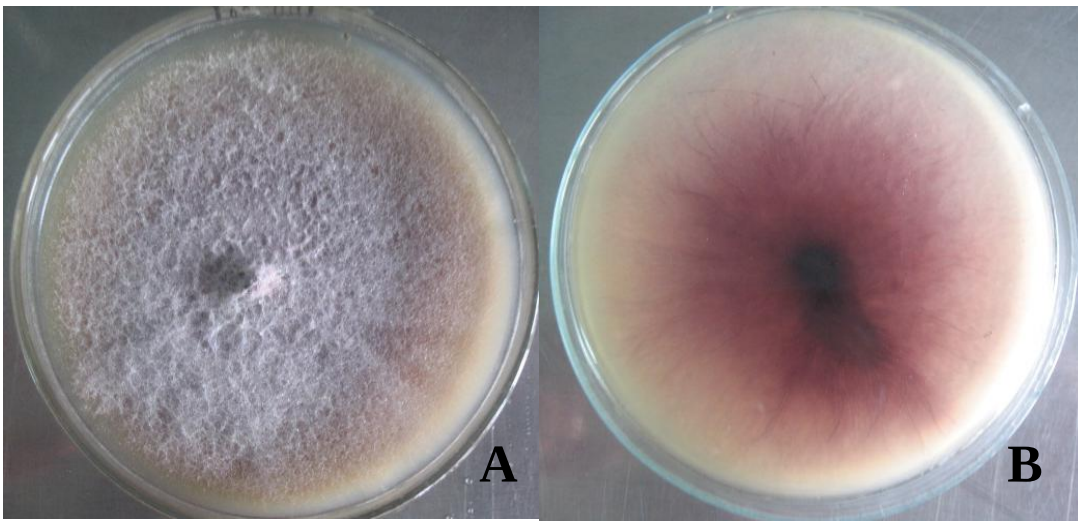


Figura 5. Características culturales de la colonia del quinto aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Las colonias del sexto aislado alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 9 días. Asimismo, se observó un micelio aéreo con textura algodonosa y color violáceo claro, así como el reverso rojo oscuro. No se apreció pigmentación del medio de cultivo pero si la presencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias evaluadas (figura 6).

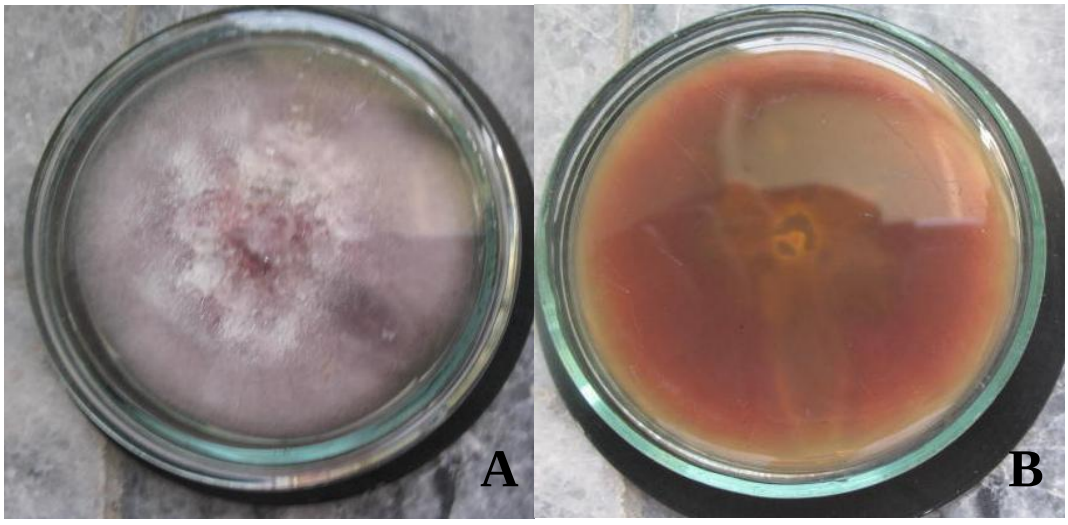


Figura 6. Características culturales de la colonia del sexto aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Las colonias del séptimo aislado alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 9 días. Se observó un micelio aéreo de color anaranjado-violáceo y una textura algodonosa. El reverso fue de color rojo oscuro. No se apreció pigmentación del medio de cultivo ni la presencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias evaluadas (figura 7).

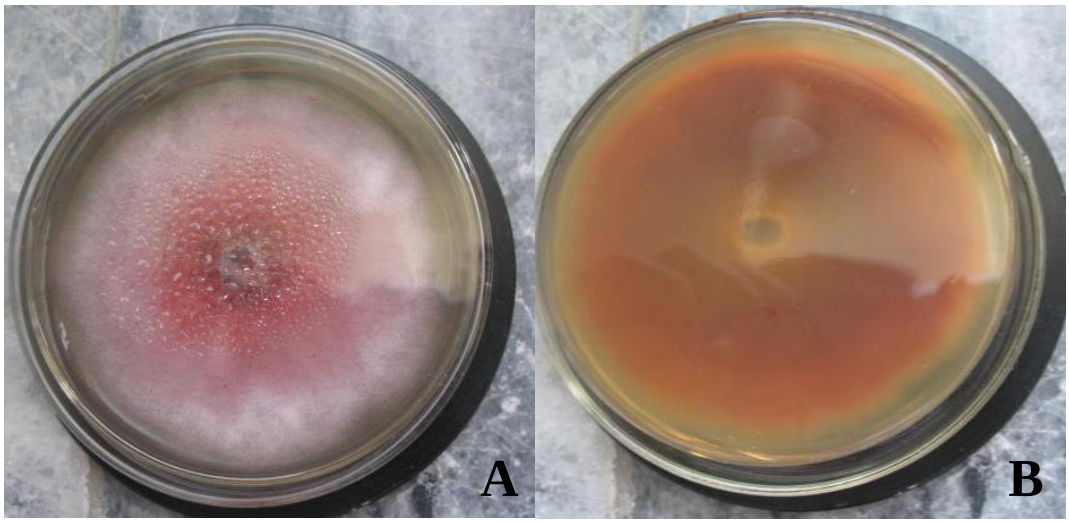


Figura 7. Características culturales de la colonia del séptimo aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Las colonias del octavo aislado alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 9 días. También se observó la presencia de un micelio aéreo de color violeta oscuro y textura afelpada. El reverso de las colonias fue de color marrón. No se detectó pigmentación del medio de cultivo, aunque sí la presencia de líquido transpirado en la superficie de las colonias evaluadas (figura 8).

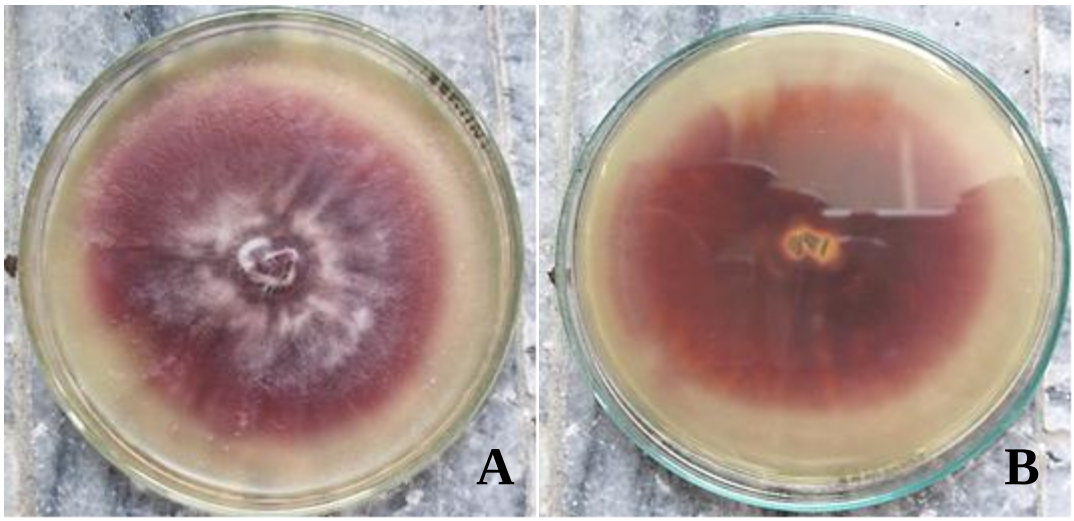


Figura 8. Características culturales de las colonias del octavo aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Las colonias del noveno aislado alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 9 días. Se observó un micelio aéreo de color violeta oscuro y con una textura algodonosa. El reverso fue de color rojo oscuro, sin pigmentación del medio de cultivo ni la presencia de líquido transpirado (figura 9).

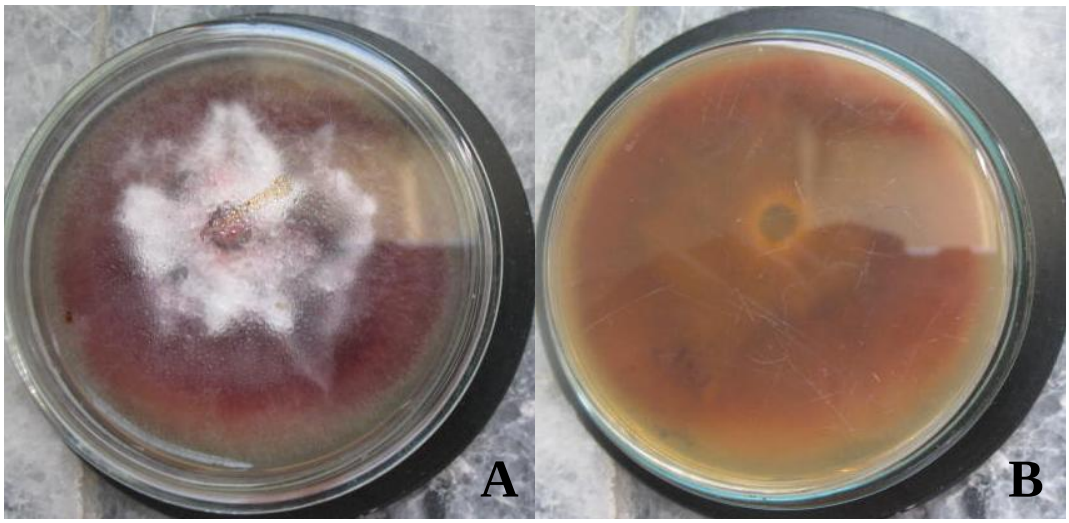


Figura 9. Características culturales de las colonias del noveno aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

En el décimo aislado, se observaron colonias que alcanzaron la totalidad de la placa de Petri a los 8 días. El micelio de las mismas fue aéreo, escaso y de color violeta. El reverso de las colonias fue de color violeta, sin pigmentación en el medio de cultivo ni la presencia de líquido transpirado en su superficie (figura 10).

