

22476

**BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA**

Reg. 55838

31 AGO. 2009

Estudio de la sensibilidad de *Sclerotinia* sp. a fungicidas utilizados en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*)

LINA GABRIELA ORDÓÑEZ FLÓREZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá D.C.
JUNIO DE 2009**

Estudio de la sensibilidad de *Sclerotinia* sp. a fungicidas utilizados en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*)

LINA GABRIELA ORDÓÑEZ FLÓREZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de:

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá D.C
JUNIO DE 2009

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Estudio de la sensibilidad de *Sclerotinia* sp. a fungicidas utilizados en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*)

LINA GABRIELA ORDÓÑEZ FLÓREZ

APROBADO

Carlos Andrés Moreno Velandia
Director

Laura Fernanda Villamizar Rivero
Codirectora

Gerardo Moreno
Jurado

Ivonne Gutiérrez
Jurado

Estudio de la sensibilidad de *Sclerotinia* sp. a fungicidas utilizados en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*)

LINA GABRIELA ORDÓÑEZ FLÓREZ

APROBADO

Ingrid Schuler Ph. D
Decana académica

Janeth del Carmen Arias M. Sc.
Directora de carrera

A Dios por haberme brindado la sabiduría, la voluntad y la fuerza para obtener grandes triunfos, para alcanzar las metas propuestas y cumplir mis más grandes sueños.

A mi madre María Inés, una mujer muy especial y maravillosa, que con su inmenso amor, su incondicional amistad, su constante esfuerzo, sus sabios consejos y su inigualable ejemplo, hizo que los valores que me inculcó desde mi niñez permitieran hacer de mí una mujer de bien.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), su Directora la doctora Alba Marina Cotes, investigadores y personal de apoyo, por ofrecerme los recursos necesarios para el desarrollo de este estudio.

A Carlos Andrés Moreno Velandia por su dirección, colaboración y apoyo en la culminación de este proyecto.

A Laura Fernanda Villamizar Rivero por su paciencia, sus aportes y asesoría en el análisis de resultados.

A las demás personas que contribuyeron de una u otra forma en el desarrollo de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1. Moho blanco de la lechuga (Lettuce drop)	18
2.1.1. Agentes causales	18
2.1.1.1. Clasificación taxonómica	19
2.1.1.2. Características morfológicas	19
2.1.2. Epidemiología	21
2.1.2.1. Síntomas y signos de la enfermedad	23
2.1.2.2. Patogénesis	24
2.1.3. Herramientas utilizadas para el control del moho blanco de la lechuga	26
2.1.3.1. Biológicas	26
2.1.3.2. Culturales	28
2.1.3.3. Físicas	30
2.1.3.4. Genéticas	31
2.1.3.5. Químicas	32
2.1.3.5.1. Moléculas recomendadas para el control de <i>Sclerotinia</i> spp.	33
2.1.3.5.2. Riesgos de desarrollo de resistencia a fungicidas	38
2.1.3.5.3. Resistencia a fungicidas	39
2.1.3.5.4. Líneas base de fungicidas	41
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	45
3.1. Formulación del problema	45
3.2. Justificación de la investigación	46
4. OBJETIVO	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.1. Reactivación de aislamientos conservados	49
5.2. Aislamiento de hongos a partir de material de campo	49
5.3. Selección de ingredientes activos y dosis para la prueba de sensibilidad	50
5.4. Evaluación de la sensibilidad de <i>S. minor</i> y <i>S. sclerotiorum</i> a fungicidas	51
5.4.1. Obtención de inóculo	51
5.4.2. Preparación de los medios de cultivo con fungicida	51
5.4.3. Prueba <i>in vitro</i> de sensibilidad	52
5.5. Análisis de la información	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
	8

6.1. Aislamiento de <i>Sclerotinia minor</i> y <i>S. sclerotiorum</i>	54
6.2. Evaluación de la sensibilidad de <i>S. minor</i> y <i>S. sclerotiorum</i> a fungicidas	57
6.2.1. Efecto de los fungicidas sobre la velocidad de crecimiento de <i>Sclerotinia</i> sp.	66
6.2.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Sclerotinia</i> sp. por los ingredientes activos	73
6.2.3. Concentración efectiva media (CE ₅₀) de los fungicidas sobre <i>Sclerotinia</i> sp.	77
7. CONCLUSIONES	79
8. RECOMENDACIONES	80
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10. ANEXOS	97

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Moléculas usadas en el control de <i>Sclerotinia</i> spp.	36
Tabla 2. Métodos estandarizados en Cuba para la evaluación de la sensibilidad a los fungicidas	42
Tabla 3. Fungicidas y dosis para la prueba de sensibilidad <i>in vitro</i>	50
Tabla 4. Codificación de los aislamientos de <i>Sclerotinia minor</i> y <i>S. sclerotiorum</i>	55
Tabla 5. Efecto del ingrediente activo Kresoxim-metil en la producción de esclerocios de los 6 aislamientos de <i>Sclerotinia</i> sp. de la Sabana de Bogotá	59
Tabla 6. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc001 expuesto a los diferentes fungicidas	67
Tabla 7. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc002 expuesto a los diferentes fungicidas	69
Tabla 8. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc005 expuesto a los diferentes fungicidas	69
Tabla 9. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc006 expuesto a los diferentes fungicidas	70
Tabla 10. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc007 expuesto a los diferentes fungicidas	71
Tabla 11. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc008 expuesto a los diferentes fungicidas	71
Tabla 12. Sensibilidad <i>in vitro</i> de los aislamientos de <i>Sclerotinia</i> sp. a la dosis recomendada de fungicidas	72
Tabla 13. Concentración efectiva 50 para los aislamientos de <i>Sclerotinia</i> sp.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la enfermedad moho blanco ocasionada por <i>S. minor</i>	21
Figura 2. Ciclo de la enfermedad moho blanco ocasionado por <i>S. sclerotiorum</i>	22
Figura 3. Características morfológicas de los aislamientos nativos de <i>Sclerotinia</i> sp. después de 8 días de incubación a 25°C	55
Figura 4. Efecto de las 6 concentraciones del ingrediente activo Kresoxim-metil en la morfología de las colonias de los 6 aislamientos de <i>Sclerotinia</i> sp. de la Sabana de Bogotá	61
Figura 5. Inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos Sc001, Sc002 y Sc005 expuestos a diferentes dosis fungicidas	74
Figura 6. Inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos Sc006 y Sc008 expuestos a diferentes dosis fungicidas	75
Figura 7. Inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos Sc007 expuestos a diferentes dosis fungicidas	77

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Dosis recomendada de producto comercial e ingrediente activo	97
Anexo 2. Cálculos para preparación de soluciones stock de fungicida (Benomil, Boscalid y Tebuconazole) y medios de cultivo	98
Anexo 3. Cálculos para preparación de soluciones stock de fungicida (Iprodione, Kresoxim-metil y Procimidona) y medios de cultivo	99
Anexo 4. Análisis de varianza para el número de esclerocios producidos por los aislamientos de <i>Sclerotinia</i> sp. en ausencia de fungicida	100
Anexo 5. Análisis de varianza para el número de esclerocios producidos por los aislamientos de <i>Sclerotinia</i> sp. en presencia de Kresoxim-metil	101
Anexo 6. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc001	102
Anexo 7. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc001	102
Anexo 8. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc002	103
Anexo 9. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc002	103
Anexo 10. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc005	104
Anexo 11. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc005	104
Anexo 12. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc006	105
Anexo 13. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc006	105
Anexo 14. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc007	106
Anexo 15. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc007	106
Anexo 16. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc008	107
Anexo 17. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento	107

obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc008	
Anexo 18. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc001	108
Anexo 19. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc001	109
Anexo 20. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc002	110
Anexo 21. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc002	111
Anexo 22. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc005	112
Anexo 23. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc005	113
Anexo 24. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc006	114
Anexo 25. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc006	115
Anexo 26. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc007	116
Anexo 27. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia minor</i> Sc007	117
Anexo 28. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc008	118
Anexo 29. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Sc008	119

