

**DESARROLLO DE UN ESQUEMA
DE MANEJO INTEGRADO
DE LA ENFERMEDAD MOHO
BLANCO DE LA LECHUGA QUE
INCLUYE EL CONTROL BIOLÓGICO
CON *Trichoderma koningiopsis* Th003**



CAPÍTULO 5

5.1 INTRODUCCIÓN

En el mercado mundial la tendencia actual de la demanda se caracteriza por el consumo de alimentos limpios, de buena apariencia física y con óptimas cualidades organolépticas (Min. Ambiente, 2002). Al respecto, la legislación en varios países exige una disminución considerable del uso de plaguicidas químicos, la implementación de medidas fitosanitarias integradas y de buenas prácticas agrícolas.

La enfermedad moho blanco de la lechuga causada por los hongos *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *S. minor* Jagger amenaza la sostenibilidad económica y ambiental del agroecosistema hortícola debido a la magnitud de las pérdidas en rendimientos que ocasionan y al alto uso de fungicidas de síntesis química que el agricultor emplea para su control. Esta enfermedad es común en los municipios productores de lechuga en la región Sabana de Occidente en Cundinamarca, principal zona productora de Colombia.

Teniendo en cuenta las características de consumo en fresco de esta hortaliza, las tendencias al cambio en los hábitos que demandan alimentos libres de residuos de plaguicidas y el contexto actual de las negociaciones comerciales internacionales, es necesario dirigir esfuerzos de investigación, desarrollo y transferencia de tecnologías alternativas que fortalezcan la competitividad de los métodos de producción de lechuga en el país y en general de la cadena de hortalizas.

Una vía para reducir la entrada de insumos en un sistema de producción agrícola sostenible, consiste en implementar programas de manejo integrado de las enfermedades. Los métodos para su control incluyen el uso de moléculas químicas, control biológico con microorganismos antagonistas, control físico, prácticas culturales, siembra de cultivares resistentes y medidas legales. En fitopatología se definieron los componentes que determinan el desarrollo de la enfermedad en el denominado "triángulo de la enfermedad" los cuales se interrelacionan entre sí;

tales componentes son la planta hospedero, el patógeno y el ambiente (Agrios, 1988). La manipulación de cualquiera de ellos por el hombre como una estrategia de manejo, podría disminuir o controlar la enfermedad.

El uso de agentes de control biológico constituye una herramienta atractiva para el control de insectos plaga y de fitopatógenos; en este último caso el hongo *Trichoderma* spp. ha resultado eficaz para el control de diferentes patógenos en diferentes cultivos (Papavizas, 1985).

Existen muchas vías por medio de las cuales un microorganismo antagonista puede ejercer control contra un fitopatógeno blanco; la prevención de la infección por agentes de control biológico o la supresión de la enfermedad están basadas en la resistencia inducida en la planta hospedero, la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis, el hiperparasitismo, la reducción de la habilidad saprofítica y de la diseminación de las esporas y/o de los factores de patogenicidad (Elad y Freeman, 2002).

Elad y Freeman (2002) también afirman que las formulaciones biológicas pueden servir como medios alternativos de control si ellas reducen la enfermedad hasta niveles económicos aceptables, siendo este el caso del bioplaguicida desarrollado a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003.

Algunas medidas para mejorar la capacidad de los agentes de control biológico para ser efectivos bajo diversas condiciones ambientales son: aplicarlos en mezcla o alternándolos con fungicidas químicos compatibles; aplicar más de un agente de biocontrol al mismo tiempo, con diversos modos de acción que sean complementarios (Shtienberg y Elad, 2002) o introducirlos en programas de manejo integrado, lo cual también ha sido objeto de investigación en Corpoica con el bioplaguicida a base de la cepa Th003. En tal sentido, en este capítulo se presentan los resultados de las investigaciones realizadas para generar una recomendación de uso de *T. koningiopsis* Th003 para el control de la enfermedad moho blanco de la lechuga.

5.2 COMPATIBILIDAD DE *Trichoderma koningiopsis* (Th003) CON PLAGUICIDAS QUÍMICOS

Magda García M.Sc., Adriana Santos B.Sc.,
Andrés Díaz García M.Sc., Laura Villamizar D.Sc.,
y Alba Marina Cotes Ph.D.

5.2.1 Introducción

El bioplaguicida desarrollado en Corpoica a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* ha demostrado su versatilidad para ser aplicado para el control de patógenos foliares y del suelo, tanto en semillero como en campo en diversos cultivos de importancia económica en Colombia. Sin embargo, el uso de bioplaguicidas en el contexto del manejo integrado requiere que su eficiencia no se vea afectada cuando su aplicación se hace en combinación o alternadamente con agroquímicos tales como plaguicidas, fertilizantes y con otros agentes tales como biofertilizantes, extractos vegetales y otros bioproductos.

Actualmente, los compuestos que inhiben la biosíntesis de esterol (DMI por sus siglas en inglés) constituyen el grupo más importante de fungicidas químicos sistémicos en la agricultura (Figueras-Roca *et al.*, 1996); la mayoría de dichos fungicidas impiden la demetilación C-14 de lanosterol o eburicol. Adicionalmente, en Colombia se aplican plaguicidas pertenecientes al grupo químico de las carboxamidas y su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la respiración celular del patógeno.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la compatibilidad *in vitro* de *T. koningiopsis* (Th003) con los plaguicidas químicos comúnmente empleados en el cultivo de lechuga en la Sabana de Bogotá.

Investigadores Laboratorio de Control Biológico,
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.
Km 14 vía Bogotá-Mosquera.
E-mail: lvillamizar@corpoica.org.co

RESUMEN

Dado el amplio espectro de los modos de acción de los plaguicidas químicos usados comúnmente en Colombia, es posible que en condiciones de campo la actividad biocontroladora de las formulaciones desarrolladas a base de *T. koningiopsis*, se vea disminuida debido al efecto de los fungicidas aplicados para el manejo de enfermedades. A pesar de esto, en la literatura científica son muy escasos los reportes de trabajos para determinar la sensibilidad o la compatibilidad de microorganismos biocontroladores con los plaguicidas químicos, siendo por lo tanto muy valiosa toda la información generada acerca del efecto de estos plaguicidas sobre el hongo *T. koningiopsis*. En este trabajo se evaluó el efecto de 13 plaguicidas químicos sobre el hongo *T. koningiopsis* bajo condiciones de laboratorio y se encontró que solamente Validacin® y azufre presentaron mediana compatibilidad en la dosis más baja evaluada, mientras que los restantes fueron totalmente incompatibles en todas las concentraciones. Estos resultados serán el punto de partida para generar recomendaciones de uso y estrategias de aplicación en campo del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*, que permitirán la reducción de la cantidad de químicos empleados y consecuentemente disminuir los riesgos concernientes a la resistencia en los patógenos y a la residualidad en alimentos de consumo humano.

Tabla 1. Concentraciones de los fungicidas evaluados en condiciones *in vitro* con *Trichoderma koningiopsis*.

Fungicidas (Nombre, codificación)	Dosis (ppm)		
	100%	50%	25%
Orthocide® (Or)	2500	1250	625
Validacin® (Va)	2500	1250	625
Aliette® (Al)	5000	2500	1250
Cobrethane® (Co)	5000	2500	1250
Kocide® (Ko)	2000	1000	500
Score® (Sc)	500	250	125
Carbendazim® (Ca)	500	250	125
Benomil® (Be)	350	175	88
Difenoconazol® (Di)	125	63	31
Oxicloruro de cobre (Ox)	12600	6300	3150
Clorotalonil® (Cl)	720	360	180
Metil-tiofanato® (Mt)	700	350	175
Azufre (Az)	2520	1260	630

5.2.2. Materiales y métodos

Microorganismo

El aislamiento de *T. koningiopsis* Th003 fue obtenido del Banco de Germoplasma de Microorganismos con interés en Control Biológico de Corpoica.

Evaluación de la compatibilidad *in vitro* de *T. koningiopsis* con plaguicidas químicos.

La compatibilidad *in vitro* de *T. koningiopsis* se evaluó en medio Saboureaud Sacarosa Agar (SSA), al cual

se le adicionaron los plaguicidas en estudio en tres concentraciones, equivalentes a 100%, 50% y 25% de la dosis recomendada (Tabla 1). Los 13 plaguicidas químicos evaluados fueron Orthocide®, Aliette®, Validacin®, Score®, Cobretane®, Kocide®, Clorotalonil®, Difenoconazol®, Metil tiofanato®, Carbendazim®, Benomil®, Oxicloruro de Cobre y Azufre en sus presentaciones comerciales. Con un sacabocados de 5mm de diámetro se cortaron fragmentos de igual tamaño de medio PDA crecido con el microorganismo durante 8 días a 28°C. Cada fragmento fue colocado

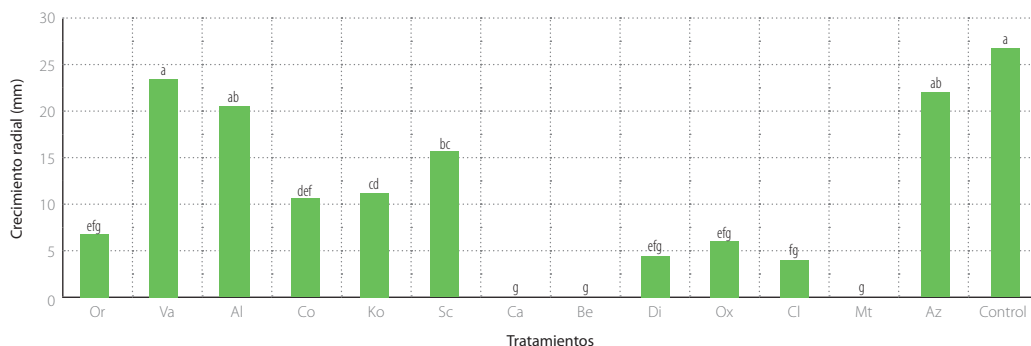


Figura 1. Efecto de los plaguicidas evaluados (25% de la dosis recomendada), sobre el crecimiento radial de *Trichoderma koningiopsis* después de seis días de incubación. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. Tukey ($\alpha = 95\%$). La codificación de los plaguicidas corresponde a la Tabla 1.