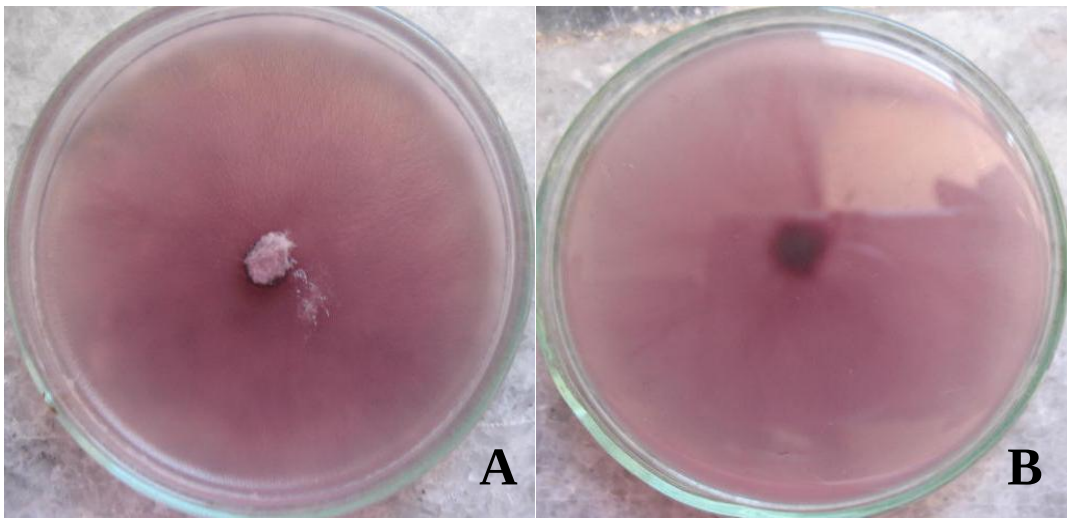


Figura 10. Características culturales de las colonias del décimo aislado de hongo filamentoso obtenido a partir de tubérculos que mostraron síntomas de pudrición seca. A: Anverso B: Reverso

Con estos resultados se apreció una gran variabilidad en las características culturales de las colonias de los 10 aislados de hongos filamentosos asociados con la pudrición seca de tubérculos de papa. Los aislados fueron conservados en la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (figura 11).

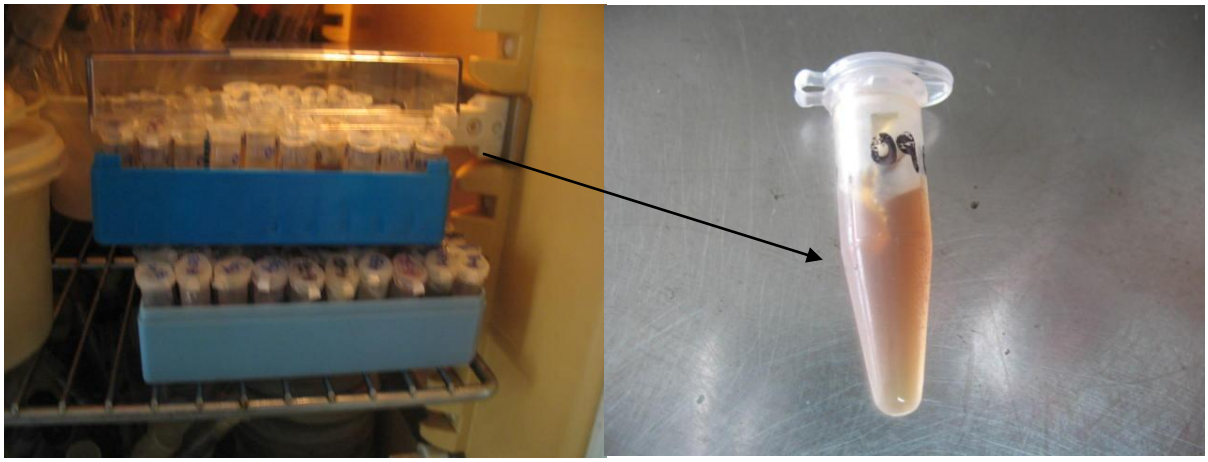


Figura 11. Conservación por el método alternativo de transferencia periódica en Cámara climatizada a 4ºC.

4.1.2. Caracterización morfológica de las especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa

Caracterización morfológica de las estructuras de reproducción y clamidosporas

Las características morfológicas de las estructuras de reproducción asexual y clamidosporas, coincidieron con las descritas para el género *Fusarium*, a excepción de las observadas en el primer aislado. Los aislados segundo y cuarto, mostraron características morfológicas similares a las descritas para la especie *Fusarium solani* mientras que los aislados tercero, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo, mostraron características similares a las descritas para la especie *Fusarium oxysporum.*

Por otra parte, el medio de cultivo SNA fue efectivo para inducir la formación de las estructuras de reproducción asexual y clamidosporas en cada uno de los aislados caracterizados, las cuales se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de las estructuras de reproducción asexual y clamidosporas, observadas en aislados de dos especies de *Fusarium* obtenidas a partir de minitubérculos de papa que mostraron síntomas de pudrición seca.

Especie	Conidióforos	Macroconidios	Microconidios	Clamidosporas
Fusarium solani	Hialinos con masa de esporas en el ápice	2 a 4 septos (23,4-66.3)µm de largo	0 a 2 septos que miden 7,8-19,5µm de largo, en cadenas, ovales	No abundantes, globosas, solitarias o formando parejas
Fusarium oxysporum	Hialinos, simples, cortos, largos, con masa de esporas en el ápice	2 a 5 septos (23,4-62,4)µm de largo	0 a 2 septos que miden 3,9-19,5µm de largo ovales, elípticos	Abundantes, globosas, solitarias,

Asimismo, algunas de características morfológicas de ambas especies observadas bajo el microscopio clínico se muestran en las figuras 12 y 13.

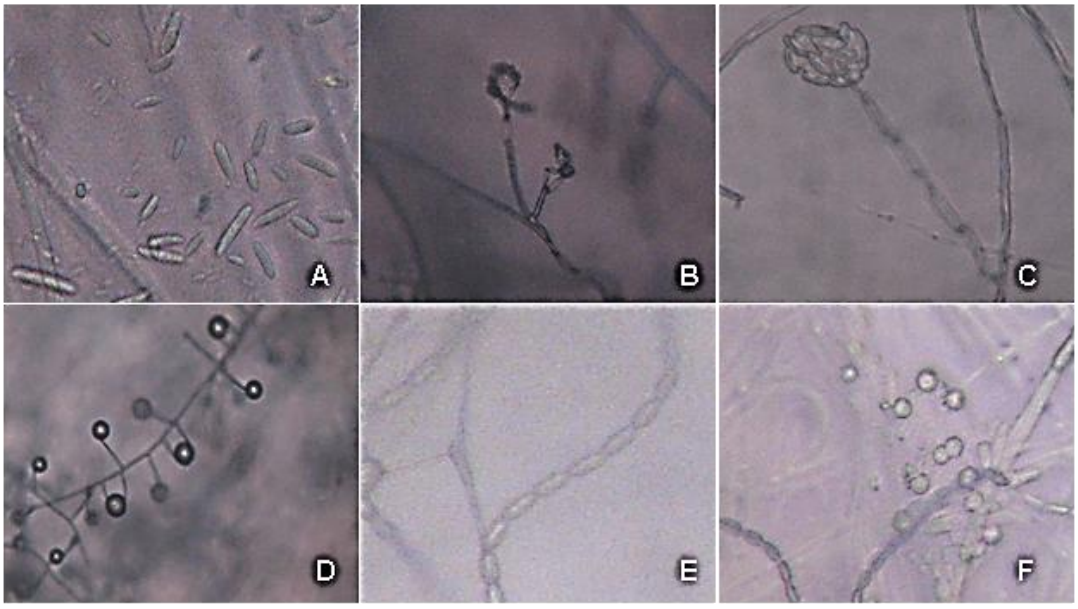


Figura 12. Características morfológicas de la especie *Fusarium solani*. Presencia de macroconidios y microconidios (A), Conidióforos cortos y largos (B), Conidióforo largo con masa de esporas en el ápice (C), Conidióforo cortos con masa de esporas en el ápice (D), Microconidios en cadenas (E), Clamidosporas solitarias y en parejas (F).

Figura 13. Características morfológicas de la especie *Fusarium oxysporum*. Presencia de macroconidios y clamidosporas abundantes (A); Conidióforos largos con masa de microconidios; (B, D, F); Macroconidios septados (C); Conidióforo corto con masa de esporas en el ápice (E); Cadenas de microconidios (G).

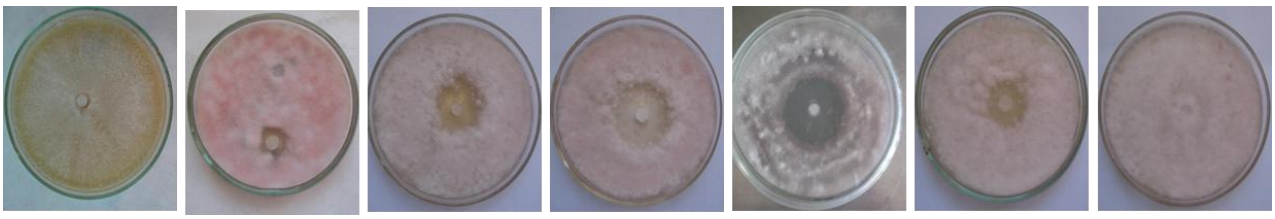
4.2. Evaluación *in vitro* de la acción de fungicidas frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Excepto el Cuproflow, en el resto de los fungicidas utilizados en este estudio se observó una acción inhibitoria, tanto con el método de difusión; así como por el método de dilución en medio de cultivo sólido.