Resumen

La región Sabana de Occidente en el Departamento de Cundinamarca es la principal área productora de lechuga en Colombia, sin embargo allí se presentan grandes pérdidas económicas de éste cultivo debido a la incidencia de la enfermedad moho blanco causada por las especies *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum*. La única herramienta que utilizan los agricultores para su control es la aspersión de fungicidas químicos, y aunque estos no cuentan con registro de uso en lechuga se han utilizado durante 40 años aproximadamente. Con el fin de determinar el estado de sensibilidad de aislamientos de *S. sclerotiorum* y *S. minor* provenientes de cultivos comerciales, a fungicidas, se evaluó el efecto *in vitro* de Benomil, Iprodione y Procimidona (ingredientes activos utilizados con frecuencia en el cultivo de lechuga en los municipios de Funza, Madrid y Mosquera, Cundinamarca) y de Boscalid, Kresoxim-metil y Tebuconazole (moléculas utilizadas en otros países en el control de *Sclerotinia* sp.). Los ingredientes activos Iprodione, Procimidona y Tebuconazole, inhibieron el crecimiento de los aislamientos de *Sclerotinia* sp. Por el contrario, Kresoxim-metil permitió el desarrollo de los hongos, 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 de Boscalid, todos los aislamientos conservaron sus características pero, este fungicida inhibió la formación de los esclerocios. Algunos aislamientos presentaron baja sensibilidad a los fungicidas Kresoxim-metil, Boscalid y Benomil mientras que otros fueron altamente sensibles, sugiriendo una variabilidad genética entre los aislamientos de *Sclerotinia* sp. la cual, debe ser estudiada. 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.

PALABRAS CLAVE: *Sclerotinia* sp., Fungicidas, Sensibilidad, Resistencia

Abstract

The region of West Sabana in Cundinamarca's department is the most important area for the production of lettuce in Colombia, however it has experienced great economic losses due to incidence of the disease lettuce drop, which is caused by *S. minor* and *S. sclerotiorum* species. Agicultors have used chemical fungicides for 40 years approximately as an unique tool of the control of lettuce drop, although these fungicides have not registered for the use in lettuce. In order to determine the degree of *S. minor* and *S. sclerotiorum* sensitivity to fungicides utilized in commercial crops, the *in vitro* effects of Benomyl, Iprodione, and Procymidone (active ingredients used frequently in lettuce crops of Funza, Madrid and Mosquera counties (Cundinamarca)) and Boscalid, Kresoxim-methyl, and Tebuconazole (molecules used in other countries on the control of *Sclerotinia* sp.) was evaluated. Iprodione, Procimidona, and Tebuconazole active ingredients inhibited the growth of the *Sclerotinia* sp. isolates. On the contrary, Kresoxim-methyl allowed the growth of fungi although it affected the production of sclerotia as well as the morphological characteristics of isolates colonies. Benomyl caused changes in the texture of the isolates as well as an inhibition of the production of sclerotia. As to Boscalid, all the isolates kept their characteristics but the growth of sclerotia did not take place in any of the isolates. Some isolates showed low sensitivity to fungicides Kresoxim-methyl, Boscalid, and Benomyl, whereas other isolates were highly sensitive. This suggests a genetic variability between *Sclerotinia* sp. isolates, which must be studied. This study establishes a point of reference concerning the level of phytopathogens *S. minor* and *S. sclerotiorum* in the lettuce crops in the Funza, Madrid and Mosquera counties.

KEY WORDS: *Sclerotinia* sp., Fungicides, Sensitivity, Resistance.

1. Introducción

Colombia se destaca por ser un país agrícola, siendo ésta la principal actividad económica debido a la gran variedad de frutas y hortalizas producidas en todo el territorio (Rossier, 2003). Una de las zonas agrícolas más importantes en el Departamento de Cundinamarca es la región Sabana de Occidente, muy cercana a Bogotá, donde se desarrolla un mercado amplio que incluye especies como zanahoria, brócoli, coliflor, repollo, cilantro, lechuga, entre otras (DANE, 2002).

En los últimos años, la lechuga se ha convertido en un cultivo dominante en la Sabana de Bogotá durante diferentes épocas del año. Cifras otorgadas por el censo hortícola de la Sabana de Bogotá, realizado por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (2002), lo destacan como el cultivo con mayor área sembrada (383,44 Ha), el segundo con mayor área cosechada (189,32 Ha) y el quinto en rendimiento anual (21,59 Ton/Ha), posicionándose en el mercado como una de las hortalizas de mayor consumo en el país (Agrocadenas, 2003). El consumo per cápita ha ido aumentando gradualmente en los últimos años de 0,5 Kg hasta 0,52 Kg, por parte de los colombianos (Agrocadenas, 2003).

El interés por parte de los consumidores en la compra de este producto se debe en parte a sus propiedades organolépticas, pues el sabor fresco y textura crocante de las variedades ha incrementado su consumo (ERS, 2001). También es importante por sus propiedades nutricionales, ya que presenta un bajo contenido en calorías y es fuente de vitaminas como la A y la C y de minerales como el Calcio (Davis *et al.*, 2002), que hacen de ella un alimento fundamental en dietas (Mortesen y Bullard, 1971). De igual manera, la lechuga posee propiedades medicinales, ya que el contenido de látex presente en sus hojas, puede actuar como un suave somnífero si se toman sus hojas en infusión (Agrocadenas, 2003).

Aunque los rendimientos registrados mantienen un nivel considerable, éste se ve afectado por la enfermedad moho blanco causada por *Sclerotinia* sp., principal fitopatógeno que afecta los cultivos en cualquier etapa del crecimiento, pero predominantemente cerca de la cosecha (Adams y Ayers, 1979), generando pérdidas por encima del 70% (Davis *et al.*, 2002).

Dentro de las especies de *Sclerotinia* sp. identificadas como agentes causales de la enfermedad moho blanco, se encuentran *S. minor* Jagger y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Subbarao *et al.*, 1997). Estos fitopatógenos permanecen en el suelo principalmente como

esclerocios, los cuales pueden germinar e infectar la corona y la raíz de la lechuga, ocasionando pudrición blanda acuosa de sus tejidos hasta ocasionar la muerte de la planta (Adams y Tate, 1976; Marcum *et al.*, 1977). Sin embargo, los esclerocios de *S. sclerotiorum*, producen apotecios bajo óptimas condiciones de humedad ocasionando otro tipo de infección por diseminación de ascosporas en el aire (Subbarao, 1998).

La tendencia en Colombia con respecto al manejo de la enfermedad moho blanco ha sido utilizar fungicidas de síntesis química, a pesar de esto los niveles de incidencia se han incrementado en los cultivos de lechuga, y en la actualidad se presentan pérdidas hasta del 54% (Moreno, *et al.*, 2009). El incremento de la incidencia podría deberse al desarrollo de tolerancia del fitopatógeno frente a los ingredientes activos utilizados por los agricultores.

En el país no existe registro de fungicidas para el control de *Sclerotinia* sp. en el cultivo de lechuga, debido a que el valor de este mercado no resulta tan atractivo para las compañías de agroquímicos como si ocurre con otros cultivos. Por esto los agricultores utilizan fungicidas que no controlan a *Sclerotinia* spp., emplean dosis incorrectas, no respetan los períodos de carencia y no los utilizan de la forma adecuada.