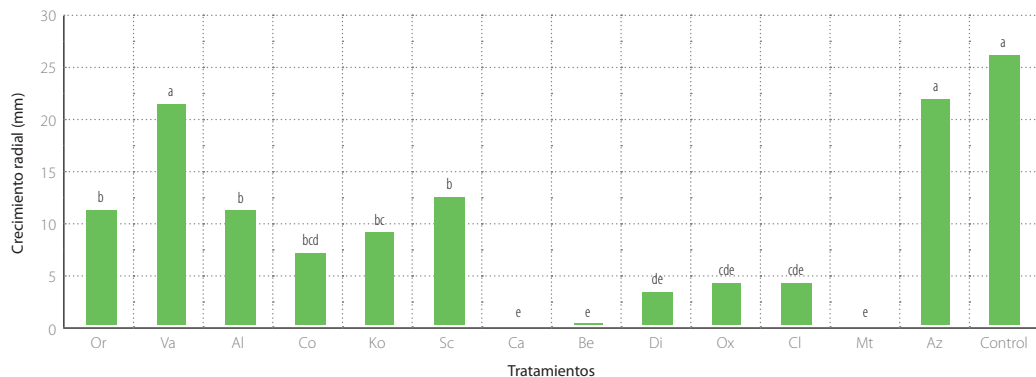


Figura 2. Efecto de los plaguicidas evaluados (50% de la dosis recomendada), sobre el crecimiento radial de *Trichoderma koningiopsis* después de seis días de incubación. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. Tukey ($\alpha = 95\%$). La codificación de los plaguicidas corresponde a la Tabla 1.

en el centro de cajas de Petri con medios SSA con y sin plaguicidas. Los medios inoculados con Th003 se incubaron a 28°C por seis días y a los 0, 3 y 6 días se midió el radio de la colonia con un calibrador digital. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado.

5.2.3 Resultados y discusión

Efecto de los plaguicidas químicos sobre la viabilidad de *T. koningiopsis*.

Cuando se evaluó la compatibilidad del microorganismo con los funguicidas a 25% de la dosis recomendada, se evidenció una disminución en el crecimiento radial de la colonia en todos los plaguicidas. Sin embargo, la prueba de comparación de medias de Tukey no detectó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los plaguicidas Validacin®, Aliette® y azufre (Figura 1). Los demás funguicidas causaron una inhibición significativa del crecimiento radial de *T. koningiopsis* Th003 ($P < 0,05$).

A la mitad de la dosis recomendada para los funguicidas (50%) se evidenció una tendencia similar y el microorganismo presentó un crecimiento radial menor en presencia de los funguicidas en comparación con el control. Sin embargo, la prueba de comparación de medias de Tukey no detectó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos cuando se utilizaron los plaguicidas Validacin® y azufre (Figura 2). Los demás funguicidas evaluados inhibie-

ron significativamente el crecimiento radial del microorganismo ($P < 0,05$) (Figura 2).

Los funguicidas Carbendacim®, Benomil® y Metil-tiofanato® en todas las dosis evaluadas, inhibieron totalmente el crecimiento radial de *T. koningiopsis*. Este comportamiento está relacionado con el modo de acción de estos ingredientes activos, los cuales interfieren el proceso de división celular, permitiendo la germinación del microorganismo pero deteniendo el desarrollo del tubo germinal lo que provoca irregularidades en la división celular y en algunos casos da lugar a células anormales. Los efectos adversos de este tipo de compuestos en la división celular probablemente causan la muerte del hongo (De Liñan, 1997).

Al igual que en el presente trabajo, Kososki y colaboradores (2001) detectaron un efecto negativo de los funguicidas benomil, metil-tiofanato y clorotalonil a una concentración de 10ppm en el desarrollo del área micelial de *Colletotrichum acutatum*. Así mismo, Pomurugan y colaboradores (2006) observaron una disminución gradual en el crecimiento radial de *Phomopsis theae* a medida que se aumentó la concentración de carbendazim en el medio de cultivo; los autores atribuyeron la supresión del crecimiento al efecto del funguicida, el cual inhibe la mitosis del hongo y de esta manera la división celular que determina el crecimiento del microorganismo.

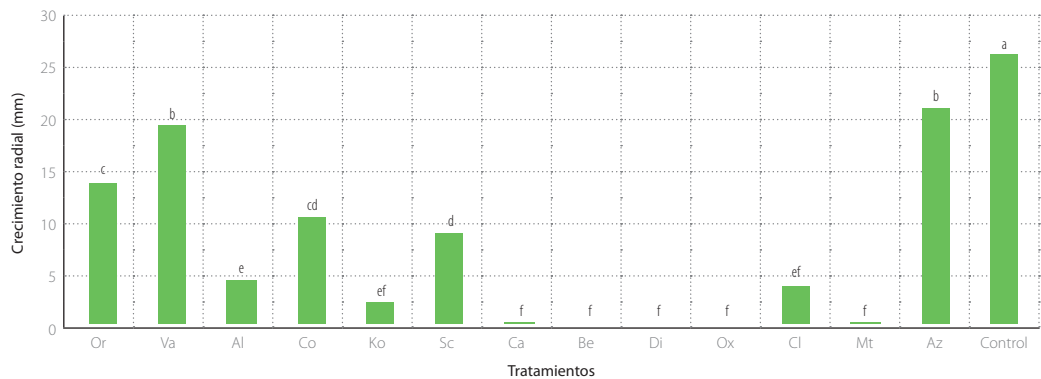


Figura 3. Efecto de los plaguicidas evaluados (dosis recomendada), sobre el crecimiento radial de *Trichoderma koningiopsis* después de seis días de incubación. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. Tukey (95%). La codificación de los plaguicidas corresponde a la Tabla 1.

Cuando se evaluó la dosis recomendada (100%) para todos los plaguicidas se observó una disminución mayor en el crecimiento radial en comparación al comportamiento presentado a 25% y 50% de la dosis. Este resultado indica que el efecto de estos productos de síntesis química aumentó directamente con la dosis del ingrediente activo utilizada; es decir, que a mayor dosis de plaguicida mayor inhibición del crecimiento del microorganismo.

La prueba de comparación de medias de Tukey detectó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento control y los trece fungicidas evaluados (Figura 3), lo que demostró que la adición de todos los productos al medio de cultivo, utilizando la dosis recomendada, afectó negativamente el crecimiento radial del microorganismo.

Los resultados de radio de colonia *versus* tiempo fueron sometidos a un análisis de regresión lineal, obteniéndose coeficientes de correlación superiores a 0,90, valores que sugieren que el crecimiento radial siguió una cinética de orden cero. Con base en los resultados de regresión se determinaron las pendientes de cada recta, las cuales representan la velocidad de crecimiento radial en mm/día (Tabla 3). Las velocidades establecidas para cada fungicida a las tres dosis evaluadas (25%, 50% y 100%) y el tratamiento control fueron sometidos a un análisis

de varianza ANOVA y a una prueba de diferencia mínima significativa (DMS) con una confiabilidad de 95%.

La velocidad de crecimiento radial de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) tratamiento control, no presentó diferencias significativas con respecto a la velocidad obtenida para el tratamiento con azufre a las tres dosis evaluadas y con el plaguicida Validacin® a 25% de la dosis recomendada. Estos resultados sugieren que el aislamiento Th003 de *Trichoderma koningiopsis* fue compatible con el ingrediente activo azufre y podría utilizarse conjuntamente con dosis bajas del ingrediente activo Validacin®.

Las especies de *Trichoderma* son conocidas por expresar reacciones diferenciales a grupos de fungicidas (Sharma *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2006). En este estudio también se observó un comportamiento similar.

Se apreció que con Carbendazim®, Benomil® y Metil-tiofanato® se presentaron los mayores niveles de inhibición; este fenómeno ha sido confirmado en numerosos estudios (Nallathambi *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004; Nallathambi *et al.*, 2008) por lo que incluso se ha sugerido abandonar el uso integrado de Carbendazim® con *T. harzianum*, *T. viride* y *Gliocladium virens* (Begum y Bhuiyan, 2004).

Tabla 3. Velocidades de crecimiento *in vitro* de *T. koningiopsis* Th003.

Tratamiento	Dosis (%)	Pendiente (mm/día)	S.D.	r ²
Orthocide®	100	2,29 b	0,24	0,98
	50	1,86 bc	0,73	0,92
	25	1,12 c	0,65	0,95
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Validacin® (Va)	100	3,22 c	0,11	0,94
	50	3,60 bc	0,29	0,90
	25	3,85 ab	0,26	0,92
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Aliette® (Al)	100	0,72 d	0,06	0,95
	50	1,86 c	0,14	0,98
	25	3,37 b	0,25	0,84
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Cobrethane® (Co)	100	1,72 b	0,48	0,95
	50	1,17 b	0,30	0,97
	25	1,75 b	0,38	0,97
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Kocide® (Ko)	100	0,33 c	0,32	0,98
	50	1,51 b	0,38	0,94
	25	1,85 b	0,32	0,98
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Score® (Sc)	100	1,47 c	0,01	0,91
	50	2,09 bc	0,40	0,99
	25	2,58 b	1,00	0,98
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Carbendazim® (Ca)	100	0 b	-	1,00
	50	0 b	-	1,00
	25	0 b	-	1,00
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Benomil® (Be)	100	0 b	-	1,00
	50	0 b	-	1,00
	25	0 b	-	1,00
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Difenoconazol® (Di)	100	0 c	-	1,00
	50	0,66 b	0,04	0,96
	25	0,99 b	0,07	0,94
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Oxicloruro de cobre (Ox)	100	0 c	-	1,00
	50	0,66 b	0,28	0,93
	25	0,99 b	0,28	0,90
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Clorotalonil® (Cl)	100	0,60 b	0,03	0,98
	50	0,67 b	0,04	0,93
	25	0,65 b	0,06	0,93
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Metil-tiofanato® (Mt)	100	0 b	-	1,00
	50	0 b	-	1,00
	25	0 b	-	1,00
	Control	4,39 a	0,46	0,95
Azufre (Az)	100	3,50 a	0,29	0,90
	50	3,67 a	0,33	0,90
	25	3,61 a	0,35	0,90
	Control	4,39 a	0,46	0,95

Con respecto a los fungicidas del grupo de las dicarboxamidas (tales como Orthocide®) se produjo un efecto inversamente proporcional a la concentración usada con magnitudes de inhibición del crecimiento de *T. koningiopsis* entre 70% con 625 ppm y 44% con 2500 ppm, por lo cual se puede considerar medianamente compatible; Harman y colaboradores (1996) demostraron que *T. harzianum* es compatible con dicarboxamidas tales como Iprodione® y Vinclozolin®.

De otra parte, hubo incompatibilidad con el grupo de productos con oxiclورو de cobre (incluyendo Cobrethane® y Kocide®) en todas las dosis evaluadas, con inhibiciones del crecimiento entre 60% y 72% a las menores dosis y entre 60% y 100% con las dosis más altas; en contraste, Nallathambi y colaboradores (2009) reportaron tolerancia intrínseca de varias especies de *Trichoderma* con oxiclورو de cobre y Manzobeb (en concentraciones por encima de 500 mg/g).

