

UN PRODUCTO

 **Corpoica**
CORPORACIÓN COLOMBIANA
DE PROMOCIÓN Y DEFENSA
AGROPECUARIA

 **libra**
LABORATORIO
DE INVESTIGACIÓN
AGROPECUARIA

www.corpoica.org.co

56532

**DESARROLLO DE UN BIOPLAGUICIDA
A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003
Y USO EN EL CULTIVO DE LECHUGA
PARA EL CONTROL DEL MOHO BLANCO
(*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*)**

22719
3 cop



22719
3 cop.

33 EBLONIDA

56532



Libertad y Orden
República de Colombia
Ministerio de Agricultura y
Desarrollo Rural



Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*)



Moreno, C.A. y Cotes, A.M. (Eds.) 2010. Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*). CORPOICA. Bogotá, Colombia. 76 p

Palabras clave: MIP, Control biológico, *Trichoderma koningiopsis*, Bioplaguicidas, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, Lechuga

Publicación de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Financiada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - MADR, la Asociación Hortofrutícola de Colombia - ASOHOFRU-COL y la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Económico de la Gobernación de Cundinamarca



ISBN: 978-958-740-026-7
Código único interno: 1170
Código de agenda: PN25100046
Primera edición: Julio de 2010
Tiraje: 200 Ejemplares

EQUIPO TÉCNICO:

Investigadores

I. A. M. Sc. Carlos Andrés Moreno Velandia
Ph. D. Alba Marina Cotes Prado
Microbiólogo Alexander Smith May
Biólogo Camilo Rubén Beltrán Acosta
D. Sc. Laura Fernanda Villamizar Rivero
Ph. D. Martha Isabel Gómez Álvarez
I. Q. M. Sc. Andrés Díaz García
Q. F. Erika Paola Grijalba Bernal
Microbióloga M. Sc. Magda Xiomara García Rodríguez
I. Q. Fredy Mauricio Cruz Barrera
Microbióloga Adriana Marcela Santos Díaz

Estudiantes

Microbióloga Carolina Garzón Torres
Microbióloga Viviana Peña Páez
Microbióloga Lina Carolina Cruz Martínez
Microbióloga Zeidy Alejandra Martínez Pérez
Microbióloga Lina Gabriela Ordóñez Flórez
Microbióloga Eliana Cañón Amaya

Auxiliares de campo y laboratorio

Víctor Martín Díaz Rodríguez
Claudia Milena Mesa Barrera
Juan Carlos Barrios Murcia
Gabriela Perdomo
Aura María Salamanca

Agradecimientos a:

Dr. Yigal Elad investigador del Volcani Center, Israel; Asesor científico del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA.

Handwritten notes and stamps on the right side of the page:
A large 'X' mark.
The word 'Corpoica' written in cursive.
A date stamp: '25 AGO. 2010'.
A price stamp: '\$30.000'.

FOTOGRAFÍAS:

Carlos Andrés Moreno Velandia, Alexander Smith May, Laura Fernanda Villamizar Rivero, Fredy Mauricio Cruz Barrera.

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN:

Diego Villate

PRODUCCIÓN EDITORIAL:

Impresión y encuadernación



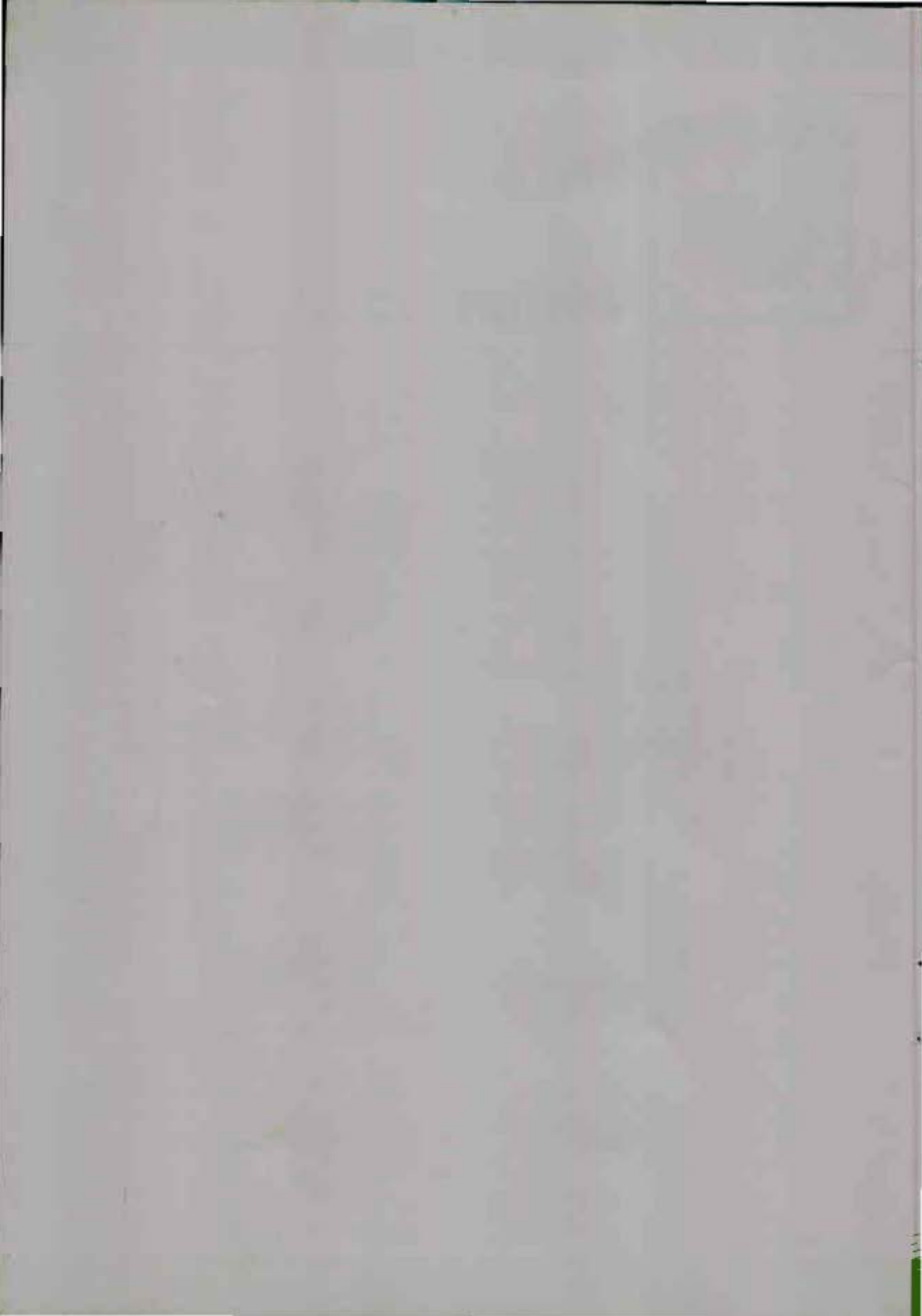
<http://www.produmédios.org>
Teléfono: 288 5338 - Bogotá, D.C.

Impreso en Colombia
Printed in Colombia
2010



CONTENIDO

- 9** DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA CAUSADA POR *Sclerotinia* spp. EN EL CULTIVO DE LECHUGA EN LOS MUNICIPIOS DE FUNZA, MADRID Y MOSQUERA (CUNDINAMARCA, COLOMBIA)
- 23** PRODUCCIÓN DE *Trichoderma koningiopsis* Th003
- 29** DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*
- 37** ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003
- 53** DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE MANEJO INTEGRADO DE LA ENFERMEDAD MOHO BLANCO DE LA LECHUGA QUE INCLUYE EL CONTROL BIOLÓGICO CON *Trichoderma koningiopsis* Th003





PRESENTACIÓN

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 (<http://www.cci.org.co/noticias.html>; http://www.eurep.org/fruit/index_html).

El cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) es afectado por una diversidad de patógenos siendo las especies *Sclerotinia minor* Jagger y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary los hongos que ocasionan las mayores pérdidas económicas. Este hongo se puede encontrar en todas las áreas del mundo en donde se produce lechuga tanto en campo abierto como en invernadero, produciendo pérdidas de plantas que pueden oscilar entre 10% y 50% (Nico, et al., 2001). Las dos especies de *Sclerotinia* presentan alta similitud en los aspectos biológicos y morfológicos, pero se diferencian en que *S. minor* produce esclerocios de menor tamaño y *S. sclerotiorum* produce apotecios frecuentemente, fenómeno que para el caso de *S. minor* ocurre raramente (Subbarao, 1998). En el caso de la región hortícola Sabana de Bogotá occidente, no se tiene conocimiento de la especie del fitopatógeno más predominante en las áreas de cultivo, lo cual sería importante saber para determinar los riesgos con respecto a la producción de inóculo (esclerocios y ascosporas), aspecto relevante para tomar decisiones de manejo de la epidemia.

La enfermedad moho blanco causada por *Sclerotinia* spp. presenta gran importancia dada su amplia

distribución en las regiones templadas y tropicales del mundo y las pérdidas que ocasiona en los cultivos afectados pues reduce los rendimientos y la calidad del producto cosechado. Dentro de este género, *Sclerotinia sclerotiorum* es la especie más ampliamente distribuida y la que tiene mayor importancia económica (Zhou y Boland, 1998), ya que tiene distribución mundial y un rango de hospederos de 408 especies vegetales de 75 familias dentro de los que se encuentran frijol, cítricos, melón, patilla (squash), soya, tomate, lechuga, pepino, apio, cilantro, repollo, brócoli, coliflor, zanahoria, tomate, pimentón, papa, uva, girasol, alcachofa, espárrago, remolacha y muchos cultivos ornamentales, entre otros (Boland y Hall, 1994) citados por (Zhou y Boland, 1998). Por su parte, *Sclerotinia minor* se presenta principalmente en zonas templadas (Smith et al., 1992) y tiene un rango de huéspedes menor que el de *S. sclerotiorum* que incluye lechuga, apio, zanahoria, soya, uva, girasol, maní y algunas pocas plantas adicionales. La fuente de inóculo primario de *Sclerotinia* spp. la constituyen los esclerocios en el suelo, los cuales pueden permanecer por varios años y el micelio presente en los residuos vegetales infectados de anteriores ciclos de cultivo (Jones, et al. 2004, 2004b).

La producción intensiva de lechuga en los municipios de la región Sabana de occidente en el departamento de Cundinamarca, se caracteriza por la dependencia exclusiva de fungicidas de síntesis química cuyo uso es permitido en otros cultivos diferentes, debido a que actualmente no existen variedades resistentes a este patógeno (Young, et al. 2004). Esta situación es particularmente grave si se tiene en cuenta el corto ciclo del cultivo de la lechu-

ga, que se consume como producto fresco y que además, por no haber productos registrados para este cultivo, no hay períodos de carencia definidos para la aplicación de fungicidas. Justamente el exagerado e indiscriminado uso de fungicidas por parte de los agricultores, aumenta los riesgos de contaminación ambiental, de desarrollo de resistencia y de residualidad de ingredientes activos en el producto de consumo.

Dadas las tendencias de cambio en los hábitos de consumo por alimentos sanos y el contexto actual de las negociaciones comerciales internacionales, es necesario plantear y dirigir esfuerzos de investigación, desarrollo y transferencia de tecnologías alternativas que fortalezcan la competitividad del cultivo de la lechuga en el país.

Dentro de las opciones para el manejo de la enfermedad mocho blanco, los tratamientos físicos al suelo tales como la solarización han demostrado efectividad. Con esta técnica se logra desinfectar el suelo al recubrirlo con una lámina plástica de polietileno de un espesor entre 0.025 y 0.1 mm durante un período de tiempo comprendido entre 4 y 6 semanas, pudiéndose efectuar riegos por debajo de la lámina durante ese lapso. Así se alcanzan temperaturas de 45 °C a 50 °C a una profundidad de 10 cm y de 38 °C a 45 °C a 20 cm, logrando destruir los esclerocios allí presentes, (Shlevin *et al.*, 2004).

Otra opción promisoría para el manejo del mocho blanco es el control biológico mediante la utilización de bioplaguicidas, formulados a base de microorganismos antagonistas nativos. Sin embargo, a pesar de la biodiversidad existente en el país, son pocos los estudios desarrollados que permitan obtener dichos bioplaguicidas, como el propuesto en el presente trabajo, cuyo principio activo es una cepa nativa del hongo *Trichoderma koningiopsis* (antes identificado como *Trichoderma koningii*) con demostrada actividad previa en varios pato-sistemas donde se han obtenido resultados de control entre 50% y 70%. Es el caso de *Pythium splendens* en frijol y pepino (Jacqmin *et al.*, 1993); *Rhizoctonia solani* en frijol (Mezui *et al.*, 1994); *Rhizoctonia solani* en papa (Beltrán *et al.*, 2007), *R. solani* y *Fusarium oxysporum*

f.sp. *lycopersici* en tomate (Cotes *et al.*, 2001); *Botrytis cinerea* y *Oidium* sp. en tomate (Moreno *et al.*, 2007); *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga (Cotes *et al.*, 2007) y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar *et al.*, 2004). Dichos modelos han involucrado actividades a nivel de laboratorio, pruebas experimentales en invernadero bajo condiciones controladas y en cultivos comerciales en campo abierto e invernadero.

El logro de un bioplaguicida implica el cumplimiento de diversas etapas técnicas que aseguren la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichos pasos comprenden el aislamiento del microorganismo y su conservación, la evaluación de su actividad biocontroladora, las investigaciones para conocer la ecología, fisiología y taxonomía del biocontrolador potencial, el estudio de los mecanismos de acción implicados en dicha actividad, su producción masiva, su formulación, la determinación de dosis, las formas y frecuencias de aplicación, la evaluación del producto en campo, los estudios de impacto ambiental y la caracterización molecular y/o huella genómica del microorganismo para lograr su posterior patentamiento, cuando este proceso aplique y dependiendo del país.

Una vez que se han obtenido aislamientos microbianos con potencial para ser usados en control biológico, es decir aquellos que no representan riesgo de ser patógenos humanos, animales o vegetales y que, de acuerdo con lo que se conozca de ellos, pueden ser usados en el control de un patógeno en particular, se les debe evaluar su actividad biocontroladora, para lo cual se desarrollan inicialmente bioensayos de laboratorio e invernadero que permiten identificar los aislamientos más promisorios para luego ser evaluados en campo. En esta última fase se determinan sus tiempos de acción y concentraciones mínimas efectivas y se definen tanto el tiempo como la cantidad de inóculo necesarios para lograr un control efectivo del fitopatógeno, cuando se aplica en condiciones de campo. Esta información complementada con el estudio de los mecanismos de acción involucrados en el control biológico, permite optimizar tanto su empleo como los sistemas de producción masiva para obtener un inóculo microbiano efectivo.

De otra parte, basados en el conocimiento sobre la ecología y la fisiología se determina el efecto de los factores medio-ambientales sobre su supervivencia y propagación natural y las condiciones necesarias para su producción masiva. En esta última etapa se busca producir altas cantidades de inóculo a bajo costo y que preserve sus características biocontroladoras, pues frecuentemente durante este proceso se produce una reducción de su actividad o de su supervivencia en condiciones de almacenamiento.

Luego de tener un inóculo microbiano efectivo, se somete a la fase de formulación con el fin de mejorar la eficacia del microorganismo, ya que permite la aplicación eficiente de éste, además se le confiere tolerancia a las condiciones medio-ambientales de campo y de almacenaje, ayudando a aumentar su vida útil. En la primera etapa de preformulación, se define el sistema de entrega del microorganismo (verbigracia: gránulos, polvos, suspensiones oleosas, etc.); con la información obtenida se establecen los parámetros de inestabilidad a los que éste se enfrentará cuando sea expuesto a condiciones de campo y almacenamiento, se seleccionan los auxiliares de formulación que permitan la obtención de prototipos de bioplaguicidas con adecuadas características y se seleccionan los más estables y eficientes. Basados en los resultados de los estudios de preformulación, se desarrollan los estudios de formulación, cuyo objetivo es lograr la combinación correcta de los ingredientes de tal manera que el ingrediente ac-

tivo junto con los auxiliares de formulación formen un bioplaguicida estable, efectivo, seguro, de fácil aplicación y aceptable para su uso. Este microorganismo formulado debe someterse tanto a estudios de vida útil para establecer por cuánto tiempo y en qué condiciones de almacenamiento puede mantenerse viable y eficiente, como a evaluaciones de campo para determinar su eficacia biocontroladora, lo cual permite su registro, producción industrial y comercialización.

En el presente trabajo se presenta parte de los resultados generados en los proyectos de investigación "Optimización tecnológica y evaluación de bioplaguicidas a base de *Trichoderma koningii* para el control de enfermedades en cultivos de tomate bajo invernadero" financiado por COLCIENCIAS durante los años 2005 a 2007 y "Generación de estrategias de manejo integrado de plagas en cultivos de lechuga, cilantro y espinaca bajo esquemas de producción limpia" financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural -MADR- y ASOHOFRUCOL durante los años 2006 a 2009. El bioplaguicida desarrollado a base de *Trichoderma koningiopsis* para el control de fitopatógenos del suelo y foliares, en este caso se evaluó sobre *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* en el cultivo de lechuga. Además, dado que para controlar un fitopatógeno es necesario conocer su biología, ecología y epidemiología, también se presentan los resultados de los estudios realizados en estos aspectos en condiciones de la región Sabana de Occidente, Cundinamarca.

Alba Marina Cotes Prado
Investigadora Ph. D. Principal
Centro de Biotecnología y Bioindustria
CBB CORPOICA

Carlos Andrés Moreno Velandia
Investigador M. Sc. Asistente
Centro de Biotecnología y Bioindustria
CBB CORPOICA

- Beltrán, C., Cotes, A. M., Paris, A. 2007. Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* Kühn. in potato. IOBC WPRS Bulletin, 30: 55-58.
- Corporación Colombia Internacional - CCI. 2004. Comunicación especial Programa de certificación de productos ecológicos; Acreditación Eurepgap. En línea: <http://www.cci.org.co/noticias.html>.
- Cotes, A. M., Lepoivre, P., Semal, J. 1996. Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. European Journal of Plant Pathology, 102: 497-506.
- Cotes, A. M., Cárdenas, A., Pinzón, H. 2001. Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. IOBC WPRS Bulletin, 24: 259-263.
- Cotes, A. M., Moreno, C. A., Molano, L. F., Villamizar, L., Piedrahita, W. 2007. Prospects for integrated management of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce. IOBC WPRS Bulletin, 30: 391-394.
- Jacqmin, B., Cotes, A. M., Lepoivre, P., Semal, J. 1993. Effect of the combination of seed priming and *Trichoderma* treatment on incidence of damping-off agents. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 58/3b: 1321-1328.
- Jones, E. E., Mead, A., Whipps, J. M. 2004b. Effect of inoculum type and time of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: control of *Sclerotinia* disease in glasshouse lettuce. Plant Pathology 53: 611 - 620.
- Jones, E. E., Mead, A., Whipps, J. M. 2004a. Effect of inoculum type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: influence on apothecial production. Plant Pathology 53: 611 - 620.
- Mezui, J. C., Cotes, A. M., Lepoivre, P., Semal, J. 1994. Evaluation of seed priming and *Trichoderma* treatment for the biological control of damping-off agents. In Diseases and Insects in Forest Nurseries. Ed. INRA, Paris (Les Colloques, N° 68), pp.189-196.
- Ministerio del Medio Ambiente-MMA; Sociedad de Agricultores de Colombia-SAC; Asociación Hortifructícola de Colombia-ASCHOFRUCOL; Fondo Nacional de Fomento Hortifructícola-FNFH. 2002. Guía Ambiental para el Subsector Hortifructícola. Produmedios Bogotá, D. C. 77 p.
- Moreno, C. A., Cotes, A. M., Guevara, E. 2007. Biological control of foliar diseases in tomato greenhouse crop in Colombia: selection of antagonists and efficacy tests. IOBC WPRS Bulletin 30: 59-62.
- Nico, A., Mónaco, C., Rollán, M. C., Dal Bello, G. 2001. Effect of organic amendments on survival and pathogenicity of sclerotia of *Sclerotinia minor*. IOBC WPRS Bulletin 24: 271.
- Shlevin, E., Mahrer, Y., Katan, J. 2004. Effect of moisture on thermal inactivation of soilborne pathogens under structural solarization. Phytopathology 94: 132 - 137.
- Smith, J. M., Dunez, J., Phillips, D. H., Lelliot, R. A., Archer, S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ediciones Mundiprensa Madrid. pp.671.
- Subbarao, K. V. 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. Plant Disease, 82: 1068 - 1078.
- Subbarao, K. V. 2002. Caída (Drop). En: Plagas y enfermedades de la lechuga. Ediciones Mundiprensa. The American Phytopathological Society. pp 19 - 21.
- 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. pp. 136.
- http://www.eurep.org/fruit/index_.html
- Zhou, T. y Boland, G. J. 1998. Biological control strategies for *Sclerotinia* diseases. En: Plant Microbe Interactions and biological control. Boland, G. J. y Kuykendall, L. D. (eds.), Editorial Marcel Dekker Inc. Nueva York. P. 127 - 156.

DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA CAUSADA POR *Sclerotinia* spp. EN EL CULTIVO DE LECHUGA EN LOS MUNICIPIOS DE FUNZA, MADRID Y MOSQUERA (CUNDINAMARCA, COLOMBIA)

Carlos Andrés Moreno M.Sc., Alexander Smith B.Sc.,
Alejandra Martínez B.Sc., Lina Ordóñez B.Sc.,
Camilo Rubén Beltrán B.Sc., Laura Villamizar D.Sc.
y Alba Marina Cotes Ph.D

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



CAPÍTULO 1

RESUMEN

La lechuga es una de las hortalizas de mayor consumo en Colombia; sin embargo, la incidencia de la enfermedad mohó blanco ha reducido los rendimientos del cultivo. En el país es escaso el conocimiento de las especies del hongo *Sclerotinia* que causan esta enfermedad así como de la respuesta del microorganismo a las moléculas químicas comúnmente usadas para su control. Teniendo en cuenta que conocer este problema es fundamental para tomar decisiones de manejo, el presente trabajo buscó generar información del estado actual de la problemática del mohó blanco de la lechuga. Para esto se realizaron muestreos de plantas enfermas en cultivos comerciales en los municipios de Funza, Madrid y Mosquera en donde se obtuvieron aislamientos y se determinó la especie del agente causal. Se hizo el seguimiento a la incidencia y se determinó el patrón de distribución espacial de la enfermedad en campo. Con los aislamientos del hongo se efectuó una prueba de patogenicidad *in vivo* sobre plantas de lechuga. Los hongos *S. sclerotiorum* y *S. minor* se observaron en los cultivos muestreados; en 75% de estos se encontró *S. sclerotiorum*, en 50% estuvo presente *S. minor* y en 25% de los casos se hallaron las dos especies. La incidencia de la enfermedad varió de 5% a 54% entre las fincas muestreadas y se vio que la producción de esclerocios en el tejido vegetal fue mayor para *S. minor*. Aunque en algunos cultivos comerciales de lechuga se apreciaron apotecios de *S. sclerotiorum*, la distribución espacial de la enfermedad fue agregada para ambas especies. El fungicida más utilizado por los agricultores para el control de la enfermedad es iprodione, pero en ningún cultivo se notó descenso o estabilidad de la epidemia. Por esta razón se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad *in vitro* en donde se observó que los fungicidas Iprodione, Proclimidona y Tebuconazole inhibieron totalmente el crecimiento de los aislamientos de *S. sclerotiorum* y *S. minor* obtenidos, sugiriendo que existen otros factores diferentes al hongo que reducen la eficacia de los fungicidas en campo. Los resultados también sugieren que se deben evaluar las formas, frecuencias y técnicas de aplicación de los fungicidas utilizados por los agricultores y otros métodos de control alternativos para aumentar la eficacia sobre la enfermedad mohó blanco de la lechuga.

1.1 INTRODUCCIÓN

El departamento de Cundinamarca representa un área importante para la producción de hortalizas en el país pues allí se realiza cerca de 72% de la producción de lechuga en Colombia (DANE, 2002), destacándose en esta actividad la región Sabana de Occidente, cercana a Bogotá, D.C. En este departamento se siembran al año alrededor de 383 ha con lechuga, con un rendimiento promedio de 22 t/ha, (DANE, 2002). Sin embargo, el área sembrada tiene la tendencia a aumentar debido al aumento en la demanda de este alimento, del cual una persona consume 0.52 Kg al año en Colombia (Agrocadenas, 2003).

A pesar de las buenas expectativas en la demanda, los rendimientos en el país son bajos comparados con los obtenidos en Estados Unidos y Bélgica, principales países productores con 38 y 37 t/ha respectivamente (FAO, 2009). Esta pérdida en los rendimientos se debe principalmente a la incidencia de la enfermedad mohó blanco, de la cual se conoce en varios países que es causada por las especies de hongos *S. sclerotiorum* y *S. minor* (Subbarao *et al.*, 1998), presentes en todas las regiones del mundo donde se produce lechuga y que causan pérdidas económicas importantes. En California por ejemplo, la principal zona productora de lechuga de los Estados Unidos, han registrado pérdidas de 60% y se estima que debido a esta enfermedad se pierden anualmente cerca de 150 millones de dólares en el mundo (Davis *et al.*, 2002).

En Colombia son pocos los estudios realizados para determinar la presencia de estos dos patógenos en el cultivo de lechuga y para cuantificar las pérdidas ocasionadas por los mismos, teniendo como referencia solamente los estudios de eficacia realizados en campo por Ávila de Moreno (1991) y Smith (2007) quienes encontraron una incidencia promedio de 46% a 68% en el testigo; y una incidencia cercana a 70%, según la comunicación personal de un productor de lechuga del municipio de Mosquera, citada por Pérez (2003).

Aunque no hay mayor claridad sobre la ocurrencia de las dos especies de *Sclerotinia* en el país, en el

directorio de fitopatógenos de Colombia, Buritica (1999) menciona la presencia del hongo *S. minor* en Cundinamarca, lo cual es importante en el presente tema ya que las especies *S. sclerotiorum* y *S. minor* presentan diferencias en su biología. *S. sclerotiorum* por ejemplo, tiene la capacidad de formar apotecios a partir de los esclerocios mientras que en *S. minor* esto no es frecuente (Abawi y Grogan, 1979; Subbarao, 1998), aspecto que también implica diferencias en la epidemiología de la enfermedad, que a su vez debería verse traducido en diferencias en la forma de control con respecto al tipo, la elección del sitio blanco y las épocas para tal control.

Además de la falta de claridad en el conocimiento de las dos especies que causan el moho blanco y de la magnitud de las pérdidas ocasionadas en Colombia, se sabe que aunque no existen fungicidas de síntesis química registrados ante el ICA para su uso en el cultivo de lechuga, los agricultores los utilizan con frecuencia y también que después de cuarenta años de empleo no se han realizado estudios para medir la sensibilidad de los fitopatógenos a estas moléculas. Teniendo en cuenta que la importancia de tener este conocimiento traería beneficios para el registro y uso correcto de métodos de control, reducción de costos de producción y por consiguiente aumento de competitividad para el sector, los objetivos del presente trabajo fueron precisar la incidencia de las especies de *Sclerotinia* en el cultivo de lechuga en los municipios de Funza, Madrid y Mosquera, cuantificar las pérdidas de rendimientos por causa de este hongo y determinar la sensibilidad de aislamientos del hongo a fungicidas comerciales.

1.2 METODOLOGÍA

1.2.1 Determinación del agente causal de la enfermedad moho blanco de la lechuga

Para obtener aislamientos del agente causal del moho blanco se colectaron muestras de lechuga (hojas, raíces o plantas completas) con síntomas y signos de la enfermedad, en 14 cultivos de los municipios de Funza (3), Madrid (5) y Mosquera (6). Estas

muestras se procesaron en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica (Mosquera), se tomaron esclerocios y trozos de micelio que fueron inoculados directamente en medio de cultivo PDA sintético suplementado con Cloramfenicol (250 mg/L; Merck). El medio de cultivo inoculado se incubó a 25 °C hasta observar crecimiento del micelio del hongo y se realizó la purificación de las colonias. Para la conservación de los aislamientos de los hongos se almacenaron esclerocios secos en viales de vidrio estériles. Durante el crecimiento de los aislamientos en el medio de cultivo se realizaron observaciones de las características microscópicas y macroscópicas del hongo con el fin de determinar la especie, teniendo en cuenta las características descritas por Hawthorne (1975) para el caso de *S. minor*, por Kohn (1979) para el caso de *S. sclerotiorum* y de Willets y Wong (1980).

1.2.2 Cuantificación de pérdidas por el moho blanco en cultivos comerciales

Para cuantificar las epidemias, se registró periódicamente la incidencia de la enfermedad en seis cultivos comerciales de lechuga tipo batavia a campo abierto, estableciendo áreas fijas de muestreo desde el trasplante. En tres de estos cultivos se utilizó una red para la muestra con un área de 1.000 m² en el centro del cultivo y en los otros tres se instalaron aleatoriamente 20 puntos de muestreo de 10 m de longitud (100 plantas aproximadamente) dentro de las camas de cultivo. Mediante el programa Sigma plot se determinó el modelo de crecimiento que más se ajustó a la curva de incidencia obtenida en cada caso.

1.2.3 Estimación del patrón de distribución espacial de la enfermedad en campo

Los datos de incidencia de la enfermedad obtenidos en los cultivos donde se utilizó la red de cuadrantes para el muestreo, fueron utilizados para determinar la distribución espacial de la enfermedad. El tamaño de los cuadrantes fue de 2 m de longitud paralela a la cama de cultivo y de 1,7 m de ancho (igual al ancho de la cama). Para caracterizar el modelo espacial

de la incidencia se aplicaron herramientas del análisis geostadístico, como los mapas de contorno y los semivariogramas mediante el programa GS + 9.0.

1.2.4 Prueba de patogenicidad de *Sclerotinia* spp. en plantas de lechuga

Con el fin de comprobar la patogenicidad de los aislamientos de *Sclerotinia* obtenidos y de estandarizar una metodología para reproducir la enfermedad en condiciones de invernadero, se seleccionaron dos aislamientos identificados como *S. minor* y *S. sclerotiorum* y codificados como Sc001 y Sc002 respectivamente. Estos hongos se multiplicaron en sustrato estéril de cebada perlada (25 g) dispuesta en Erlenmeyer de 250 mL, suplementada con agua destilada (50 mL), y se le adicionaron 5 discos (0.5 cm de diámetro) de medio de cultivo PDA con crecimiento del hongo. El sustrato de crecimiento inoculado se incubó durante una semana en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente (15 °C), tiempo después del cual se formaron esclerocios que fueron cosechados y secados durante una hora en una cabina de flujo laminar horizontal. Estos esclerocios se utilizaron como inóculo para la prueba de patogenicidad y se evaluó el efecto de diferentes densidades (2, 5, 8 y 11 esclerocios) sobre la incidencia de la enfermedad en plantas de lechuga sembradas en materas con suelo (4 kg). Para inocular los esclerocios se llenó la matera hasta ¾ de su capacidad, el ¼ de sustrato restante se mezcló con el inóculo y posteriormente se adicionó a la matera. Finalmente se rea-

lizó el trasplante de plántulas de lechuga tipo batavia variedad Vanmax de 4 semanas de edad. La unidad experimental consistió en 10 plantas y el diseño utilizado fue el de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Mediante ANAVA se determinaron los efectos significativos de los tratamientos sobre la incidencia del moho blanco y se hicieron comparaciones de promedios de tratamientos mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

1.2.5 Determinación de la sensibilidad de aislamientos de *Sclerotinia* a fungicidas

Con el fin de determinar el estado de sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *S. sclerotiorum* y *S. minor* provenientes de cultivos comerciales, se evaluó el efecto *in vitro* de Benomil, Iprodione y Procimidona (ingredientes activos utilizados con frecuencia en el cultivo de lechuga en la zona de estudio) y de Boscalid, Kresoxim-metil y Tebuconazole (moléculas utilizadas en otros países en el control de *Sclerotinia* spp.), poniendo a crecer el hongo en medio de cultivo PDA suplementado con cada fungicida. Para esto se seleccionó un aislamiento de cada especie para los municipios de Funza, Madrid y Mosquera. Para la selección de las dosis de los fungicidas se tuvo en cuenta la dosis más alta de ingrediente activo recomendada para el producto comercial y arbitrariamente se evaluó también 1/2, 2/3, 3/2 y el doble de la dosis comercial (Tabla 1). Como inóculo se utilizaron cultivos de los hongos de seis días de edad, provenientes del segundo subcultivo después de la reactivación de

Tabla 1. Fungicidas seleccionados para la prueba de sensibilidad *in vitro* de *Sclerotinia* spp.

Fungicida	Dosis (ppm)					
	1	2	3	4 Dosis recomendada	5	6
Benomil	0,0	125,0	166,7	250,0	375,0	500,0
Boscalid	0,0	300,0	400,0	600,0	900,0	1200,0
Tebuconazole	0,0	0,5	0,7	1,0	1,8	2,0
Iprodione	0,0	0,3	0,3	0,5	0,8	1,0
Kresoxim-metil	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3
Procimidona	0,0	250,0	333,3	500,0	750,0	1000,0

los aislamientos conservados. Para la preparación de los medios de cultivo con fungicida, se hizo una solución stock con base en la dosis recomendada y la solubilidad de cada uno de los fungicidas. El volumen requerido de solución fungicida fue adicionado al medio PDA estéril con una temperatura aproximada de 45 °C, se agitó manualmente para homogeneizar la mezcla y luego se sirvió en cajas de Petri. El inóculo obtenido anteriormente se colocó en el centro de la caja de Petri que contenía el medio PDA-fungicida, con el micelio en contacto con el agar y se llevó a incubar en condiciones de oscuridad y a 25 °C durante 8 días. Diariamente se midió el diámetro de la colonia (dos diámetros perpendiculares que fueron promediados) y finalizado el ensayo se registró el número de esclerocios producidos. El experimento se efectuó mediante un diseño experimental completamente aleatorio con tres repeticiones y la unidad experimental consistió en una caja de Petri. Para cada aislamiento evaluado se incluyó un testigo absoluto en el cual no se adicionó fungicida al medio de cultivo. Durante ocho días se registró el diámetro de la colonia de hongo y se realizaron observaciones de la colonia para detectar efectos sobre la morfología. Se determinó la velocidad de crecimiento micelial mediante un análisis de regresión lineal entre el diámetro de la colonia y el tiempo de incubación para cada repetición, con

ayuda del programa Excel de Microsoft Office 2007* y estos valores fueron sometidos a un ANAVA y a una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando el programa Statistix® 1.0. También se estimó el porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislamientos debido a la acción del fungicida.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Agente causal del moho blanco de la lechuga

Los cultivos de lechuga muestreados entre los años 2006 a 2008 (en 14 fincas) presentaron tamaños de 1 a 3 Ha, en las veredas San Francisco, San José y San Jorge (de Mosquera), El Corzo (de Madrid) y Tres Esquinas, La Isla y México (de Funza). Durante todo el ciclo de cultivo se apreciaron síntomas tales como marchitamiento de hojas externas y decaimiento generalizado de la planta, lesiones de color marrón en el tejido foliar, pudrición blanda acuosa, crecimiento de micelio color blanco sobre el tejido y formación de esclerocios (Figura 1). Tanto en las plantas de lechuga como en el medio de cultivo en las cajas de Petri se observaron aislamientos cuyos esclerocios fueron de dos tipos: unos de forma irregular, apla-



Figura 1. Síntomas y signos de la enfermedad moho blanco de la lechuga causados por *S. minor* (fotografías en la fila superior) y *Sclerotinia sclerotiorum* (fotografías en la fila inferior). Obsérvese la formación de esclerocios de los hongos sobre el tejido foliar.

Tabla 2. Producción de esclerocios en la superficie de plantas de lechuga afectadas por el moho blanco.

	Producción de esclerocios en el tejido vegetal en campo (No.)				Dimensiones de los esclerocios de campo (mm)		
	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación estándar	Tamaño de muestra	Ancho	Largo
<i>S. sclerotiorum</i>	2,0	132,0	42,6	37,7	19,0	2,4 a 3,7	4,2 a 6,0
<i>S. minor</i>	1,0	1266,0	206,9	306,9	27,0	1,7 a 1,8	

nados y de mayor tamaño y otros de forma redondeada y más pequeños; aquellos de forma irregular formaron esclerocios de forma radial o concéntrica en la caja de Petri, mientras que los aislamientos de esclerocios pequeños los formaron de manera uniforme (Figura 1). De acuerdo con estas características los primeros fueron clasificados como *S. sclerotiorum* y los otros como *S. minor*. Se determinó que la especie *S. sclerotiorum* estuvo presente en 50% de las fincas muestreadas, *S. minor* en 29% y que 21% de las fincas presentaron las dos especies de *Sclerotinia* en el cultivo. En campo se observó que *S. minor* produce mayor cantidad de esclerocios sobre las plantas afectadas comparada con *S. sclerotiorum* (Tabla 2).

1.3.2 Incidencia del moho blanco en cultivos comerciales de lechuga

La incidencia de la enfermedad varió entre 12 y 33% para el caso de *S. sclerotiorum* mientras que para *S. minor* se presentó entre 25 y 51%. Cuando los dos patógenos se presentaron en una misma área, la enfermedad alcanzó una incidencia de 45%

(Figura 2). Lo importante para destacar en este aspecto es que a pesar del uso de los fungicidas recomendados para el control de *Sclerotinia* spp., en ningún caso se apreció una estabilidad de la curva de progreso de la epidemia. En la mayoría de los casos los agricultores aplican los fungicidas Iprodione y Procimidona, en otros casos emplean Captan y Validamicina, con 10 aplicaciones por ciclo de cultivo, lo cual representa en promedio 17% de los costos totales de producción en una Ha, incluyendo la mano de obra para realizar las aplicaciones.

1.3.3 Distribución espacial del moho blanco en el cultivo de lechuga

Según los semivariogramas omnidireccionales de la incidencia de la enfermedad, no hubo dependencia espacial entre cada punto de muestreo para los cultivos ubicados en las fincas La Fragua (vereda San Jorge, Mosquera), Lagunilla (vereda Tres esquinas, Funza) y San Nicolás (vereda El Corzo, Madrid). En los semivariogramas se presentó un efecto pepita, es decir que la semivarianza fue muy similar a la va-

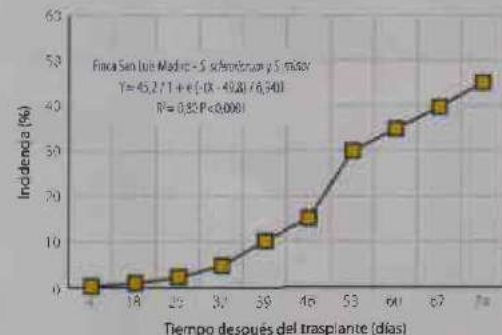
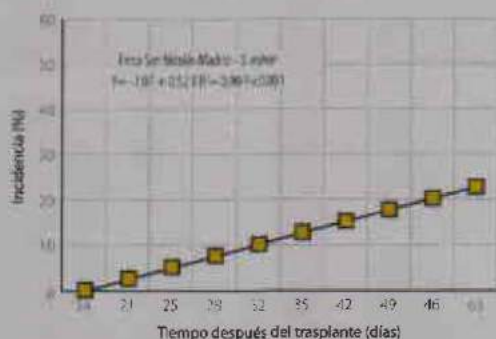


Figura 2. Curvas de progreso de la incidencia de la enfermedad moho blanco de la lechuga en cultivos comerciales. Durante el ciclo de cultivo el agricultor aplicó fungicidas y realizó sus prácticas agronómicas de rutina.

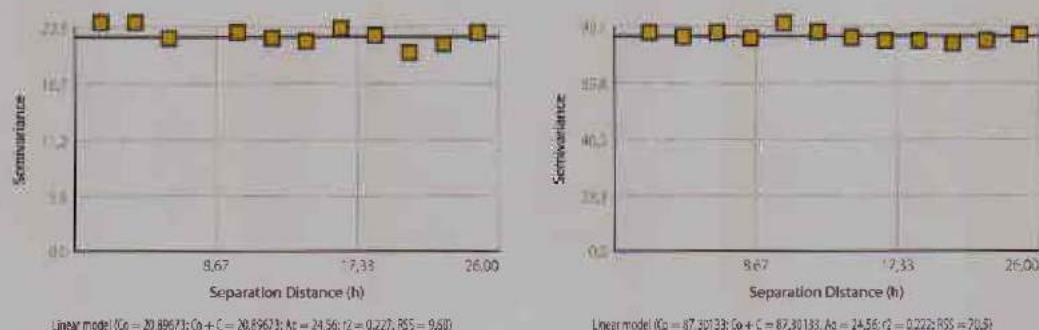


Figura 3. Semivariogramas obtenidos para la incidencia de la enfermedad moho blanco causada por *S. minor* en la finca San Nicolás, Madrid. Izquierda: muestreo realizado 21 días después del trasplante. Derecha: muestreo realizado 63 días después del trasplante.

rianza de la muestra (Figura 3). El efecto pepita que muestran los semivariogramas también es un indicador de baja correlación espacial de la enfermedad causada por las especies *S. sclerotiorum* (Funza) y *S. minor* (Mosquera y Madrid).