En Estados Unidos, principal productor de lechuga en el mundo y donde también se presenta la enfermedad moho blanco de forma importante, se han realizado investigaciones de sensibilidad de *Sclerotinia* sp. a diferentes fungicidas sin encontrar casos de tolerancia (Hubbard *et al.*, 1997; Bowen *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2002; Matheron y Porchas, 2004). Sin embargo, en Colombia no se han realizado estudios para conocer si las especies de *Sclerotinia* sp. presentes en los campos donde se cultiva lechuga son sensibles a los fungicidas utilizados por los agricultores o si éstas han desarrollado tolerancia o resistencia.

Por estas razones el objetivo del presente trabajo fue determinar la sensibilidad de *Sclerotinia* spp. a fungicidas de síntesis química utilizados en cultivos de lechuga de la Sabana de Bogotá. Este conocimiento permitirá generar líneas base para la futura evaluación de las moléculas, en el control de la enfermedad moho blanco en campo; así mismo se espera que este trabajo represente una invitación a los productores de agroquímicos para que registren productos eficaces en el control de *Sclerotinia* sp. en el cultivo de lechuga y que capaciten a los agricultores en el uso correcto de los mismos.

2. Marco teórico y revisión de literatura

2.1. Moho blanco de la lechuga (Lettuce drop)

El moho blanco es la principal enfermedad de la lechuga, siendo una de las más destructivas a nivel mundial en su cultivo (Purdy, 1979; Subbarao, 1998). Stevens y Hall (1911), realizaron la primera descripción de la incidencia del moho blanco en invernaderos en el estado de Massachusetts, Estados Unidos, en el año de 1890. Esta enfermedad posee una alta distribución geográfica (Hartman *et al.*, 1999); se presenta tanto en el cultivo como en almacenamiento; causa "damping off" en semilleros y pudrición en plantas adultas (Walter, 1959; Chupp y Sherf, 1960).

2.1.1. Agentes causales

Sclerotinia minor Jagger y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, son los agentes causales de la enfermedad moho blanco de la lechuga (Purdy, 1979; Subbarao, 1998). Estas son dos especies de hongos fitopatógenos cosmopolitas relacionadas íntimamente con el desarrollo de la enfermedad (Abawi y Grogan, 1979; Subbarao, 1998; CABI/EPPO, 1999) y también pueden atacar un amplio rango de huéspedes (Purdy, 1979; Boland y Hall, 1994), incluyendo muchos cultivos agrícolas (Hartman *et al.*, 1999) entre ellos el de lechuga, el tomate, las crucíferas, la zanahoria, la alcachofa, el apio, el pepino (Ávila de Moreno y Velandia, 1992), el frijol y la canola (CABI/EPPO, 1999).

S. sclerotiorum, es patógeno de 408 especies de plantas en 278 géneros, representados en 78 familias. La mayoría de estas especies son herbáceas y dicotiledóneas, pero varias monocotiledóneas y gimnospermas, así como una especie de las Pteridofitas también puede ser infectada por *S. sclerotiorum* (Boland y Hall, 1994). A su vez *S. minor*, tiene como huéspedes 94 especies de plantas en 66 géneros representados en 21 familias. Se conoce que *S. minor* infecta únicamente angiospermas y solamente dos monocotiledóneas (Melzer *et al.*, 1997).

2.1.1.1. Clasificación taxonómica

	<i>Sclerotinia minor</i> Jagger	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
Reino	Fungi	Fungi
División	Ascomycota	Ascomycota
Clase	Ascomycetes	Ascomycetes
Orden	Helotiales	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae	Sclerotiniaceae
Género	<i>Sclerotinia</i>	<i>Sclerotinia</i>
Especie	<i>Sclerotinia minor</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

(Fuente: Global Biodiversity Information Facility, 2009)

2.1.1.2. Características morfológicas

S. minor produce micelio vegetativo de color blanco y de textura algodonosa debido a la germinación eruptiva de los esclerocios (Hawthorne, 1972; Hawthorne, 1975; Hao *et al.*, 2003; Jarvis y Davis *et al.*, 2002), su principal forma de supervivencia en el suelo (Wu y Subbarao, 2006).

Su crecimiento en medio de cultivo se caracteriza por generar un patrón aleatorio de dispersión de los esclerocios en toda la colonia (Davis *et al.*, 2002). Estos esclerocios o cuerpos latentes, son estructuras multicelulares pigmentadas de color negro, compuestos por hifas vegetativas entrelazadas y condensadas (Chet y Henis, 1975) que conforman un agregado pequeño, circular y uniforme en diámetro (0,5 mm – 2,0 mm) (Davis *et al.*, 2002), manteniendo inactivo el hongo por extensos periodos de tiempo en el suelo bajo condiciones que no son favorables para su crecimiento vegetativo (Chet y Henis, 1975; Adams y Ayers, 1979). Sin embargo, estos esclerocios pueden desintegrarse o perder su viabilidad después de 8 semanas en un suelo saturado (Imolehin *et al.*, 1980).

La propagación de *S. minor* por medio de la germinación carpogénica es un evento esporádico, pues la producción de apotecios y la liberación de sus ascosporas se ha observado raramente en la naturaleza (Abawi y Grogan, 1979; Hao *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

Las colonias de *S. sclerotiorum* obtenidas en cultivo, se observan como un micelio de color blanco y textura algodonosa. Se producen esclerocios en los márgenes en crecimiento de la colonia, formando anillos concéntricos, líneas radiales y otros dibujos (Davis *et al.*, 2002). Los esclerocios son la principal forma en la que *S. sclerotiorum* permanece en el suelo (Wu y Subbarao, 2006); estos poseen un color negro en el exterior y blanco en el interior. La corteza esclerocial se compone de una capa de células globosas de paredes oscuras, con un espesor de dos a seis células. (Davis *et al.*, 2002). Su tamaño es relativamente grande, pueden medir entre 2 mm – 20 mm de largo por 3 mm – 7 mm de ancho y poseen formas irregulares (Kohn, 1979).

Cada esclerocio le permite al hongo sobrevivir por largos periodos de tiempo bajo condiciones adversas, algunos pueden mantenerse inactivos por muchos años en el suelo, (Patterson y Grogan, 1985; Phillips, 1987; Ben-Yephet *et al.*, 1993) de 4 a 5 años, conservando su viabilidad bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura (Adams y Ayers, 1979; Torneau, 1979; Willetts y Bullock, 1992) y otros pueden sobrevivir por más de 11 años (Adams, 1975).

En el caso de *S. sclerotiorum* estas estructuras generalmente germinan carpogénicamente (Jarvis y Hawthorne, 1972; Hawthorne, 1975; Abawi y Grogan, 1979; Patterson, 1983; Davis *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2003) dependiendo de las condiciones medioambientales (Huang y Ericsson, 2008) produciendo uno a varios apotecios que normalmente tienen forma de copa, pero algunas veces son extendidos y planos con un pequeño hoyuelo central (Abawi y Grogan, 1979; Kohn, 1979). Los apotecios son generalmente blancos, amarillos o cafés. Las ascas son cilíndricas – claviformes miden más de 130 μm de largo por 10 μm de ancho, y contienen ocho ascosporas binucleadas (Kohn, 1979) que son la fuente principal de dispersión (Abawi y Grogan, 1979), estas son aseptadas, uniseriadas, hialinas y elípticas (9 – 13 μm de largo por 4 – 5 μm de ancho) (Kohn, 1979).

2.1.2. Epidemiología

Tanto *S. minor* como *S. sclerotiorum*, requieren condiciones diferentes para desarrollar la infección en la planta hospedera. De igual forma el modo de infección de cada una de las especies emplea un proceso distinto (Davis *et al.*, 2002). Sin embargo, la enfermedad puede aparecer en cualquier fase del crecimiento de la planta en las dos especies.