En conclusión, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se podría afirmar que la cepa de *T. koningiopsis* (Th003) fue incompatible con todos los productos evaluados, a excepción de azufre y Validacin® a 25% de la dosis recomendada; lo anterior probablemente se deba a que el microorganismo se ve enfrentado a una exposición forzada y drástica con los ingredientes activos. Sin embargo, se recomienda realizar estudios en los cuales se evalúe el efecto *in vivo* de los productos químicos, usados habitualmente por los agricultores, sobre microorganismos biocontroladores, con el propósito de favorecer y desarrollar estrategias para el manejo integrado de los cultivos.

5.3 PRUEBAS DE EFICACIA DE *Trichoderma koningiopsis* Th003 PARA EL CONTROL DEL MOHO BLANCO DE LA LECHUGA

Carlos Andrés Moreno Velandia M.Sc., Alexander Smith May B.Sc., Alba Marina Cotes Ph.D.

5.3.1 Formas y frecuencias de aplicación del bioplaguicida

El objetivo de esta actividad fue seleccionar las formas y frecuencias de aplicación de *T. koningiopsis* Th003, en el control de la enfermedad moho blanco de la lechuga.

5.3.1.1 Metodología

Ubicación

Se realizaron tres experimentos independientes en condiciones de invernadero, con temperatura promedio de 16 °C y HR promedio de 68%, en el centro de investigación Tibaitatá de Corpoica, Mosquera - Cundinamarca.

Inóculo patogénico

Se utilizaron los aislamientos *Sclerotinia minor* Sc001 y *Sclerotinia sclerotiorum* Sc002 respectivamente, obtenidos de cultivos comerciales de lechuga batavia en Mosquera y Funza (Martínez, 2007). Para la conservación de estos hongos se produjeron esclerocios en medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA), los cuales fueron colectados manualmente en condiciones de asepsia y se almacenaron en viales de vidrio a temperatura ambiente.

Para la producción del inóculo patogénico de las cepas de *Sclerotinia*, se inoculó un sustrato estéril de cebada perlada con discos de agar con crecimiento

Investigadores Laboratorio de Control Biológico,
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.
Km 14 vía Bogotá-Mosquera.
E-mail: cmoreno@corpoica.org.co

Tabla 1. Tratamientos evaluados en el experimento uno (Formas de aplicación del bioplaguicida WG a base de *T. koningiopsis* Th003).

No.	Descripción del tratamiento*	Abreviación
1	Formulación WG de <i>T. koningiopsis</i> Th003 aplicado en drench	WG drench
2	Formulación WG de <i>T. koningiopsis</i> Th003 aplicado directamente al sustrato (0.5 g/planta)	WG directo
3	<i>T. koningiopsis</i> Th003 sin formular aplicado en drench	Th drench
4	Testigo químico (Benomil 1 g/l; 30 ml/planta aplicado en drench)	Benomil
5	Testigo absoluto (sustrato con inóculo patogénico; ninguna medida de control de la enfermedad)	Testigo

* La concentración de *T. koningiopsis* Th003 en las suspensiones fue de (1x10⁶ conidios/ml), para lo cual se utilizó una dosis de 1 g/l en el caso de la formulación. La aplicación directa de los gránulos del bioplaguicida se hizo en el fondo del sitio de trasplante; los demás tratamientos se aplicaron inmediatamente después, empleando un volumen de 100 ml/materia para el caso del bioplaguicida y de 30 ml/materia para el fungicida.

Tabla 2. Tratamientos evaluados en el experimento dos (Frecuencias de aplicación del bioplaguicida WG a base de *T. koningiopsis* Th003).

No.	Descripción del tratamiento*	Abreviación
1	El sustrato se humedeció con la suspensión WG Th003 (100 mL/materia), luego se realizó el trasplante	WG d at
2	El sustrato se humedeció con la suspensión WG Th003 (100 mL/materia), luego se realizó el trasplante, 7 días después se aplicó la suspensión WG Th003 con una frecuencia semanal.	WG d at + d7
3	El sustrato se humedeció con la suspensión WG Th003 (100 mL/materia), luego se realizó el trasplante, 14 días después se aplicó la suspensión WG Th003 con una frecuencia quincenal.	WG d at + d14
4	La formulación WG Th003 se incorporó en el sustrato antes del trasplante.	WG at
5	La formulación WG Th003 se incorporó en el sustrato antes del trasplante, 14 días después se aplicó la suspensión WG Th003 en drench con una frecuencia quincenal.	WG at + d14
6	Testigo químico* (Benomil 1 g/l; 30 ml/planta aplicado en drench)	Benomil
7	Testigo absoluto (sustrato con inóculo patogénico; ninguna medida de control de la enfermedad)	Testigo

* El fungicida benomil se aplicó sólo una vez inmediatamente después del trasplante.

Tabla 3. Tratamientos evaluados en el experimento tres (Eficacia de dos prototipos de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003).

No.	Descripción del tratamiento*	Abreviación
1	Formulación WG de <i>T. koningiopsis</i> Th003 aplicado en drench*	WG drench
2	Formulación WP de <i>T. koningiopsis</i> Th003 aplicado en drench	WP drench
3	Formulación WP de <i>T. koningiopsis</i> Th003 asperjado	WP foliar
4	Testigo Químico 1 (Procimidona 1 g/l; 30 ml/planta aplicado en drench)	Procimidona
5	Testigo Químico 2 (Iprodione 1 ml/l; aproximadamente 5 ml/planta asperjado)	Iprodione
6	Testigo absoluto (sustrato con inóculo patogénico; ninguna medida de control de la enfermedad)	Testigo

* Para las aplicaciones en drench se utilizó un volumen de 30 ml/planta. La frecuencia de aplicación para los tratamientos biológicos fue cada dos semanas. En el caso de los fungicidas, éstos se aplicaron inmediatamente después del trasplante y dos semanas después.

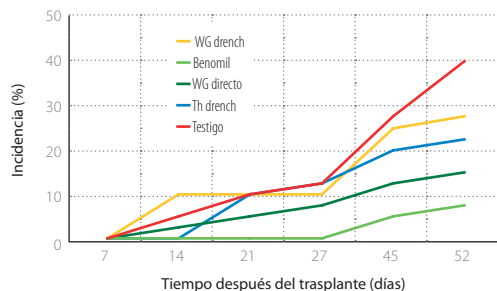


Figura 1. Efecto de las formas de aplicación del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la incidencia de la enfermedad moho blanco de la lechuga causada por *Sclerotinia minor* Sc001. El bioplaguicida WG [1x10⁹ conidios/g] se usó en dosis de 1 g/L cuando se reconstituyó en agua o se aplicaron 0,5 g/planta cuando se colocó en el sitio de trasplante directamente. Th003 también se empleó sin formular como una suspensión de conidios en concentración de 1x10⁶ conidios/mL. El fungicida Benomil (Benlate® 1 g/L) se aplicó en drench inmediatamente después del trasplante (30 mL/planta). Los tratamientos se utilizaron una sola vez en el momento del trasplante.

micelial y formación de esclerocios (provenientes del segundo subcultivo después de la reactivación de las cepas); luego de dos semanas de crecimiento se separaron los esclerocios formados

Inoculación

Se utilizó una densidad de 11 esclerocios para cada especie de *Sclerotinia*, seleccionada en la prueba de patogenidad descrita en el capítulo 1 de este documento. El procedimiento de inoculación consistió en incorporar el inóculo patogénico al sustrato de siembra; para esto se utilizó una mezcla de suelo y cascarilla de arroz (2:1) esterilizado en autoclave (20 PSI / 30 min / 90 °C). El sustrato se dispuso en materas plásticas de 2 Kg de capacidad hasta 2/3 de su altura y en el tercio superior se agregó el suelo con los esclerocios incorporados aleatoriamente; posteriormente se trasplantó en cada matera una plántula de lechuga batavia var. Van Max de 4 semanas de edad.

Tratamientos

Para las evaluaciones se utilizaron dos formulaciones a base del hongo *T. koningiopsis* Th003, un granulado dispersable (WG) y un polvo mojable (WP). En el experimento uno se comparó el efecto de las formas de aplicación del bioplaguicida WG en drench y de

los gránulos sin reconstituir en agua (Tabla 1). En el experimento dos se determinó el efecto de diferentes frecuencias de aplicación del bioplaguicida WG a base de Th003 (Tabla 2). En el experimento tres se comparó la eficacia de los dos prototipos de formulación WG y WP a base de Th003 (Tabla 3).

Diseño experimental y análisis de datos

En los tres experimentos se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental consistió en 10 plantas de lechuga, sembrando una por matera. Se midió la incidencia de la enfermedad moho blanco, expresada como la proporción de plantas con síntomas y/o signos. Al finalizar cada experimento se estimó la eficacia de los tratamientos con respecto al testigo absoluto con la fórmula $[(a-b)/a]*100$ donde a es el valor de incidencia en el testigo absoluto y b es el valor de la incidencia en un tratamiento. Los datos finales de incidencia de la enfermedad fueron sometidos a ANAVA para determinar efectos significativos de los tratamientos y los promedios fueron comparados mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95%.

5.3.1.2 Resultados

Efecto de las formas de aplicación del bioplaguicida WG Th003 sobre el moho blanco

La enfermedad moho blanco de la lechuga se apreció dos semanas después del trasplante, con una incidencia inferior a 10% en todos los tratamientos utilizados para su control y tuvo un progreso significativo en el testigo absoluto en donde se presentó el mayor nivel de enfermedad (40%) 52 días después del trasplante (Figura 1).

Todos los tratamientos aplicados para controlar la enfermedad moho blanco redujeron significativamente su incidencia, siendo el fungicida químico el que la disminuyó en mayor proporción (eficacia de 81%). La aplicación de *T. koningiopsis* Th003 redujo la incidencia del moho blanco entre 31% y 63%, siendo en este caso la forma de aplicación directa del granulado de Th003 el tratamiento con mayor eficacia (63%), mientras que la aplicación en drench del bioplaguicida presentó el menor porcentaje de eficacia (31%).