La incidencia de la enfermedad en el área de muestreo se inició a partir de pequeños focos hasta focos con altos niveles de incidencia durante el final del ciclo del cultivo (Figura 4).

1.3.4 Patogenicidad de *Sclerotinia* spp.

Las plantas de lechuga inoculadas con las cepas de *S. sclerotiorum* Sc002 y *S. minor* Sc001 presentaron síntomas de la enfermedad moho blanco, los cuales fueron similares para las dos especies. Estos síntomas fueron pérdida de turgencia de hojas externas, amarillamiento y necrosis de hojas viejas y posterior desarrollo de micelio color blanco sobre el

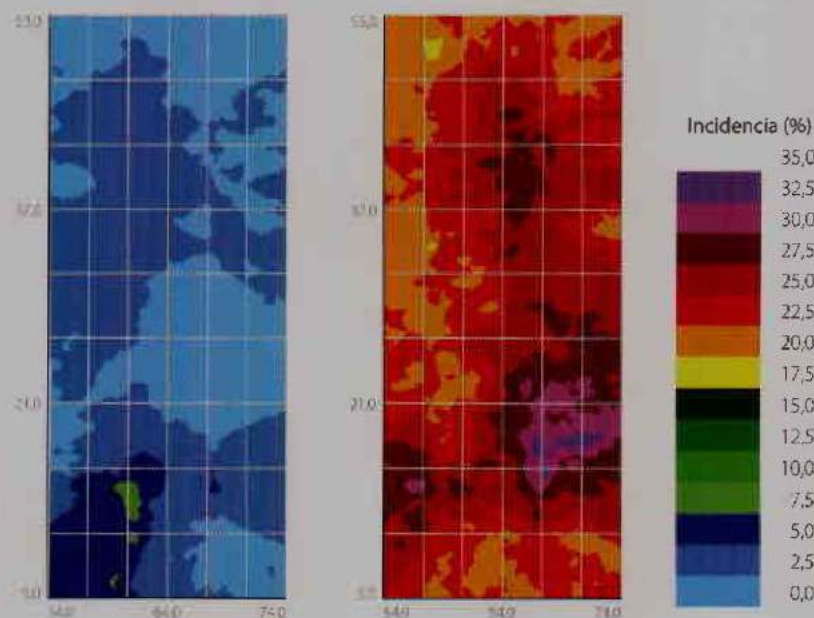


Figura 4. Mapas de contorno 2D de la incidencia de la enfermedad moho blanco de la lechuga causada por *S. minor* en la finca San Nicolás, Madrid, para los muestreos realizados 21 días (izquierda) y 63 días (derecha) después del trasplante. La barra de colores muestra la escala de incidencia.



Figura 5. Síntomas y signos de la enfermedad moho blanco de la lechuga causada por *S. minor* Sc001 en las plantas de lechuga establecidas en materas. Antes del trasplante el sustrato se inoculó con esclerocios del patógeno.

tejido infectado (Figura 5), lo cual coincidió con la descripción de síntomas realizada por Bolton y colaboradores (2006) y Subbarao (1998). Después de la formación del micelio se produjo la formación de esclerocios, cuya diferencia entre las dos especies de *Sclerotinia* spp. radicó en el tamaño de ellos.

El ANAVA mostró efectos significativos de la densidad de esclerocios inoculados en las materas sobre el grado de incidencia de la enfermedad causada por *Sclerotinia* spp. en las plantas de lechuga.

La enfermedad moho blanco se presentó primero en las plantas inoculadas con *S. sclerotiorum* (9 días después de la inoculación) mientras que en las unidades experimentales inoculadas con *S. minor* la enfermedad se apreció desde el día 26 después de la inoculación. En ambos casos la densidad de 11 esclerocios causó la incidencia significativamente más alta (48 y 27% respectivamente). Sin embargo, *S. minor* causó mayor presencia de la enfermedad en comparación con *S. sclerotiorum* en todas las densidades de inóculo utilizadas (Figura 6).

Los mayores porcentajes de incidencia de *S. minor*, podrían ser atribuidos a causas endógenas de los esclerocios, ya que Lumsden (1979) describió que los esclerocios de *S. minor* poseen reservas energéticas, lo cual permite la directa penetración de la cutícula de la planta de lechuga por las hifas, mientras que en la germinación micelológica de *S. sclerotiorum*, las hifas inicialmente deben nutrirse y desarrollarse.

Cincuenta y cuatro días después del trasplante se apreció la formación de apotecios en la superficie del sustrato de crecimiento de las plantas de lechuga inoculadas con el hongo *S. sclerotiorum* (Figura 7). En Colombia no existían reportes de la formación de apotecios de *Sclerotinia* sp.; sin embargo, bajo las condiciones experimentales y también en campos de cultivo del municipio de Mosquera, durante el desarrollo de la presente investigación fue posible observar dicho fenómeno. Esto indica la posibilidad de que en nuestras condiciones (Sabana de Bogotá) ocurra la dispersión de la enfermedad moho blanco a través de ascosporas, además de la forma usual de producción de esclerocios como estructuras de resistencia.

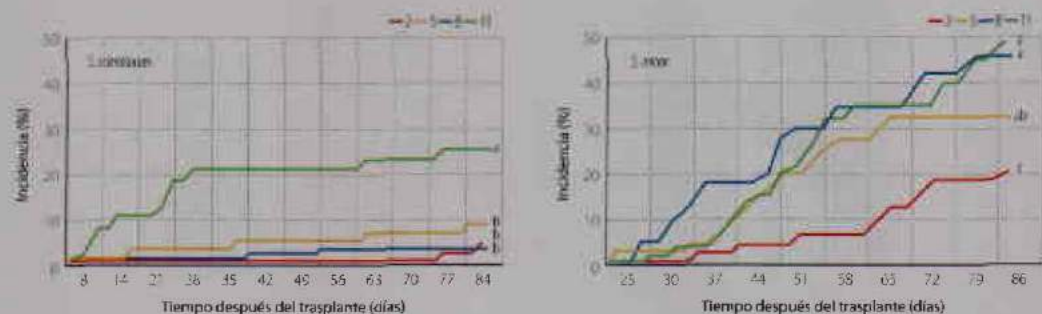


Figura 6. Efecto de la densidad de inóculo de *S. sclerotiorum* Sc002 (izquierda) y *S. minor* Sc001 (derecha) sobre la incidencia de la enfermedad moho blanco. Los marcadores al final de cada serie con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$).



Figura 7. Apotecios de *S. sclerotiorum* Sc002 formados sobre el sustrato de crecimiento de las plantas de lechuga en las materas.

Los resultados de esta prueba de patogenicidad son útiles para implementarse en pruebas de eficacia de métodos de control de la enfermedad en condiciones controladas y para medir la susceptibilidad de aislamientos de *Sclerotinia* a fungicidas químicos.

1.3.5 Efecto de fungicidas sobre *Sclerotinia* spp.

Después de ocho días de contacto los ingredientes activos Iprodione, Procimidona y Tebuconazole, in-

hibieron el crecimiento de los seis aislamientos de los hongos *S. sclerotiorum* (Sc002, Sc006, Sc008) y *S. minor* (Sc001, Sc005, Sc007), sugiriendo así una alta sensibilidad de estos hongos a las moléculas, por lo que la Procimidona podría ser un fungicida con alto potencial para el control de *Sclerotinia* spp. en el cultivo de lechuga (Tabla 3).

Los fungicidas Iprodione y Procimidona pertenecen al grupo químico de las dicarboxamidas, moléculas que afectan principalmente el crecimiento de los hongos y en menor razón la germinación de las

Tabla 3. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc001 expuesto a la dosis recomendada de diferentes fungicidas.

Tratamiento	Coefficiente de correlación (R ²)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)	Desviación estándar	Grupos homogéneos (Tukey 95%)
Testigo	0,97	20,72	0,85	a
Kresoxim-metil	0,96	18,82	0,30	b
Boscalid	0,98	9,21	0,58	c
Benomil	0,84	0,27	0,21	d
Iprodione	-	0,00	0,00	e
Procimidona	-	0,00	0,00	e
Tebuconazole	-	0,00	0,00	e

esporas (De Lián, 1997; Damicone, 2000; Beltrán *et al.*, 2006; Pappas y Fisher, 2006), efecto debido a la inhibición de la biosíntesis de quitina y de los triglicéridos de las membranas biológicas, por alteración oxidativa de sus componentes (Pappas y Fisher, 2006).

El Iprodione ha sido empleado para el manejo de moho blanco en lechuga en algunos países con resultados satisfactorios de control (Hubbard *et al.*, 1997), así como también para otro tipo de fitopatógenos (Hisada *et al.*, 1978; Pappas y Fisher, 2006). Según De Lián (1997) este fungicida se recomienda para el manejo específico de *S. minor* en cultivos de lechuga a una concentración de 0,5 ppm.

En Colombia existe una gran variedad de fungicidas a base de Iprodione, el cual es empleado por los agricultores frecuentemente para el control de varias enfermedades en flores de corte (clavel, crisantemo y rosas), hortalizas (tomate, cebolla y papa) (ICA, 2008) y lechuga, aunque para ésta última no hay ningún fungicida registrado.

En países como España, la Proclimidona está recomendada para el control del moho blanco (Terralia,

2009). En Colombia este producto se encuentra registrado para el control de *Botrytis* spp en clavel, pero no para el manejo de *Sclerotinia* spp. en lechuga.

Desde el año 1994 se encuentran registrados varios fungicidas con el principio activo Tebuconazole en el mercado colombiano de productos fitosanitarios. Sin embargo, el uso convencional de esta molécula ha sido principalmente en arroz, banano, cebolla de bulbo, cebolla de rama y tomate (ICA, 2008) pero no se tiene información sobre su uso en el cultivo de lechuga. En otros países como Estados Unidos, este insumo ha sido empleado en el control de enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* en cultivos de soya y canola (Mueller *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 2006) pero no se ha descrito su uso en el cultivo de lechuga.

Por el contrario, en el presente estudio la molécula Kresoxim-metil permitió el desarrollo de los hongos (Tabla 3), aunque afectó la producción de esclerocios y las características morfológicas de las colonias. Con el fungicida Benomil, se observaron cambios en la textura de las colonias de los aislamientos utilizados así como también una inhibición en la producción de los esclerocios. En el caso del fungicida Boscalid, todos los aislamientos conserva-



Figura 8. Efecto del Ingrediente activo Kresoxim-metil en la morfología de las colonias de los 6 aislamientos de *Sclerotinia* sp. de la Sabana de Bogotá. (T = Testigo absoluto, 1 = 0,063 ppm, 2 = 0,083 ppm, 3 = 0,125 ppm, 4 = 0,188 ppm, 5 = 0,25 ppm). A. Aislamiento Sc001 (*S. minor*). B. Sc002 (*S. sclerotiorum*). C. Sc005 (*S. minor*). D. Sc006 (*S. sclerotiorum*). E. Sc007 (*S. sclerotiorum*). F. Sc008 (*S. minor*).

ron sus características pero este fungicida impidió la formación de los esclerocios (Figura 8). Algunos aislamientos presentaron baja sensibilidad a los fungicidas Kresoxim-metil, Boscalid y Benomil mientras que otros fueron altamente sensibles, insinuando una variabilidad genética entre los aislamientos de *Sclerotinia* sp., la cual debe ser estudiada.

El ingrediente Kresoxim-metil pertenece al grupo químico de las Estrobilurinas (De Liñán, 1997), compuesto que es un metabolito secundario segregado de forma natural por el hongo Basidiomiceto *Strobilurus tenacellus* (International Programme on Chemical Safety, 2009). Kresoxim-metil interfiere en la síntesis de Adenosín trifosfato (ATP), la principal fuente de energía de la célula, ocasionando la alteración de una gran cantidad de procesos bioquímicos vitales y en consecuencia afectando severamente el crecimiento y el desarrollo del hongo (Pesticide Safety Directorate, 1997; Carmona, 2006).

Aunque en Colombia se encuentra registrado este producto fungicida desde el año 1999 (ICA, 2009), no se posee información con respecto al control de *Sclerotinia* sp. en lechuga. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO – el ingrediente activo de este fungicida es utilizado para prevenir las enfermedades ocasionadas por *Sclerotinia* spp. y *Botrytis* spp. en cultivos de tomate, pero no para lechuga (FAO, 2009). De la misma manera, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos indica que esta molécula no está registrada para el control de *Sclerotinia* spp. en lechuga, sino para el manejo de mildew polvoso en flores (EPA US, 2009).

La molécula Benomil pertenece al grupo químico de los Benzimidazoles (De Liñán, 1997) la cual inhibe la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio a bajas concentraciones (Leroux et al., 2002; citado por Pérez, 2003), ya que bloquea el proceso de división celular de los hongos por medio de su transformación dentro de la célula en la molécula de metilbenzimidazol-2-il carbamato (Carbendazim o MBC) y posteriormente en un mononucleótido activo (De Liñán, 1997; Terralía, 2009). En Colombia se encuentran registrados varios productos a base de

este ingrediente activo para ser utilizados en arroz, fresa, frijol y clavel, pero no se recomiendan para el manejo de la enfermedad moho blanco de la lechuga (ICA, 2008).

Boscalid es una molécula que pertenece al grupo químico de las carboximidaz, el cual inhibe la esporulación, la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de las esporas e impide el crecimiento del micelio del hongo (BASF, 2006). Este ingrediente activo también interfiere con la respiración de la mitocondria debido a la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa (Stammler y Speakman, 2006).

En Europa, el Boscalid ha sido empleado como una herramienta eficiente para el control de *S. sclerotiorum* (Stammler et al., 2007). En Estados Unidos ha demostrado alta eficacia en el manejo de enfermedades en canola y frijol ocasionadas por *S. sclerotiorum* como la pudrición del tallo y el moho blanco respectivamente (Matheron y Porchas, 2004; Bradley et al., 2006).

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, Boscalid está recomendado para el control de enfermedades en cultivos de hortalizas y frutas en general, inclusive de la lechuga (EPA US, 2009). Aunque en Colombia los productos Cantus y Cumora que contienen éste principio activo se encuentran registrados desde el año 1998, únicamente están recomendados para enfermedades en rosa y banano respectivamente y no para el control de *Sclerotinia* spp. en lechuga (ICA, 2008).

El presente estudio establece un punto de referencia sobre el estado de la sensibilidad de los fitopatógenos *S. sclerotiorum* y *S. minor* en los cultivos de lechuga de los municipios de Funza, Madrid y Mosquera, Cundinamarca.

1.4 CONCLUSIONES

Los hongos *S. sclerotiorum* y *S. minor* son los agentes causales de la enfermedad moho blanco de la lechuga en las zonas productoras de los municipios de Funza, Madrid y Mosquera Cundinamarca.

El hongo *S. sclerotiorum* tiene la capacidad de formar apotecios en las condiciones ambientales de las zonas productoras de lechuga estudiadas, por lo que se deben contemplar estrategias de protección dirigidas a controlar el inóculo del hongo en las superficies aéreas de las plantas de esta hortaliza.

Los aislamientos de los hongos *S. sclerotiorum* y *S. minor* obtenidos de cultivos comerciales de lechuga presentaron alta sensibilidad a varios de los fungicidas utilizados por los agricultores, sugiriendo que se deben estudiar otros factores diferentes a la resistencia genética como los responsables de su limitada eficacia en campo.

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores de Corpoica expresan sus agradecimientos a las instituciones que aportaron recursos económicos para la ejecución del proyecto "Generación de estrategias de manejo integrado de plagas en cultivos de lechuga, cilantro y espinaca bajo esquemas de producción limpia" (MADR, ASOHOFRUCOL, Secretaría de Agricultura de la Gobernación de Cundinamarca, Alcaldías de Chía y Cota, Cooperativas de agricultores COOPHORTICOTA y ECOMAJUY). Al Doctor Yigal Elad investigador del Volcani Center de Israel, asesor científico del proyecto mencionado. A los auxiliares del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica (Pedro Forero y Martín Díaz) y a los estudiantes (Yuli Vega, Andrea Alarcón y Julio Díaz) que colaboraron en el desarrollo del proyecto. Asimismo, a los agricultores que participaron en el mismo en los municipios de Funza, Madrid, Mosquera y Cota.

REFERENCIAS

- Abawi, G. S. y Grogan, G. 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 899-904.
- Agrocadenas (Montevideo). Agrocadenas [en línea]: Inteligencia de mercados. [Uruguay]: Exploración de mercados. <www.montevideo.gub.uy/mvd_rural/hortaliza.pdf> [Consulta: 15 feb. 2009].
- Ávila de Moreno, C. 1991. Control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga I. Determinación del método, dosis y época de aplicación de *T. harzianum*. *Revista ICA*, 26: 35-42.
- BASF. 2006. Cantus: Eficaz acción Botritricida. *Boletín Técnico Zeppelin*, 11:2.
- Beltrán, M. J., Ogura, T., Manzo, G. y Arias, C. 2006. Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas? *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24: 50-58.
- Bolton, M., Thomma, B. and Nelson, B. 2006. Pathogen Profile *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and Molecular Traits of a Cosmopolitan Pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7: 1-16.
- Bradley, C. A., Lamey, H. A., Endres, G. J., Henson, R. A., Hanson, B. K., McKay, K. R., Halvorson, M., LeGare, D. G. and Porter, P.M. 2006. Efficacy of fungicides for control of *Sclerotinia* stem rot of canola. *Plant Disease*, 90: 1129-1134.
- Buritica, P. 1999. Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Produmedios, Bogotá, pp 138 - 139.
- Carmona, M. 2006. (Buenos Aires). Clarín [en línea]: Tecnología agrícola. [Argentina]: Enfermedades en trigo. <<http://www.clarin.com/suplementos/rural/2006/10/28/r-01011.htm>>, [Consulta: 04 mar. 2009].
- Damicone, J. 2000. Fungicide Resistance Management. Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Science and Natural Resources. OSU Extension, Okiahoma, USA. Facts 7663: 8.
- Davis, R., Subbarao, K., Raid, R., y Kurtz, E. 2002. Plagas y enfermedades de la lechuga. Primera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 100 p.
- De Liñán Vicente, 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. Ediciones Agrotécnicas, S.L. España. 1189 p.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), 2002. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), Sistema de Información del Sector Agropecuario y Pesquero Colombiano (SISAC). Censo Horticola de la Sabana de Bogotá, p 28.
- Environmental Protection Agency (Washington, DC). EPA [en línea]: Report of the food quality protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment Progress and Risk Management Decision (TRED) for Procymidone. [Estados Unidos]: Office of Prevention Pesticide and toxic substances. <<http://www.epa.gov/>>, [Consulta: 04 mar. 2009].
- Environmental Protection Agency (Washington, DC). EPA [en línea]: Benomyl RED Facts. [Estados Unidos]: November 2001 EPA-738-F-02-001. <<http://www.epa.gov/>>, [Consulta: 04 mar. 2009].
- Environmental Protection Agency (Washington, DC). EPA [en línea]: Desarrollo y cumplimiento de las regulaciones ambientales [Estados Unidos]. <<http://www.epa.gov/>>, [Consulta: 15 abr. 2009].
- Environmental Protection Agency (Washington, DC). EPA [en línea]: Pesticide fact sheet Iprodione RED Facts. Boscalid [Estados Unidos]: Office of Prevention, Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency. <<http://www.epa.gov/oppr001/factsheets/boscalid.pdf>>, [Consulta: 12 may. 2009].
- FAO 2009. Datos agrícolas de FAOSTAT. [En línea]: <http://www.fao.org>, [Consulta: 28 may. 2009].
- Food and Agriculture Organization (Bogotá). FAO [en línea]: Conceptos generales de la FAO sobre plaguicidas en tomate [Colombia]: <<http://www.fao.org/co/manuaitemate.pdf>>, [Consulta: 13 may. 2009].
- Hawthorne, B. T. 1975. Observations on the development of apothecia of *Sclerotinia minor* Jagg. in the field, New Zealand Journal of Agricultural Research, 19: 383-386.
- Hisada, Y., Kato, T. y Kawase, Y. 1978. Mechanism of antifungal action of procymidone in *Botrytis cinerea*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 44: 509-518.
- Hubbard, J. C., Subbarao, K. V. y Kolke, S. T. 1997. Development and significance of dicarboximide resistance in *Sclerotinia minor* isolates from commercial lettuce fields in California. *Plant Disease*, 81:148-153.