La infección de las plantas de lechuga por *S. minor* inicia con la germinación eruptiva de los esclerocios (Beute *et al.*, 1975; Wadsworth, 1979), situados a 2 cm de la raíz principal y a 8 cm de la superficie, dando origen a una masa densa de hifas vegetativas que pueden entrar en contacto con las raíces, tallos y hojas senescentes (Adams y Tate, 1975; Imolehin *et al.*, 1980; Dillard y Grogan, 1985; Melzer y Boland, 1994; Subbarao, 1998; Davis *et al.*, 2002), colonizar los tejidos de la corona y formar un gran número de esclerocios infectando otros tallos y hojas de otras plantas en contacto con el suelo (Davis *et al.*, 2002) (Figura 1).

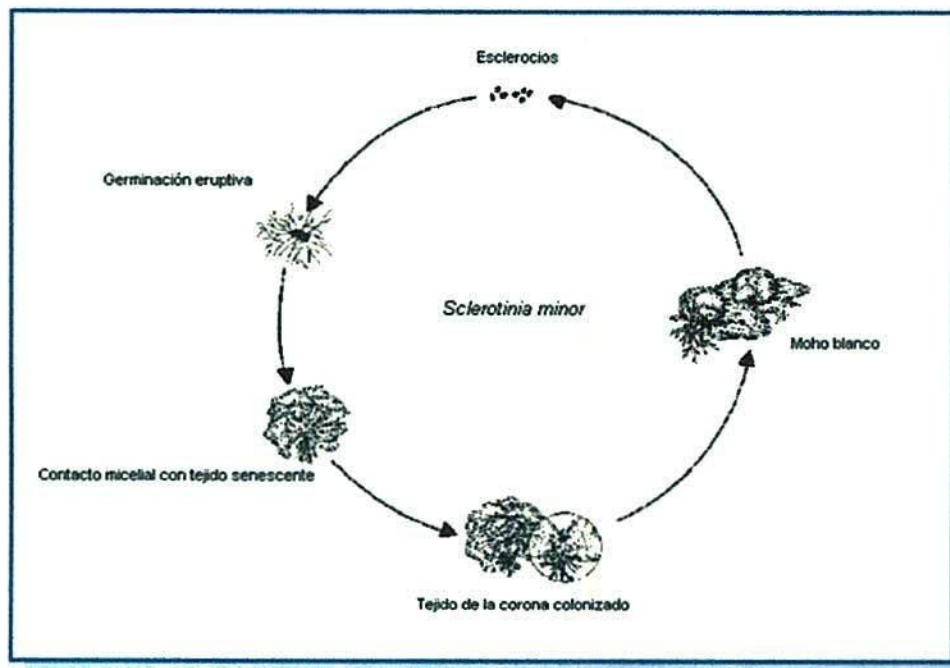


Figura 1. Ciclo de la enfermedad moho blanco ocasionada por *S. minor*
(Adaptado de Subbarao, 1998)

La humedad y la temperatura del suelo afectan la germinación eruptiva en *S. minor*, la germinación de los esclerocios y el crecimiento del micelio ocurre entre 6 °C y 30 °C, con una temperatura óptima de 18 °C (Imolehin *et al.*, 1980) y una humedad relativa menor del 95% (Dow *et al.*, 1988).

El proceso de germinación carpogénica por parte de *S. minor* es un evento raramente observado en la naturaleza (Abawi y Grogan, 1979; Patterson, 1986) y ocasionalmente reportado (Jarvis y Hawthorne, 1972; Hawthorne, 1975; Hao *et al.*, 2003).

La epidemiología de *S. sclerotiorum* se caracteriza por el desarrollo de apotecios a partir de la germinación carpogénica de los esclerocios situados en el suelo cuando la humedad del suelo se mantiene próxima a la saturación durante dos o más semanas (Davis *et al.*, 2002). Para la formación de los apotecios es necesario que la temperatura se encuentre entre los 11 °C a 15 °C (Davis *et al.*, 2002).

Dentro de los apotecios se encuentran las ascas y dentro de estas las ascosporas, millones de estas unidades reproductivas son expulsadas y dispersadas por el viento (Davis *et al.*, 2002; Kull *et al.*, 2004). Una vez estas ascosporas llegan a hojas senescentes o muertas de la lechuga, germinan en presencia de una lámina muy delgada de agua sobre la superficie de los tejidos de la planta, formando hifas vegetativas que se agrupan para conformar un micelio blanco algodonoso el cual, da origen nuevamente a los esclerocios y estos a la vez a apotecios (Adams y Tate, 1975; Galea y Price, 1988; Ben-Yephet *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 2002) (Figura 2).

La infección directa a partir de germinación eruptiva de los esclerocios también se puede observar en *S. sclerotiorum*, pero de una manera poco frecuente (Abawi y Grogan, 1979). La infección por ascosporas a partir de la germinación carpogénica por parte de *S. sclerotiorum*, ocurre bajo condiciones de campo muy limitadas de profundidad y humedad del suelo, únicamente los esclerocios que se encuentran en los primeros 2 cm – 3 cm de profundidad del suelo son biológicamente funcionales, limitando la producción de apotecios y por consiguiente la liberación de ascosporas y la posterior infección. De igual manera es necesario mantener altos niveles de humedad durante varios días para favorecer el desarrollo de los apotecios (Abawi y Grogan, 1979; Hao y Subbarao, 2005).

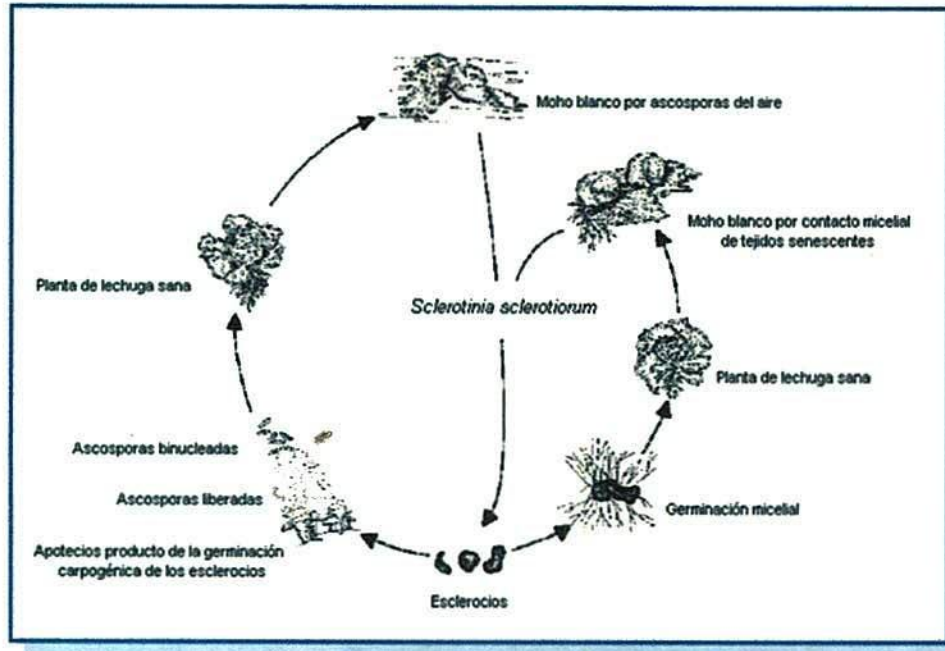


Figura 2. Ciclo de la enfermedad mohos blancos ocasionado por *S. sclerotiorum*
(Adaptado de Subbarao, 1998)

2.1.2.1. Síntomas y signos de la enfermedad

La lechuga puede ser afectada en cualquier etapa de crecimiento, aunque en la mayoría de las ocasiones los síntomas se hacen más evidentes al final del periodo vegetativo (Ávila de Moreno y Velandia, 1992). Las infecciones de mohos blancos pueden aparecer en dos fases. La primera fase se presenta inmediatamente después del trasplante en un porcentaje muy bajo de plantas; la segunda fase, cuando tiene lugar la mayor parte de la infección, aparece en o cerca de la madurez del cultivo (Abawi y Grogan, 1979; Davis *et al.*, 2002).