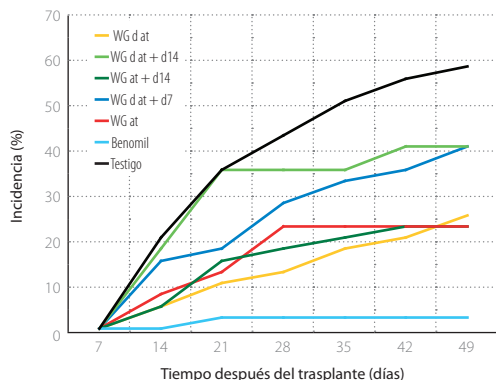


Figura 2. Efecto de las formas y las frecuencias de aplicación del bioplaguicida TricoTec WG a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la incidencia de la enfermedad del mocho blanco de la lechuga causada por *S. minor* Sc001. En cada materia se inocularon 11 esclerocios del fitopatógeno *Sclerotinia minor* Sc001 y posteriormente se trasplantó una planta de lechuga tipo batavia var. Van max de 4 semanas de edad. El bioplaguicida [1×10^9 conidios/g] se utilizó en dosis de 1 g/L cuando se reconstituyó en agua. El fungicida Benomil (Benlate® 1 g/L) se aplicó en drench inmediatamente después del trasplante. d: drench. at: antes del trasplante. 7 y 14: días de periodicidad.

Efecto de las frecuencias de aplicación del bioplaguicida WG Th003 sobre el mocho blanco

En este experimento la incidencia de la enfermedad fue mayor a la que se presentó en el experimento anterior y en un menor período de tiempo, ya que después de 49 días del trasplante, en el presente experimento la incidencia fue de 58% en el testigo absoluto. Los tratamientos evaluados para controlar la enfermedad causada por *S. minor* redujeron significativamente su presencia (Figura 2) con niveles de eficacia de 30% a 96%, siendo el fungicida benomil el que generó el máximo valor de eficacia.

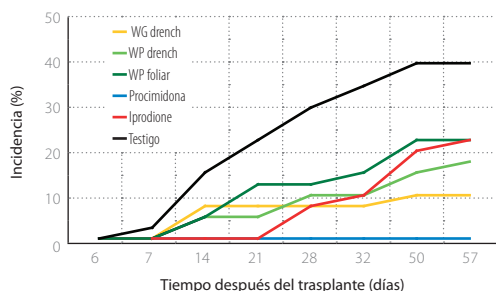


Figura 3. Efecto de dos formulaciones a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la incidencia del mocho blanco de la lechuga causada por *Sclerotinia minor* Sc001.

El empleo de la suspensión del bioplaguicida WG Th003 al sustrato antes del trasplante (Wg d at) con aplicaciones periódicas de 7 y 14 días, mostró los menores valores de eficacia en el control de la enfermedad, mientras que con la aplicación directa del bioplaguicida al suelo antes del trasplante, o con una sola también antes del trasplante, se obtuvieron valores intermedios de eficacia (57% a 61%), coincidiendo con la tendencia observada en el experimento 1.

Eficacia de dos prototipos de bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003

En este experimento los síntomas de la enfermedad se hicieron evidentes una semana después del trasplante de la lechuga y durante el desarrollo de la operación la incidencia fue más alta en el testigo absoluto, llegando a ser de 40% después de 57 días del trasplante.

El fungicida Proclimidona® aplicado en la base de la planta (drench) inhibió completamente la infección por *S. minor* Sc001, en tanto que el fungicida Iprodione aplicado de forma foliar tuvo una eficacia de 44%, inferior al control obtenido con la aplicación de los tratamientos biológicos (Figura 3).

En contraste con lo observado en los dos experimentos anteriores, en el presente la aplicación del bioplaguicida WG Th003 en drench con una frecuencia quincenal, presentó el efecto más alto en la reducción de la enfermedad (75%). Sin embargo, el empleo del bioplaguicida formulado como WP Th003 mostró una eficacia de control significativa (Figura 3).

5.3.2 Eficacia del bioplaguicida en condiciones de cultivo

El objetivo de esta actividad fue generar una recomendación para incorporar el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003 en el cultivo de lechuga.

5.3.2.1 Metodología

Ubicación

Tres experimentos se realizaron en el lote 5 del Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica, Mosquera y dos se adelantaron en el lote 1 de la finca Santa

Tabla 4. Tratamientos evaluados en el primer experimento en Centro de Investigación.

No.	Descripción del tratamiento*	Abreviación
1.	La formulación WG Th003 se incorporó en el suelo antes del trasplante (en la cama de trasplante)	WG Voleo Pre
2.	La formulación WG Th003 se aplicó en el fondo de cada sitio de trasplante	WG Sitio
3.	La formulación WG Th003 se aplicó al voleo en la superficie de la cama después del trasplante	WG Voleo Pos
4.	Se utilizaron plántulas de lechuga que recibieron el tratamiento biológico WG Th003 en el semillero	WG Semillero
5.	Se utilizaron plántulas de lechuga sin tratamiento biológico (testigo)	Testigo
6.	La formulación WG Th003 se reconstituyó en agua y se aplicó en drench con una frecuencia quincenal	WG Drench 14
7.	La formulación WG Th003 se reconstituyó en agua y se aplicó en drench con una frecuencia semanal	WG Drench 7

* Para incorporar el bioplaguicida en el suelo se colocó en la superficie de la cama de siembra y con un rastrillo manual se removió, mezclando así los gránulos; para la aplicación localizada del bioplaguicida se utilizaron 0,5 g de producto en cada hoyo. Para su empleo de forma directa se pusieron 25 g en cada cama. Las plántulas tratadas con el bioplaguicida durante el semillero recibieron dos aplicaciones de la suspensión en concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ (dosis 1 g/L), a los 7 y 21 días después de la siembra, las cuales se realizaron en drench con una regadera de jardinería (500 mL aproximadamente). Para aplicar en drench el producto también se usó una dosis de 1 g/L mediante una fumigadora de espalda operada con palanca (Guarany®) a la cual se le retiró la boquilla y en cada planta, alrededor de su base, se hizo una descarga de la suspensión (30 mL).

Ana, del agricultor Juan García, en la vereda el Corzo, municipio de Madrid, Cundinamarca. Estos dos sitios fueron seleccionados porque en cultivos anteriores de lechuga se presentó la enfermedad moho blanco.

Tratamientos del primer experimento en el Centro de Investigación

Con el fin de validar los resultados obtenidos con los experimentos en materas, inicialmente en el Centro de Investigación se realizó un experimento

Tabla 5. Tratamientos evaluados en el primer experimento en finca comercial.

No.	Descripción del tratamiento*	Abreviación
1	Suelo solarizado - Formulación WG Th003 suspendida en agua aplicada en drench (30 mL/planta) inmediatamente después del trasplante, 7 y 14 días después - Formulación WP Th003 suspendida en agua aplicada de forma foliar a los 28 y 42 días después del trasplante - Remoción de plantas enfermas.	MIP
2	Suelo solarizado	Solarización
3	El fungicida Procimidona (Sumilex®; 1g/L) se aplicó en drench inmediatamente después del trasplante 30 mL/planta; una semana después el fungicida Iprodione (Torin®; 1g/L) se aplicó de manera foliar; por último se aplicó el fungicida Tebuconazole (Folicur® 1 mL/L) de forma foliar a los 35 días después del trasplante.	Químico
4	No se emplearon medidas para el control de la enfermedad moho blanco.	Testigo
5	Suelo solarizado - Cobertura plástica sobre la cama de siembra - Formulación WG Th003 suspendida en agua aplicada en drench (30 mL/planta) inmediatamente después del trasplante, 7 y 14 días después - Formulación WP Th003 suspendida en agua aplicada de forma foliar a los 28 y 42 días después del trasplante - Remoción de plantas enfermas.	MIP cobertura

*Para la solarización se levantaron las camas de siembra y luego se humedeció el suelo mediante riego por aspersión hasta la capacidad de campo; finalmente se cubrieron con polietileno negro de calibre 6, sujetando los bordes del plástico a la base de la cama. El período de solarización en la finca comercial fue de 42 días. Se utilizaron plántulas de lechuga batavia var. Grandes Lagos, producidas convencionalmente en un semillero comercial y sin tratamiento biológico.

para evaluar el efecto del bioplaguicida WG Th003 sobre la incidencia de la enfermedad moho blanco, incorporado en un esquema de manejo integrado en el que se incluyó la práctica de solarización del suelo (Tabla 4). Sin embargo, en este experimento no se presentó la enfermedad por lo cual se midió el rendimiento del cultivo.

Diseño del primer experimento en el Centro de Investigación

Se utilizó un diseño de parcelas divididas con una estructura básica de bloques completos al azar con cinco repeticiones. La unidad experimental consistió en una cama de cultivo de 1,5 m de ancho por 3 m de longitud (4,5 m²) en donde se trasplantaron 50 plantas con distancias de siembra de 0,4 m x 0,4 m. La unidad de muestreo consistió en 10 plantas las cuales se pesaron individualmente.

Tratamientos del primer experimento en finca comercial

Este experimento se realizó en el segundo semestre del año 2008 (22 de julio a 11 de noviembre); se diseñó un modelo de manejo integrado evaluado para el control de la enfermedad moho blanco de la lechuga. En la tabla 5 se describen los tratamientos evaluados.

Diseño del primer experimento en finca comercial

El diseño experimental fue el de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La unidad consistió

en una cama de siembra de 1,7 m de ancho por 10 m de largo (17 m²) en la que se trasplantaron 106 plántulas. Se utilizó un espacio de 2 m entre los bloques en donde se sembró cilantro como barrera. Durante el experimento se registró la incidencia de la enfermedad moho blanco de la lechuga y al finalizar el ciclo del cultivo se anotó el peso de las plantas cosechadas y se estimó el rendimiento.

Tratamientos del segundo experimento en el Centro de Investigación

El fin de este fue validar los resultados obtenidos en el primer ensayo de la finca comercial. En la tabla 6 se describen los tratamientos evaluados.

Diseño del segundo experimento en el Centro de Investigación

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cinco repeticiones. La unidad experimental consistió en tres camas de cultivo de 1,7 m de ancho por 5 m de largo (26 m²) en las que se trasplantaron 159 plantas de lechuga batavia var. Van max, con distancias de siembra de 0,4 m x 0,4 m. La enfermedad moho blanco de la lechuga se presentó de forma natural cerca a la cosecha, por lo cual esta variable se midió una vez. También se determinó el peso fresco de la lechuga cosechada y se estimó el rendimiento; para esto la unidad de muestreo usada fue de 15 plantas. El tiempo de solarización en este experimento fue de 94 días (desde el 10 de Noviembre de 2008).

Tabla 6. Tratamientos evaluados en el segundo experimento en el Centro de Investigación.