4.2.1. Método de difusión en medio de cultivo sólido

Se constató la efectividad de los fungicidas utilizados en la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de las especies de *Fusarium* a excepción del Cuproflow (figura 13).

F. solani



F. oxysporum

Figura 14. Influencia de fungicidas comerciales en la inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* y *F. oxysporum*. Nótese la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos de papel impregnados con los fungicidas

El mayor halo de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxyporum* y *Fusarium solani*, se obtuvo al utilizar el fungicida sistémico Supreme EW 40 (tabla 2 y tabla 3).

Tabla 2. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de fungicidas químicos mediante la determinación del halo de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxyporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen.

Fungicidas	**Medias del halo de Inhibición (mm)**	**Rango promedio**
Supreme EW 40	18,50	45,50 **a**
Silvacur combi CE 30	10,25	36,75 **b**
Orius ECNA 25	8,57	28,50 **c**
Benomyl PH 50	2,25	11,50 **e**
Score CE 25	7,2	21,90 **d**
Cuproflow SC 37,75	0	4,00 **f**

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U Mann Whitney para p< 0,05.

Tabla 3. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de fungicidas químicos mediante la determinación del halo de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen.

Fungicidas	Medias del halo de Inhibición (mm)	Rango promedio
Supreme EW 40	16.38	45.50 **a**
Orius ECNA 25	10.57	34.50 **b**
Silvacur combi CE 30	10.00	32.50 **bc**
Benomyl PH 50	2.25	11.50 **d**
Score CE 25	5.30	20.50 **e**
Cuproflow SC 37,75	0	4.00 **f**

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba de Kruskal Wallis complementada, con la prueba U Mann Whitney para p< 0,05.

La mínima concentración inhibitoria del fungicida Supreme frente al crecimiento micelial de *Fusarium oxyporum* y *Fusarium solani* fue de 3,125 g.L^{-1} (Nº 7) (figura 15).

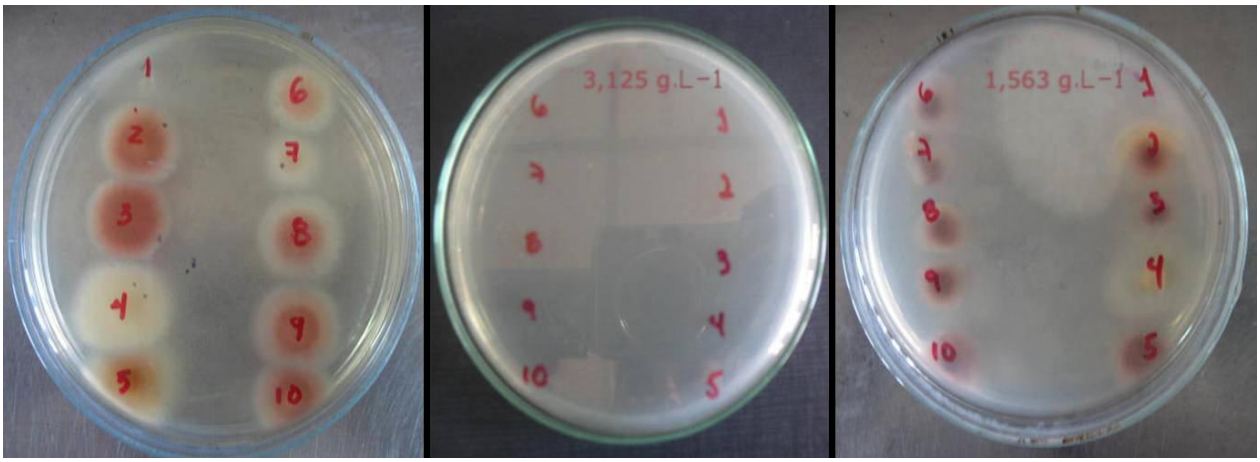


Figura 15. Método empleado para evaluar la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) del fungicida Supreme EW 40 frente a *Fusarium oxyporum* y *Fusarium solani* Controles sin fungicidas (A); Inhibición del crecimiento con la concentración No7 (3,125 g.L^{-1}) (B) y Crecimiento micelial de las especies cuando se utilizó la concentración Nº 8 (1,523 g.L^{-1}) (C).

4.3. Evaluación del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Se comprobó el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los hongos fitopatógenos *F. solani* y *F. oxysporum* (figura 16).

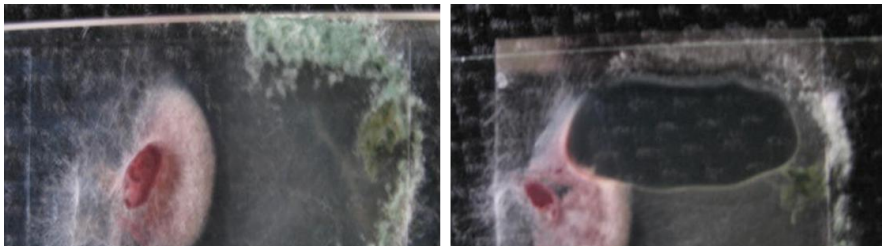


Figura 16. Microcultivo de *Trichoderma viride* vs *F. oxysporum.* Nótese que aun las hifas no se han entrelazado (A).Hifas de *F. oxysporum* y *T. viride* en enfrentamiento dual (B). Microcultivo de *Trichoderma viride* vs *F. oxysporum.* Nótese que las hifas comienzan a entrelazarse (C). *T. viride* creciendo por encima de *F. oxysporum* (D).

La competencia por los nutrientes y el espacio vital de *Trichoderma viride* fue significativamente mayor con respecto a las dos especies de *Fusarium* (tabla 4).

Tabla 4. Velocidad de crecimiento radial (mm) de *Trichoderma viride* y de los patógenos *F. solani* y *F. oxysporum* a las 72 horas de inoculados.

Especies	**Velocidad de crecimiento radial (mm)**	
	Media	**Rangos medios**
Trichoderma viride	42,00	20,50 **a**
Fusarium oxysporum	16,00	11,50 **b**
Fusarium solani	11,50	5,50 **c**

Letras distintas en una misma columna, indican que las medias difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para p<0,05.

Trichoderma viride ejerció un mayor antagonismo frente a la especie de *Fusarium oxysporum* (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de las especies de *Fusarium* en enfrentamiento a *Trichoderma viride* a las 72 horas de inoculados.

Especies	**Porcentaje de inhibición del crecimiento radial(PICR) (mm)**

	Media	Rangos medios
Fusarium oxysporum	50,25	11,44 **a**
Fusarium solani	37,63	5,56 **b**

Letras distintas en una misma columna, indican que las medias difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para p<0,05.

4.3.1. Determinación de las formas de antagonismo de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Se comprobó que las hifas de *T. viride* y *Fusarium solani* así como *T. viride* y *Fusarium oxysporum* formaron un relieve abultado en la zona de contacto como evidencia de antagonismo físico (figura 16 A y C). Las hifas del hongo antagonista recubrieron las del parásito y ocuparon toda la superficie de las colonias de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, lo cual demostró una competencia por el espacio o antagonismo hiperparasítico (figura 17 B y D).