El síntoma inicial de la enfermedad mohos blancos es el marchitamiento de la capa exterior de hojas, dando a la planta una apariencia de estrés (Walker, 1959; Purdy, 1979; Davis *et al.*, 2002; Subbarao, 1998). Gradualmente, la infección avanza por las hojas exteriores hacia otras capas de hojas, éstas se marchitan, caen planas sobre el suelo y luego toda la planta, incluido el cogollo, se marchita y colapsa (Purdy, 1979; Abawi y Grogan, 1985; Patterson y Grogan, 1985). Después de la colonización de los tejidos de la planta se producen lesiones de color amarillo a café pálido (Imolehin y Grogan, 1980; Dow *et al.*, 1988) con la posterior pudrición de los mismos. Esta pudrición se caracteriza por ser blanda acuosa (Purdy, 1979; Abawi *et al.*, 1985; Paterson y Grogan, 1985; Subbarao, 1998) la cual presenta finalmente el aspecto de una masa gelatinosa o viscosa (Walker, 1959; Galea y Price, 1988).

Al mismo tiempo el hongo produce un micelio algodonoso de color blanco, formando una masa de hifas que se ponen en contacto con los tejidos senescentes de la lechuga (Walker, 1959; Abawi y Grogan, 1979; Purdy, 1979; Patterson y Grogan, 1985; Galea y Price, 1988). Posteriormente, en el envés de las hojas que tocan el suelo, este micelio produce los esclerocios, los cuales según Messiaen y Lafon (1968) son inicialmente blancos, del color del micelio que los origina, después toman una coloración grisácea y finalmente se pigmentan de color negro por completo. Estos esclerocios pueden entrar en contacto con los tejidos de otras plantas, germinar eruptivamente e iniciar una nueva infección (Imolehin y Grogan, 1980; Dow *et al.*, 1988). De esta manera se aumenta la cantidad del inóculo en el suelo causando daños a las próximas siembras (Agrios, 1991).

La infección ocasionada por ascosporas desarrolla síntomas similares a los descritos anteriormente sin embargo, dicha infección se origina en las partes expuestas de la planta de lechuga, donde las ascosporas se establecen y causan la infección. En los tejidos afectados, se desarrolla un abundante micelio algodonoso blanco, produciendo posteriormente grandes esclerocios negros de forma irregular (Davis *et al.*, 2002).

2.1.2.2. Patogénesis

La habilidad de *Sclerotinia* spp. para penetrar e infectar el tejido del huésped puede variar según el tipo de inóculo, las características de la planta, el nivel nutricional del hongo y las condiciones ambientales (Lumsden, 1979; Subbarao, 1998).

El proceso de infección ocurre directamente a través de la cutícula de la planta (Purdy, 1958; Abawi y Grogan, 1979). A partir de la germinación carpogénica de los esclerocios, se forman estructuras complejas, multicelulares (Purdy, 1958) denominadas apresorios, cuya formación requiere de estímulos de contacto entre el fitopatógeno y el hospedero (Purdy, 1958; Abawi y Grogan, 1979).

Después del contacto con la planta, las hifas se dividen en dos estructuras en forma de dedo las cuales se desarrollan como cojines infecciosos (Purdy, 1958; Abawi y Grogan, 1979), los cuales se fijan a la superficie del huésped gracias a la formación de un mucílago y permiten ejercer una considerable fuerza en la cutícula para ingresar de manera mecánica al interior del hospedero (Purdy, 1958; Abawi y Grogan, 1979).

Una vez las hifas del hospedero han ingresado a través de la cutícula, se forma una vesícula granular inflada entre la cutícula y la dermis celular, ésta vesícula permite que la hifa de infección se desarrolle gradualmente desde los cojines de infección e invada los tejidos del hospedero (Purdy, 1958).

Probablemente, las hifas de infección son las responsables de los cambios en los tejidos infectados del hospedero (Lumsden, 1979), estos cambios ocasionan las alteraciones en los materiales pécticos de las paredes celulares, muerte de las células (Lumsden 1979), acumulación de fluidos y agua en los márgenes de avance, cambios en la permeabilidad de las células en avance (Newton y Sequeira, 1972; Lumsden 1979) y producción de enzimas y otras sustancias responsables de la patogenicidad (Lumsden, 1979).

Después de la extensiva colonización del tejido, las hifas emergen de los tejidos de la planta, a través de los estomas o a través de la cutícula, construyendo un entretejido condensado de micelio algodonoso en la superficie de las lesiones maduras (Lumsden, 1979).

La penetración exclusivamente intercelular de las hifas de infección a través del tejido, es incrementada por enzimas capaces de degradar la lamela media de las células del hospedero; son tres las enzimas líticas producidas por *Sclerotinia* spp., tales como endopectinasas y exopectinasas, celulasas y hemicelulasas, y proteasas las cuales, facilitan la degradación de la pared celular y la colonización de los tejidos hospederos (Lumsden, 1979).

Algunos autores han descrito el rol del ácido oxálico en el proceso de infección (Noyes y Hancock, 1981; Marciano *et al.*, 1983; Godoy *et al.*, 1990). La hipótesis acerca del mecanismo o mecanismos referentes a la secreción de ácido oxálico y su relación con la virulencia se centra en tres modos de acción. El primero de ellos es la actividad de varias enzimas secretadas por el hongo durante la invasión de los tejidos hospederos, y se lleva a cabo a pH bajos. El segundo, debido a que el ácido oxálico puede ser tóxico para las plantas hospederas, probablemente este debilita la planta facilitando así la invasión de los tejidos (Noyes y Hancock, 1981; Cessna *et al.*, 2000). Finalmente, la quelación del Ca^{2+} de la pared celular por el oxalato compromete la función del Calcio, del cual dependen las respuestas de defensa y debilita la pared celular de la planta (Cessna *et al.*, 2000).

2.1.3. Herramientas utilizadas para el control del moho blanco de la lechuga

2.1.3.1. Biológicas

Los impactos negativos generados al ambiente como consecuencia de la aplicación indiscriminada de plaguicidas, han estimulado el interés en la búsqueda de métodos de control del moho blanco que conlleve a una producción limpia de lechuga, dentro de los cuales se destaca el uso de organismos antagonistas, conocidos como agentes biocontroladores (Huang, 1991a, Zadoks, 1993).

Un agente biocontrolador es aquel organismo capaz de contrarrestar otros organismos fitopatógenos por medio de interacciones negativas, en una relación en la cual éste se beneficia y a su vez perjudica la población del patógeno controlando su crecimiento (Chávez, 2006).

Los mecanismos utilizados por los biocontroladores para desplazar al fitopatógeno son: competencia directa por espacio y la dominancia de la rizósfera (en el caso de microorganismos del suelo) o por nutrientes. Relaciones de amensalismo, por producción de metabolitos antibióticos (antibiosis), enzimas de tipo lítico que destruyen las paredes celulares de los esclerocios o estructuras de resistencia del hongo, o enzimas hidrolíticas, a las que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular. Por micoparasitismo directo, el antagonista actúa mediante la ruptura de las paredes de las hifas del hongo patógeno, lo penetra con sus hifas por acción de enzimas como xilasas, quitinasas, pectinasas, glucanasas, glucosidasas y quitobiosidasas, aprovechando los nutrientes que éste le puede ofrecer (Papavizas, 1985).