No.	Descripción del tratamiento	Abreviación
1	Suelo solarizado - Plántulas tratadas con WG Th003 en el semillero - Formulación WG Th003 suspendida en agua aplicada en drench (30 mL/planta) inmediatamente después del trasplante, 7 y 14 días después - Formulación WP Th003 suspendida en agua aplicada de forma foliar a los 28 y 42 días después del trasplante - Remoción de plantas enfermas.	MIP
2	El fungicida Proclimidona (Sumilex®; 1g/L) se aplicó en drench inmediatamente después del trasplante 30 mL/planta; una semana después el fungicida Iprodione (Torín®; 1g/L) se aplicó de forma foliar; por último se aplicó el fungicida Tebuconazole (Folicur® 1 mL/L) de forma foliar a los 35 días después del trasplante.	Químico
3	No se aplicaron medidas para el control de enfermedades moho blanco.	Testigo
4	Suelo solarizado - Cobertura plástica sobre la cama de siembra - Plántulas tratadas con WG Th003 en el semillero - Formulación WG Th003 suspendida en agua aplicada en drench (30 mL/planta) inmediatamente después del trasplante, 7 y 14 días después - Formulación WP Th003 suspendida en agua aplicada de forma foliar a los 28 y 42 días después del trasplante - Remoción de plantas enfermas.	MIP cobertura

Tratamientos del tercer experimento en el Centro de Investigación

Con el fin de validar los resultados obtenidos en el experimento anterior en el Centro de Investigaciones, el ensayo fue repetido conservando la ubicación de las unidades experimentales y los tratamientos (Tabla 6). Sin embargo, a diferencia del anterior, en los procedimientos MIP y MIP Cobertura se recolectaron los residuos de la cosecha y se retiraron del área, mientras que en los otros dos tratamientos (Químico y Testigo) los residuos fueron incorporados en la cama de siembra cuando se hizo la labranza del suelo con azadón. Aquí también se midió la incidencia del moho blanco y se estimaron los rendimientos de la misma forma a la descrita para el anterior ensayo. Este tercer experimento se llevó a cabo entre el 6 de julio y el 5 de octubre del 2009.

Tratamientos del segundo experimento en finca comercial

En este caso se validó el uso de *T. koningiopsis* Th003 en el sistema de producción comercial de lechuga batavia. Se utilizó la formulación WP a base del hongo antagonista, la cual se incorporó a las plántulas de lechuga var. Salinas y posteriormente se aplicó en el cultivo a campo abierto, siendo este el tratamiento MIP.

La primera aplicación de TricoTec WP en el semillero se realizó inmediatamente después de sembrado. Esta práctica se adaptó al sistema de siembra utilizado por el plantulador; el procedimiento consistió en llenar las bandejas con el sustrato húmedo (cascarilla de arroz quemada + turba) y poner la semilla en cada sitio dejándola expuesta (sin tapar); posteriormente se asperjó la suspensión del bioplaguicida WP Th003 [1×10^6 conidios mL^{-1}] y se aplicó riego por nebulización para aumentar la humedad del sustrato; luego se apilaron las bandejas y se cubrieron con una lámina de polietileno negro durante 24 horas, tiempo después del cual se cubrió la semilla con el sustrato. Las siguientes aplicaciones del bioplaguicida se efectuaron en drench a los 7 y 21 días después de la siembra y una última aplicación foliar a los 30 días después de ella. El tratamiento biológico se le hizo a 75 bandejas (15.000 plántulas) y se dispuso de un número igual con plántulas de lechuga producidas de forma convencional (sin tratamiento biológico).

Las plántulas de cada tratamiento se trasplantaron a 9 camas continuas, cada una de 1,7 m de ancho por 50 m de largo (990 m^2). Las atendidas con MIP fueron tratadas con el bioplaguicida WP Th003 suspendido en agua (dosis 1 g/L) y aplicado en drench (30 mL/planta aprox.) al momento del trasplante, una semana y 2 semanas después del mismo; se realizaron dos aspersiones foliares, a los 33 y 42 días después del trasplante. Mientras tanto, con el manejo convencional el agricultor empleó los fungicidas Procimidona e Iprodione que usa corriente y periódicamente.

Diseño del segundo experimento en finca comercial

Se hizo en una parcela única para cada tratamiento (990 m^2) y cada dos semanas se registró la incidencia de la enfermedad moho blanco de la lechuga por medio de una red de cuadrantes de 1,7 m x 2 m (22 por cama).

Análisis de datos de los cinco experimentos en campo

Al finalizar cada experimento se estimó la eficacia de los tratamientos con respecto al testigo absoluto con la fórmula $[(a-b)/a] \times 100$ donde a es el valor de incidencia de la enfermedad en el testigo absoluto y b el valor de la incidencia en un tratamiento. Los datos finales fueron sometidos a ANAVA para determinar los efectos significativos de los tratamientos y los promedios fueron comparados mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95%.

5.3.2.2 Resultados

Primer experimento en el Centro de Investigación

Dado que en el experimento no se presentó la enfermedad moho blanco de la lechuga, se midió el efecto de los tratamientos sobre el rendimiento del cultivo 80 días después del trasplante. Se observó en general que la solarización del suelo tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas ya que en estas unidades experimentales el rendimiento fue mayor al obtenido en las camas no solarizadas (Figura 4).

Aunque los rendimientos fueron mayores en las unidades experimentales tratadas con el bioplaguicida, en comparación con el obtenido en el testigo

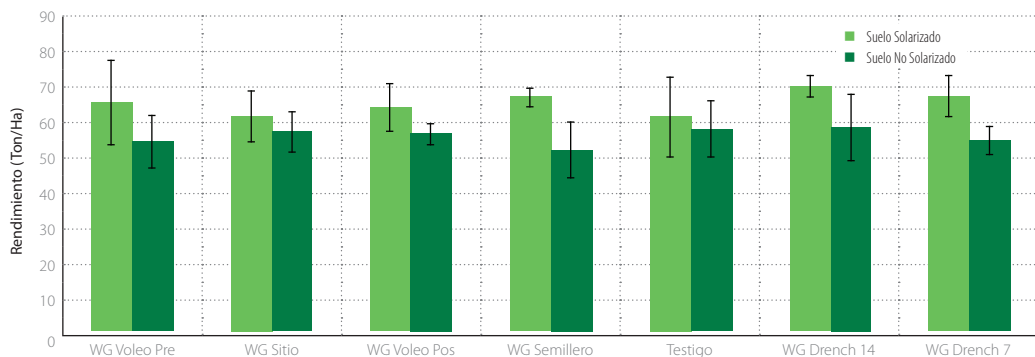


Figura 4. Efecto de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y de la solarización del suelo sobre el crecimiento de las plantas de lechuga expresado en términos de peso fresco. Las líneas verticales sobre las columnas muestran la desviación estándar de los datos (n= 10).

cuando el suelo no se solarizó, éstas diferencias no fueron estadísticamente significativas. A pesar de ello se debe resaltar que la combinación de la solarización del suelo con la aplicación en drench del bioplaguicida WG Th003 arrojó los mayores rendimientos del cultivo (70 ton/ha), mientras que en el testigo con suelo solarizado el rendimiento fue de 61 Ton/Ha, lo que representa en términos económicos una diferencia en ingresos para el agricultor de 6 millones de pesos, con un precio de venta promedio de 3 mil pesos por docena de lechuga en la central mayorista.

Primer experimento en finca comercial

Todos los tratamientos evaluados redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad causada

por *S. sclerotiorum* (Figura 5A), siendo el químico el que tuvo mayor eficacia de control (87%), seguido por la combinación de la solarización del suelo y el uso de *T. koningiopsis* Th003 (68% a 74%) y por la solarización del suelo sola, que la redujo en 58%. Estos resultados sugieren un efecto sinérgico entre la solarización del suelo y el control biológico con Th003.

Los resultados de cosecha permiten inferir un resultado positivo sobre los rendimientos del cultivo, debido tanto al control de la enfermedad como a la promoción del crecimiento vegetal, ya que se observó que las plantas tratadas con *T. koningiopsis* Th003 presentaron los mayores pesos, los cuales fueron todavía más altos en las unidades experimentales con cobertura plástica (Figura 5B).

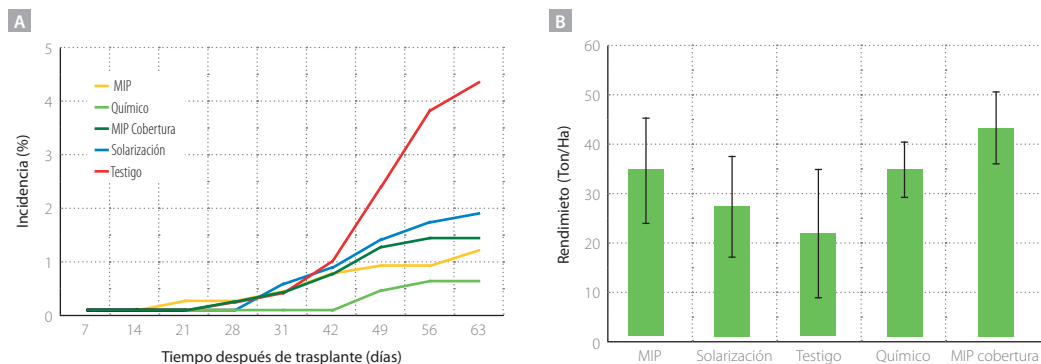


Figura 5. Efecto de un esquema de manejo integrado de enfermedades sobre la incidencia del moho blanco de la lechuga causada por *S. sclerotiorum* (A) y sobre los rendimientos del cultivo (B) a los 70 días después del trasplante en la finca Santa Ana, Madrid (Cundinamarca). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos en torno al promedio (Incidencia n= 159; Rendimientos n= 15).



Figura 6. Área experimental en la finca Santa Ana, vereda El Corzo (Madrid), recién trasplantada y apotecios de *Sclerotinia sclerotiorum* detectados a los 38 días después del trasplante.

En este experimento se observó la formación de apotecios de *S. sclerotiorum* cerca de la base de las plantas de lechuga, cubiertos por las hojas viejas a los 38 días después del trasplante (Figura 6). A pesar de esto durante el ciclo del cultivo no se presentaron infecciones en la cabeza de las plantas sugiriendo que la enfermedad fue causada por esclerocios y no por ascosporas.

Segundo experimento en el Centro de Investigación

La enfermedad moho blanco de la lechuga fue causada por el hongo *S. sclerotiorum* y los síntomas se hicieron evidentes al finalizar el ciclo del cultivo. La incidencia de la enfermedad fue similar entre los tratamientos MIP, Químico y Testigo con valores entre 4% y 6%, pero fue más alta en el tratamiento donde se utilizó la cobertura plástica de la cama, con una incidencia promedio de 15% (Figura 7A). Probable-

mente tal cubierta en estas unidades experimentales creó un microclima favorable para el desarrollo de *S. sclerotiorum*, tal como alta temperatura y humedad constante del suelo. La eficacia de control de la enfermedad con el tratamiento MIP fue de 34% y con el químico fue de 21%.