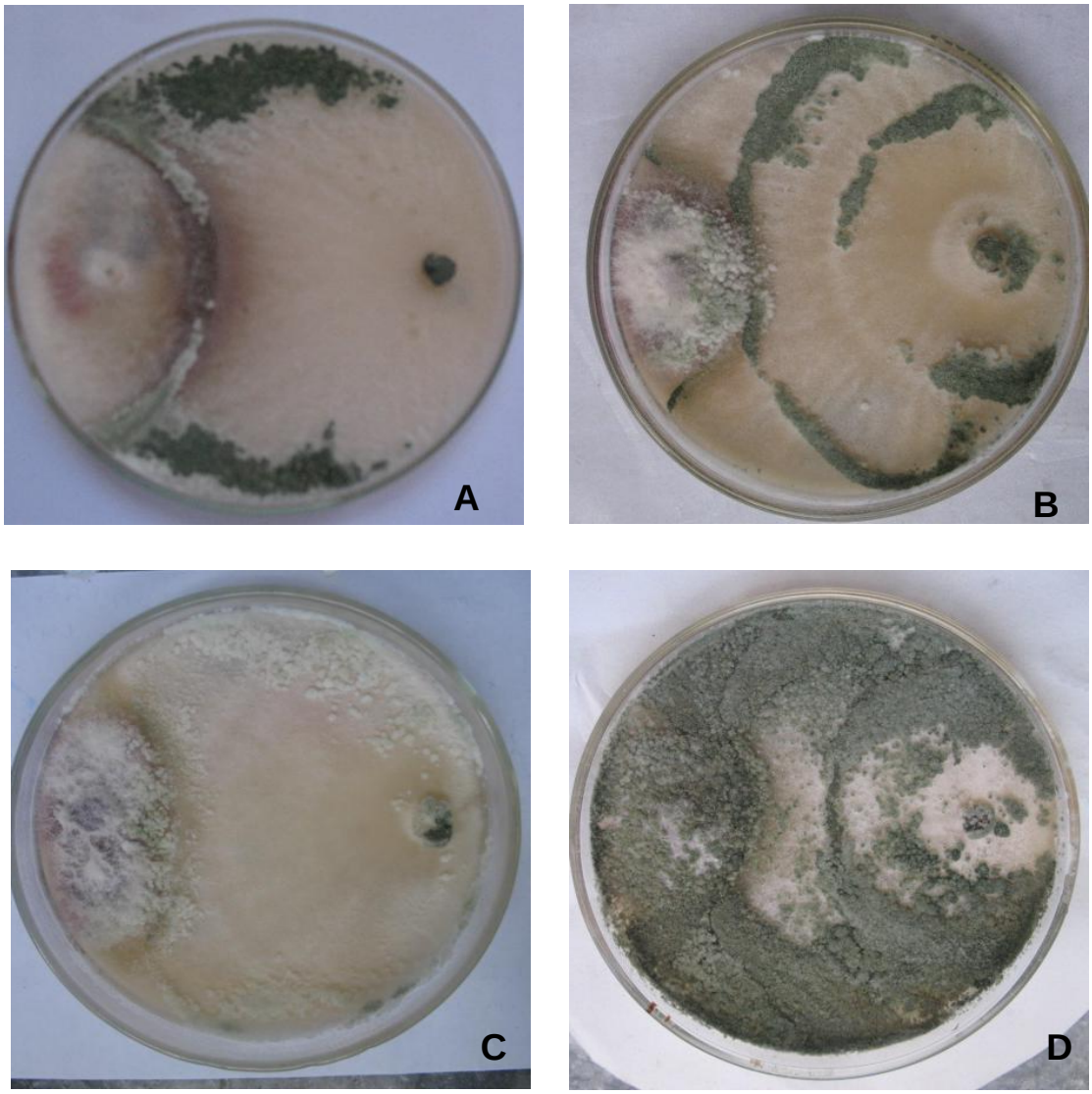


Figura 17. Cultivo dual de *Trichoderma viride* y *Fusarium solani* a las 72 horas de inoculados (A). Cultivo dual de *Trichoderma viride* y *Fusarium oxysporum* a las 72 horas de inoculados (C). Crecimiento de *Trichoderma viride* por encima de *Fusarium solani* a los cinco días de inoculados (B). Crecimiento de *Trichoderma viride* por encima de *Fusarium oxysporum* a los cinco días de inoculados (D).

4.3.2. Intensidad del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Se observó una elevada intensidad antagónica de *Trichoderma viride* frente a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, pues a las 72 h el crecimiento micelial de ambos hongos fitopatógenos fue inhibido en más del 25% (figura 18).

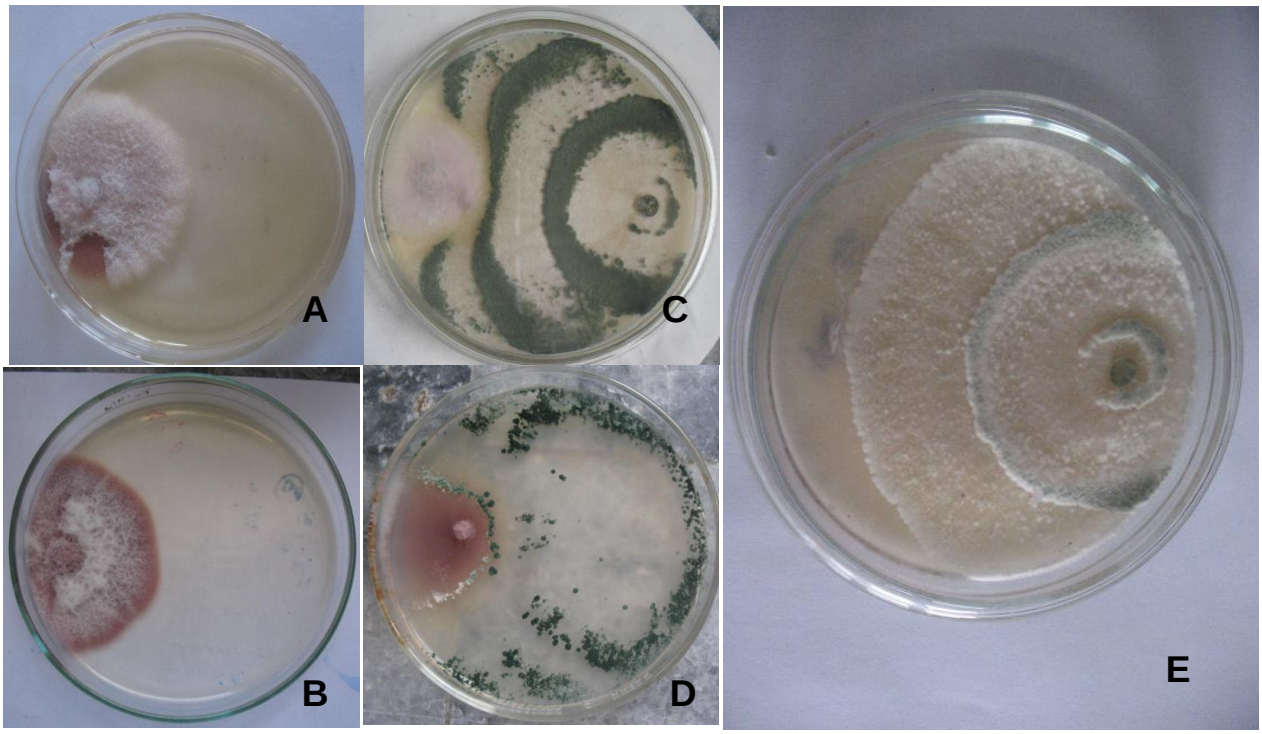


Figura 18. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* por el antagonista *Trichoderma viride* a las 72 horas de inoculados*. Fusarium solani* control (A); *Fusarium oxysporum* control (B); Cultivo dual de *Trichoderma viride* y *Fusarium solani* (C). Cultivo dual de *Trichoderma viride* y *Fusarium oxysporum* (D). *Trichoderma viride (*CCIBP-Trich-3) control (E).

El empleo de hongos antagonistas, como estrategia de biocontrol de enfermedades en plantas, causadas por hongos fitopatógenos del suelo, es más efectivo que el empleo de fungicidas químicos; porque además de ser más económico y saludable, se ha encontrado que el uso sistemático de fungicidas sobre hongos, puede inducir la fungorresistencia (Lenteren y Woets, 1988).

5. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento, caracterización e identificación de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa

Aislamiento de hongos filamentosos

Los aislados obtenidos correspondieron a hongos filamentosos cuyas características coincidieron con algunas especies que han sido informadas como causantes de pudrición seca en tubérculos de papa.

Resultados similares a los descritos anteriormente, fueron obtenidos por Loiveke (2006), quien logró aislar 9 especies de hongos filamentosos asociadas con la pudrición seca de tubérculos de papa, utilizando un procedimiento para el aislamiento similar al usado en nuestro trabajo. Sin embargo, este autor utilizó tubérculos infectados para realizar los aislamientos durante cinco años consecutivos, mientras que en este trabajo se usaron tubérculos de una sola campaña. Lo anterior puede justificar la mayor diversidad de hongos fitopatógenos asociados a los tubérculos de papa enfermos que encontró este investigador.

Por otra parte, García *et al*. (2009) lograron aislar y caracterizar solamente una especie de hongo causante de la pudrición seca de tubérculos de *Solanum tuberosum* en Colombia, a pesar de haber realizado el aislamiento a partir de tubérculos de una sola campaña, similar a nuestro trabajo.

Para el aislamiento de las especies de hongos, generalmente se utilizan: tejidos de planta con síntomas y signos, muestras de suelo, fragmentos de tejidos de plantas a modo de cebos y en ocasiones se puede realizar a partir de la captura de esporas procedentes de muestras aéreas (Leslie y Summerell, 2006).

En el presente trabajo, el medio de cultivo PDA demostró ser efectivo para realizar los aislamientos de las especies de hongos filamentosos asociados con los tubérculos de papa que mostraron síntomas de pudriciones secas. Sin embargo, Leslie y Summerell (2006) describieron otros medios de cultivos que pueden resultar útiles para este mismo propósito como son: el cultivo semi-selectivo Peptona PCNB Agar, fragmentos de hojas de clavel Agar o CLA Agar (del inglés Carnation Leaf-piece Agar), SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar).

5.1.1. Caracterización cultural de especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa

Caracterización cultural de las colonias

Los caracteres culturales observados en los aislados de los hongos asociados con la pudrición seca de los minitubérculos, fueron similares a los informados por otros autores. En este sentido, Miru *et al*., (2012) realizaron la caracterización cultural de 260 aislados de hongos filamentosos que se agruparon en cinco especies diferentes a pesar de mostrar caracteres culturales similares. Varias de estas características culturales fueron similares a las obtenidas en el presente trabajo.

Signh y Kumar (2011), observaron una gran variabilidad en los caracteres culturales de diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* Littrell, G.M. Armstr. & J.K. Armstr., al alterar la composición de fuentes carbonadas en los medios de cultivos, el pH y la temperatura de incubación. Los principales cambios se detectaron en la velocidad de crecimiento radial así como en el desarrollo de la biomasa de los aislados en medios de cultivos líquidos.

Por otra parte, Chandran y Kuwar (2012) informaron la presencia de una elevada variabilidad en los caracteres culturales de las colonias (color de las colonias, textura, pigmentación) de aislados de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. , lo cual concuerda con nuestros resultados. Puesto que en el presente trabajo, dos aislados de esta misma especie, mostraron diferencias en algunas características culturales como en el color de las colonias; aunque también mostraron similitud con otras características propias de la especie.

El género *Fusarium* presenta gran variabilidad respecto a los caracteres culturales así como en el crecimiento y desarrollo de sus colonias (Signgh *et al*., 2010). Se ha comprobado que el uso de medios ricos en carbohidratos y otros nutrientes influyen negativamente en la conservación de las cepas. Muchos caracteres distintivos útiles para el diagnóstico de especies del género *Fusarium*, pueden modificarse y ocasionar la degeneración de la cepa. Algunos de estos caracteres son la velocidad de crecimiento, abundancia del micelio aéreo, producción de pigmentos en el agar, dimensiones de los conidios (Seifert *et al*., 2000).

Estos resultados, permitirán disponer de aislados de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* Schltdl. conservados, los cuales pueden ser utilizados como referencias en caracterizaciones culturales futuras de nuevos aislados de *Fusarium* asociadas a la pudrición seca de la papa.

5.1.2. Caracterización morfológica de las especies de hongos filamentosos asociadas a la pudrición seca de la papa

Caracterización morfológica de las estructuras de reproducción y clamidosporas

Para realizar una correcta caracterización morfológica de diferentes especies de *Fusarium;* Nelson (1991) y Windels (1993) evaluaron caracteres morfológicos similares a los utilizados en el presente trabajo como fueron: el tamaño y forma de macroconidios, la presencia o ausencia de microconidios, dimensiones de microconidios, formación de clamidosporas y las características de los conidióforos.