- Instituto Colombiano Agropecuario, 2008 (Bogotá). ICA, [en línea]: Registros de venta de plaguicidas químicos de uso agrícola. [Colombia]: PQUA Noviembre 28 de 2008. <http://www.ica.gov.co/getdoc/b29a3af4-709b-494d-923c-aebd50f758e/Registro_venta_PQUA_Julio152008.aspx>, [Consulta: 12 feb. 2009]
- Kohn, L. 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 881-886.
- Lumsden, R. 1979. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 68: 890 - 896.
- Matheron, M. E. y Porchas, M. 2004. Activity of boscalid, fenhexamid, fluzinam, fludioxonil and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Disease*, 88: 665-668.
- Mueller, D. S., Dorrance, A. E., Derksen, R. C., Ozkan, E., Kurlle, J. E., Grau, C. B., Gaska, J. M., Hartman, G. L., Bradley, C. A. y Pedersen, W. L. 2002. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia stem rot* in soybean. *Plant Disease*, 86: 26-31.
- Pappas, A. C. y Fisher, D. J. 2006. A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 10: 239-246.
- Pérez, S. 2003. La pudrición de la lechuga causada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* o *Sclerotinia minor*. Monografía. Especialización en Horticultura. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, pp 33-160.
- Pesticide Safety Directorate. 1997. Evaluation of fully approved or provisionally approved products: Benomyl. Department for Environment, Food and Rural Affairs. York, United Kingdom. 295.
- Smith, A. 2007. Caracterización, análisis espacial y manejo integrado del moho blanco (*Sclerotinia minor* Jagger y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga batavia (*Lactuca sativa* L. var *capitata*) en la vereda La Moya (Cota, Cundinamarca). Trabajo de grado. Microbiología agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 143 p.
- Stammler, G., Benzinger, G. y Speakman, J. 2007. A rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. *Journal of Phytopathology*, 155: 746-748.
- Subbarao, K.V. 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. *Plant Disease*, 82: 1068-1078.
- Willetts HJ, Wong LAJ. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Reviews*, 46:101-65.

PRODUCCIÓN DE *Trichoderma koningiopsis* Th003

Fredy Mauricio Cruz I.Q.,
Martha Isabel Gómez Ph.D.
y Alba Marina Cotes Ph.D.

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



CAPÍTULO 2

RESUMEN

El hongo *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003 fue aislado de suelo en el departamento de Cundinamarca y ha sido objeto de varios estudios por sus características promisorias para el control biológico de diferentes hongos fitopatógenos. Por esta misma razón en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica se desarrollaron diferentes sistemas de producción masiva de este agente biocontrolador. Con el propósito de contar con un sistema de producción masiva, técnico y económicamente favorable, se evaluaron diferentes sustratos orgánicos bajo condiciones de fermentación sólida y medios de cultivo líquidos en condiciones de fermentación bifásica, teniendo como punto de partida los resultados de las investigaciones previas de Peña, *et al.* (2002) y Cruz, *et al.* (2007), donde se obtuvieron producciones de *T. koningiopsis* Th003 con concentraciones finales de 1.0×10^9 conidios/g en sustratos sólidos y de 5.0×10^8 conidios/ml en medios líquidos. La técnica de fermentación sólida fue utilizada para evaluar dos metodologías de producción, en una el sustrato estandarizado SS1 se dispuso en bandejas de aluminio y en la otra en bolsas de polietileno. Tras realizar 3 lotes piloto para cada metodología, las productividades promedio de *T. koningiopsis* Th003 al final de las fermentaciones fueron de 8.45×10^9 conidios/Kg sustrato/hora para la fermentación en bandejas de aluminio y de 4.73×10^9 conidios/Kg sustrato/hora en bolsas de polietileno.

2.1 INTRODUCCIÓN

Para alcanzar una producción eficiente de hongos biocontroladores tal como *Trichoderma sp.*, es de gran importancia determinar la relación óptima entre las fuentes de carbono y nitrógeno (C/N), que permita mantener la actividad de los complejos enzimáticos como xilanasas, celulasas y glucosidasas entre otros, secretados por el hongo para la asimilación de los nutrientes del sustrato. Por otra parte, en este proceso se debe brindar el suministro efectivo de oxígeno durante el crecimiento del hongo, lo cual influye en la colonización completa del sustrato y posterior esporulación (Harman y Kubicek, 1998). La estandarización del proceso de producción de *T. koningiopsis* Th003 se inició con la evaluación de sustratos potenciales para su eficiente crecimiento a nivel de laboratorio; es así como en investigaciones previas en el Laboratorio de Control Biológico se utilizaron matrices sólidas compuestas por cereales (trigo, cebada perlada, millo y arroz) con diferentes relaciones C/N. Adicionalmente, se evaluaron sustratos líquidos como medio de cultivo Saboureaud, solución de sacarosa con microelementos y arroz licuado. Después de estas investigaciones se estandarizaron las condiciones de incubación del microorganismo, las cuales fueron de 27 °C, humedad relativa superior a 50% y un tiempo de incubación entre 7 y 8 días. Igualmente, fueron seleccionados dos medios de cultivo promisorios para la producción masiva de Th003, uno sólido y otro líquido, codificados como SS1 y SL1 respectivamente (Peña, 2002).

2.2 METODOLOGÍA

Microorganismo

La cepa Th003 de *T. koningiopsis* fue suministrada por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con interés en control biológico, administrado por el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, la cual se encontraba crioconservada a -70 °C. Su mantenimiento a corto plazo (3-5 semanas) se realizó mediante el almacenamiento de cultivos esporulados en medio agar PDA a 4 °C.

Proceso de fermentación de *T. koningiopsis* Th003

A partir de cultivos del hongo de 7 días de edad en medio PDA, se removieron los conidios mediante la adición de 10 ml de una solución de Tween 80 a 0,1% (v/v). La suspensión de conidios obtenida se ubicó en un tubo estéril y se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos. A partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones seriadas usando una solución de Tween 80 a 0,1% (v/v) con el fin de obtener el inóculo con una concentración de 1×10^7 conidios/ml.

Posteriormente con el sustrato SS1, seleccionado en el estudio de Peña (2002) como el mejor en cuanto a rendimiento y con una relación C/N de 8,89, se evaluó la producción de *T. koningiopsis* Th003 mediante dos metodologías de fermentación sólida. La primera metodología consistió en el empleo de bolsas de polietileno de alta densidad que contenían 200g de sustrato humedecido (SS1). Cada bolsa se selló con un tapón de algodón y gasa con el propósito de permitir el intercambio de gases como el oxígeno y el dióxido de carbono con el ambiente durante el tiempo de incubación. Luego el sustrato fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 min. Posteriormente, el inóculo fue inyectado con una jeringa a razón de 10 ml por bolsa (Figura 1).

Las condiciones de incubación fueron de 27 °C y una humedad relativa de 50%, siendo éstas las recomen-



Figura 1. Inoculación de *T. koningiopsis* Th003 en bolsas de polietileno.

dadas en las investigaciones previas efectuadas en el Laboratorio de Control Biológico por Peña (2002) y Cruz (2007). Con esta metodología, se formaron tres lotes de fermentación de *T. koningiopsis* Th003 cada uno con 100 bolsas aproximadamente.

La segunda metodología de fermentación sólida evaluada consistió en el uso de bandejas de aluminio con dimensiones de 21x14x5 cm, en donde se colocó un promedio de 150 g de sustrato SS1 humedecido con agua. Las bandejas con el sustrato fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 min. En este caso la inoculación del sustrato con Th003 se hizo por aspersión directa, a razón de 3,5 ml por bandeja, aproximadamente (Figura 2).

Una vez inoculado el sustrato, las bandejas fueron selladas mediante una película plástica que permitía el intercambio de gases y luego se incubaron en las condiciones antes mencionadas. Con esta metodología se instalaron tres lotes con aproximadamente 60 bandejas cada uno.

Los tiempos de incubación para las fermentaciones en bolsas de polietileno fueron de 10 días, siendo éste el tiempo necesario para alcanzar la colonización y la esporulación homogéneas del hongo en el sustrato y evitando así el parasitismo. Por otra parte, para las fermentaciones llevadas a cabo en bandejas de aluminio, se requirieron 8 días de incubación,



Figura 2. Inoculación de *T. koningiopsis* Th003 en bandejas de aluminio.

Tabla 1. Resultados de los lotes producidos de *T. koningiopsis* (Th003) por fermentación sólida, mediante las dos metodologías descritas.

LOTE	Bolsas de polietileno			Bandejas de aluminio		
	Concentración (conidios/g)	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Concentración (conidios/g)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	8.31×10^9	0,028	0,32%	1.23×10^9	0,055	0,60%
2	1.65×10^9	0,109	1,19%	2.08×10^9	0,027	0,28%
3	9.18×10^8	0,049	0,54%	1.55×10^9	0,009	0,09%
Promedio	1.13×10^9	0,161	1,78%	1.62×10^9	0,114	1,24%

Al terminar la fase de incubación de cada lote, todo el sustrato colonizado se homogeneizó en un mezclador planetario y luego, mediante recuento en cámara de Neubauer, se determinó por triplicado la concentración de conidios por gramo.

2.3 RESULTADOS

Para la metodología de crecimiento en las bolsas de polietileno, la concentración promedio de conidios

en los tres lotes de fermentación de *T. koningiopsis* Th003 fue de 1.13×10^9 conidios/g. La reproducibilidad del proceso fue alta, pues entre lotes se obtuvo una desviación estándar de 0.161 y un coeficiente de variación de 1.78% (Tabla 1). Se presume que la mayor limitante encontrada en el crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 con esta metodología, fue la baja transferencia de gases entre el hongo y el ambiente, en especial de oxígeno, ya que fue notoria la tendencia de esporulación del hongo sólo en la zona cercana a la boca de las bolsas, lo que hizo nece-



Figura 3. Fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003 en bandejas de aluminio.

saría la manipulación periódica de éstas buscando dinamizar la transferencia de oxígeno, siendo esto dispendioso para un gran número de bolsas.

El proceso de fermentación en las bandejas de aluminio mostró una concentración de conidios superior a la de las bolsas, con un valor promedio de $1,62 \times 10^9$ conidios/g. Igualmente, la reproducibilidad del proceso también fue alta, con una desviación estándar de 0.114 y un coeficiente de variación entre lotes de 1,24% (Tabla 1).

El mejor comportamiento encontrado en el crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 utilizando bandejas de aluminio se podría explicar por la mejor oxigenación del hongo en el sustrato, a causa de la mayor área de transferencia. Adicionalmente, el sustrato fue colonizado por el hongo homogéneamente, a diferencia de lo que ocurrió en las bolsas, por lo que no fue necesario manipular el sustrato durante la incubación (Figura 3).

Después de estas fermentaciones se estimaron los rendimientos de producción del hongo en tres lotes piloto, obteniendo $4,73 \times 10^9$ conidios/Kg sustrato/

hora para el crecimiento en bolsas de polietileno y $8,45 \times 10^9$ conidios/Kg sustrato/hora para la fermentación en bandejas de aluminio. Se puede afirmar que la metodología de fermentación sólida utilizando bandejas, presenta mayor viabilidad de escalamiento a nivel de planta piloto pues, adicional a una mayor productividad, tiene menores tiempos de incubación y se requiere menos volumen de inóculo: 0,023 ml/g sustrato. Mientras que la producción en bolsas de polietileno requiere mayor tiempo de incubación, mayor volumen de inóculo: 0,050 ml/g sustrato y mano de obra adicional para manipular periódicamente el sustrato durante la incubación, mostrando así que esta última metodología tiene bajo potencial técnico y económico para ser escalable.

2.4 CONCLUSIÓN

El sustrato sólido SS1 y la metodología de fermentación sólida en bandejas fueron las condiciones más promisorias seleccionadas para llevar a cabo la producción masiva de *T. koningiopsis* Th003 a nivel de planta piloto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a los investigadores Laura Villamizar Ph.D. y Carlos Andrés Moreno M.Sc, a las estudiantes de microbiología industrial de la Universidad Javeriana Viviana Peña, Carolina Cruz, Isabel Quiroga y Eliana Cañón, a los auxiliares del Laboratorio de Control Biológico Juan Carlos Barrios y Aura María Salamanca, quienes colaboraron con la presente investigación y desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

Cruz, C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 127 p.

Harman G, Kubicek C. 1998. *Trichoderma and Gliocadium enzymes and biological control applications*. Cornell University, Geneva, N.Y., USA. University of Technology, Vienna, Austria. Volumen 2. 183-190.

Peña, V. 2002. Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de grado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 153 p.

DESARROLLO DE UNA FORMULACION A BASE DE *Thichoderma koningiopsis*

Laura Fernanda Villamizar D.Sc.,
Magda García M.Sc.
y Alba Marina Cotes Ph.D.

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



CAPÍTULO 3

RESUMEN

La cepa nativa Th003 de *Trichoderma koningiopsis* ha mostrado alta eficacia para controlar fitopatógenos del suelo y foliares en diferentes patosistemas, por lo que el Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -Corpoica- desarrolló un prototipo de bioplaguicida formulado como un polvo mojable usando como principio activo conidios de este hongo. El producto fue caracterizado, demostrando adecuadas características microbiológicas y fisicoquímicas. El estudio de vida útil comprendió la evaluación durante 18 meses de la viabilidad del hongo formulado y sin formular, almacenado a tres temperaturas: 4 °C, 18 °C y 28 °C. Cada tres meses se evaluó el porcentaje de germinación del microorganismo en medio Agar Extracto de Malt, luego de 24 horas de incubación. El prototipo de bioplaguicida no presentó una disminución significativa de la germinación cuando fue almacenado durante 18 meses a 4 °C, mientras que los conidios sin formular redujeron su porcentaje de germinación de 97% a 20% para el noveno mes de almacenamiento. Cuando este se realizó a 18 °C, el producto en polvo mantuvo estable su germinación durante los 18 meses de almacenamiento; en contraste, el tratamiento correspondiente a los conidios sin formular presentó una disminución progresiva de la germinación a partir del sexto mes de almacenamiento, hasta obtener una germinación de 4% luego de 18 meses. Los resultados permitieron recomendar la conservación del prototipo en polvo a temperaturas entre 4 °C y 18 °C para asegurar la calidad y efectividad del mismo durante su vida útil.

3.1 INTRODUCCIÓN

Una formulación de alta calidad es la base para el éxito de un bioplaguicida de origen microbiano; la posibilidad de obtener productos adecuados depende de las propias características del microorganismo, de su relación con los componentes de la formulación y del ambiente de almacenamiento (Engormix, 2008).

Para el desarrollo de nuevos productos de origen biológico se deben tener en cuenta diferentes aspectos: definir un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva del inóculo, para permitir una buena relación costo - rendimiento en la producción; establecer ensayos de producción a pequeña escala; garantizar la estabilidad del producto; determinar las condiciones de almacenamiento; poder utilizar la maquinaria estándar de cualquier explotación agrícola para su aplicación y ser efectivo en dosis parecidas a las utilizadas para los agroquímicos. Una vez se desarrolle una formulación, es necesario realizar bioensayos de laboratorio, invernadero y campo que confirmen la efectividad del producto una vez formulado (Engormix, 2008).

Una formulación óptima debe asegurar la estabilidad biológica y física del producto en condiciones de almacenamiento, debe optimizar la viabilidad y actividad biocontroladora del principio activo, debe mejorar las características físicas y químicas del producto para su aplicación, debe incrementar la capacidad del microorganismo biocontrolador para adaptarse a condiciones adversas del medio ambiente y debe garantizar el valor comercial del agente biocontrolador (Chiou & Wu, 2003).

En toda formulación se distinguen dos tipos de componentes: el principio activo responsable de la actividad biocontroladora (hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus o nematodos) y los excipientes. Estos últimos comprenden: el vehículo que puede ser sólido o líquido y los coadyuvantes que ayudan a mejorar o modificar la acción del ingrediente activo. Los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas (Gómez & Villamizar, 2000).

Una de las razones que ha limitado la implementación de los agentes de control biológico en campo, ha sido la inactivación que en algunos casos sufre el principio activo (células, conidios, esporas o toxinas) como consecuencia de la acción de la radiación solar (Saxena *et al.*, 2002). Sin embargo, una estrategia para asegurar la estabilidad y la efectividad para el uso de estos agentes es su formulación (Niegel & Dylan, 2003). Uno de los factores a tener en cuenta en la formulación de bioplaguicidas es incrementar su resistencia a condiciones ambientales adversas tales como la lluvia y la degradación por la luz ultravioleta.

Un gran número de trabajos han sido dedicados a encontrar técnicas y materiales adecuados para inhibir o retardar la fotoinactivación de los microorganismos utilizados como agentes de control biológico. Entre los intentos por fotoproteger a los biocontroladores del daño producido por la radiación solar, se incluyen técnicas de encapsulación y formulaciones granulares, como también el uso de pantallas solares, materiales dispersantes, materiales fluorescentes y colorantes, entre otros (Cohen *et al.*, 2003).

La estabilidad en almacenamiento es otro de los problemas en el desarrollo de bioplaguicidas, ya que de ésta depende la viabilidad o actividad durante la distribución del producto en el mercado (Boyetchko y Hynes, 2006).

Durante el almacenamiento, los microorganismos pueden sufrir alteraciones debido a factores del proceso de manufactura del producto, como el medio de cultivo, el proceso de separación y secado y la utilización de agentes protectores de secado (Abadías *et al.*, 2001)

Factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa y la forma de empaque pueden afectar la viabilidad y actividad del agente biocontrolador durante la fase de almacenamiento (Boyetchko y Hynes, 2006), siendo de gran importancia considerar y estudiar estos factores durante el desarrollo de un producto, para ofrecer al cliente final un producto de alta calidad.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Desarrollo de la formulación

Una vez desarrollado un sistema de fermentación para el aislamiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003, se iniciaron los estudios de formulación de la biomasa. Considerando que dicho aislamiento en estudios previos demostró su eficiencia tanto para el control de patógenos foliares como de patógenos del suelo, se diseñó un prototipo de formulación en polvo mojable (WP), que permitiera su aplicación en agua mediante aspersion (Figura 1). En el diseño de esta formulación se consideró que una de las condiciones más limitantes para la eficiencia del agente de biocontrol, era la radiación ultravioleta del sol. Por tal razón, este prototipo incluyó en su composición, protectores solares y otros auxiliares de formulación como protectores de secado, adherentes y diluentes.

Una vez desarrollado el producto en polvo fue caracterizado y presentó una concentración promedio



Figura 1. Bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 formulado como polvo mojable (WP).

Tabla 1. Características de la formulación polvo mojable a base de *T. koningiopsis* Th003.

Característica	Polvo (WP)
Viabilidad	1 x 10 ⁹ UFC/g
Germinación	>80% en 24 horas
Contenido de contaminantes	< 5 x 10 ⁶ UFC/g
Aspecto	Polvo
Tamaño de partícula	Inferior a 100 µm
Color	Verde claro a gris
Olor	Propio del producto
Humedad	4-7%
Densidad apisonada	500 Kg/L
pH	5-7
Protección ultravioleta	Incluye filtros ultravioleta

de 1,0 x 10⁹ conidios.g⁻¹, una germinación de 95% después de 16 horas de incubación y un tamaño de partícula menor a 100 µm (Tabla 1).

Posteriormente se elaboraron varios lotes del bioplaguicida, los cuales fueron caracterizados física, química y microbiológicamente (Tabla 1), y con los resultados se establecieron los límites de aceptación para todas las pruebas de control de calidad del producto terminado. Estos controles son aplicados a cada lote de producción para asegurar la calidad del producto y la repetibilidad en las características de todos los lotes.