Las infecciones del moho blanco en las plantas de lechuga se caracterizaron por presentar pudrición desde el cuello del tallo y de las hojas viejas hacia la cabeza de la planta, por lo cual se puede afirmar que fueron ocasionadas por esclerocios del hongo presentes en el suelo. Por esta razón también se podría decir que la solarización del suelo no fue totalmente efectiva, ya que su temperatura no fue suficientemente alta para inhibir la germinación de los esclerocios, siendo de 35°C la máxima y de 28°C en promedio a 5 cm del suelo, y más baja a mayor profundidad.

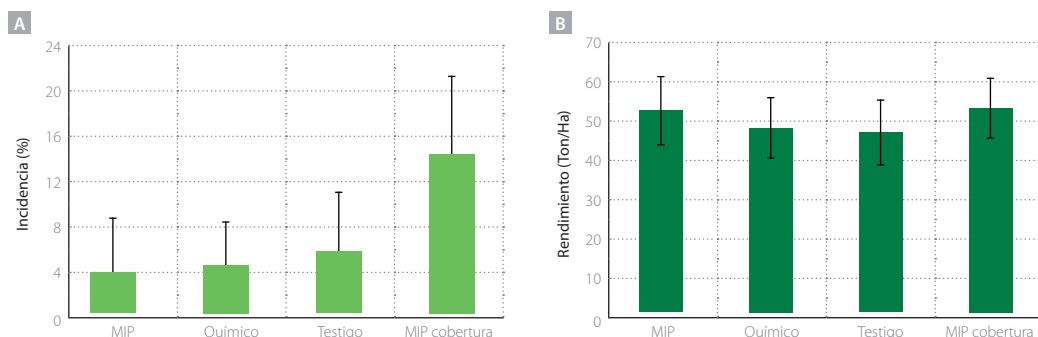


Figura 7. Efecto de un esquema de manejo integrado de enfermedades sobre la incidencia del moho blanco de la lechuga (A) causada por *S. sclerotiorum* y sobre los rendimientos del cultivo (B) a los 83 días después del trasplante en el Centro de Investigación Tibaitatá (Mosquera). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos en torno al promedio (Incidencia n= 159; Rendimientos n= 15).

A pesar de las pérdidas de plantas por el moho blanco con el tratamiento MIP Cobertura, se observó que la presencia de la cubierta plástica en el suelo favoreció el crecimiento de las lechugas, y que durante todo el experimento éstas presentaron un mayor tamaño en comparación con las de los demás tratamientos, teniendo al finalizar aquí los mayores rendimientos (Figura 7B).

Con el fin de validar estos resultados en un nuevo experimento y para estimar la densidad de inóculo que quedaría en el suelo, dos semanas después de la cosecha se tomaron muestras de 3 plantas afectadas por *S. sclerotiorum* y se realizó el conteo de esclerocios producidos por el hongo. Se encontró que la mayor producción de ellos ocurrió en las plantas afectadas en las unidades experimentales del tratamiento MIP Cobertura con 232 esclerocios en promedio, mientras que en los demás tratamientos la cantidad de esclerocios formados fue más baja y similar entre ellos (Figura 8). Posiblemente esto se dió debido a que el hongo que infectó las plantas de este tratamiento encontró mayor volumen de tejido vegetal para desarrollarse y formó mayor cantidad de esclerocios.

Tercer experimento en el Centro de Investigación

En este experimento el nivel de incidencia de la enfermedad fue más bajo del que se presentó en el anterior, siendo inferior a 1,5% en todos los tratamientos (Figura 9A). Posiblemente ese bajo nivel se debió a las condiciones secas que predominaron durante el desarrollo del experimento (6 de Julio a 5 de Octubre

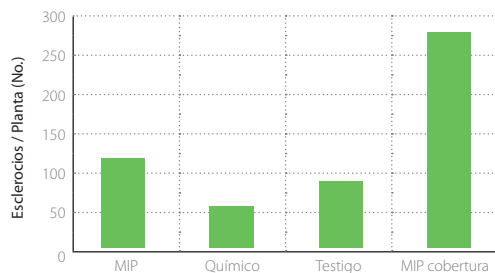


Figura 8. Producción de esclerocios en las plantas de lechuga afectadas por el hongo *S. sclerotiorum* en el segundo experimento en el Centro de Investigación.

de 2009), lo cual no favoreció el desarrollo del fitopatógeno a pesar de que en los tratamientos Químico y Testigo se aseguró una cantidad de inóculo mayor al de los otros tratamientos cuando se incorporaron los residuos vegetales de la cosecha anterior.

Aunque no hubo una consistencia clara entre los resultados de los dos experimentos en el Centro experimental para la variable de incidencia, el efecto de la cobertura plástica en el suelo sobre los rendimientos sí mantuvo alta consistencia (Figura 9B) y causó el mayor valor promedio de beneficio.

Segundo experimento en la finca comercial

La enfermedad se apreció en las plantas de lechuga después de un mes del trasplante, afectando 0,3% de la población con el tratamiento MIP y 0,6% con el convencional. En este último se observó un mayor progreso de la incidencia de la enfermedad durante

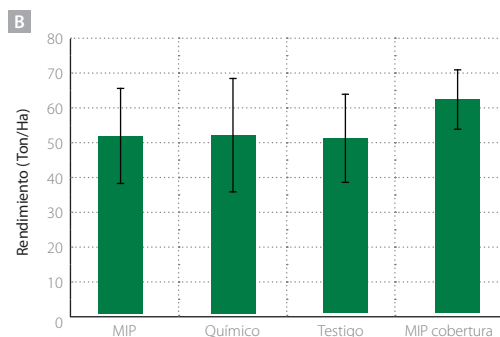
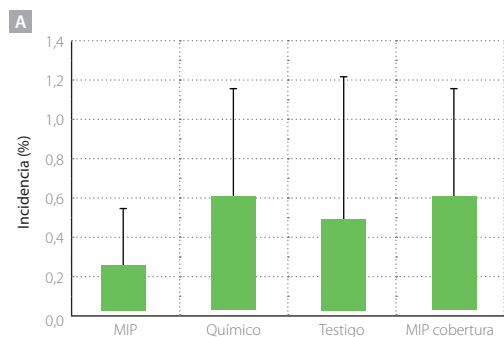


Figura 9. Validación del esquema de manejo integrado de la enfermedad moho blanco de la lechuga en el Centro de Investigación Tibaitatá (Mosquera). Incidencia de la enfermedad moho blanco causada por *S. sclerotiorum* (A) y rendimiento del cultivo (B) registrados a los 91 días después del trasplante. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos en torno al promedio (Incidencia n= 159; Rendimientos n= 15).

todo el tiempo del experimento, llegando hasta 4,5% a los 62 días después del trasplante (ddt), en comparación con la que se presentó con el tratamiento MIP que fue de 1,4%. Aunque la presencia de la enfermedad fue moderada en el cultivo, estos valores son consistentes con la incidencia que se presentó en el experimento de evaluación de estrategias MIP para el control del moho blanco, realizado en este mismo lote durante los meses de septiembre y noviembre de 2008 (primer experimento en finca comercial), en donde el testigo absoluto presentó la enfermedad en 4,4% después de 63 ddt.

Con los valores obtenidos se calculó la eficacia del tratamiento MIP la cual fue de 70%, muy similar a la del MIP (solarización y aplicaciones del bioplaguicida WG Th003) evaluado en el experimento anterior en este mismo lote, cuyo efecto fue de 74%. Esto sugiere que las dos formulaciones (WG y WP) a base del hongo *T. koningiopsis* Th003 presentan consistencia en la efectividad de control sobre *S. sclerotiorum*.

5.3.3 Efecto promotor de crecimiento de *T. koningiopsis* en plantas de lechuga

5.3.3.1 Metodología

Bioensayo en el Centro de Investigación

Con el fin de determinar el efecto del microorganismo antagonista *T. koningiopsis* sobre parámetros de

crecimiento vegetal, se llevo a cabo un experimento en condiciones de semillero donde se evaluó la pregerminación de las semillas de lechuga en presencia del hongo, su aplicación en el sustrato de siembra y en el período posterior a la siembra de esta hortaliza.

Se utilizó como material vegetal semillas de lechuga tipo batavia var. Van Max. y se midieron las variables emergencia de plántulas, peso seco de la raíz y peso seco foliar. Para las variables de emergencia se evaluaron los tratamientos descritos en la tabla 7.

Para el de la pregerminación de las semillas éstas se sumergieron durante 10 minutos en agua (tratamientos 3 a 6) o en una suspensión de conidios de *T. koningiopsis* Th003 (tratamientos 1 y 2), para lo cual se utilizó el producto WP en dosis de 10 g/L (concentración 1×10^7 conidios.mL⁻¹). Luego las semillas se colocaron en una bolsa de velo suizo y esta en un recipiente plástico con tapa con 200 g de cascarilla de arroz estéril y humedecida con agua, hasta con 80% de retención de humedad, durante 8 horas en condiciones de temperatura ambiente (14 °C).

Como sustrato de siembra se utilizó turba humedecida con agua (tratamientos 2,4 y 6) y con suspensión del producto WP Th003 en dosis de 1 g/L (tratamientos 1, 3 y 5) antes de llenar las bandejas de germinación.

Para evaluar la variable de peso seco se combinaron los tratamientos descritos en la tabla 7 con la aplica-

Tabla 7. Tratamientos evaluados en el semillero ubicado en el Centro de Investigación.

No.	Descripción del tratamiento	Abreviación
1	Semilla de lechuga pregerminada en presencia de Th003 y siembra en sustrato humedecido con suspensión de Th003	PThS
2	Semilla de lechuga pregerminada en presencia de Th003 y siembra en sustrato humedecido con agua	PTh
3	Semilla de lechuga pregerminada sin Th003 y siembra en sustrato humedecido con suspensión de Th003	PS
4	Semilla de lechuga pregerminada sin Th003 y siembra en sustrato humedecido con agua	P
5	Semilla de lechuga sin pregerminar y siembra en sustrato humedecido con suspensión de Th003	NPS
6	Semilla de lechuga sin pregerminar y siembra en sustrato humedecido con agua	NP

Tabla 8. Tratamientos para validar el uso del bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* Th003 en semillero de lechuga

No.	Descripción del tratamiento	Abreviación
1	Semilla de lechuga pregerminada en presencia de TricoTec WP durante 8 horas + sustrato de siembra humedecido con suspensión de TricoTec WP + Aplicación de TricoTec WP en drench a los 7 y 14 días después de la siembra + Aspersión de suspensión de TricoTec WP a los 21 días después de la siembra.	PThS
2	Semilla de lechuga convencional sembrada en sustrato de siembra humedecido con suspensión de TricoTec WP.	ThS
3	Semilla de lechuga convencional sembrada en sustrato de siembra humedecido con agua, como lo hace corrientemente el plantulador + Aspersión del fungicida Flutolanil (Moncut®) para el control de Damping off (<i>Rhizoctonia</i>) dos días después de la siembra + Aspersión del fungicida Carbofurán (Previcur®) para el control de mildew veloso a los 21 días después de la siembra.	Quí
4	Semilla de lechuga convencional sembrada en sustrato de siembra humedecido con agua, como lo hace corrientemente el plantulador + Aplicación de TricoTec WP en drench a los 7 y 14 días después de la siembra + Aspersión de suspensión de TricoTec WP a los 21 días después de la siembra.	Th Pos

ción del producto WP Th003 en suspensión (1 g/L) a los 14 días después de la siembra.