El género *Fusarium* agrupa un complejo de especies que pueden causar la pudrición seca de tubérculos de papa (*Fusarium sulphureum* Schltdl; *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.; *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium avenaceum* Fr Sacc (Asscheman *et al*., 1996; López *et al*., 1997; Barrios *et al.,* 2001). Sin embargo, Cullen *et al*. (2005) consideraron que el número supera las 13 especies de *Fusarium*, las cuales están distribuidas por diferentes regiones productoras de papa a nivel mundial. En este sentido, en nuestro trabajo solo aparecieron dos especies de este género, lo cual pudo deberse a que se utilizaron tubérculos procedentes de frigorífico de una misma variedad (Grettel) y no de condiciones de campo.

Yli *et al*. (2004), observaron diferencias en los caracteres morfológicos de diferentes especies de *Fusarium* (*F. avenaceum* (Fr.) Sacc.*, F. arthrosporioides* (Sherb.) Messiaen & R. Cass., *F. sporotrichioides* Sherbakoff*, F. culmorum* (W.G. Smith) Saccardo y *F. graminearum* Schwabe) y lograron establecer una correspondencia entre la identificación tomando en cuenta criterios morfológicos y utilizando técnicas moleculares. A diferencia de este autor, en nuestro trabajo solo fue posible caracterizar morfológicamente las especies de *Fusarium* y se apreciaron similitudes en las características morfológicas entre los aislados acorde con cada una de las especies a la que pertenecían.

Fusarium oxysporum es una especies con una gran importancia económica debido a su distribución cosmopolita, ser un habitante común en diferentes tipos de suelos y por causar marchitez vascular, muerte de las posturas y pudrición en numerosos cultivos de interés agrícola. Adicionalmente, dentro de esta especie se describen diferentes formas especiales y razas lo cual complejiza su caracterización e identificación taxonómica (Farr *et al*., 1995).

Según Leslie y Summerell (2006), las características morfológicas de *F. oxysporum* incluyen la producción de microconidios en cabezas falsas sobre fiálides cortas que se forman en las hifas, la producción de clamidospora y por la forma de los macroconidios y microconidios. Estos autores plantearon también que *F. oxysporum* es muy difícil distinguirlo de las especies *F. solani* y *F. subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas, puesto que *F. solani* forma microconidios en cabezas falsas sobre fiálides muy largas sobre las hifas, mientras *F.*

subglutinans solo se distingue de *F. oxysporum* por la formación de microconidios a partir de polifiálides y por la ausencia de clamidosporas. En el presente trabajo se pudieron observar las características distintivas de ambas especies, lo cual permitió diferenciarlas acorde a sus características morfológicas.

Fusarium solani es una de las especies más comunes y conocidas como causante de la pudrición seca de la papa. La misma, puede estar asociada con el suelo, así como con numerosas especies de plantas causando marchitez, pudriciones en las raíces, pudriciones del pie y chancros en tallos. Se encuentra frecuentemente asociada con heridas o infecciones, causadas por otros hongos y ataca hospederos debilitados por las condiciones ambientales desfavorables, infecciones virales o daños por nemátodos (Leslie y Summerell, 2006).

F. solani es considerado como un habitante nativo del suelo, principalmente se localiza en hábitats de bosques lluviosos. En condiciones tropicales húmedas así como en campo pueden observarse la formación de peritecios. Este hongo, se ha informado como una especie fitopatógena que ataca a un rango diverso de plantas hospedantes de interés económico como: aguacate (*Persea americana* Mill.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), cítricos, malanga (*Xanthosoma sagittaefolium* Schott.), orquídeas, fruta de la pasión, chícharo (*Pisum sativum* L.), pimiento (*Pimienta dioca* Merr.), papa.

Según Secor y Gudmestad (1999) sugirieron a *Fusarium solani* como una de las especies de hongos fitopatógenos que deben tenerse presente para establecer un manejo de las enfermedades fúngicas de la papa. En este sentido, Morid *et al*. (2009) lograron relacionar la actividad patogénica y la agresividad de *Fusarium* solani sobre tubérculos de papa, con la producción de enzimas del tipo cutinasas.

Asimismo, dentro de *Fusarium solani* se describen más de 15 formas especiales, las cuales se encuentran afectando específicamente a determinados cultivos (Gerlach y Nirenberg, 1982); lo cual complejiza su clasificación taxonómica e identificación. En Cuba, se ha comunicado su presencia en suelo y cultivos tales como café (*Coffea arabica*), frijol y papa, entre otros (López *et al*., 1997).

Los resultados del presente trabajo permitirán disponer de aislados de las especies *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, los cuales pueden ser utilizados como referencias en caracterizaciones morfológicas futuras de nuevos aislados asociadas a la pudrición seca de la papa.

5.2. Evaluación *in vitro* de la acción de fungicidas frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Las formulaciones Orius ECNA 25 (tebuconazol), Silvacur combi CE 30 (tebuconazol + triadimenol**)** y Supreme EW 40 (tebuconazol + procloraz**)** contienen tebuconazol como parte de sus ingredientes activos. En este sentido, McMullen *et al*., (2012) utilizaron fungicidas que contenían tebuconazol para controlar el tizón de las panículas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) causado por *Fusarium* spp. y lograron un control efectivo de estas especies. Sin embargo, estos autores no determinaron *in vitro* la inhibición del crecimiento micelial. Estos resultados, coinciden con los obtenidos en el presente trabajo en relación con la eficiencia en el control de especies de *Fusarium* mediante fungicidas que contienen tebuconazol como ingrediente activo.

Asimismo, Amarasinghe *et al*., (2013) demostraron que los fungicidas que contenían tebuconazol + metconazol y prothioconazol + tebuconazol, lograron reducir eficientemente el índice de infestación del tizón de las panículas del centeno (*Secale cereale* L.) causado por *Fusarium* spp. en comparación con otros fungicidas que contenían otros ingredientes activos. De modo similar, en este trabajo se logró determinar *in vitro* la eficiencia del uso de fungicidas que contienen tebuconazole para inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum.*

La formulación Orius ECNA 25 en Cuba se ha usado en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.) para el control de *Alternaria porri*. En arroz (*Oryza sativa* L.), se ha recomendado para el control de *Pyricularia oryzae* Cav. En los cultivos de la papa y el tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill. (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753) se usa para el control de tizón temprano (*Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones) y el moho gris (*Stemphyllium solani* Weber); mientras que en el plátano (*Musa balbisiana* L.) se utiliza para el control de Sigatoka (*Mycosphaerella* spp).

Por otra parte, la formulación Supreme EW 40, se usa fundamentalmente en cítricos para el control de enfermedades fúngicas (*Mycosphaerella citri* Whiteside) en naranja (*Citrus X aurantium* L.) variedad Valencia. Asimismo, se ha utilizado en la papa para controlar el tizón temprano (*Alternaria solani*) y en la soya (*Glycine max* Merr. (*G. soja* Sieb. & Zucc.)) se utiliza para el control de enfermedades foliares y de fin de ciclo. La formulación Silvacur combi CE 30 se ha utilizado en Cuba en el cultivo del arroz para el control de *Pyricularia grisea* Sacc., *Richosporium oryzae* Hashioka & Yokogi*, Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw y otros hongos que causan el manchado de los granos y en la papa para el control de tizón temprano (*Alternaria solani*).

Sin embargo, a pesar de la efectividad de las formulaciones de Orius ECNA 25 (tebuconazol), Silvacur combi CE 30 (tebuconazol + triadimenol**)** y Supreme EW 40 (tebuconazol + procloraz**)** en el control de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, no se utilizan actualmente en nuestro país para proteger la semilla de papa de la pudrición seca. Por tanto los resultados de este trabajo pueden servir para utilizar nuevos candidatos de fungicidas en la protección de la semilla nacional de papa.

En relación con el fungicida Benomyl PH 50 (benomilo), Paulus *et al*., (1971) lograron controlar eficientemente en el gladiolo (*Gladiolus* spp. L.), al agente causal de la marchitez (*Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) W.C. Snyder & H.N. Hansen) mediante el uso del mismo**.** Estos autores a diferencia de nuestro trabajo efectuaron la evaluación de este producto, utilizando la inmersión de bulbos-semillas en lugar de realizar la evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica.

En Cuba la formulación Benomyl PH 50, se ha utilizado en aguacate y mango (*Mangifera indica* L.) contra la antracnosis, en arroz para el control de *Pyricularia* Sacc. y *Helminthosporium* Link, en banano (*Musa acuminata* L.) se usa para el control de la pudrición de la corona mediante el tratamiento por inmersión de frutos y se aplica mediante aspersión al follaje para controlar la Sigatoka negra. En la calabaza (*Cucurbita moschata* Duch.), melón (*Citrillus vulgaris* Schard.) y pepino (*Cucumis melo* L.) se ha utilizado para controlar el *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev y en cítricos para controlar la *Mycosphaerella citri* y la antracnosis. Sin embargo, no se ha utilizado para el control de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* para proteger la semilla de papa de la pudrición seca. Por ello, estos resultados pueden sugerir nuevos fungicidas para proteger la semilla nacional de papa.

En relación con el fungicida Score CE 25 (difenoconazol), este se ha utilizado en Cuba para el control de diferentes especies de *Alternaria* spp en ajo, cebolla y tomate. Similarmente, Secor *et al*., (2010), lograron un control efectivo de *Cercospora beticola* Sacc. en el cultivo de remolacha (*Beta vulgaris* L.) utilizando la formulación Score CE 25**.** Estos autores sugirieron este modelo de interacción patógeno–fungicida para desarrollar nuevas estrategias para manejar a largo plazo esta enfermedad. Sin embargo, Small *et al*., (2012) utilizó diferentes fungicidas que contenían difenoconazol como ingrediente activo y no lograron un control efectivo de la pudrición de las mazorcas de maíz (*Zea mays* L.) causada por diferentes especies de *Fusarium*. Gachango *et al*., (2012) lograron determinar la concentración media de fungicidas que contenían difenoconazol como ingrediente activo para la reducción del 50% del crecimiento micelial (EC_{50}) de *F. sambucinum* y *F. oxysporum*, causantes de la pudrición seca de la papa en el estado de Michigan (EEUU). Estos autores constataron la efectividad de este fungicida en comparación con otros productos químicos para prevenir y controlar las pérdidas poscosecha de tubérculos de papa. Sin embargo no lograron determinar la mínima concentración inhibitoria.