El ideal en los productos biológicos es mantener viables y estables las características fisiológicas y de actividad biocontroladora del ingrediente activo; sin embargo, dadas las condiciones desfavorables para el microorganismo a nivel ambiental es preciso desarrollar formulaciones que mejoren su desempeño en campo, faciliten su manejo, su aplicación y permitan su almacenamiento en condiciones económicamente rentables, con una pérdida mínima de las cualidades iniciales del producto (Elzein *et al.*, 2004). Uno de los requerimientos para tener en cuenta para la aceptación y comercialización de un producto biológico es su vida útil, la cual se ve influenciada por factores de almacenamiento como la temperatura, la humedad relativa y el tipo de empaque, entre otros, determinando el mantenimiento de las

características del agente de control biológico. Por tal razón, como parte de los estudios de formulación se determinó la vida útil del bioplaguicida, bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

3.2.2 Determinación de la vida útil del bioplaguicida

El estudio de vida útil comprendió la evaluación durante 18 meses de la estabilidad de la capacidad de germinación de los conidios de Th003 en el prototipo de bioplaguicida en polvo.

La producción masiva del microorganismo se llevó a cabo empleando un sustrato de crecimiento previamente estandarizado por el Laboratorio de Control Biológico. Posteriormente se elaboró el bioplaguicida y se determinó la concentración de conidios, la humedad y la germinación, siguiendo las metodologías establecidas por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas BIOTÉCNICA de Corpoica,

La unidad experimental consistió en bolsas metalizadas selladas al vacío (Figura 2) donde se colocó una muestra de 0,1g del prototipo polvo mojable y 0,1g de conidios secos del microorganismo sin formular. Las muestras y contra-muestras fueron guardadas a tres temperaturas: 4°C, 18 °C y 28 °C. Las evaluaciones se realizaron cada tres meses contando con seis repeticiones por tratamiento (3 de la muestra y 3 de



Figura 2. Muestras de los bioplaguecidas empleadas en el estudio de estabilidad.

la contra-muestra) y determinando en cada tiempo de evaluación el porcentaje de germinación del microorganismo en medio Agar Extracto de Malta. Las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo con 9 ml de una solución de Tween 80 de 0,1% y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . A partir de las dos últimas diluciones se sembraron 100 μ l en tres cajas de Petri con el medio antes mencionado y se llevaron a incubación a 25 °C durante 24 horas, tiempo después del cual se estableció el porcentaje de germinación de los conidios mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos.

3.3 RESULTADOS

El bioplaguecida no presentó disminución de la germinación cuando fue almacenado durante 18 meses a 4 °C, mientras que los conidios sin formular redujeron su porcentaje de germinación de 96,9% a 20,1% en el noveno mes de almacenamiento (Figura 3). Este comportamiento sugiere que a una temperatura de 4 °C los auxiliares de formulación del prototipo de bioplaguecida, posiblemente ejercieron un efecto positivo sobre los conidios del hongo durante el tiempo de almacenamiento impidiendo la inducción de fuertes estados de latencia.

Dentro de los auxiliares de formulación empleados para la elaboración del bioplaguecida se encuentran sustancias protectoras de secado y compuestos que tienen un efecto osmoregulador sobre el microorganismo. Tales protectores son principalmente sustancias que protegen la integridad de la membrana celular durante el proceso de deshidratación. Este

efecto fue reportado por Jackson *et al.*, (2006) quienes evaluaron diferentes formulaciones del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* con el propósito de aumentar su tolerancia a la desecación y su estabilidad durante el almacenamiento. Los autores observaron un aumento significativo de la viabilidad de las blastosporas del hongo al ser almacenado durante 12 meses a 4 °C y -20 °C, respuesta que atribuyeron a la adición de protectantes, como la leche descremada, a la formulación del bioplaguecida; a diferencia de ello, los conidios sin formular presentaron una disminución drástica en los porcentajes de germinación a partir del segundo mes de almacenamiento, llegando a obtener valores cercanos a 20%.

Compuestos de tipo poliol, denominados solutos compatibles, son comúnmente utilizados como protectores de secado. Estas sustancias son acumuladas por las células permitiéndoles mantener el equilibrio osmótico intracelular, la integridad de las proteínas y proteger los organelos. Dichos solutos son generalmente azúcares o alcoholes que están relacionados con la tolerancia del microorganismo ante el estrés osmótico que se puede generar en el proceso de elaboración del bioplaguecida (Abadías *et al.*, 2000).

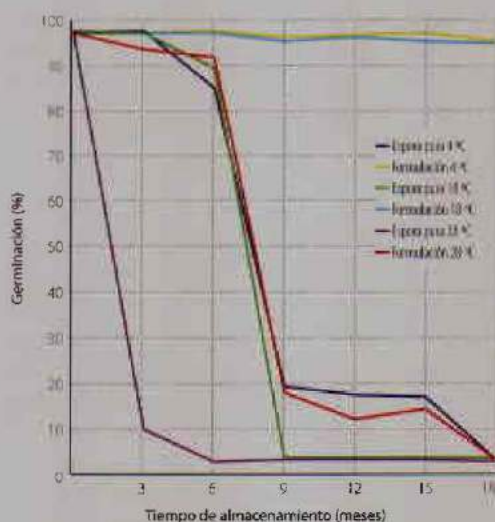


Figura 3. Cinética de la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 formulados y sin formular, durante 18 meses de almacenamiento

Cuando el almacenamiento se realizó a 18 °C, el producto en polvo mantuvo estable su germinación durante 18 meses. (Figura 3), obteniéndose valores de germinación que oscilaron entre 94,8% y 96,8%. Por el contrario, el tratamiento correspondiente a los conidios sin formular presentó una disminución progresiva de la germinación a partir del sexto mes de estar almacenado hasta obtener una germinación de 4,2% luego de los 18 meses.

Las muestras de bioplaguicida conservadas a 28 °C mostraron una reducción en la capacidad de germinación de *T. koningiopsis* tanto formulado como sin formular (Figura 3). Los conidios sin formular presentaron una disminución en su germinación de 93,6% después de seis meses de almacenamiento. Sin embargo, luego de incubar las muestras por 36 horas se alcanzó una germinación superior a 95%, lo que sugiere, al igual que cuando se guardaron a 18 °C, que el microorganismo entró en un estado de latencia debido al almacenamiento a dichas temperaturas. Para el bioplaguicida la germinación se mantuvo por encima de 80% hasta los seis meses de guardado y a partir de allí ésta decayó drásticamente, pero fue superior a 80% al incrementar los tiempos de incubación. Algunos autores han establecido que las formulaciones de microorganismos requieren que el ingrediente activo (conidios del hongo) entre en un estado de latencia durante el almacenamiento para mantenerse estable y no pierda sus características fisiológicas y de actividad biocontroladora en el momento de su aplicación (Murillo *et al.*, 2003).

La temperatura de almacenamiento es un factor crítico que determina la conservación de la viabilidad y de la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas. Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron observados por Zahnf *et al.*, en el 2006, quienes evaluaron el almacenamiento bajo dos temperaturas de una formulación a base de la levadura *Cryptococcus nodaensis*; los autores observaron una viabilidad del principio activo entre 7,8 y 8 Log UFC.g⁻¹ cuando el producto fue almacenado a 4 °C, mientras que a temperatura ambiente (25 °C) provocó una reducción en el conteo de unidades formadoras de colonia hasta valores inferiores a 5 Log UFC g⁻¹ luego de 14 semanas.

Factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa determinan en gran medida la vida útil de los bioplaguicidas; es así como temperaturas de 4°C y humedades relativas cercanas a 12% mantuvieron alta la viabilidad y la actividad biocontroladora de una formulación granular a base de *Alternaria alternata* durante 20 meses de almacenamiento; esta misma formulación al ser conservada a 20 °C presentó una reducción significativa en su eficacia y viabilidad luego de 12 meses.(Lawrie *et al.*, 2002). Así mismo, el producto "Pesta", cuyo principio activo es *Fusarium oxysporum* Foxy 2, presentó una reducción de 32% y 21% en su viabilidad luego de seis y doce meses de almacenamiento respectivamente; los autores afirmaron que la pérdida rápida de las reservas endógenas de carbono fue una de las posibles causas que ocasionaron bajos niveles de viabilidad del microorganismo almacenado a 25 °C (Elzein *et al.*, 2004). Al igual que en los ensayos anteriormente mencionados, *Trichoderma koningiopsis* Th003 mostró mayor viabilidad y vida útil cuando fue guardado a una temperatura de 4°C, presentándose una disminución en dichos valores a medida que se aumentó a 28 °C.

En todos los tratamientos evaluados en el presente estudio se observó que al aumentar la temperatura de almacenamiento, aumentó el efecto deletéreo sobre la germinación, lo que indica que para incrementar la vida útil de los prototipos, estos deben ser conservados a la menor temperatura posible.

Los resultados de las seis réplicas de la cinética de la germinación de cada tratamiento fueron sometidos a un análisis de regresión, a partir del cual se elaboró la línea de tendencia y sobre ella se extrapoló la vida útil de cada producto, teniendo en cuenta una germinación mínima de 80%.

Los mayores tiempos de vida útil se obtuvieron con el prototipo en polvo almacenado a 4 °C y 18 °C (Tabla 2). Por otra parte, la temperatura de 28 °C presentó un efecto nocivo sobre el microorganismo, obteniéndose una de vida útil de 3,7 meses para el formulado en polvo y de 0 meses para las esporas sin formular. Estos resultados evidencian el efecto protector que tienen los excipientes sobre el mi-

Tabla 2. Tiempo de vida útil de prototipos de bioplaguicida a base de Th003

Producto	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de vida útil (meses)
Conidios sin formular	4	3,7
Conidios sin formular	18	3,3
Conidios sin formular	28	0
Prototipo polvo	4	18
Prototipo polvo	18	18
Prototipo polvo	28	3,7

croorganismo, asegurando su estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento, ayudando a su aplicación en campo, protegiendo el producto de condiciones ambientales desfavorables y promoviendo la efectividad del bioplaguicida sobre el agente blanco.

Aunque la mayoría de bioplaguicidas que se encuentran en el mercado nacional e internacional deben ser preservados en condiciones de refrigeración, a partir de los resultados del estudio se puede recomendar la conservación del prototipo en polvo a una temperatura promedio de 18 °C.

AGRADECIMIENTOS

A Claudia Mesa y Gabriela Perdomo, auxiliares del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica y a la estudiante Carolina Garzón, quienes colaboraron en el proceso de desarrollo de la formulación.

REFERENCIAS

- Abadias, M., Teixido, A., N., Usall, J., Viña, I., Magan, N. 2000. Solute stresses affect growth patterns, endogenous potentials and accumulation of sugars and cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 1009-1017.
- Abadias, M., Teixido, N., Usall, J., Benabarre, A., Viñas, I. 2001. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agente *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of food protection*, 64: 856-861.
- Boyetchko, S.; Hynes, R. 2006. Research Initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 845-849.
- Chiou, A. L., Wu, W.S. 2003. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of Lily Grey Mould (*Botrytis elliptica*). *Journal of Phytopathology*, 151: 13-18.
- Cohen, E., Joseph, T., Wassermann-Golan, M. 2001. Photostabilization of biocontrol agents by berberine. *International Journal of Pest Management*, 47: 63-67.
- Elzein, A., Jurgen, K., Muller-stover, D. 2004. Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of 'Pesta' formulation of *Fusarium oxysporum* Foxy 2; a Potential Mycoherbicide for Striga: Effects of Temperature, Granule Size and Water Activity. *Biocontrol Science and Technology*, 14: 545-559.
- ENGORMIX, 2008. Formulación de hongos entomopatógenos como control Biológico [On line]. http://www.engormix.com/formulacion_hongos_entomopato_genos_como_s_articulos_1315_AGR.htm. [Consulta: 26 febrero 2008].
- Gómez, M., Villamizar, L. 2000. Formulación de Bioplaguicidas. En: *Primer Curso Taller Internacional de Control Biológico*. CORPOICA. Bogotá, pp. 108-112.
- Jackson, M., Selim Erhan, s., Poprawski, T. 2006. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology*, 16: 61-75.
- Lawrie, J., Down, M., Greaves, P. 2001. Effects of Storage on Viability and Efficacy of Granular Formulations of the Microbial Herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 283-295.
- Moore, D., Bateman, P., Carey, M., Prior, C. 1995. Long term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation for the control of locust and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 193-199.
- Murillo, R., Laso, R., Gouison, D., Williams, T., Muñoz, D., Caballero, P. 2003. Effect of Tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 1668-1674.
- Niegel, D. P., Dylan, G. J. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: Towards an integrated approach (Review). *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 48-54.
- Saxena, D., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Barak, Z., Boussiba, S., Zariitsky, A. 2002. A UV Tolerant Mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing Melanin. *Current Microbiology*, 44: 25-30.
- Zhang, S., Schisler, D., Jackson, M., Boehm, M., Sliminger, P., Liu, Z. 2006. Cold shock during liquid production increases storage shelf-life of *Cryptococcus nodaensis* after air-drying. 16 (3): 281 - 293.

ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003

Martha Isabel Gómez Ph.D., Andrés Díaz M.Sc.,
Fredy Mauricio Cruz I.Q. y Alba Marina Cotes Ph.D.

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



CAPÍTULO 4

RESUMEN

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el capítulo 2 sobre producción masiva, selección del medio de cultivo y condiciones de fermentación para *T. koningiopsis* Th003, en este estudio se evaluaron dos metodologías de fermentación para la producción del bioplaguicida a escala planta piloto. Se utilizaron equipos diseñados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica y se evaluaron la fermentación bifásica en un fermentador de tipo airlift y la fermentación sólida en un fermentador de bandejas estáticas. Después de optimizar las condiciones y determinar la reproducibilidad de los procesos, el rendimiento promedio obtenido - medido en cantidad de conidios en el sustrato por tiempo de fermentación (conidios/Kg.h) - fue de 5.97×10^9 conidios/Kg.h y 1.42×10^9 conidios/Kg.h para la fermentación bifásica y sólida, respectivamente. La fermentación sólida fue seleccionada como metodología de fermentación para *T. koningiopsis* Th003. Las operaciones en el proceso de formulación del bioplaguicida polvo mojado (WP), así como la separación del principio activo, la mezcla con excipientes y el secado, fueron también estandarizadas a nivel planta piloto.

4.1 INTRODUCCIÓN

Las oportunidades económicas y comerciales de los bioplaguicidas dependen en gran medida de su facilidad de escalamiento. Este es un mecanismo mediante el cual se trasladan condiciones y variables de operación de un proceso en un equipo o sistema determinado, a otro de tamaño diferente (Gallego *et al.*, 2002). Con el escalamiento de la producción de bioplaguicidas se busca mantener las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo, la generación y separación de metabolitos y/o biomasa encontrados a nivel de laboratorio, obteniendo resultados similares en cuanto a rendimientos y productividades. Para el escalamiento se debe recoger la mayor cantidad de información posible del proceso en condiciones de laboratorio; esto implica conocer la fenomenología del proceso y factores tales como la temperatura, la concentración de nutrientes, el pH y la actividad del agua, entre otros. Adicionalmente, con los datos experimentales generados se deben realizar balances de materia y determinar los rendimientos en términos de cantidad de microorganismo por sustrato y cantidad de sustrato por producto final (Duarte, 1995). Teniendo en cuenta estos aspectos, para el escalamiento a nivel planta piloto de la producción del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003), surgieron las operaciones y puntos críticos descritos en la figura 1.

Entre las técnicas de fermentación más estudiadas para la producción de hongos filamentosos se encuentran la fermentación sólida (SSF), la fermentación sumergida (SmF) y la fermentación bifásica (mezcla de SSF y SmF). Para los procesos de SSF los factores más importantes incluyen el tipo de sustrato, el microorganismo, el contenido de humedad, el pH y la altura de la matriz sólida. De otra parte en la fermentación sumergida (SmF) para hongos filamentosos los factores más destacados por controlar, son las condiciones reológicas de operación como la viscosidad, la densidad, las velocidades de agitación, el pH y la concentración de oxígeno disuelto (Singhania *et al.*, 2008).

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica, tras varios

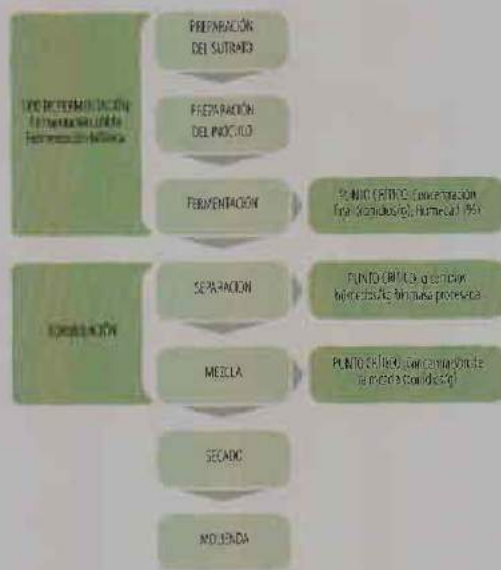


Figura 1. Esquema general del escalamiento de la producción del bioplaguicida a base del hongo *T. koningiopsis* Th003

estudios de evaluación del crecimiento comparativo para la producción masiva del hongo *T. koningiopsis* Th003, se desarrolló un método de producción masiva eficiente en un medio sólido codificado como SS1. Sin embargo, las condiciones del proceso de fermentación para este hongo no habían sido estandarizadas a nivel de planta piloto, por lo tanto se hizo necesaria su estandarización para la obtención de conidios del hongo biocontrolador.

Una vez las condiciones de producción masiva de *T. koningiopsis* Th003 a escala piloto se estandarizaron, este principio activo fue formulado para la obtención de un bioplaguicida en forma de polvo mojable (WP). Las operaciones unitarias de separación, mezcla, secado y molienda fueron escaladas a nivel de planta piloto y la eficiencia de las mismas se evaluaron teniendo en cuenta los puntos críticos de estos procesos (Figura 1).

El escalamiento de la producción a nivel de planta piloto fue realizado en la planta de bioplaguicidas ubicada en el Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica. Esta construcción cuenta con instalaciones adecuadas para la producción de bioplaguicidas a nivel semicomercial y equipos apropiados

para las operaciones de fermentación, separación continua de principio activo, mezcla, granulación y secado. También cuenta con áreas para el control de calidad tanto de materias primas como de productos en proceso y terminados.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Escalamiento del proceso de fermentación de *T. koningiopsis* Th003

4.2.1.1 Fermentación bifásica

Para la estandarización de la fermentación bifásica, inicialmente se efectuó la fermentación líquida determinando las condiciones óptimas para maximizar la producción de conidios de Th003 en un fermentador de tipo airlift. Este medio de cultivo fue el inóculo para la fermentación sólida producida en un fermentador de bandejas. Ambos fermentadores fueron diseñados y puestos en marcha previamente en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica.

Primera fase: fermentación líquida

Preparación del preinóculo

A partir de cultivos en medio PDA con el hongo crecido durante 7 días, se removieron los conidios mediante la adición de 10 ml de una solución de Tween 80 a 0.1% (v/v). La suspensión de conidios obtenida se puso en un tubo estéril y se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos. A partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones seriadas en solución Tween 80 a 0.1% (v/v) con el fin de lograr una suspensión en concentración de 1×10^7 conidios/ml.

Esta suspensión se inoculó (2.5 ml) en Erlenmeyers de 125 ml de capacidad que contenían 25 ml del medio de cultivo estéril codificado como SL1 (Peña, 2002). Los Erlenmeyers se incubaron a 25°C con agitación constante (180 rpm) en un baño termostataado Lindberg Blue® durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió al control de calidad del caldo de fermentación mediante una coloración de Gram para detectar la presencia de bacterias y

Tabla 1. Principales características del fermentador airlift, diseñado en el Laboratorio de Control Biológico.

Característica	Descripción
Volumen	20 litros
Tipo de lazo	Interno
Relación altura diámetro	5
Tipo de distribuidor de aire	Anular
Material de construcción	Acero inoxidable y vidrio

Tabla 2. Factores y niveles evaluados durante la fermentación líquida del hongo *T. koningiopsis* Th003 en un biorreactor airlift de 20 litros.

Factores	Nivel bajo	Nivel alto	Variable de respuesta
Altura de la zona de ascenso	44,3 cm	55,1 cm	
Caudal del gas de entrada	0,5 vvm	0,75 vvm	
	0,075% (v/v)	0,1% (v/v)	Concentración de biomasa (micelio principalmente, g/L)
Volumen de antiespumante	15 ml	20 ml	

de azul de Lactofenol para visualizar las estructuras fúngicas. Posteriormente se llevaron a cabo tres cambios de volumen sucesivos en Erlenmeyers de 125ml, 500ml y 1000ml, manteniendo una relación volumen medio de cultivo a volumen del Erlenmeyer de 1:5. Los Erlenmeyers fueron incubados bajo las mismas condiciones ya descritas y las coloraciones mencionadas fueron realizadas para verificar la pureza del cultivo y para observar microscópi-

camente la morfología del hongo. Finalmente, los preinóculos se inyectaron a un fermentador tipo airlift para la evolución de la fermentación líquida y la estandarización del proceso.