Estos organismos biocontroladores también estimulan la germinación de semillas y el desarrollo de la planta (Chet, 1990) por medio de sustancias como auxinas, giberelinas, citoquininas y fitoalexinas, que favorecen el crecimiento vegetal mejorando el desarrollo y estimulando mayor resistencia frente a patógenos (Arbeláez y Borda, 1993). También pueden otorgar protección a la planta produciendo sistemas radiculares más grandes, en donde no hay infección sino por el contrario, forma una simbiosis con las raíces de la planta, el hongo se alimenta de los exudados de las raíces y las raíces son protegidas por el hongo y al mismo tiempo reduce o elimina las fuentes de alimento del patógeno (Arbeláez y Borda, 1993).

Dentro de los microorganismos con potencial biocontrolador de *Sclerotinia* spp. generalmente se encuentran hongos y bacterias. Algunos hongos antagonistas como *Coniothyrium minitans* Campbell, descrito por Campbell en 1947 como el primer micoparásito de esclerocios de *Sclerotinia* spp. (Adams, 1989); *Clonostachys rosea* (sin. *Gliocladium roseum*), *Sporidesmium sclerotivorum*, *Talaromyces flavus*, *Trichothecium roseum*, *Epicoccum purpurascens* y *Trichoderma* spp., son capaces de parasitar y degradar esclerocios de *Sclerotinia* spp. o también inhibir el crecimiento micelial del hongo (Rahe y Utkhede, 1990; De la Isla, 1991; Huang y Kokko, 1993; McLaren *et al.*, 1994; Bolton *et al.*, 2006; Rabeedran *et al.*, 2006).

Huang (1980), demostró que la aplicación de *C. minitans* en el suelo de un cultivo infectado naturalmente por *S. sclerotiorum*, redujo la incidencia de la marchitez del girasol en 42% - 46%. Resultados similares fueron observados con este micoparásito en el control de moho blanco de la lechuga en el Reino Unido por Budge y Whipps (1991).

En condiciones de campo, *Trichoderma harzianum* se asperjó con el mismo procedimiento empleado en las aplicaciones de productos químicos, y presentó un resultado de control un poco más bajo que el tratamiento con Benomil pero, sensiblemente más alto que el testigo. En el testigo se observó un 46,21% de plantas afectadas; 15,7% con Benomil y 22,4% con *T. harzianum* (Ávila de Moreno, 1991a; Ávila de Moreno, 1991b). Recientemente, Cotes, *et al.*, (2007) demostraron que la incorporación de una formulación a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* (antes *T. koningii*) cepa Th003 en el cultivo de lechuga, redujo la incidencia del moho blanco hasta en 92%.

Aunque el uso de los biocontroladores ha demostrado ser un buen método de control del moho blanco, se han generado algunas dificultades con la aplicación de dichos agentes, pues se requiere cantidades considerables del microorganismo, así como también es necesario realizar las aplicaciones con una alta frecuencia para obtener resultados en el control de la enfermedad (Adams, 1989; Adams y Fravel, 1990). De la misma forma, la actividad antagonista puede fracasar debido a factores del ambiente que no favorezcan la actividad del biocontrolador. Si el ambiente al cual ingresa el agente biocontrolador no tiene las condiciones adecuadas de pH, temperatura, humedad o luz para su normal crecimiento, luego no puede adaptarse al espacio donde va a llevar a cabo su antagonismo (Rahe y Utkhede, 1990).

2.1.3.2. Culturales

Las prácticas culturales, son aquellas medidas que destruyen al patógeno o previenen que éste llegue a las plantas eliminando las fuentes de inóculo. Dichas prácticas también incrementan la resistencia del huésped, modificando las condiciones del ambiente y volviéndolas desfavorables para la infección del fitopatógeno (Davis *et al.*, 2002). Los controles culturales son muchos y tienen un potencial muy amplio, especialmente porque las prácticas requieren poca o ninguna consideración reguladora (Davis *et al.*, 2002).

Arado

El arado profundo se basa en el entierro de los esclerocios a profundidades donde estos no se puedan desarrollar (Subbarao *et al.*, 1996).

Debido a que la viabilidad de los esclerocios disminuye con el tiempo y la profundidad de entierro, el desplazamiento de los esclerocios a profundidades mayores a 10 cm podría prevenir las infecciones por moho blanco (Grogan *et al.*, 1980; Imolehin *et al.*, 1980). Aunque factores como la temperatura del suelo, concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono y etileno cambian con la profundidad del suelo y pueden influenciar la viabilidad del hongo, Imolehin y Grogan (1980) concluyeron que estos factores habitualmente no limitan el desarrollo de los esclerocios de *S. minor*.

Sin embargo, se ha observado que las operaciones de arado pueden redistribuir los esclerocios en áreas donde anteriormente se encontraba ausente el hongo, obteniendo así, una nueva infección por moho blanco (Subbarao *et al.*, 1996), pues las plantas infectadas son la principal fuente de inóculo del suelo (Subbarao, 1998).

Control de malezas

Dentro de las malezas existen algunas susceptibles a la infección por *Sclerotinia* spp. como la manzanilla (*Anthemis cotula*), el vira-vira (*Gnaphalium gaudichaidianum*), el llantén (*Plantago major*), etc., otras portadoras de inóculo como la lengua de vaca (*Rumex crispus*), borraja (*Borago officinalis*), cenizo (*Circus pygargus*), bledo (*Amaranthus dubius*), etc. o inmunes a la enfermedad como los pastos, el maíz, el trigo, etc. según la relación que se establezca con el patógeno. Las malezas susceptibles y portadoras son las más importantes

por cuanto el hongo puede multiplicarse en ellas y sobrevivir indefinidamente (Ávila de Moreno y Buriticá, 1985).

Burnside *et al.* (1998), observaron que la enfermedad moho blanco causada por *S. sclerotiorum* tuvo menor incidencia en aquellas zonas donde la mayoría de las malezas fueron controladas con herbicidas, atribuyendo la reducción de la infección a la disminución de la humedad que podría favorecer el desarrollo del moho blanco debido a la eliminación de las malezas.

Eliminación de residuos

La recolección y remoción de plantas infectadas, así como los residuos de cultivos enfermos, puede reducir efectivamente el inóculo del fitopatógeno en el campo (Statewide Institute of Pest Management, 2009). El moho blanco se presenta en focos, por lo cual es conveniente sacar las plantas enfermas tan pronto se aprecien las primeras manifestaciones de la enfermedad, cuando las hojas comiencen a mostrar amarillamiento o marchitez (De la Isla, 1991; Ávila de Moreno y Velandia, 1992). En lotes con índices altos, se deben retirar todas las plantas afectadas y destruirlas con el fin de no incrementar el nivel de inóculo (Ávila de Moreno y Velandia, 1992).

Riego

La humedad es quizá el factor más directamente relacionado con la incidencia de la infección, debe evitarse los excesos de riego y mantener buenos drenajes para una rápida evacuación de aguas sobrantes (Ávila de Moreno y Velandia, 1992).

Tradicionalmente, el riego por surcos se utilizó debido a su fácil operación, pero el agua utilizada era bastante e ineficiente y ocasionaba un problema de acumulación de sales en el suelo (Subbarao, 1998).

Subbarao *et al.* (1997) realizaron un estudio donde se evaluó el efecto del riego por surcos y el riego por goteo subsuperficial en el control de enfermedades y la producción de lechuga. Observaron que el sistema de riego por goteo subsuperficial mantenía una baja humedad del suelo, evitando que los esclerocios germinaran y por consiguiente previno la enfermedad en la lechuga, disminuyendo la incidencia de la enfermedad y aumentando la producción del cultivo (Subbarao *et al.*, 1997).

La enfermedad moho blanco se ve favorecida por factores de alta humedad en el suelo, temperaturas frías y alta humedad relativa, es posible que el riego por goteo reduzca estos factores y por tanto reduzca la incidencia de las enfermedades causadas por *Sclerotinia* spp. (Bell *et al.*, 1998).