El fungicida Cuproflow SC 37,75, se ha utilizado en Cuba para el control de patógenos fúngicos en cultivos como el aguacate, fruta bomba (*Carica papaya*), mango, café, cacao (*Theobroma cacao* L.) y en hortalizas. Sin embargo, en el cultivo de la papa no se ha utilizado para controlar la pudrición seca de los tubérculos causado por *Fusarium* spp.

En relación con lo anterior, Folgueras *et al*., (2010), evaluaron *in vitro* ocho fungicidas dentro de los cuales incluyeron al Oxicloruro de Cobre PH 50 (sinónimo de Cuproflow SC 37,75) en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA); que contenía diferentes concentraciones. Estos autores demostraron que este fungicida no logró inhibir el crecimiento micelial de los agentes fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* Sacc y *Fusarium* spp, lo cual concuerda con nuestros resultados a pesar de tratarse de otra especie de planta y utilizar otras concentraciones.

El método de difusión en agar ha sido utilizado por diferentes autores para evaluar *in vitro* la acción de diferentes fungicidas sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos. En relación con lo anterior, Abad *et al*., (2007) utilizaron el método de difusión en agar para buscar compuestos con actividad antifúngica a partir de fuentes naturales para la protección de enfermedades en plantas así como en animales y humanos. Estos autores demostraron que este método resulta útil para evaluar la actividad antifúngica, lo cual es prometedor para desarrollar nuevos productos con actividad fungicida.

Asimismo, Upadhyay *et al*., (2010) utilizaron exitosamente el método de difusión en agar para determinar la actividad antifúngica y la selección de compuestos fitoquímicos en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium solani.*

En este ensayo se observó que las formulaciones que contenían tebuconazol como ingrediente activo fueron las que mayor inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* mostraron, siendo el fungicida Supreme EW 40 (tebuconazol + procloraz) el más efectivo. Asimismo, la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias permitiría un control más efectivo de la pudrición seca de tubérculos de papa semilla durante la conservación.

5.3. Evaluación del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se corresponden con los informados por Suárez *et al*., (2008) quienes evaluaron el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai frente a *Fusarium solani* (Mart) causando marchitez en Maracuyá. Ellos observaron mayor competencia por los nutrientes y el espacio vital del antagonista con respecto al patógeno y explicaron este fenómeno por la velocidad de crecimiento, una mayor intensidad metabólica así como una mayor tasa de incorporación y asimilación de nutrientes de *T. harzianum* en comparación con *F. solani*.

Por otra parte, Villegas (2005) demostró la capacidad de *Trichoderma* de producir secreciones enzimáticas extracelulares que causaron la desintegración de la pared celular y la muerte en hongos fitopatógenos (micoparasitismo). Este autor, a su vez observó la degradación de las paredes celulares de las hifas de hongos fitopatógenos (depredación) y la producción de compuestos químicos volátiles así como compuestos antifúngicos que inhibieron a especies de hongos basidiomicetos fitopatógenos. Finalmente, este autor demostró que *Trichoderma* puede colonizar directamente las hifas de algunos hongos por penetración hifal (predación), así como competir por oxígeno, nutrientes, espacio lo cual le garantiza una gran adaptabilidad y un rápido crecimiento.

Con estos resultados, se sientan las bases para determinar las formas de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente al agente causal de la pudrición seca en tubérculos de papa.

5.3.1. Determinación de las formas de antagonismo de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

Respecto al antagonismo físico obsevado, autores como Vero y Mondino (1999) observaron similarmente el antagonismo físico entre *Trichoderma* y *Rhizoctonia solani* Khün, aunque en algunos ensayos determinaron hasta cuatro tipos de interacciones hifales diferentes. En este sentido Fernández y Larrea (2001), aseguraron que el parasitismo ocasionado por *Trichoderma* puede ocurrir mediante la penetración directa de las hifas, el engrosamiento de las hifas, la formación de haustorios así como causando desorganización del contenido celular de las hifas parasitadas.

En este sentido, Harman (2001), observó penetración de hifas de *Trichoderma* en hifas de *Pythium* sp. y *R. solani,* mientras que Bernal *et al*., (2004) encontraron enrollamiento y penetración de hifas de *Trichoderma* en hifas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc).

5.3.2. Intensidad del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma viride* frente a los agentes causales de la pudrición seca de la papa

La intensidad elevada del antagonismo de *T. viride* frente a *F. solani* y *F. oxysporum* observada en este estudio, se vio favorecida por su velocidad de crecimiento y desarrollo, que sin dudas ejerció una competencia por el espacio vital.

Según Ahmad y Baker, (1987) y Hjeljord y Tronsmo, (1998), la competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante y se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los

demás. No obstante, la máxima eficacia del antagonismo pudiera lograrse en aquellos enfrentamientos donde intervengan, simultáneamente, diferentes modos de acción Lorito *et al*., (1990).

A su vez Martínez *et al*. (2008), observaron al evaluar 59 aislamientos de *Trichoderma*, competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis.

Asimismo, Salazar *et al*., (2011) evaluaron la actividad *in vitro* de *Trichoderma* sp. contra *F. oxysporum* (agente causal de la fusariosis del tomate) y observaron una disminución del porcentaje de crecimiento del patógeno con respecto a las especies de antagonistas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo a pesar de que estos autores utilizaron otra especie hospedante.

Estos resultados sientan las bases para futuros estudios relacionados con la actividad antagonista del género *Trichoderma* frente a nuevos aislados de *Fusarium*, asociados a la pudrición seca de la papa.

6. CONCLUSIONES

1. Se caracterizaron e identificaron las especies *Fusarium* oxysporum y *Fusarium solani* como agentes causales de la pudrición seca de minitubérculos de papa.

2. Todos los fungicidas, a excepción de Cuproflow SC 37.75, mostraron actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento micelial; siendo el Supreme EW 40 el más efectivo.

3. *Trichoderma viride* mostró *in vitro* antagonismo físico y antagonismo hiperparasitario frente a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar la identificación molecular de los agentes causales de la pudrición seca de minitubérculos de papa.

2. Caracterizar patogénicamente las especies asociadas con las pudriciones secas de minitubérculos de papa.

3. Realizar ensayos de susceptibilidad con los ingredientes activos del mejor fungicida en lugar de utilizar formulaciones comerciales.

4. Determinar el antagonismo *in vitro* de otros agentes biocontroladores frente a las especies asociadas con la pudrición seca de minitubérculos de papa.

.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abad, M.J, M. Ansuategui y P. Bermejo (2007): Active antifungal substances from natural sources. **ARKIVOC.** 7: 116-145.

Adewusi, E.A. y A.J. Afolayan (2009): Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the roots and leaves of *Pelargonium reniforme* Curtís (Geraniaceae). **Afr. J. Biotechnol.** 8: 6425-6433.

Agramonte, D (1999): Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba

Ahmad, J.S., R. Baker (1987): Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum.* **Phytopathol.** 77: 182-189

Al-Bayati, F.A. (2009): Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. **An. Microbiol. Antmicrob.** 8: 1-6.

Amadi, J.E., S.O. Salami y C.S. Eze (2010): Antifungal properties and phytochemical screening of extracts of African Basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Agric. Biol. J. N. Am.** 1: 163-166.

Amancio, S (2009): Distinct patterns of responses in sugarcane plantlets (Saccharum spp. hybrid) micropropagated in Jell Medium (JM) and by Temporary Immersion Bioreactors (TIB). **Acta Horticulturae** 812: 441- 446.

Amarasinghe, Ch.C., L. Tamburic-Ilincic, J. Gilbert, A.L. Brûlé-Babel,W.G.F. Dilantha (2013): Evaluation of different fungicides for control of fusarium head blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology.** DOI:10.1080/07060661.2013.773942

Aragón, C, L. Carvalho, J. González, M. Escalona, S. Amancio (2009): Distinct patterns of responses in sugarcane plantlets (*Saccharum* sp. hybrid) micropropagated in Jell Medium (JM) and by Temporary Immersion Bioreactors (TIB). **Acta Horticulturae** 812: 441- 446.

Aslam, A, A. Ali, N.H. Naveed, A. Saleem, l.J. Iqba (2011): Effect of interaction of 6-benzyl aminopurine (BA) and sucrose for efficient microtuberization oftwo elite potato (Solanum tuberosum L.) cultivars,'Desirée' and 'Cardinal'. **African Journal of Biotechnology** 10(59): 12738-12744.

Asscheman, E, J.A. Bokx, H. Brinkman, C.B. Bus, P.H. Hotsma, C.P. Meijers, A. Mulder, K. Scholte, L.J. Turkensteen, R. Wustman y D.E. Van der Zaag (1996): **Potato diseases. Fungus Diseases** Ed. Van der Zaag, Nivaa, Netherlands, 180 pp., pp 15-17.

Barrios, L.M., L.H. Neninger, E.I. Hidalgo (2001): Identificación de *Fusarium* Link en semillas, tallos, seudotallos, tubérculos y raíces en diferentes cultivares nacionales e importados en Cuba. **Fitosanidad** 5(3).

Benson, H.J. (1998): Microbiological Aplications Laboratory Manual in General Microbiology WCO/Mc Graw-Hill Ltd. 7th edition.

Bernal, A, C. Andreu, M. Moya (2004): Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* (EF Smith)

Snyd & Hans. Cuba. (activo abril 2007). http://www.virtualcentr.org/es/enllBTJ%20Tallr/bernalalezander.htm .

Borda, C.C., J. Toledo, A. Golmirzaie, W. Roca (2001): Efecto de inductores de tuberización y fotoperíodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-100.pdf (Activo octubre 2006).