Fermentación en biorreactor airlift de 20 litros

El fermentador airlift (Figura 2) es un equipo neumático de contacto gas-líquido, en el que el gas (aire u oxígeno) cumple las funciones de agitación, contribución a la transferencia de calor y suministro de oxígeno (Flórez, 2002).

En el diseño del equipo se tuvieron en cuenta parámetros como la geometría, el volumen del reactor, el tipo de lazo, la relación altura diámetro, el separador gas-líquido, la instrumentación y por supuesto el material de construcción. En la Tabla 1 se resumen las principales características del fermentador airlift diseñado en el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA (Flórez, 2002).

La selección de los factores y niveles por evaluar para la fermentación líquida de *T. koningiopsis* Th003, se hizo teniendo en cuenta las características relacionadas con el equipo (altura de la zona de ascenso) y las condiciones físicas de la fermentación (caudal de aire y volumen de antiespumante) (Tabla 2).



Figura 2. Fermentador airlift utilizado para la producción del preinóculo de *T. koningiopsis* Th003.

Tabla 3. Matriz del diseño experimental factorial fraccionado para la fermentación líquida del hongo *T. koningiopsis* Th003 en un biorreactor airlift de 20 litros.

Fermentación	Altura de la zona de ascenso (cm)	Caudal de aire (vvm)	Volumen de antiespumante (ml)
1	44.3	0.75	15
2	44.3	0.75	20
3	55.1	0.5	15
4	55.1	0.5	20
5	58.7	0.42	22
6	68.3	0.20	18

Para la estandarización se realizaron seis fermentaciones, empleando un diseño experimental factorial fraccionado a la mitad (Tabla 3). Las evaluaciones fueron hechas al cabo de 48 horas de incubación.

4.3.1 Resultados fermentación bifásica / primera fase

Durante las fermentaciones llevadas a cabo se presentó una morfología mixta de *T. koningiopsis* Th003 con presencia de agregados de diversos tamaños; se observó un rápido crecimiento micelial que incrementó la viscosidad del líquido y cambió gradualmente el color del medio de crecimiento a medida que transcurrió el tiempo de incubación (48 horas).

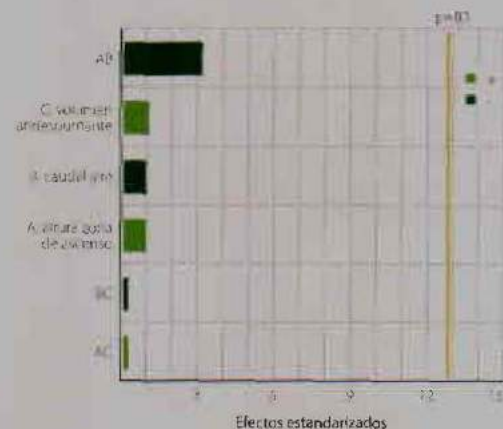


Figura 3. Diagrama de Pareto para los factores evaluados durante la fermentación líquida en un biorreactor airlift. Factores: A: Altura zona de ascenso, B: Caudal de aire, C: Volumen de antiespumante.

De acuerdo con lo anterior, durante las fermentaciones 1 y 2 en las que la velocidad de agitación fue elevada (≥ 0.75 vvm), el micelio libre fue la forma de biomasa predominante. Por el contrario, en las fermentaciones 3, 4, 5 y 6 a velocidades de agitación bajas (≤ 0.5 vvm), la forma de biomasa presente estuvo constituida en su totalidad por micelio en forma de agregados; sin embargo, en ningún caso se presentó una limitación de oxígeno ya que el disuelto se mantuvo en valores superiores a 50% con todos los caudales de aire evaluados.

Los datos de peso seco obtenidos experimentalmente permitieron comprobar la hipótesis de que los factores evaluados afectaron directamente la productividad del proceso de fermentación líquida, ya que las diferencias entre tratamientos presentaron una variación hasta de 10.23% y al realizar el análisis estadístico de los datos empleando la prueba LSD, con un 95% de confianza, se determinó que existieron diferencias significativas entre fermentaciones. Los mejores resultados en términos de biomasa seca (15.61 g/l) se consiguieron bajo las condiciones definidas en la fermentación 4; éstas fueron: altura del riser: 55.1 cm, caudal de aire: 0.5 vvm y volumen de antiespumante: 20 ml.

De ésta fase se concluyó que el cambio en la morfología del hongo fue un elemento que influyó de manera negativa sobre la producción de biomasa al final del proceso, por lo que es necesario llevar un control exacto sobre las condiciones de incubación respecto a la etapa del precultivo, la temperatura y la agitación.

De acuerdo con el análisis Pareto (Figura 3), ninguno de los factores presentó un efecto significativo sobre la concentración de la biomasa obtenida después del proceso de fermentación líquida. Se pudo observar que el resultado más importante fue la interacción de los factores altura de la zona de ascenso y caudal de aire (AB) con un efecto negativo, mientras que el menor efecto lo presentó el caudal de aire y el volumen de antiespumante (BC) de forma también negativa. En cuanto a la combinación altura de la zona de ascenso y volumen de antiespumante su efecto fue positivo.

Segunda Fase: fermentación sólida

Una vez conocidas las mejores condiciones para la producción de *T. koningiopsis* Th003 en fermentación líquida y utilizando este caldo resultante como inóculo, se evaluó la fase de fermentación sólida. Para esta segunda fase se utilizó el sustrato sólido codificado como SS1.

Existen tres grandes tipos de biorreactores para la fermentación sólida: el lecho empacado con aireación forzada, el tambor rotatorio y las bandejas con sustrato estático (Gervais, et al 2003); a este último grupo pertenece el fermentador utilizado, situado en el Laboratorio de Control Biológico. El fermentador sólido empleado contiene una cámara en acero inoxidable que permite poner 47 bandejas separadas entre sí, cargadas con 1.1 kg de sustrato húmedo, con una capacidad de carga de 60 kg. Tal fermentador tiene un sistema de control de temperatura de tipo proporcional On / Off y dos resistencias de 208 Watts para esterilización *in situ*.

Para determinar las condiciones óptimas de operación, se aplicó un diseño experimental simplex. La elección de los factores se efectuó teniendo en

cuenta 3 tipos de características: las relacionadas con el equipo (número de bandejas), las condiciones físicas de la fermentación (temperatura) y las relacionadas con el hongo *T. koningiopsis* Th003 (volumen de inóculo).

Se eligió la temperatura debido a que es un factor clave dentro del proceso de fermentación sólida, así mismo está directamente relacionado con la actividad metabólica del microorganismo y con la velocidad de crecimiento (Krishna, 2005). El volumen del inóculo líquido obtenido en el fermentador airlift y aplicado al sustrato sólido es un factor importante pues de su concentración final depende la velocidad de colonización del sustrato sólido (Krishna, 2005 y Pandey, 2003). La cantidad de bandejas empleada para llevar a cabo cada corrida experimental también es importante puesto que el espacio entre ellas limita la entrada de luz al sistema (sustrato+microorganismo). La variable de respuesta escogida fue la concentración final de conidios y los niveles seleccionados para cada uno de los factores se determinaron teniendo en cuenta los valores reportados por la literatura consultada para este tipo de procesos (Tabla 4).

El sustrato sólido se inoculó con el caldo de fermentación proveniente del biorreactor airlift y la temperatura y el caudal de aire se ajustaron según las condiciones de fermentación establecidas.

4.3.2 Resultados fermentación bifásica / segunda fase

La evaluación del proceso de esporulación del hongo se hizo al día 7 de fermentación. Los factores evaluados durante la fermentación bifásica tuvieron diferentes efectos sobre la concentración de conidios obtenidos.

Tabla 4. Factores y niveles evaluados para la fermentación sólida del hongo *T. koningiopsis* Th003 en un biorreactor de bandejas.

VARIABLES DE ESTUDIO	Nivel bajo	Nivel alto	VARIABLE RESPUESTA
Temperatura	25°C	27°C	Concentración de conidios (conidios/g)
Cantidad de bandejas	10	15	
Volumen de inóculo líquido	110 ml	220 ml	
Caudal de aire inyectado	0vvm, 0.25vvm, 0.5vvm y 1vvm		

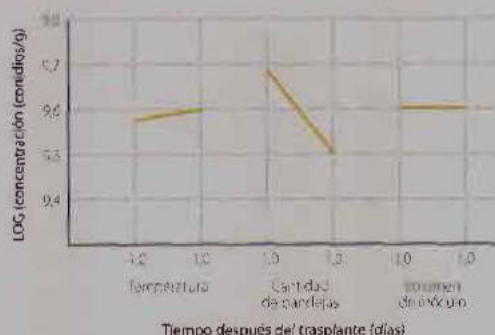


Figura 4. Representación gráfica de los efectos principales sobre la concentración de conidios de los factores evaluados en la fermentación sólida.

nida. Al analizar por separado el efecto de los factores principales, se precisó que la cantidad de bandejas fue el que tuvo mayor influencia sobre la variable de respuesta, siendo éste un efecto negativo. En segundo lugar de magnitud se encontró el factor temperatura, el cual presentó un efecto positivo sobre la concentración de conidios, mientras que el tercer factor en orden de tamaño se refiere a la concentración del inóculo proveniente de la fermentación líquida anterior y no presentó efecto alguno sobre la conidiación del hongo *T. koningiopsis* Th003 (Figura 4).

En función de estos resultados se concluyó que el volumen de inóculo empleado (en forma de micelio principalmente) no presentó un efecto significativo

sobre la concentración de conidios obtenida al final de la fermentación bifásica, debido a que los niveles de los volúmenes evaluados fueron suficientes para cubrir de forma homogénea el sustrato sólido y permitir así una esporulación similar. Sin embargo, la combinación del volumen de inóculo con el factor temperatura, mostró tener el mayor efecto negativo sobre la producción final de los conidios del hongo.

La mayor concentración del hongo se alcanzó bajo las condiciones de temperatura de incubación de 27 °C, flujo de aire de 0 vvm y 220 ml de inóculo (Tabla 5, Figura 5). La concentración de conidios en las bandejas fue del orden de 10^9 conidios/g, siendo el valor máximo $2,79 \times 10^9$ conidios/g y el valor promedio de $1,29 \times 10^9$ conidios/g.

Después de 9 días de fermentación, divididos en 2 días de fermentación líquida y 7 días de fermentación sólida, la productividad promedio de la fermentación bifásica fue de $5,97 \times 10^6$ conidios/Kg.h. Este valor es relativamente bajo comparado con los alcanzados por Kubota (1995) y Agosin *et al.* (1997) quienes obtuvieron valores de $6,0 \times 10^{10}$ conidios/Kg.h y $1,4 \times 10^{11}$ conidios/Kg.h respectivamente, en fermentación sólida de *Trichoderma harzianum*.

La baja productividad en la fermentación bifásica fue consecuencia del largo tiempo de fermentación (216 horas), que incluye la producción del preinó-

Tabla 5. Producción de conidios de *T. koningiopsis* Th003 durante la fermentación bifásica.

Bandeja	Concentración (conidios/g)	Log concentración
1	$1,71 \times 10^9$	9,23
2	$9,80 \times 10^8$	8,99
3	$2,79 \times 10^9$	9,45
4	$9,84 \times 10^8$	8,99
5	$6,70 \times 10^8$	8,83
6	$1,13 \times 10^9$	9,05
7	$1,08 \times 10^9$	9,03
8	$1,00 \times 10^9$	9,00
	Desviación estándar	0,19
	Promedio concentración	$1,29 \times 10^9$
	Coefficiente de variación (%)	0,02



Figura 5. Crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 por fermentación bifásica.

culo (48 horas), haciendo que la concentración del orden de 10^9 conidios/g, encontrada al final de la fermentación sólida, no sea suficiente para alcanzar una productividad superior a 1.0×10^{10} conidios/Kg.h.

4.2.1.2 Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido (SSF) se define como el cultivo de microorganismos sobre un soporte sólido humedecido, un vehículo inerte o sobre sustratos insolubles que además pueden ser usados como fuente de carbono y de energía. Esta fermentación tiene lugar en ausencia o con muy baja cantidad de agua libre (Holker *et al.*, 2004). Es utilizada en varios bioprocesos como bioremediación, biodegradación de compuestos tóxicos y biotransformación de residuos agrícolas, así como en la producción de metabolitos secundarios como antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de plantas, enzimas, ácidos orgánicos, biocombustibles y bioplaguicidas. Frente a la fermentación líquida, la sólida presenta rendimientos más altos para el caso de hongos filamentosos; esto se atribuye principal-

mente a que tal fermentación simula el hábitat natural del microorganismo (Pandey, 2003).

La fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003 se llevó a cabo en el mismo fermentador sólido estático de bandejas descrito anteriormente. El sustrato fue el mismo que el utilizado para la fermentación bifásica, es decir el codificado como SS1 pero con un pH ajustado a 4.0 (HCl 0.1 M), el cual reduce el riesgo de contaminación por bacterias y favorece la esporulación del hongo (Peña, 2002).

Con el fin de estandarizar los procedimientos de fermentación sólida a escala piloto, y teniendo en cuenta los resultados encontrados en la fermentación bifásica en cuanto a la influencia del número de bandejas, se realizaron 4 lotes con 14 bandejas cada uno. El inóculo se preparó a partir del hongo crecido durante 7 días en cajas de Petri con medio de cultivo PDA, al cual se le adicionaron 10 ml de solución estéril Tween 80 a 0.1% (v/v) y se removieron los conidios. La concentración de la suspensión de estos fue ajustada a 1.0×10^7 conidios/ml.

A diferencia de la fermentación bifásica, donde la inoculación del sustrato se hizo desde la bomba de inyección a través de boquillas de 1 mm, la inoculación del sustrato con *T. koningiopsis* Th003 en fermentación sólida se efectuó por aspersión directa, usando atomizadores de 500 ml los cuales permitieron una aspersión homogénea de la suspensión de conidios sobre la superficie. Bajo condiciones de asepsia se aplicaron 15 ml de la suspensión para una cantidad aproximada de 1.5×10^8 conidios/bandeja. Posteriormente, las bandejas fueron incorporadas al fermentador, donde se mantuvieron en condiciones de 27 °C, una humedad de 60 a 65% y ausencia de inyección de aire.

Después de seis días de incubación se procedió a un muestreo al azar tomando 5 g del sustrato colonizado por cada bandeja. A estas muestras se les determinó la concentración (conidios/g) por recuento en cámara de Neubauer y el contenido de humedad (%), usando una balanza halógena OHAUS MB 45. A los resultados se les fijó el coeficiente de variación para verificar el nivel de reproducibilidad entre lotes.

Tabla 6. Coeficientes de variación de la humedad (%) y concentración final (conidios/g) del sustrato esporulado para la fermentación sólida.

Lote	Coefficiente de variación para la humedad (%)	Coefficiente de variación para la concentración (%)
Lote 1	14.75	1.14
Lote 2	15.69	2.60
Lote 3	18.10	2.42
Lote 4	18.44	1.64

4.3.3. Resultados fermentación sólida

En los cuatro lotes de producción se observó que la humedad del sustrato dentro del fermentador presentó variabilidad entre las bandejas para la variable de respuesta, dándose los menores valores en las bandejas cercanas a la resistencia del fermentador (Figura 6). Adicionalmente, los coeficientes de variación entre lotes fueron superiores a 10%, encontrándose valores entre 14.75% y 18.44% (Tabla 6). Esta variabilidad en el contenido de humedad podría ser causada por el gradiente dentro de la cámara del fermentador. Resultados similares fueron encontrados por Cruz (2007) quien reportó un gradiente de humedad al finalizar la fermentación entre 19% y 39%.

En cuanto a la concentración del sustrato colonizado, después de seis días de fermentación en los cuatro lotes, en la mayoría de los casos se encontraron valores superiores a 1.0×10^9 conidios/g (Figura 7), mostrando una homogeneidad en el crecimiento del hongo en

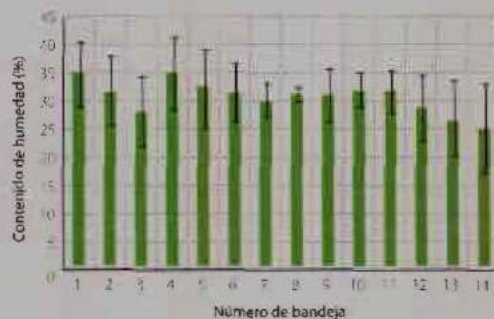


Figura 6. Humedad del sustrato colonizado por *T. koningiopsis* Th003 en la fermentación sólida. Las líneas sobre las barras representan la desviación estándar de los datos de humedad de cuatro lotes de fermentación (n=4).

Tabla 7. Rendimiento en el proceso de fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003.

Lote	Rendimiento SSF (conidios/kg hora)
Lote 1	9.15×10^9
Lote 2	1.41×10^{10}
Lote 3	1.63×10^{10}
Lote 4	1.93×10^{10}

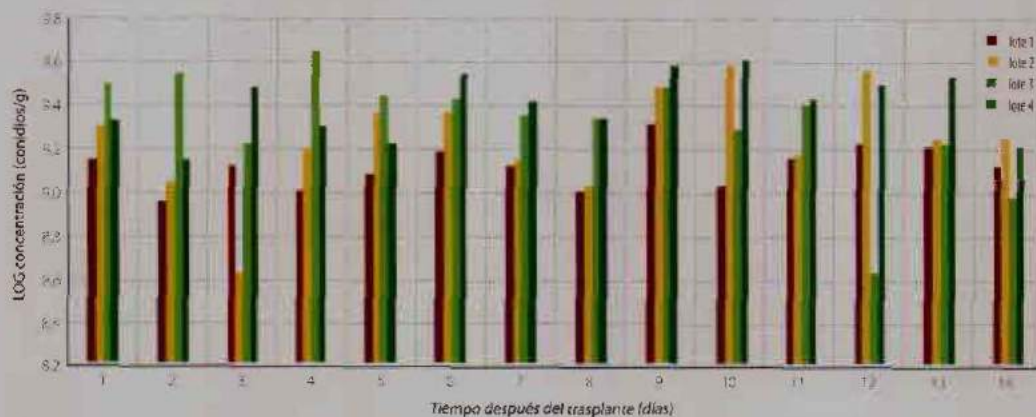


Figura 7. Concentración de conidios de *T. koningiopsis* Th003 en el sustrato colonizado en la fermentación sólida

la totalidad de los lotes evaluados. Este crecimiento fue uniforme no sólo en la superficie del sustrato, sino también en su interior (Figura 8). Al determinar los coeficientes de variación por lote (Tabla 7) se encontraron valores entre el 1.14 y 2.60%, inferiores a 10%, y por lo tanto indicaron que la producción entre lotes fue reproducible en el tiempo.

Al evaluar el rendimiento en los cuatro lotes en términos de conidios/kg.hora se encontraron valores entre 9.15×10^9 y 1.93×10^{10} conidios/kg.hora, con un valor promedio de 1.42×10^{10} conidios/kg.hora (Tabla 8). Estos resultados son cercanos a los encontrados por Kubota (1995) y Agosin *et al.* (1997) quienes reportaron rendimientos de 6.0×10^{10} conidios/kg.hora y 1.4×10^{11} conidios/kg.hora respectivamente, con *T. harzianum* para fermentaciones sólidas con granos de maíz como sustrato.

Al comparar los resultados de rendimiento de la producción de conidios, tanto en fermentación bifásica (5.97×10^9 conidios/kg.hora) como en fermentación sólida (1.42×10^{10} conidios/kg.hora), se concluyó que el proceso SSF presentó cerca del doble de rendimiento; este análisis permitió seleccionar la fermentación SSF como el proceso estándar para la producción de la biomasa utilizada como principio activo del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.



Figura 8. Crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 por fermentación sólida.

Un factor muy importante es la propiedad hidrofóbica que exhiben los conidios producidos en un sistema de fermentación sólida, determinado por la acumulación en la pared celular de proteínas hidrofóbicas y compuestos como las tricozianinas, que en conjunto repelen el agua. Esto tiene gran importancia para una rápida y persistente adherencia a la superficie de las plantas y de otros hongos que tienen iguales propiedades de hidrofobicidad (Jenkins *et al.*, 2000).