Aunque el riego por goteo subsuperficial es un sistema de manejo óptimo en áreas con cantidades poco significativas de lluvia durante el cultivo de lechuga, los costos de inversión son demasiado altos y se requiere de condiciones de manejo intensivas (Subbarao, 1998).

Rotación

La rotación de cultivos ha sido empleada en los últimos años como un método de control del moho blanco (Hao *et al.*, 2003). Aunque *S. minor* y *S. sclerotiorum* no son fácilmente manejables por rotación de cultivos debido a su amplio rango de hospederos (Subbarao, 1998; Hao *et al.*, 2003), algunas especies no susceptibles a *Sclerotinia* spp. pueden reducir la incidencia de la enfermedad en determinado terreno (Laemmlen, 2002; Statewide Institute of Pest Management, 2009).

La rotación debe llevarse a cabo en un período de por lo menos 3 años con cultivos que no sean huéspedes de *S. sclerotiorum* como espinaca, acelga, remolacha y maíz (De la Isla, 1991) y para *S. minor*, las especies no hospederas como coliflor, pimentón, trigo, etc. (Statewide Institute of Pest Management, 2009). De igual forma, se ha reportado el uso de brócoli, como especie no huésped, pues gracias a los exudados secretados por la planta, se puede reducir la viabilidad de los propágulos y la incidencia de la enfermedad causada por *S. minor* (Hao y Subbarao, 2006).

2.1.3.3. Físicas

Durante los últimos años, el empleo del control físico ha generado un notable incremento en la investigación y aplicación de esta herramienta, como alternativa viable para el control de plagas debido a las restricciones que algunos países han impuesto en el manejo químico de las enfermedades (Vivas y Astudillo, 2006).

En los métodos de control físico, el medio ambiente físico de la plaga es modificado de tal modo que esta ya no represente una amenaza para el cultivo agrícola. Esto se logra con la generación de niveles de estrés que provoquen perturbación o muerte de los fitopatógenos,

también por el uso de dispositivos como barreras físicas que protejan a las plantas de posibles ataques (Vivas y Astudillo, 2006).

Solarización

La solarización del suelo es un proceso hidrotérmico, a través de la cobertura del sustrato húmedo con una lámina de polietileno durante los meses de mayor radiación solar con la finalidad de eliminar los patógenos existentes en el suelo (Red de acción el alternativas al uso de agroquímicos, 2003).

Esta práctica implica un proceso de desinfección a partir del calentamiento de las capas superficiales del suelo, ocasionado por el incremento de la temperatura (entre 36 y 50°C) producido por la energía solar irradiada y capturada sobre la lámina de polietileno, lo suficiente para inactivar malezas, plagas y patógenos (Katan, 1981; Braicovich, 2004).

Para implementar este método, es necesario mantener el suelo humedecido durante varios días o semanas para estimular la activación de las estructuras latentes del fitopatógeno a formas vegetativas, sensibles a las elevadas temperaturas y por consiguiente controlar la enfermedad (Braicovich, 2004).

Según los resultados arrojados por un estudio de Vannacci *et al.* (1988), la solarización redujo la incidencia de *S. minor* en el suelo, reduciéndose la recuperación y viabilidad de los esclerocios en 26% y 57% respectivamente, lo que indicó que la solarización puede reducir el inóculo de hongos formadores de esclerocios en el suelo (Vannacci *et al.*, 1988),

Sin embargo, este proceso solo puede ser utilizado en lugares donde el clima es el apropiado, con una radiación solar alta y en terreno donde no sea cultivado por lo menos durante un mes (Katan, 1981).

2.1.3.4. Genéticas

La selección o mejoramiento de cultivares de lechuga, inmunes, resistentes o tolerantes a la enfermedad moho blanco, es una de las herramientas novedosas en el control de *Sclerotinia* spp. Las variedades resistentes, ofrecen la opción más fiable, conveniente y menos costosa en el manejo del moho blanco.

En un estudio realizado por Newton y Sequeira (1972), se identificaron varios cultivares de lechuga con un nivel alto de resistencia en cultivo frente a *S. sclerotiorum* en condiciones de campo, esta actividad se atribuyó al hábito de crecimiento, como determinaron también Coyne *et al.* (1974), en frijoles resistentes al moho blanco. En contraste, Abawi *et al.* (1980), evaluaron 100 variedades de lechuga y no encontraron ninguna relación entre el hábito de crecimiento y la resistencia al patógeno. No se han identificado cultivares de lechuga resistentes a *S. minor* (Abawi *et al.*, 1985).

Grube y Ryder (2004) evaluaron la resistencia de plantas de lechuga para lo cual establecieron dos tratamientos, el primero en terrenos infectados naturalmente con *S. minor*, y el segundo en terrenos con un inóculo natural, más la incorporación adicional de esclerocios de *S. minor*, este mismo procedimiento se llevó a cabo en invernadero. En este estudio se presentó resistencia parcial a *S. minor* por parte de las plantas, tanto en condiciones de campo, como en invernadero, mostrando una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad en relación con las plantas susceptibles.

Aunque en las evaluaciones de resistencia en invernadero se obtengan buenos resultados en el control de la enfermedad, es necesario realizar pruebas en campo, enfrentando al huésped resistente y al patógeno a las condiciones del ambiente (Grube y Ryder, 2004).

El desarrollo de huéspedes resistentes ha sido un proceso difícil y lento. Actualmente, no se encuentran disponibles en el comercio variedades de lechuga resistentes, prorrogando el uso de una herramienta de control de larga duración (Subbarao, 1998).

2.1.3.5. Químicas

Los sistemas de producción agrícola convencionales, que buscan un incremento en los rendimientos a bajos costos de mantenimiento de los cultivos; se basan en el uso intensivo de plaguicidas, que prevengan, destruyan o controlen las enfermedades de una manera simple y efectiva, proporcionando a los agricultores el reembolso de la inversión en el cultivo y cosecha de los productos (Torrado, 2000).

El control químico del moho blanco en plantas de lechuga implica el uso de un amplio grupo de fungicidas capaces de inhibir las estructuras vegetativas del hongo. La eficacia de este método de control depende del acierto en la elección del producto y de la época y forma de aplicación de los mismos (Ávila de Moreno y Velandia, 1992).

Sin embargo, Rahe y Utkhede (1990) afirmaron que el control de hongos formadores de esclerocios no ha presentado los mejores resultados en la mayoría de los casos, debido a la destreza del ataque del fitopatógeno a su hospedero por un tiempo prolongado, a la capacidad de ocasionar enfermedad por debajo de las capas de suelo, y a los intentos fallidos y costosos de erradicar químicamente los esclerocios tanto del suelo, como de los residuos de cosecha (Rahe y Utkhede, 1990).

La aplicación de fungicidas inmediatamente después del trasplante (en la fase de 4 a 6 hojas verdaderas) generalmente reduce significativamente la incidencia de la caída de la lechuga causada por *S. minor* pero, por lo general no reducen la infección por *S. sclerotiorum* (Davis *et al.*, 2002).

El uso inadecuado de los fungicidas ha generado problemas como la pérdida de la fertilidad natural de los suelos y su erosión, así como la destrucción de los microorganismos nativos de los mismos. De igual forma se ha incrementado la contaminación en suelos, agua, aire, y en el producto final, afectando la salud tanto de productores como de consumidores (Torrado, 2000; Sánchez y Moreno, 2004).

La rotación de ingredientes activos es una práctica importante para no generar tolerancia de las plagas a los plaguicidas, teniendo en cuenta los mecanismos de acción, disminuir el uso de productos sistémicos y residuales, disminuir la frecuencia y realizar la aplicación de las dosis correctas (Sánchez y Moreno, 2004).