Calderón, A.L., R. Valvuena, R. Hidalgo, J.D. Moreno (2008): Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. Acta Agronómica (Palmira) 57(3): 175-180.

Campbell, R (1989): **Biological control of microbial plant pathogens**. Cambridge University Press. Cambridge.; 218pp.

Carlile, M. J., G. W. Gooday, S. C. Watkinson (2005): **The Fungi. Academic Press, Inc**. Segunda Edición. U.S.A. 590pp.

Carsolio, C, N. Benhamou, S. Haran, C. Cortés, A. Gutierrez, I. Chet, A. Herrera (1999): Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitim. **Appl Environ Microbiol.** 65: 929-935.

Cervantes, A. **Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos**. (2007) (activo febrero 2007). http://infoagro.comhortalizasmicroorganismos_%20beneficiosos_cultivos.htm/.

Chandran R.M., M. Kumar (2012): Studies on cultural, morphological variability in isolates of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., incitant of dry root-rot of Citrus. **Current Biotica** 6(2): 152-162.

Chet, I y S.H. Benhamou (1998): Mycoparasitism and lectin enzymes. En: G.E. Harman y C.P. Kubice (eds.) ***Trichoderma & Gliocladium:*** **Enzymes, biological control and commercial applications.** 2:153-152. London, Great Bretain.

Chet, I y J. Inbar (1994): Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 48:37-43.

Coleman, W.K., D.J. Donnelly, S.E. Coleman (2001): Potato Microtubers as Research Tools: A Review. **American Journal of Potato Research** 78: 47-55.

Cruz, M, Y. Alvarado, M. Acosta, M. Leiva, B. Roque, M. Lezcano (2006): Susceptibilidad de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* a los agentes de selección Higromicina B y Carbendazim. **Biotecnología Vegetal** 6(4): 203 – 206.

Cullen D.W., I.K Toth, Y. Pitkin, N. Boonham, K. Walsh, I. Barker and A.K. Lees (2005): Use of quantitative molecular diagnostic assays to investigate *Fusarium* dry rot in potato stocks and soil. **Phytopathol.**95(12): 1462-1471.

Davet, P, M. Artiguez y C. Martin (1981): Production in conditions on aseptiques d ' inoculom of *Trichoderma harzianum*. Ripaipour des essais de lute biological. **Agronomic.** pp. 933-936.

Dennis, L y J. Webster (1971): Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma.* III Hyphal interaction. **Trans Br Mycol Soc.** 57: 363-369.

Desjardins, A.E., E.A. Christ, S.P. McCormick, A. Secor (1993): Population structure and genetic analysisof field resistance to thiabendazole in *Gibberella pulicaris* from potato tubers. **Phytopathol.** 83: 164-170.

Díaz, J (1994): Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.

Doughar, J.H. (2006): Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. **Trop. J. Pharm Res.** 5: 597-603.

Elad, Y, I. Chet, P. Boyle, Y. Hennies (1983): Parasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fruorencence microscopy. **Phytopathol.** pp. 73:78.

Eveleigh, D.E., A.L. Demain, N. Solomon (1986): *Trichoderma*. Biology of industrial microorganisms. Biotech Ser. (Ed). Cap.16 pp. 489-500.

Ezziyyani, M, S.C. Pérez, M.E. Requena, L. Rubio y M.E. Candela (2004): Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. **Anales**

FAO (2008) Año Internacional de la Papa. (activo noviembre 2010) http://www.potato2008.org/es/index.html.

FAOSTAT (2010) Venezuela Producción de Papa (activo noviembre 2010): http://FAOSTAT.FAO.org/site/567/

Farr, F, F. Bills, P. Chamuris y Y. Rossman (1995): **Fungi on plants and plant products in the United States**. APS Press. Minnesota. USA. 1252 pp.

Fernández, R.J. y C.L. Suárez (2009): Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. **Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín** 62(1): 4743-4748.

Folgueras, M (2010): Las pudriciones radicales de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Cuba. Etiología. Epifitiología y manejo. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. Santa Clara. Cuba. 98 pp.

Gachango, E, L.E. Hanson, A.J. Rojas, J. Hao y W.W. Kirk (2012): *Fusarium* spp. Causing Dry Rot of Seed Potato Tubers in Michigan and Their Sensitivity to Fungicides. **Plant disease** 96(12): 1767-1774.

García, L, A. Grajales, M.E. Cárdenas, R. Sierra, M.C. Cepero de Garcia, A, Bernal, P. Jiménez y S. Restrepo (2011): Firstreport of *Fusarium oxysporum* causing potato dry rot in *Solanum tuberosum* in Colombia. **New Disease Reports** 24: 1-14.

García, R, J. Salas (2005): Aspectos generales del cultivo de la papa*. En: Producción de Semilla de* Papa *en Venezuela.* pp 18-29.

Gerlach, W y H. Nirenberg (1982): **The genus *Fusarium* a Pictorial Atlas**. Mitt. Biol. Bundesanst.Ld-u. Forstw. Berlin-Dahlem. 209: 1-406.

Gopal, J, A. Chamail y D. Sarkar (2004): *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germoplasma: effect of genotype, abscisic acid and sucrose. ***In vitro* Cell Dev. Plant** 40: 485-490

Hadacek, F y H. Greger (2000): Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem. anal.** 11:137-147.

Haram, S, H. Schickler, A. Oppenheim, I. Chet (1996): Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathol.** 86:980-985.

Haram, S, H.L. Schickler, I. Chet (1996): Molecular mechanisms of lectin enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology.** 142: 2321-2331.

Harman, G.E. (2001): *Trichoderma* spp., including *T*. *harzianum*, *T*. *viride*, *T*. *koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system). (activo febrero 2007) http://www.birdhybrids. com/t-22.htm.

Harman, G.E. (2003): *Trichoderma harzianum*, *T*. *viridis*, *T*. *koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales) (activo febrero 2007) http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html.

Harman, G.E. (2004): Mythos and dogmas of biocontrol, changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. **Plant Dis.** 84: 377-393.

Hjeljord, L y A. Tronsmo (1998): *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En: G.E. Harman y C.P. Kubice (eds.) ***Trichoderma* & *Gliocladium*: Enzymes, biological control and commercial applications.** 2:131-151.

Hoque, M.E. (2010): *In vitro* tuberization in potato (Solanumtuberosum L.). **Plant Omics Journal** 3(1): 7-11.

Holley J.D. y L.M. Kawchuk (1996): Distribution of thiabendazole and thiophamate-methyl resistant strains of *Helminthosporium solani* and *Fusarium sambucinum* in Alberta potato storage. **Canadian Plant Disease** 76(1): 21-29.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease** 87(1): 4-10.

Huamán, Z.A., T. Golmirzaie, W. Amoros (1997): The Potato. En: Dominic Fuccillo, Linda Sears Paul Stapleton (eds). Biodiversity in trust: conservation and use of plant genetic resources in CGIAR Centres.Chapter 2, pp. 21-28. Cambridge. University Press Cambridge.

Igarza J, D. Agramonte, Y. Alvarado-Capó, M. de Feria, T. Pugh (2012): Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa **Biotecnología vegetal** 12(1): 3–24.

Infante, D, B. Martínez, N. González y Y. Reyes (2009): Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. **Rev. Protección Veg**. 24(1): 14-21 http://scielo.sld.cu/scielo.php

Jiménez, F, D. Agramonte, J.N. Pérez, D. Ramírez, O. Gutiérrez, M. Pérez (2001): Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* (L.) variedad 'Desirée' **Biotecnología vegetal** 1 (2): 103-108.

Klančnik, A, S. Piskernik, B. Jeršek, S. Smole (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **J. Microbiol. Methods.** 81:121-126.

Lago, C.L. (1991): Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa. En: Roca W, LA Mrogrinski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali

Lenteren, V y J. Woets (1988): Biological and integrated pest control in greenhouses. **Anual Review of Entomology** 33: 239-269.

Leslie, J.F. y B.A. Summerell (2006): **The *Fusarium* Laboratory Manual.** Editorial Blackwell Publishing, Iowa, USA, 387 pp.

Lista oficial de plaguicidas autorizados año 2008 – 2010 (2007): Registro central de plaguicidas publicado en Gaceta Oficial de la Republica de Cuba.

Lõiveke, H (2006): Incidence of *Fusarium* spp. on several field crops in Estonia and their toxicity towards *Bacillus stearothermophilus*. **Agronomy Research** 4: 273–280.

López, D y M.O. López (2010): Especies de *Fusarium* fitopatógenas de Cuba. Guía para su aislamiento e identificacion. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal

López, M, E. Vázquez, R. López (1995): **Raíces y tubérculos**. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana, Cuba, pp 225 -305.

López, M, A. Estrada, A. Milla e I. Sandoval (1997): Especies de *Fusarium* Link. en los cultivos de café, caña de azúcar, banano, frijol y papa en Cuba. Resúmenes. Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. La Habana. 23-27 de junio, pp 144-145.

Lorenzo, N (2001): Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana.

Lorito, M, G. Harman, A.D. Prieto y C. Hayes (1990): Extracellular chitimolytie enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. **Phytopathol.** 82(10):10-77.

Lucas, J.A. (2002): **Plant Pathology and Plant Pathogens.** Black Publishing, Berlin, Alemania, 195 pp.

Luginbuhl, S (2010): *Fusarium solani*. A class project Serpentine Outcrops in Sri Lanka. Pharm. Bol. **Soilborne Plant Pathogens.** 40: 235-244 (activo marzo 2013) http://www.cals.ncsu.edu

Martínez, B, L. Fernández, T. Solano (1994): Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco. **Cultivos Tropicales.** 15(3): 54.

Martínez, C.M. y R. Alemán (2005): Papa (*Solanum tuberosum* Sw.), cosecha, beneficio, y almacenamiento. Caso cubano. **Centro Agrícola** 32(3): 5-11.

Martínez, J.T. (1998): Uso de *Trichoderma* para el Control Biológico de Organismos Patógenos de Plantas. En Memorias del Simposium sobre Agricultura Orgánica y de baja residualidad. Cuautémoc, Chih. México, pp 25-27.