4.2.2 Escalamiento del proceso de formulación de *T. koningiopsis* Th003

Una vez se estandarizó la metodología de fermentación para la producción masiva de *T. koningiopsis* Th003, se desarrolló el escalamiento, a nivel de planta piloto, de la formulación del bioplaguicida diseñado como un polvo mojable (WP) teniendo en cuenta las operaciones descritas en la figura 1.

Para dicho escalamiento se definieron los puntos críticos de cada una de las operaciones unitarias involucradas. La importancia de esos puntos radica en el control que ejercen sobre los procesos, de manera que permiten definir si un lote terminado o en curso es aprobado. Los puntos críticos del proceso de formulación fueron en su orden, el rendimiento de separación en peso de conidios húmedos por unidad de biomasa procesada (g/kg), la concentración de la mezcla (conidios/g) y la concentración final después del proceso de secado (conidios/g). Para el escalamiento de las operaciones de formulación se evaluaron cuatro lotes piloto de aproximadamente 10 Kg, y a los resultados encontrados se les determinó el coeficiente de variación con el fin de evaluar la reproducibilidad del proceso.

Separación de los conidios

Los conidios obtenidos en la fermentación sólida fueron separados por medio de un proceso de centrifugación continua. Inicialmente fueron apartados del sustrato mediante un lavado utilizando solución Tween 80 (0.1% v/v) y posteriormente filtrados a través de una tela muselina. La suspensión de conidios sin sustrato fue alimentada con una bomba peristáltica (Pump drive PD5006) a razón de 24 L/h hacia una

centrífuga continua (Carl Padberg 77933) cuya velocidad promedio de operación fue de 27,000 rpm.

La biomasa obtenida (conidios húmedos) fue pesada y se determinaron la concentración (conidios /g) y la humedad (%). Al final de la operación se anotó el rendimiento en términos de g de conidios húmedos/kg de sustrato procesado para los cuatro lotes evaluados.

4.3.4 Resultados escalamiento de la formulación / separación

Los conidios húmedos obtenidos en los 4 lotes presentaron humedades entre 61.08% y 63.65% con una media de 62.36%. En cuanto a la concentración se encontraron valores entre 1.5×10^{10} y 3.0×10^{10} conidios/g con un valor promedio de 2.25×10^{10} conidios/g (Figura 9). Para lograr que el polvo mojable de *T. koningiopsis* tuviera una concentración final de 1.0×10^9 conidios/g fue necesario partir de conidios húmedos con una concentración mínima de 1.0×10^{10} conidios/g; en esa forma los cuatro lotes evaluados estuvieron dentro de este rango, con lo cual se garantizó que el producto final cumpliera con los límites de aceptación establecidos.

En cuanto al rendimiento en términos de g de conidios/kg de biomasa procesada se observaron valores entre 73.20 y 84.40 g/kg (Tabla 8). Esta variable fue considerada como un punto crítico para el desarrollo de la operación de centrifugación ya que permite controlar el proceso y asegurar que no se tengan problemas con el equipo (centrífuga continua), con la inyección de la suspensión (bomba peristáltica) y con los tiempos de operación. Teniendo en cuenta los valores obtenidos para estos cuatro lotes y los resultados previamente encontrados en

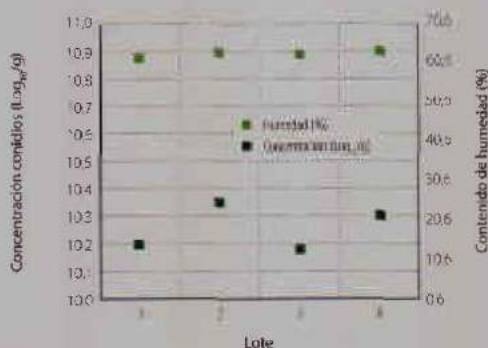


Figura 9. Concentración y contenido de humedad de conidios de *T. koningiopsis* Th003 obtenidos después del proceso de centrifugación.

condiciones de laboratorio, se decidió establecer como límite un rendimiento de separación mínimo de 70 g de conidios/kg de biomasa procesada.

Operación de mezcla

Los conidios húmedos fueron mezclados con excipientes que brindan al bioplaguicida final propiedades de desintegración y protección frente a los rayos ultravioleta del sol. Inicialmente, esos excipientes fueron introducidos por cinco minutos en un mezclador planetario; luego los conidios húmedos y agua estéril fueron adicionados en la marmita poco a poco. Al final de la mezcla se tomaron muestras de tres puntos de la marmita con el fin de determinar la concentración (conidios/g) y la humedad (%).

El tiempo de mezcla ideal fue determinado evaluando diferentes lapsos (10, 15 y 20 min) a la máxima velocidad de agitación. La distribución del microorganismo se determinó mediante el IM (índice de Mezcla), utilizando como trazador la concentración de conidios de *T. koningiopsis* en la marmita.

Tabla 8. Resultados obtenidos en la operación de separación para cuatro lotes de *T. koningiopsis* Th003

Lote	Concentración (conidios/g)	Rendimiento (g conidios/ húmedos/kg biomasa procesada)	Humedad (%)
1	1.56×10^{10}	73.20	61.08
2	2.19×10^{10}	82.73	63.65
3	1.51×10^{10}	84.42	62.07
4	1.99×10^{10}	81.80	62.44

4.3.5 Resultados escalamiento de la formulación / mezcla

En la Figura 10 se observa que a los 10 y 20 minutos el índice de mezcla está alejado del valor de 1, mientras que a los 15 minutos es igual o cercano a 1, es decir que los valores teóricos de la concentración de conidios y los determinados experimentalmente fueron muy similares. De esa manera un tiempo de 15 minutos fue seleccionado como el tiempo óptimo de mezcla. Este comportamiento también se observó en los demás lotes evaluados (Tabla 9). En cuanto a la humedad final de la mezcla no se encontraron diferencias significativas entre lotes, por lo que se estableció para esta característica un rango de aceptabilidad comprendido entre 43 y 45%.

Para garantizar una concentración final de 1.0×10^9 conidios/g en el producto final seco, se determinó como límite de aceptación en el proceso de mezcla una concentración mínima de 6.0×10^8 conidios/g en los tres puntos muestreados de la marmita. Los cuatro lotes fabricados cumplieron con los límites fijados tanto de humedad como de concentración, asegurando así la homogeneidad del producto obtenido.

Operación de secado

El porcentaje de humedad es de gran importancia, ya que para que el microorganismo se encuentre en un estado de latencia es necesario almacenarlo a bajas humedades. Para la mayoría de productos de control biológico se sugiere mantenerlos con humedades inferiores a 10% (Burges, 2000).

Para precisar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de germinación y la pérdida de humedad de los conidios de *T. koningiopsis* Th003, se eva-

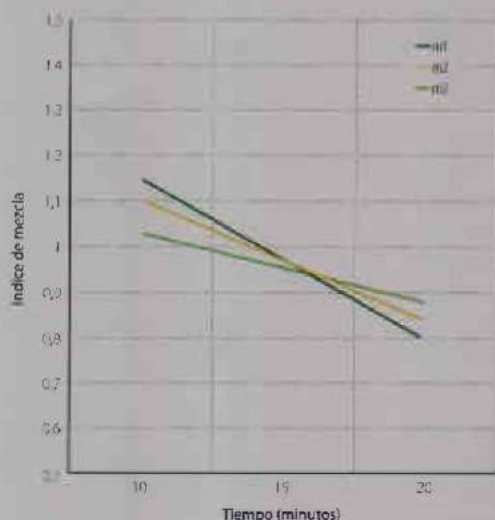


Figura 10. Índice de mezcla (IM) para el lote 1 de *T. koningiopsis* Th003. m. muestra.

luaron cuatro cinéticas de secado a 27 °C, 30 °C, 33 °C y 36 °C. La cinética a 27 °C se mantuvo como control por ser ésta la temperatura recomendada en estudios previos realizados en condiciones de laboratorio. El cuarto de secado utilizado para las cinéticas presenta las siguientes características: dimensiones de 1,3x1x2 m de alto, 41 cortinas móviles para el paso del aire y controladores de temperatura Autonic del tipo TZ45T y TZN45 para un secado directo con aire, de HR promedio de 50% (Figura 11).

Una vez iniciadas las cinéticas de secado, se tomaron dos muestras cada dos horas durante aproximadamente 25 horas con el fin de determinar la humedad (%) y la germinación de los conidios (%) mediante las técnicas de pérdida de peso y microscopía respectivamente.

Tabla 9. Resultados de la operación de mezcla húmeda de 4 lotes de *T. koningiopsis* Th003.

Lote	Tiempo de mezcla ideal (minutos)	Humedad (%)	Concentración promedio (conidios/g)
1	15	44.06	7.60×10^8
2	15	44.96	9.40×10^8
3	15	44.24	8.31×10^8
4	15	43.18	9.21×10^8



Figura 11. Cuarto de secado de bandejas.

4.3.6 Resultados escalamiento de la formulación / secado

Al realizar las cinéticas de secado a las diferentes temperaturas (27, 30, 33 y 36°C) se observó respecto a la pérdida de humedad que a mayor temperatura el producto se seca más rápido, hasta llegar a valores de humedad por debajo de 6% (Figura 12). Para llegar a este valor se requirieron 17 horas a 27 °C y 17,5,

13 y 5 horas a 30 °C, 33 °C y 36 °C respectivamente. En cuanto a la germinación los resultados demuestran que con el aumento de temperatura la germinación de los conidios se ve afectada negativamente, acentuándose este efecto a mayores tiempos de exposición (Figura 13). A 27 °C después de 17 horas de secado se presentó una reducción de la germinación en 5.1%, mientras que a 30 °C disminuyó 7.08% después de 19 horas. A 33 °C la merma fue relativamente alta (12.10%); no obstante, el mayor efecto se presentó a 36 °C ya que con sólo 5 horas de secado tales valores se redujeran en 30% (Figura 14). La pérdida en la germinación a 30 °C no fue significativamente diferente comparada con la obtenida a 27 °C, por lo que estas temperaturas podrían ser utilizadas en el proceso de secado. Las temperaturas de 33 °C y 36 °C no fueron recomendadas para el secado, ya que aunque los tiempos fueron cortos, las pérdidas en germinación fueron superiores a 10%.

Operación de Molienda

Al producto seco obtenido se le disminuyó el tamaño de partícula hasta obtener uno de 500 µm.

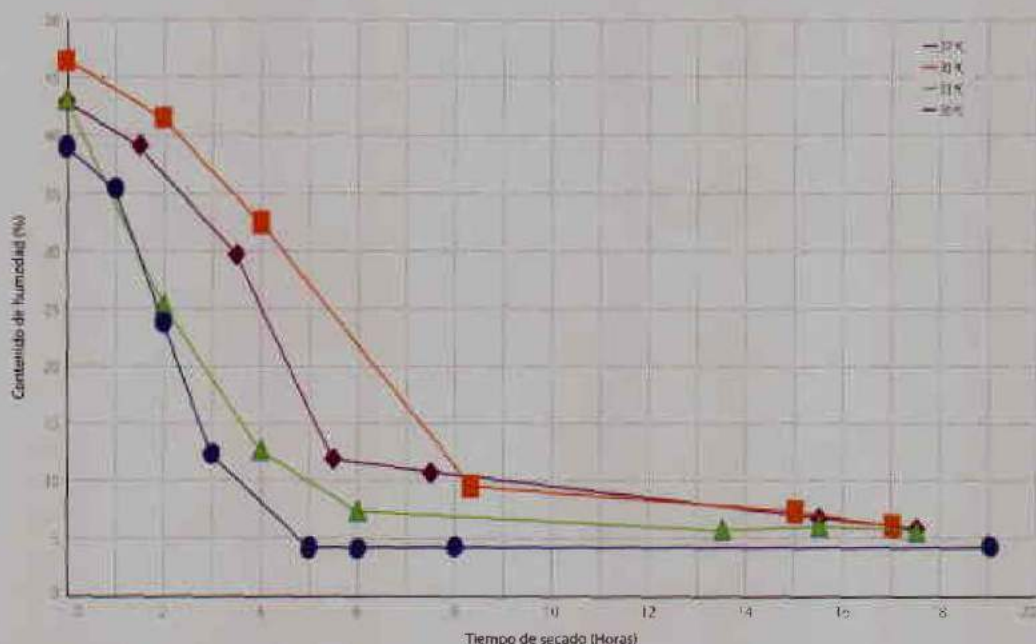


Figura 12. Efecto de la temperatura de secado sobre la dinámica de pérdida de humedad del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.

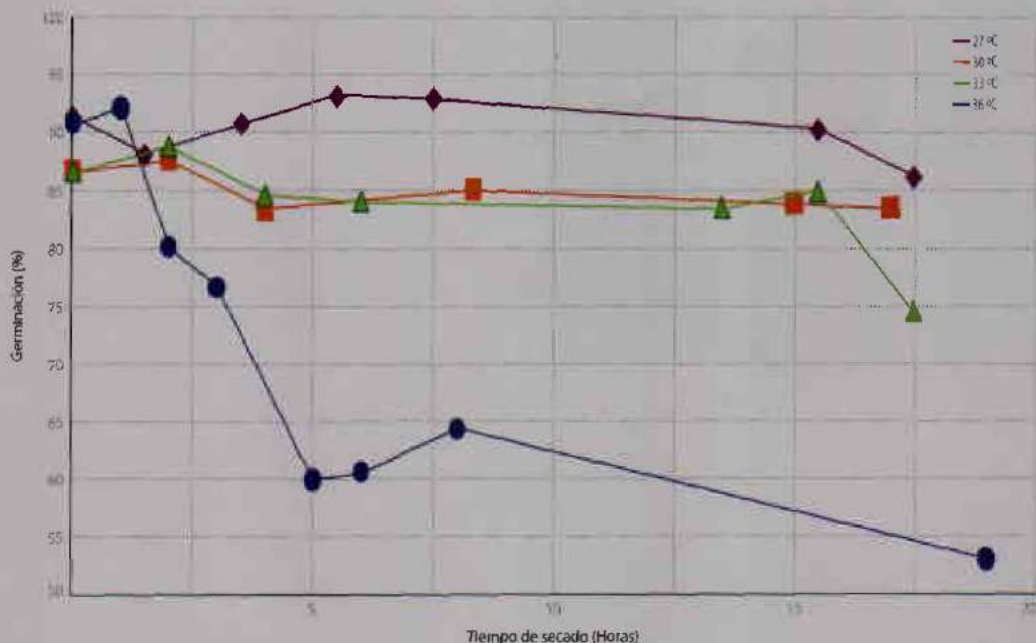


Figura 13. Efecto de la temperatura de secado sobre la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 en el bioplaguicida.

El polvo resultante fue empacado en bolsas metalizadas con capacidad de 500 g y selladas al vacío. Finalmente, se llevaron muestras por duplicado de 5 g de cada lote al laboratorio certificado (Biotécnica) para realizar el control de calidad del producto terminado.

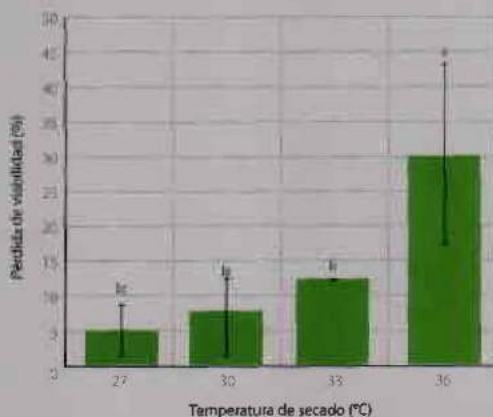


Figura 14. Pérdida de viabilidad de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 por efecto de la temperatura de secado a la que fue sometido el bioplaguicida.

4.3.7 Resultados escalamiento de la formulación / molienda

Una vez terminados los procesos de producción del bioplaguicida, cada uno de los lotes se sometió a protocolos de análisis de control de calidad. La concentración de los productos finales se estimó mediante el recuento por triplicado en cámara de NeuBauer, mientras que la germinación (%) de los conidios formulados se determinó después de 24 horas de incubación en medio agar agua con el recuento de los conidios germinados comparado con el total.

Los controles de calidad de los lotes obtenidos se resumen en la Tabla 10.

Al comparar los resultados de control de calidad de los lotes, se puede concluir que todos fueron aprobados en función de los límites de aceptabilidad del producto, los cuales fueron: una concentración final superior a $1,0 \times 10^9$ conidios/g, una humedad entre 3 y 7 % y por último una germinación superior a 80 % después de 24 horas.

Tabla 10. Resultados control de calidad del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.

Lote	Concentración (conidios/g)	Germinación (%)	Humedad (%)
1	1,51 x10 ⁹	81.37	3.52
2	1,58 x10 ⁹	86.55	5.07
3	1,70 x10 ⁹	89.55	3.36
4	1,67 x10 ⁹	80.34	3.34

4.4 CONCLUSIONES

En la fermentación bifásica de *T. koningiopsis* Th003, la combinación del volumen de inóculo con el factor temperatura, tiene el mayor efecto sobre la producción final de los conidios del hongo, siendo la concentración promedio de 1.29×10^9 conidios/g la alcanzada para el mejor tratamiento.

La mejor metodología de producción de *T. koningiopsis* Th003 a nivel planta piloto y reproducible en el tiempo fue la fermentación sólida, con una productividad de 1.42×10^{10} conidios/kg.

Se estandarizaron los límites de aceptabilidad y los puntos críticos de las operaciones involucradas en la producción a nivel planta piloto del bioplaguicida polvo mojable (WP) a base de *T. koningiopsis* Th003.

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores de Corpoica expresan sus agradecimientos a los investigadores Laura Villamizar Ph.D., Carlos Andrés Moreno M.Sc, Liz Alejandra Uribe M.I., Adriana Santos M.I., así como a las tesis Carolina Cruz, Isabel Quiroga y Eliana Cañón de Microbiología Industrial de la Universidad Javeriana y a los auxiliares del Laboratorio de Control Biológico Juan Carlos Barrios y Aura María Salamanca, quienes colaboraron con las presentes investigaciones y desarrollos.

- Agosin, E., Latorre, B., San Martín, R., Vásquez, G., 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against botrytis bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*, 209-21416.
- Cruz, C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* TH003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 127.
- Drysdale, R., Ride, J. 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiology Plant Pathology*, 2: 7-15.
- Duarte, A. 1995. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Editorial Universidad Nacional de Colombia. Bogotá pp 125-135.
- Flórez, J. 2002. Diseño y puesta en marcha de un reactor airlift para la producción masiva de microorganismos de interés en control biológico. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de América. pp 20-35.
- Gallego, D., Laverde, M., 2002. Introducción a la ingeniería bioquímica. Editorial Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. pp 150-160
- Gervais P., Molin, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 85-101.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64:175-86.
- Jenkins, N., Grzywacz, D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents-Assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 753-777.
- Krishna, C. 2005. Solid-State Fermentation Systems-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 1-30.
- Kubota, T. 1995, 1998. *Trichoderma harzianum* SK-55 fungus fungicide containing it, method of manufacture of the same and its use. United States Patent, 5: 422,107.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
- Peña, V. 2002. Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de grado. Microbiología industrial. Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. 153 p.
- Singhania, A. K., Patel R., Soccolc, A. 2008. Recent advances in solid-state fermentation. India CSIR, Trivandrum School of Life Sciences, 695 019.
- Tomaselli, C., Vergolignan, C., Feron, G., Durand, A. 2001. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 7: 1-5.