Diseño experimental y análisis de datos

Se usó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. La unidad experimental fue una bandeja de germinación de 200 cavidades con 100 semillas. La unidad de muestreo para la variable de peso seco consistió en 40 plántulas tomadas al azar a los 30 días después de la siembra. El porcentaje de emergencia y el peso seco se sometieron a un ANAVA y las diferencias entre tratamientos se determinaron a través de la prueba de Tukey (95%).

Experimento de validación en condiciones comerciales

Este experimento tuvo como finalidad validar los resultados de promoción del crecimiento vegetal obtenidos en el Centro de Investigación. Se efectuó en un invernadero de producción comercial de plántulas situado en el barrio El Diamante en Mosquera, Cundinamarca.

Para esto se seleccionó el tratamiento realizado para la pregerminación de la semilla de lechuga en presencia del bioplaguicida WP a base del hongo *T. koningiopsis* Th003 y se comparó con el tratamiento en el que la semilla se sembró en el sustrato turba humedecido con suspensión de WP Th003 (1 g/L), con un tratamiento en el que la semilla fue sembrada

convencionalmente y con otro en el que también fue sembrada así pero aplicando la suspensión después de la siembra (Tabla 8).

En este experimento de validación se utilizó como material vegetal lechuga tipo batavia var. Arizona.

Diseño experimental y análisis de datos

Se adoptó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. La unidad experimental consistió en una bandeja de germinación de 200 cavidades con 100 semillas de lechuga. La unidad de muestreo para la variable de peso seco consistió en 40 plántulas tomadas al azar a los 30 días después de la siembra. El porcentaje de emergencia y el peso seco se sometieron a un ANAVA y las diferencias entre tratamientos se determinaron a través de la prueba de Tukey (95%).

5.3.3.2 RESULTADOS

Experimento en Centro de Investigación

La práctica de pregerminación de la semilla tuvo un efecto positivo, ya que tres días después de la siembra, sólo con estos tratamientos se presentó la emergencia de las plántulas de lechuga y dos días más tarde fue más alta en comparación con los demás tratamientos. También se observó que la combinación de la pregerminación con la adición de la suspensión de *T. koningiopsis* Th003 al sustrato antes de la siembra, aumentó la velocidad de emergencia

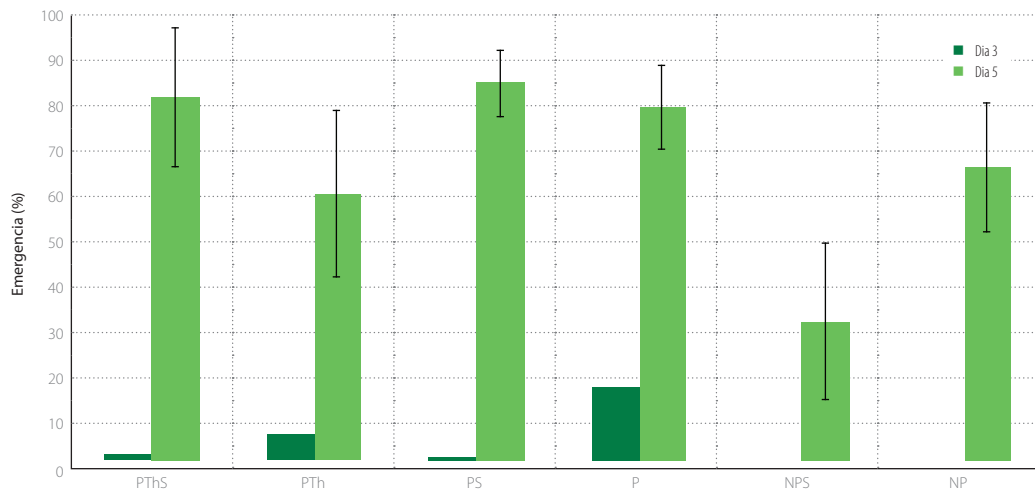


Figura 10. Efecto del uso del bioplaguicida WP a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la emergencia de plántulas de lechuga. El bioplaguicida fue incorporado a la superficie de la semilla (Th) durante la práctica de pregerminación controlada (P) o se incorporó al sustrato de siembra previamente (S). Como testigo se utilizó semilla de lechuga sin pregerminar (NP). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n = 4).

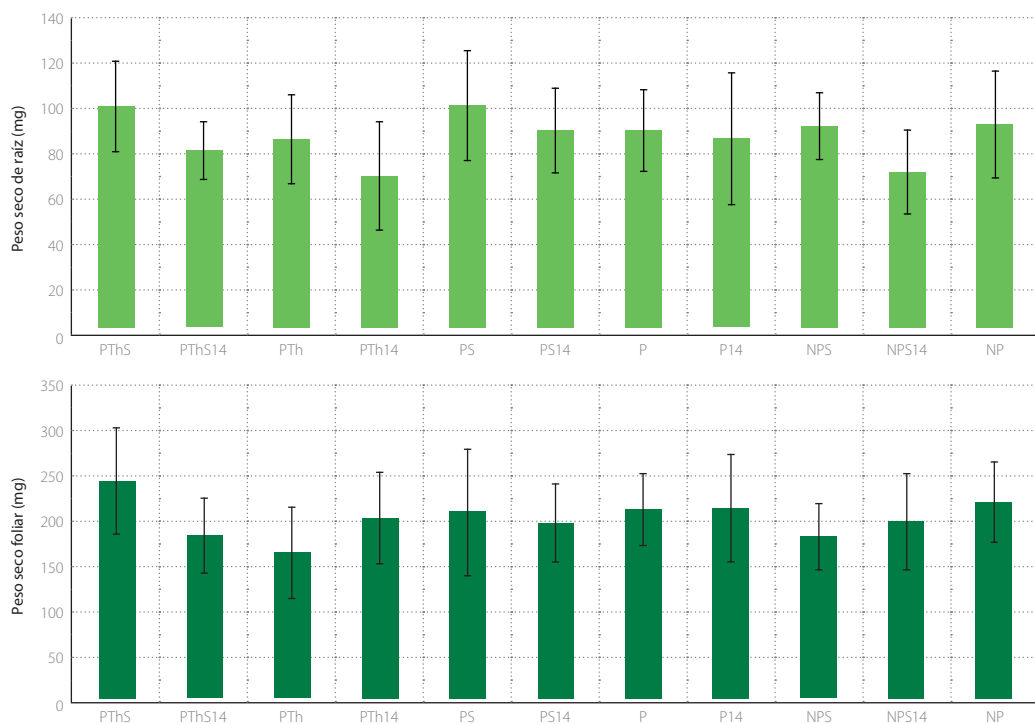


Figura 11. Efecto de la incorporación del bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* Th003 en el semillero de lechuga sobre la acumulación de biomasa 30 días después de la siembra. Además de los tratamientos mencionados antes, se evaluó también la aplicación de la suspensión del bioplaguicida en drench a los 14 días después de la siembra. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar de los datos entorno al promedio (n=40).

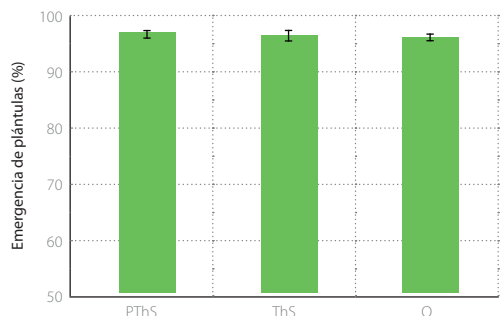


Figura 12. Efecto de *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la emergencia de plántulas de lechuga batavia var. Arizona 6 días después de la siembra. PThS: semilla pregerminada con el bioplaguicida WP Th003 y sembrada en turba humedecida con suspensión de bioplaguicida; ThS: semilla sembrada en turba humedecida con suspensión del bioplaguicida WP Th003; Q: semilla sembrada de forma convencional sin tratamiento biológico. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n= 10).

de la semilla, dado que después de 5 días de la siembra ésta fue más baja en los tratamientos donde no se pregerminó (Figura 10).

En general, no se detectó ningún efecto significativo de la adición del bioplaguicida WP Th003 después de la siembra,, sobre la acumulación de biomasa. Los valores más altos de peso seco, tanto de la raíz como de las hojas de las plántulas, se presentaron en el tratamiento donde las semillas

se pregerminaron en presencia de Th003 y se sembraron en sustrato humedecido con suspensión de Th003 (Figura 11).

Validación en invernadero comercial

Después de 6 días de la aplicación se observó una emergencia similar entre los tratamientos evaluados; aunque el empleo de *T. koningiopsis* Th003 en las plántulas mostró una emergencia ligeramente más alta en comparación con la siembra convencional, estos valores no fueron diferentes estadísticamente (Figura 12).

Aunque con la variable de emergencia no se detectaron diferencias importantes entre los tratamientos, la práctica de pregerminación de las semillas de lechuga en presencia del bioplaguicida WP Th003 si mostró un efecto notorio para el peso seco foliar, ya que después de cuatro semanas de la siembra esta variable presentó un valor significativamente más alto en comparación con los demás tratamientos (Figura 13). No obstante, el crecimiento de la raíz de las plántulas de lechuga no se afectó por la presencia de *T. koningiopsis* Th003 en la rizósfera.