McMullen, M, G. Bergstrom, E. De Wolf, R. Dill-Macky, D. Hershman, G. Shaner, D. Van Sanford (2012): A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: *Fusarium* Head Blight. **Plant Disease.** 96(12): 1712-1728

Melgarejo, P y E. Sagasta (1989): Influence of *Penicillium frecuentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. **Can. J. Bot.** 67:83-87.

Miranda, P.R. (1997): Estudios de aspectos fisilogicos relacionados con la producción de la Semilla original de papa (*Solanum tuberosum*) por métodos biotecnológicos. Tesis de maestría en ciencia.

Miru, D, R. Xiangyu, S. Qinghua, W. Yi, Z. Ruofang (2012): Characterization of *Fusarium* spp. Causing Potato Dry Rot in China and Susceptibility Evaluation of Chinese Potato Germplasm to the Pathogen. **Potato Research** 55: 175-184.

Morid, B, R. Zare, S. Rezaee, H. Zamani, S. Hajmansour (2009): The relationship between cutinases and the pathogenicity/virulence of *Fusarium solani* in potato tubers. **Phytopathologia Mediterranea** 48(3): 403-410.

Naik, P.S.,y J.L. Karihaloo (2007): Micropropagation for production of quality potato seed in Asia-Pacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, New Delhi, India.

Nelson, P.E. (1991): Hystory of *Fusarium* systematics. **Phytopathol.** 81: 1045-1048.

Ochoa, C (2001): La Papa de Sudamérica: Bolivia. Primera Edición. Prural, La Paz, Bolivia.

Paulus, A.O., S. Besemer, F. Shibuya, J. Nelson (1971): Systemic fungicides for control of *Fusarium* corm rot of gladiolus. **California Agriculture. January**. pp14-15.

Pérez, J.N., P. Orellana, M. Suárez y C. Valdés (1998): Propagación Masiva en Biofábricas. En: Pérez, JN (Ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. pp: 241-258. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Pérez, N (2004): Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 pp.

Platt, H.W. (1997): Resistance to thiabendazole in *Fusarium* species and *Helminthosporium solani* in potato tubers treated commercially in eastern Canada. **Phytoprotection** 78(1): 1-10.

Qasim, M, S. Khalid, A. Naz, M.Z. Khan, S.A Khan (2013): Effects of different planting systems on yield of potato crop in Kaghan Valley: A mountainous region of Pakistan. **Agricultural Sciences** 4(4) 175-179.

Quevedo, I (2012): Evaluación de fungicidas sistémicos y de contacto en el control de la moniliasis (*Moniliaphthora rorei*) del cacao (*Theobrama cacao*). [tesis de maestría].Tabasco: Colegio de Postgraduados.

Rekah, Y, D. Shtienberg y J. Katan (1999): Spatial Distribution and Temporal Development of *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato and Pathogen Dissemination in Field Soil. **Phytopathol.** 89 (9): 831-839.

Rivero, D (2008): Identificación y control *in vitro* con quitosano y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). **Rev Protección Veg.** 23(1): 67.

Roncal, M.S. (1993): Taxonomía de hongos fitopatógenos comunes. Editorial Cajamarca, Perú. 372 pp. (activo marzo 2013) http://www. orton.catie.ac.cr

Salas, M.P, G. Céliz, H. Geronazzo, M. Daz y S.L. Resnik (2010): Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chem.** 124: 1411-1415.

Salas, R.J. (1995): Producción de semilla pre-básica de Papa. FONAIAP Divulga, 48.

Salazar, L, N. Sanabria, G. Aponte, M. Alcano, R. Herrera, D. Colmenares, M. Esponoza, L. Alemán y S. Magaña (2011): Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. **Biagro** 23(3): 185-190.

Sánchez, C, M. Cruz, Y. Alvarado, M. Pérez, M. Medinilla, M. Acosta, M. Leiva y B. Roque (2007): Evaluación del efecto del aceite esencial de Cymbopogon nardus para el control de microorganismos contaminantes del cultivo in vitro de plantas. **Biotecnología Vegetal**. 7: 187-190.

Sandoval, I y M. Lopéz (2002): Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaceoli* y otros patógenos fúngicos del fríjol. **Fitosanidad.** 4(3-4):69-72.

Sánchez, C, M. Cruz, Y. Alvarado, M. Pérez, M. Medinilla, M. Acosta, M. Leiva y B. Roque (2007): Evaluación del efecto del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* para el control de microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. **Biotecnología Vegetal.** 7: 187-190.

Sarkar, D (2008): The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. Plant Cell Rep 27.

Scherwinski P. y F. Luces (2004): Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação in vitro. Horticultura Brasileira 22(2):197-201.

Secor, G.A., y N.C. Gudmestad. (1999): Managing fungaldiseases of potato. Can. J. **Plant Pathol.** 21: 213-221.

Secor, G.A., VV. Rivera, M.F.R. Khan, N.C. Gudmestad (2010): Monitoring fungicide sensitivity of *Cercospora beticola* of sugar beet for disease management decisions. **Plant Disease** 94: 1272–1282.

Seifert, K. (2000): FusKey. Agriculture and Agri-Food Canada. (http://res.agr.ca/brd/fusarium/)

Singh, P.K. y V. Kumar (2011): Variability among isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* pathogenic to Chrysanthemum. **International Journal of Plant Pathology.** ISS

Singh, R.K., A. Hasan y R.G. Chaudhary (2010): Variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing vascular wilt in chickpea. **Archives of Phytopathology and Plant Protection.** 43(10): 987-995.

Small I.M., B.C. Flett, W.F.O. Marasas, A. McLeod, A. Viljoen (2012): Use of resistance elicitors to reduce *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in maize. **Crop Protection** 41: 10–16

Stefanova, M, A. Leiva, L. Larriganaga, M.F. Coronado (1999): Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. **Revista Facultad de Agronomía.**16:509-516.

Suárez, C.L., R.J. Fernández, N.O. Valero, R.M. Gómez, A.R. Paez. (2008): Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. **Revista Colombiana de Biotecnología** 10(2): 35-43.

Summerell, B.A., J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden y L.W. Burgués (2001): *Fusarium:* Paul E. Nelson Memorial symposium: **American Phytopathological Society** Press. St, Paul, Minessota, EEUU. 408 pp.

Tapia, C (2009): Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica **Rev Chil Infect** 2009; 26 (2): 144-150.

Thevissen, K, K.R. Ayscough, A.M. Aerts, W. Du, K. De Brucker, E.M. Meert, J. Ausma, M.Borgers, B.P. Cammue, I.E. François (2007): Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. **J Biol Chem.** 282(30): 21592-21597.

Ulloa, C.J. (1996): Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. En: Actas del V de Simposio de controle biológico. Anais: Conferencias y Palestras. Foz de Iguaçu-Parana-Brasil. 234-238pp.

Upadhyay R.K., D. Pratibha y S. Ahmad (2010): Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils Against Pathogenic Bacterial Strains. **Asian Journal of Medical Sciences** 2(3): 152-158.

Vero, S.M. y P. Mondino (1999): Control biológico postcosecha en Uruguay. Horticultura Internacional. 7:1-10.

Villegas, M.A. (2005): *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius Biotecnología. Colombia. (activo octbre 2008) http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0%20.%20 .

Watanabe, T (2002): **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species**. CRC Press, Florida, USA, pp 271-277.

Windels, C.E., P.M. Barnes y T. Kommedahl (1993): *Fusarium* species stored for silica gel and soil for ten years. **Mycologia** 85(4): 21-23.

Yli T, S. Paavanen, P. Parikka, P. Konstantinova, T.Y. Gagkaeva (2004): Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and northwestern Russia. **European Journal of Plant Pathology** 110: 573–585.

Zahoor, S, H. Fazli, I. Muhammad (2012): Chemical and Biological Control of *Fusarium* root rot of okra **PAK. J. BOT.** 44(1): 453-457.

ANEXOS

Glosario:

afelpado: superficie de las colonias que semejan el tejido de felpa.

atenuado: afinado hacia un extremo.

célula apical: célula que se encuentra en el extremo más lejano del punto de origen.

célula basal: célula que se encuentra en el extremo más cercano al punto de origen.

célula conidiógena: célula donde se forman directamente los conidios.

clamidospora: espora asexual que se origina generalmente por la modificación de un segmento hifal y posee paredes secundarias.

claviforme: forma de clava o maza, con la parte más ancha hacia arriba.

collarete: estructura en forma de copa al final de una célula conidiógena.

conidióforo primario: se producen al principio del desarrollo en el micelio aéreo.

conidióforo secundario: se producen después del crecimiento de la colonia.

doliforme: forma de barril.

dlipsoide: forma de elipse

epíteto: segunda término (específico) de un binomio latino de un organismo.

esporodoquio: conidioma en el que la masa de esporas se origina sobre conidióforos relativamente cortos, superficiales, agrupados en forma de cojín.

falciforme: forma de hoz.

floculento: con pequeñas masas delicadamente algodonosas.

fusiforme: forma de huso.

globoso (a): forma esférica.

locus conidiógeno (plural: loci): lugar de una célula conidiógena donde se forma el conidio.

macroconidio: conidio mayor de un hongo que, además, forma microconidios.

microconidio: el conidio menor de un hongo que, además, forma macroconidios.

monolocal: célula conidiógena que solo forma conidios en un solo lugar (locus).

Mucronada: que termina en una punta aguda y corta.

multilocal célula conidiógena que forma conidios en más de un lugar.

obclaviforme: forma de clava o maza, con la parte más ancha hacia abajo.

oval: forma de óvalo.

ovoide: forma de huevo, con la parte ancha hacia abajo.

pedicelada: tiene un pedicelo o “tallito”.

pigmentación: coloración que se produce por la difusión de ciertas sustancias al medio de cultivo.

piriforme: forma de pera, con la parte más ancha hacia arriba.

proliferación simpodial:forma una espora terminal, continúa creciendo, forma otra y así sucesivamente.

reniforme: que tiene forma de riñón.

sensu lato (latín): en sentido amplio.

sensu stricto (latín): en sentido estricto.

teleomorfo: forma sexual de un hongo pleomórfico (que tiene fase asexual: **anamorfo;** y si tiene más de una fase asexual: **sinanamorfo**).