**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 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 Bioproductos - 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

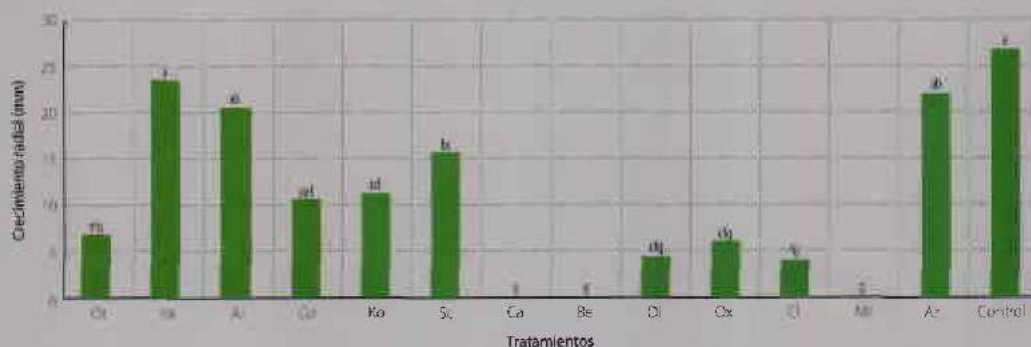


Figura 1. Efecto de los plaguicidas evaluados (25% de la dosis recomendada), sobre el crecimiento radial de *Trichoderma koningiopsis* después de seis días de incubación. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. Tukey ($\alpha = 95\%$). La codificación de los plaguicidas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

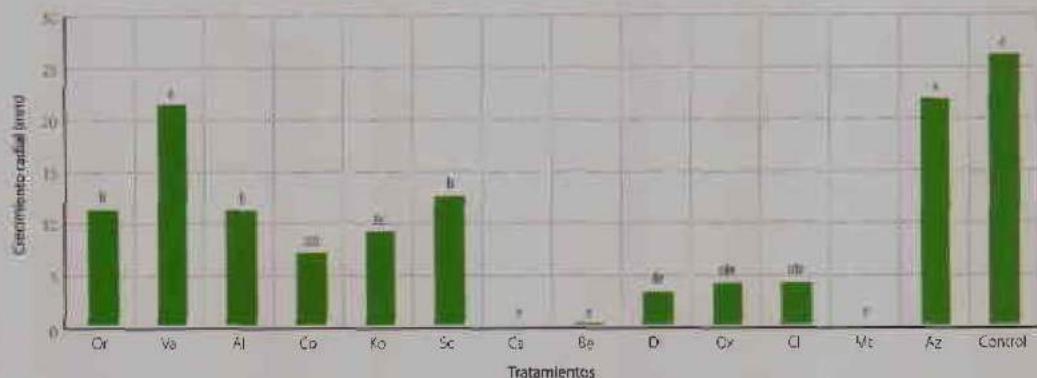


Figura 2. Efecto de los plaguicidas evaluados (50% de la dosis recomendada), sobre el crecimiento radial de *Trichoderma koningiopsis* después de seis días de incubación. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. Tukey ($\alpha = 95\%$). La codificación de los plaguicidas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

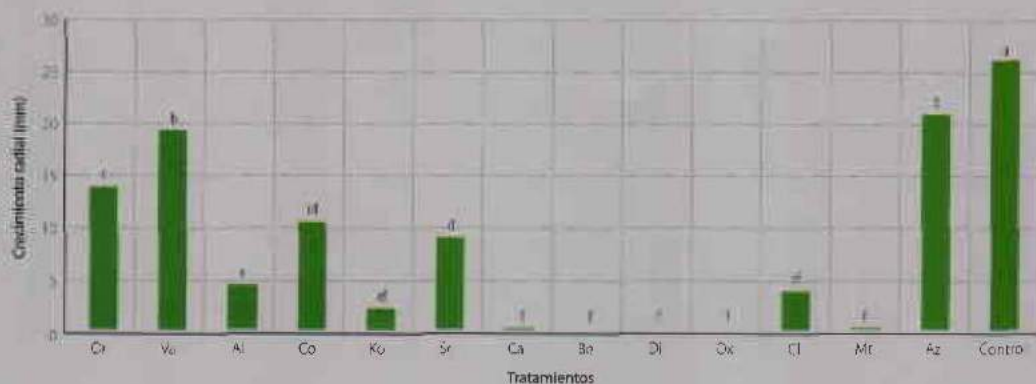


Figura 3. Efecto de los plaguicidas evaluados (dosis recomendada), sobre el crecimiento radial de *Trichoderma koningiopsis* después de seis días de incubación. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. Tukey (95%). La codificación de los plaguicidas corresponde a 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 ANAVA 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®, Benomi® 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-triofanato® (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 Mancozeb (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* (Th03) 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* Th03 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* Th03, 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 g³ 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.

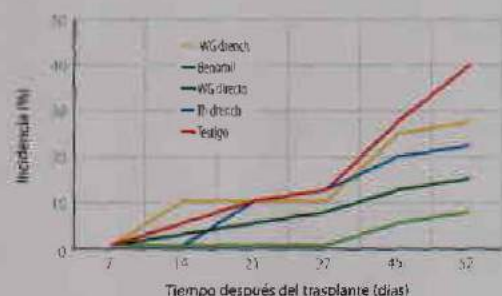


Figura 1. Efecto de las formas de aplicación del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la incidencia de la enfermedad mohor blanco de la lechuga causada por *Sclerotinia minor* Sc001. El bioplaguicida WG [1x10⁹ conidios/g] se usó en dosis de 1 g/L cuando se reconstituyó en agua o se aplicaron 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 patogenicidad 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 granulos 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 mohor 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 mohor blanco

La enfermedad mohor 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 mohor 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 mohor 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%).

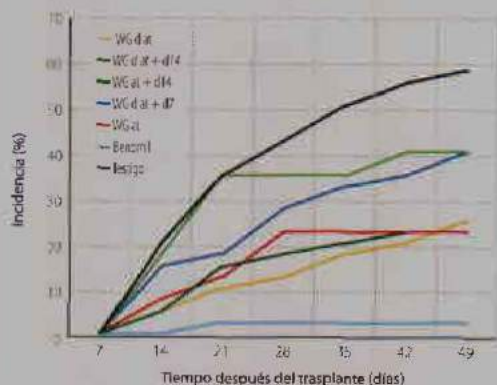


Figura 2. Efecto de las formas y las frecuencias de aplicación del bioplaguicida TricoTec WG a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la incidencia de la enfermedad moho blanco de la lechuga causada por *S. minor* Sc001. En cada materia se inocularon 11 esclerocios del fitopatógeno *Sclerotinia minor* Sc001 y posteriormente se trasplantó una planta de lechuga tipo batavia var. Van max de 4 semanas de edad. El bioplaguicida [1×10^8 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 moho 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.

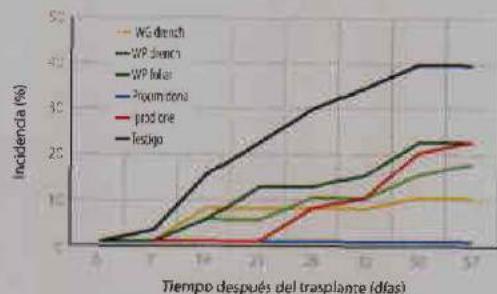


Figura 3. Efecto de dos formulaciones a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la incidencia del moho blanco de la lechuga causada por *Sclerotinia minor* Sc001.

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 Proximadona® 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 posieron 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 (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 mohó 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 [®] ; 1 g/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 mohó 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 periodo 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 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 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 - Plantulas 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 Proclimidona 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

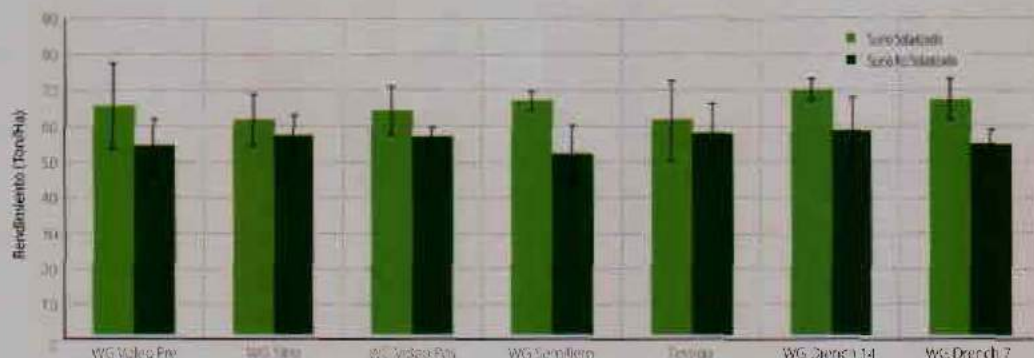


Figura 4. Efecto de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y de la solarización del suelo sobre el crecimiento de las plantas de lechuga expresado en términos de peso fresco. Las líneas verticales sobre las columnas muestran la desviación estándar de los datos (n= 10).

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).

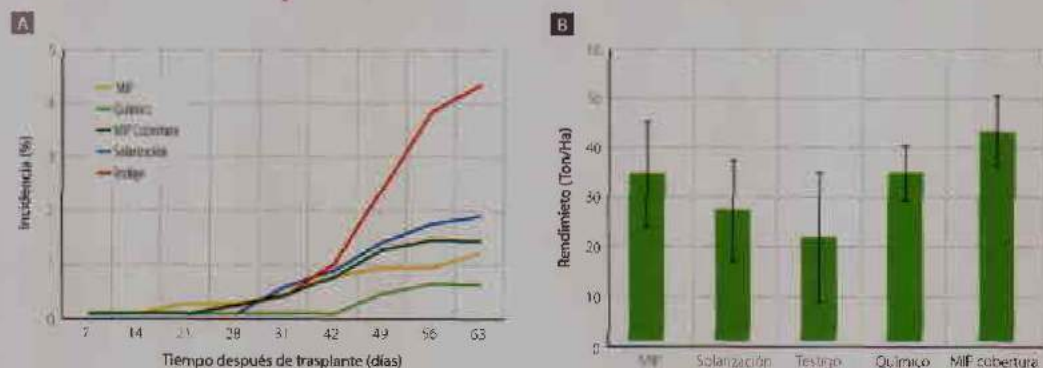


Figura 5. Efecto de un esquema de manejo integrado de enfermedades sobre la incidencia del moho blanco de la lechuga causada por *S. sclerotiorum* (A) y sobre los rendimientos del cultivo (B) a los 70 días después del trasplante en la finca Santa Ana, Madrid (Cundinamarca). Las barras sobre las columnas 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.

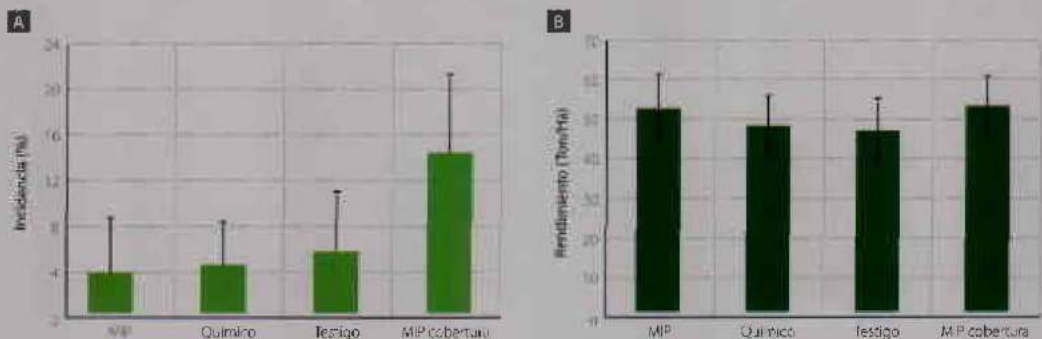


Figura 7. Efecto de un esquema de manejo integrado de enfermedades sobre la incidencia del moho blanco de la lechuga (A) causada por *S. sclerotiorum* y sobre los rendimientos del cultivo (B) a los 83 días después del trasplante en el Centro de Investigación Tibaitatá (Mosquera). Las barras sobre las 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 dio 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

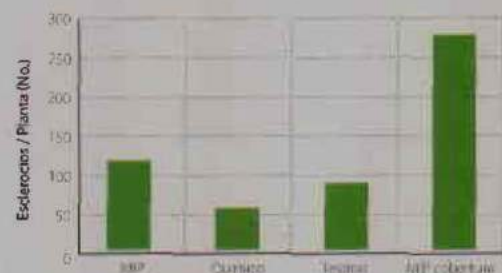


Figura 8. Producción de esclerocios en las plantas de lechuga afectadas por el hongo *S. sclerotiorum* en el segundo experimento en el Centro de Investigación.

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

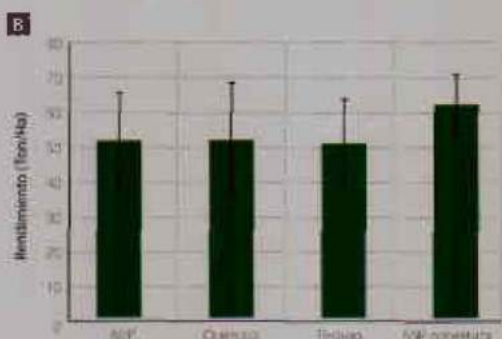
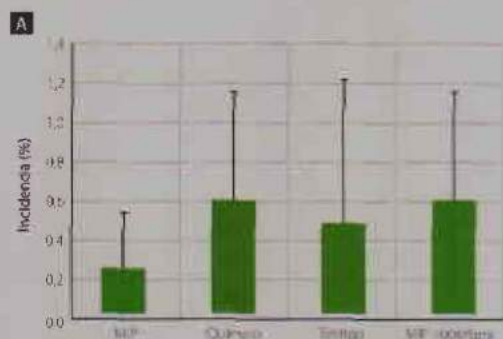


Figura 9. Validación del esquema de manejo integrado de la enfermedad moho blanco de la lechuga en el Centro de Investigación Tibaitatá (Mosquera). Incidencia de la enfermedad moho blanco causada por *S. sclerotiorum* (A) y rendimiento del cultivo (B) registrados a los 91 días después del trasplante. 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 llevó 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 biofungicida 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.	PTH5
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.	Qui
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 biofungicida 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

BIBLIOTECA AGRONÓMICA

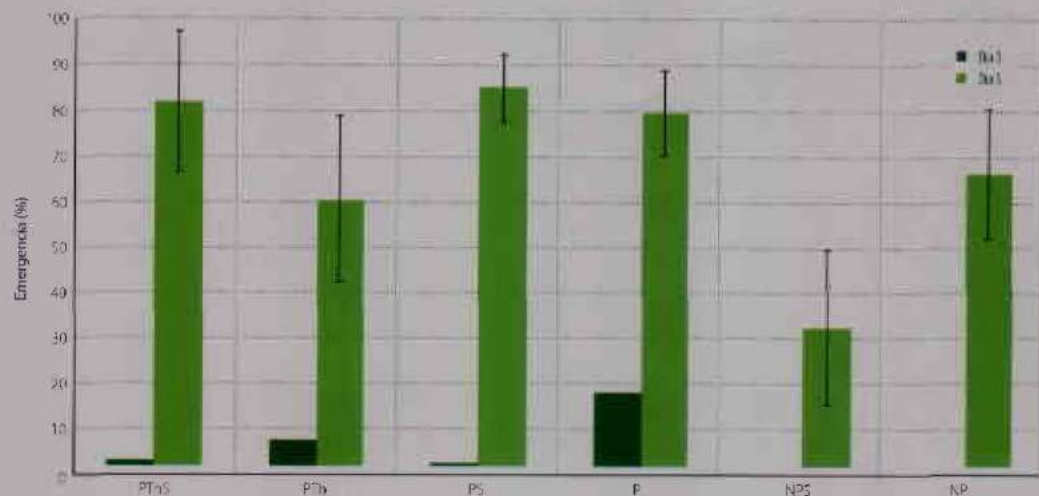


Figura 10. Efecto del uso del bioplaguicida WP a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la emergencia de plántulas de lechuga. El bioplaguicida fue incorporado a la superficie de la semilla (Th) durante la práctica de pregerminación controlada (P) o se incorporó al sustrato de siembra 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).

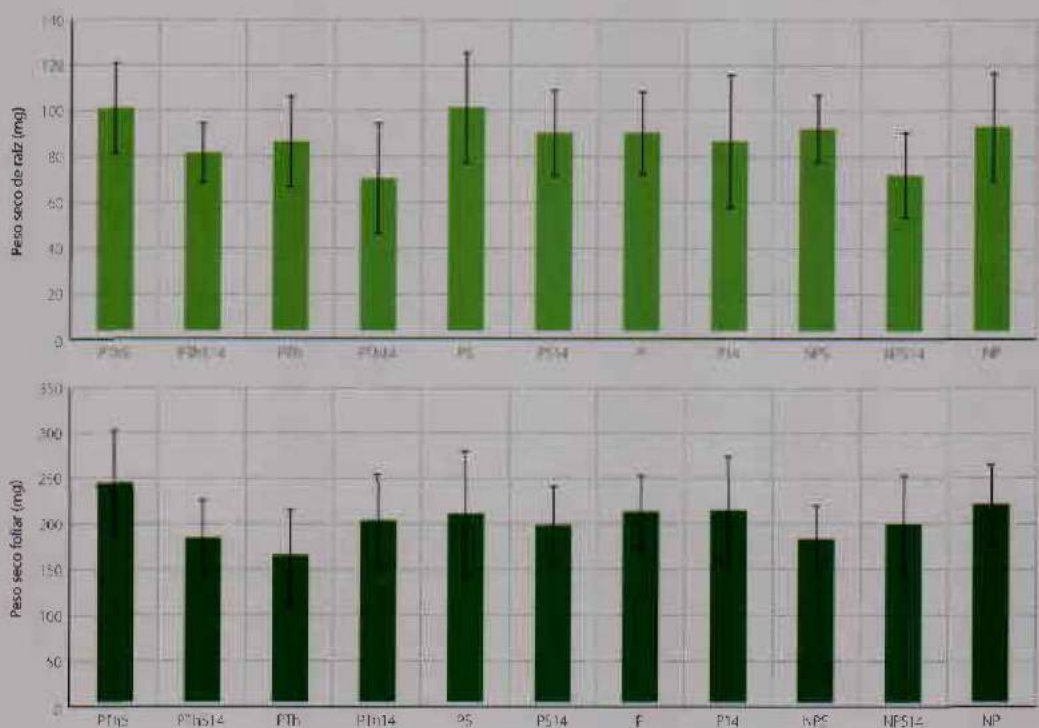


Figura 11. Efecto de la incorporación del bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* Th003 en el semillero de lechuga sobre la acumulación de biomasa 30 días después de la siembra. Además de los tratamientos mencionados antes, se evaluó también la aplicación de la suspensión del bioplaguicida en drench 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).

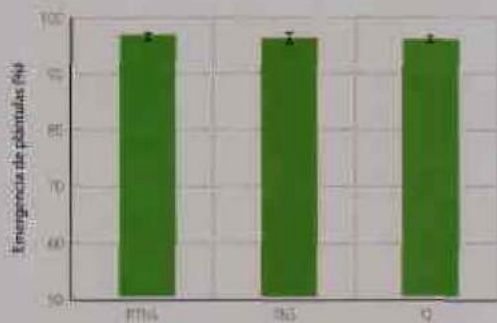


Figura 12. Efecto de *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la emergencia de plántulas de lechuga batavia var. Arizona 6 días después de la siembra. PTH: semilla pregerminada con el bioplaguicida WP Th003 y sembrada en turba humedecida con suspensión de bioplaguicida; TH: semilla sembrada en turba humedecida 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 sí 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

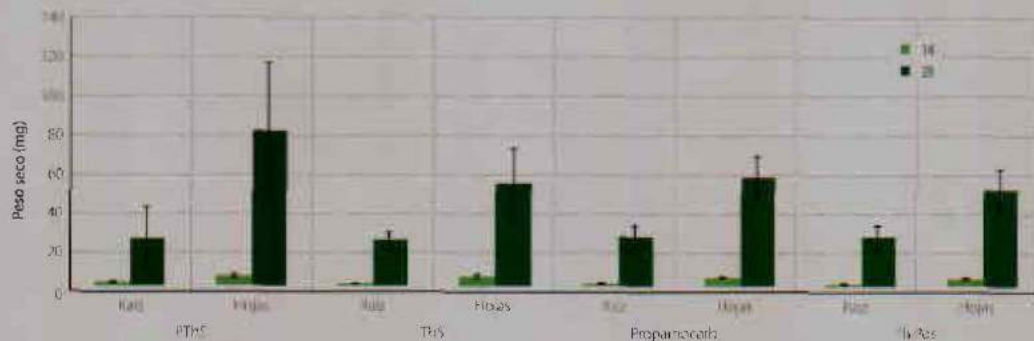


Figura 13. Efecto de *Trichoderma koningiopsis* Th003 sobre la acumulación de biomasa en plántulas de lechuga batavia var. Arizona a los 14 y 28 días después de la siembra. PTH: semilla pregerminada con el bioplaguicida WP Th003 y sembrada en turba humedecida con el bioplaguicida en suspensión; TH: semilla 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., Kunkalikar, 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. En: 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 koringii* 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 Martín, 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 marangueiro. Fitopatologia 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 Mycology 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. Köhli & 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, Kusadası. 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 production systems. Book of abstracts. Sevilla, España. Ediciones de la UdL. 136 p.



Libertad y Orden
República de Colombia
Ministerio de Agricultura y
Desarrollo Rural

Departamento de
CUNDINAMARCA

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural



Asobofrucal



ISBN 978-958-740-026-7



9 789587 400267