5.3.4 Discusión

En los experimentos realizados bajo condiciones semicontroladas, el uso de *T. koningiopsis* Th003 para controlar la enfermedad moho blanco de la

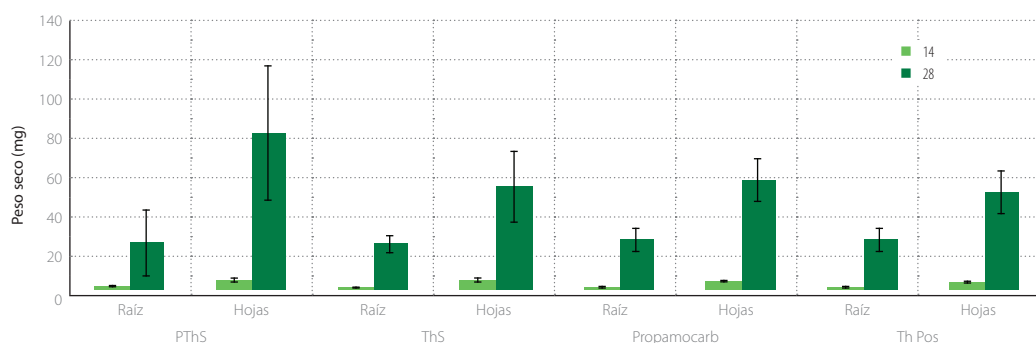


Figura 13. Efecto de *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la acumulación de biomasa en plántulas de lechuga batavia var. Arizona a los 14 y 28 días después de la siembra. PThS: semilla pregerminada con el bioplaguicida WP Th003 y sembrada en turba humedecida con el bioplaguicida en suspensión; ThS: semilla sembrada en turba humedecida con suspensión del bioplaguicida; Qui: semilla sembrada de forma convencional, aplicación en drench de Propamocarb (1 mL/L) inmediatamente después de la siembra y 14 días después; ThPos: semilla sembrada de forma convencional y tratada con suspensión del bioplaguicida a los 7, 14 y 21 días después de la siembra. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n= 100)

lechuga mostró alto potencial para incorporarlo en el cultivo. Aunque la aplicación directa del prototipo de bioplaguicida granulado presentó una eficacia más alta que la obtenida con la aplicación de la suspensión en drench, la viabilidad para realizarlo en campo se debe analizar desde una perspectiva económica, ya que se necesitarían 32,5 Kg de producto para emplearlo de forma localizada en 1 Ha de cultivo de lechuga; también resultaría una práctica dispendiosa, teniendo que invertir más en mano de obra.

Desde el punto de vista técnico una opción para incorporar el bioplaguicida granulado en el cultivo de lechuga consiste en hacerlo al voleo; sin embargo, de esta forma las posibilidades para que el hongo antagonista colonice la rizósfera de las plantas rápidamente son más bajas, comparada con la aplicación localizada.

Por las anteriores razones se debe procurar la utilización de los equipos para fumigación y los de riego para introducir el bioplaguicida en el sistema de producción de lechuga. En este aspecto es importante mencionar que la formulación WP Th003 tiene mayor viabilidad para usarla en comparación con la formulación WG Th003, dado que ésta última ha generado problemas de taponamiento de filtros y boquillas en los equipos. Además, teniendo en cuenta que la formulación WP Th003 redujo significativamente la enfermedad moho blanco, ésta fue la seleccionada para ser aplicada en campo.

Aunque los experimentos realizados en materia mostraron que las aplicaciones periódicas de los bioplaguicidas en drench no redujeron la incidencia de la enfermedad tan eficazmente como los demás tratamientos evaluados, podría pensarse que ésta práctica aumentó la humedad del suelo en la materia y favoreció el crecimiento del fitopatógeno y la infección, fenómeno que se espera no se presente en campo.

5.3.5 Conclusiones

El hongo antagonista *T. koningiopsis* Th003 mostró alta eficacia de control de la enfermedad moho blan-

co de la lechuga causada por el hongo fitopatógeno *S. minor* Sc001 en condiciones semicontroladas.

La forma de empleo en drench de los prototipos de bioplaguicida WG y WP a base de *T. koningiopsis* Th003 fue seleccionada para ser utilizada en los experimentos de campo.

El uso del bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* Th003 en un esquema de manejo integrado, que incluye su aplicación en el semillero de la lechuga y en el cultivo en combinación con la solarización del suelo, controló la enfermedad moho blanco de la lechuga y es una alternativa efectiva frente al uso convencional de fungicidas.

5.4 RECOMENDACIONES DE USO DEL BIOPLAGUICIDA A BASE DE *T. koningiopsis* EN CULTIVOS COMERCIALES DE LECHUGA

Uso en semillero de lechuga

Los resultados de las investigaciones realizadas mostraron que en el momento de la siembra el bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* Th003 puede incorporarse a la semilla mediante la práctica de pregerminación controlada. Para esto se debe utilizar una dosis de 10 g del bioplaguicida por litro de agua potable; 100 g de semilla se pueden sumergir en 200 mL de suspensión durante 10 minutos.

Como sustrato estéril para la pregerminación durante 8 horas se puede utilizar arena, escoria o cascarilla humedecidas hasta capacidad de campo (ver el capítulo de promoción de crecimiento).

Los resultados también mostraron la conveniencia de combinar la práctica de la pregerminación de la semilla con la incorporación del bioplaguicida para humedecer el sustrato de siembra o con la aplicación en drench de la suspensión del bioplaguicida

en dosis de 1 g/L de agua, a los 7 y 21 días y de forma foliar a los 28 días, después de la siembra.

Uso durante el cultivo

La práctica de solarización del suelo, previa a la aplicación del bioplaguicida WP a base de Th003, sería ideal para aumentar las posibilidades de colonización del hongo antagonista en la rizósfera de las plantas de lechuga y reducir así las infecciones por *S. sclerotiorum* y *S. minor*. Sin embargo, dado el esquema de uso del suelo en los sistemas de producción de hortalizas de la Sabana de Bogotá, en donde el agricultor no deja descansar el suelo por más de dos semanas antes de instalar un nuevo cultivo, se recomienda que el bioplaguicida sea aplicado en forma de drench inmediatamente después del trasplante. Para esto se debe preparar la suspensión de WP Th003 en dosis de 1 g/L y con una fumigadora de espalda dirigirla a la base de la

planta, aplicando 30 mL a cada una, accionando el gatillo de la lanza una sola vez y con su boquilla totalmente abierta

Después de esto se recomienda repetir la aplicación en drench del bioplaguicida a los 7 y a los 21 días después del trasplante y realizar dos fumigaciones foliares a los 28 y 42 días después del trasplante para proteger la superficie de las hojas de las infecciones causadas por ascosporas de *S. sclerotiorum* y por conidios de *Botrytis cinerea*.

Teniendo en cuenta que el nivel de incidencia de la enfermedad depende de la densidad del inóculo primario (esclerocios) de *S. sclerotiorum* y *S. minor* en el suelo, se recomienda utilizar un fungicida para el control de estos hongos fitopatógenos (Procimidona, Iprodione, Tebuconazole) cuando la incidencia de la enfermedad alcance un nivel de 5%.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Martín Díaz, auxiliar de campo del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica por el trabajo realizado.

REFERENCIAS

- Agrios, G. N. 1997. Plant pathology. 4a Ed. Editorial Academic Press. California, USA. 635 p.
- Begum, J., Bhuiyan, K. 2004. Effect of temperature and pH on *Trichoderma harzianum* and its sensitivity to fungicides. Bangladesh Journal of Plant Pathology, 20: 21–25.
- De Liñan, C. 1997. Farmacología vegetal. Compendium de las sustancias activas, insectos y ácaros utilizados en la prevención y control de plagas, enfermedades y plantas no deseadas así como en la regulación de la fisiología de los vegetales cultivados. Ed. Ediciones Agrotécnicas. España. 1176 p.
- Desai, S., Thammaiah, N., Kunkaliker, S. 2002. Fungicidal tolerance by *Trichoderma harzianum* Rifai-a biocontrol agent. Karnataka Journal of Agricultural Science, 15: 397–398.
- Elad, Y., Freeman, S. 2002. Biological Control of Fungal Plant Pathogens. Ed: K. Esser y J. W. Bennett (eds.). The Mycota XI. Ed. Springer – Verlag, Berlin. pp. 93-109.
- Figueras-Rota, M., Cristani, C., Vannacci, G. 1996. Sensitivity of *Trichoderma* isolates and selected resistant mutants to DMI fungicides. Crop Protection, 15: 615-620.
- Garzón, C., Villamizar, L., Cotes, A. M. 2002. Desarrollo y caracterización microbiológica y física de preformulados en polvo a base del hongo *Trichoderma koningii* para el control de fitopatógenos. En: Memorias XXIII Congreso Ascolfi. Nuevas Tendencias en Fitopatología. Bogotá D. C. 88 p.
- Harman, G., Latorre, B., Agosin, E., San Martin, R., Riegel, D., Nielsen, P., Tronsmo, A., Pearson, R. 1996. Biological and integrated control of Botrytis bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. Biological Control, 7: 259-266.
- Kosowski, R., Furlanetto, C., Tomita, C., Filho, A. 2001. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. Fitopatología Brasileira, 26: 662-666.
- Nallathambi, P., Padmanaban, P., Mohanraj, D., 2001. Fungicide resistance in sugarcane associated *Trichoderma* isolates. Journal of Mycology and Plant Pathology, 31: 125.
- Nallathambi, P., Umamaheswari, C., Joshi, H., More, T., Subramanian, K., Navale, A. 2008. Performance of bioagents under field conditions for the management of ber powdery mildew. In: Proceedings on National Seminar on Opportunities and Challenges of Arid Horticulture for Nutrition and Livelihood, 8–9th March, 2008. CIAH, Bikaner, 110 p.
- Pandey, K., Pandey, P., Mishra, K. 2006. Bio-efficacy of fungicides against different fungal bioagents for tolerance level and fungistatic behaviour. Indian Phytopathology, 59: 68–71.
- Ponmurugan, P., Baby, U., Gopi, C. 2006. Efficacy of certain fungicides against *Phomopsis theae* under *in vitro* conditions. African Journal of Biotechnology, 5: 434-436.
- Sharma, S., Mishra, A., Pandey, R., Patel, S. 2001. Sensitivity of *Trichoderma harzianum* to fungicides. Journal of Mycoogy and Plant Pathology, 31: 189–192.
- Shtienberg, D., Elad, Y. 2002. ¿Is it possible to cope with variability of biological control? (abstract) En: Y. Elad, J. Köhl & N. Delen (eds.). Program and Abstracts. Influence of Abiotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents. Seventh meeting of the IOBC/WPRS WG. Mayo de 2002. Turkey. Pine Bay, Kusadasi. pp. 19.
- Singh, S., Yadav, J., Chauhan, M. 2004. Sensitivity of *Trichoderma viride* to fungicides. Journal of Cotton Research and Development, 18: 109–110.
- Villamizar, L., Moreno, C., Paris, A., Cotes, A., Garzón, C. 2004. Development of biopesticide prototypes for controlling pathogens in vegetables. En: Diseases Biocontrol International Workshop: Development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food productions systems. Book of abstracts. Sevilla, España. Ediciones de la UdL. 136 p.