Conociendo el potencial que existe en las poblaciones de *Sclerotinia* spp. de desarrollar resistencia a los fungicidas, es necesario contar con una gama de fungicidas de tal forma, que pueda realizarse rotación y evitar favorecer el desarrollo de la resistencia (Pérez, 2003)

2.1.3.5.1. Moléculas recomendadas para el control de *Sclerotinia* spp.

Benomil

Dentro de los primeros fungicidas utilizados en el control de moho blanco se encuentra el Benomil en el año 1948. (Torkewitz, 2008), perteneciente al grupo químico de los benzimidazoles (Fungicide Resistance Action Committee, 2008). El mecanismo de acción que desarrolla este ingrediente activo se inicia con su transformación dentro de la célula del hongo, en metilbencimidazolil carbamato (MBC) y posteriormente en un mononucleótido

activo (De Liñán, 1997) (Tabla 1). La molécula de MBC actúa interfiriendo la síntesis del ADN, la mitosis (formación del huso cromático y la segregación de los cromosomas) y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del ADN al ARN (De Liñán, 1997; Carmona, 2006).

Según De Liñán (1997), este ingrediente activo está recomendado para prevenir y curar enfermedades ocasionadas por *Sclerotinia* spp. en cultivos de hortalizas en general. Sin embargo, el Instituto Colombiano Agropecuario – ICA (2008) posee dentro de sus registros, productos con este ingrediente activo recomendados para su uso en arroz, fresa, frijol y clavel como Benomyl 50 WP y Zellus, ingresados en el año 2007. Otros productos como Colimyl, Bepoint 50 WP y Benomil 50 WP Agricense se encuentran registrados desde el año 2001 y 2002, pero no se encuentran recomendados para el control de moho blanco de la lechuga (ICA, 2008).

El Benomil ha sido empleado en el manejo de las enfermedades causadas por *Sclerotinia* spp. en girasol, repollo, frijol (Ferreira y Boyle, 1992) y lechuga (Laemmlen, 2002). Algunos estudios han demostrado que el control químico de *S. minor* con este fungicida ha fallado al realizar aplicaciones post-transplante en cultivos de lechuga en California (Marcum *et al.*, 1977) y Nueva Zelanda (Hawthorne, 1979). Sin embargo, Ben-Yephet *et al.*, (1986) demostraron que la aplicación de Benomil redujo el número de esclerocios de *S. sclerotiorum* capaces de germinar carpogénicamente, además de disminuir la incidencia de la enfermedad. Actualmente, el Benomil no posee registro para ser usado en cultivos de lechuga en los Estados Unidos (Subbarao, 1998). La cancelación de su registro se ha atribuido a la relación entre la exposición de mujeres embarazadas, con la generación de malformaciones fetales en ojos y cerebro. Tanto la molécula de Benomil como la de MBC pueden ocasionar defectos a nivel de hígado, sistema reproductor masculino y consecuencias más graves como el cáncer (EPA, 2001).

Iprodione y Procimidona

La aparición de otros ingredientes activos después de esta época como el Iprodione (1974) y la Procimidona (1976) (Torkewitz, 2008) modificó el manejo de la enfermedad, empleando otros tipos de moléculas que demostraron un aumento significativo en el control de la infección por *Sclerotinia* spp. (Subbarao, 1998).

El Iprodione pertenece al grupo químico de las dicarboximidias, el cual impide la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio (De Liñán, 1997) (Tabla 1). Esta molécula puede inhibir la síntesis de membranas celulares y lípidos, interfiriendo en el control de una serie de señales intracelulares que controlan funciones del hongo, incluyendo la incorporación de carbohidratos como constituyente celular (Bayer CS, 2009). Ha sido recomendada para el control específico de *S. minor* en cultivos de lechuga a razón de 0,5 ppm (De Liñán, 1997). En cuanto a su toxicidad, no se han encontrado casos donde el Iprodione genere complicaciones graves en la salud humana (EPA, 1998).

En Colombia se han registrado en los últimos años, cerca de diez productos comerciales que contienen este ingrediente activo (Voider 500 SC y Torin 500 SC son un ejemplo) los cuales, son utilizados frecuentemente en el control de enfermedades en flores de corte como el clavel, el crisantemo y las rosas; hortalizas como el tomate, la cebolla y la papa (ICA, 2008).

Después del año 1995, se realizó el registro del producto Rovral 50 WP y en el año 1998 el registro de Rovral Flo los cuales, no están recomendados para el control de *Sclerotinia* spp. en lechuga (ICA, 2008).

Por otra parte, la Procimidona también pertenece al grupo de las dicarboximidias, actúa por inhibición de la síntesis de los triglicéridos, con lo que se impide la germinación de las esporas y se bloquea el crecimiento micelial (Tabla 1). Este ingrediente activo está recomendado para el manejo de *S. sclerotiorum* en cultivos de lechuga (De Liñán, 1997). Hasta el momento únicamente se encuentran registrados ante el ICA dos productos fungicidas con el ingrediente Procimidona, Sumilex 50 WP (registrado en 1993) y Sialex 50 SC (registrado en 2001), ninguno de los cuales posee recomendaciones de uso en el cultivo de lechuga ni la enfermedad moho blanco (ICA, 2008). En cuanto a toxicidad, no se considera un riesgo para la salud humana (EPA, 2005).

Al asperjar Iprodione o Procimidona sobre la cama y la base de las plantas, mojando bien las hojas inferiores y también el suelo, se logra un buen control de la enfermedad moho blanco (Subbarao, 1998; Ávila de Moreno, 1991b; Dillard, 1987).

Aunque estos fungicidas fueron ampliamente utilizados en el control de *Sclerotinia* spp, hasta mediados de los años ochenta, su efectividad en el manejo de la enfermedad fue poco duradera (Subbarao, 1998), pues los agricultores realizaron aplicaciones de los productos durante al menos 3 años consecutivos (Martín *et al.*, 1991), lo que llevó a un control menos

satisfactorio de los fungicidas en suelos tratados repetidamente con el mismo ingrediente activo (Subbarao, 1998).

Tebuconazole

A mediados de los años ochenta, el ingrediente activo Tebuconazole (1986) (Torkewitz, 2008) aparece por primera vez como producto químico. Esta molécula hace parte de los triazoles, un grupo químico que influye en la formación y en la selectividad de la membrana celular (Carmona, 2006), por consiguiente inhibe el proceso de biosíntesis de esteroides en los hongos patógenos (De Liñán, 1997). El mecanismo detallado se basa en el bloqueo de la desmetilación del C¹⁴ del lanosterol que da lugar a la acumulación de trimetilesteroides, luego impide la deshidrogenación en el Δ^7 y la acumulación de 3 Δ^5 esteroides, Δ^5 estigmastenol, $\Delta^{5,22}$ – estigmastenediol y Δ^5 – ergostenol (De Liñán, 1997) (Tabla 1).

De Liñán (1997) afirma que el Tebuconazole posee un campo de actividad muy amplio, incluyendo *Sclerotinia* spp.

En el país se encuentran registrados gran variedad de productos con este ingrediente activo. En el año 1994 aparece Folicur EC 250 y en 1996 Folicur EW 250 (ICA, 2008). Los últimos productos registrados como Nuteb 200 EC y Tacora 25 EW (registrados en el 2008), están recomendados para usar en arroz, banano, cebolla de bulbo, cebolla de rama y tomate, pero no para lechuga (ICA, 2008). No existen datos concretos acerca del control de *Sclerotinia* spp. por parte de esta molécula.

Tabla 1. Moléculas usadas en el control de *Sclerotinia* spp.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Formulación	Grupo químico	Modo de acción
Benlate	Benomil	WP	Benzimidazoles	Interfiere en la división celular
Folicur	Tebuconazole	EW	Triazoles	Inhibe la biosíntesis de ergosterol
Rovral	Iprodione	SC	Dicarboximidias	Inhibe la síntesis de lípidos de la membrana celular
Sumilex	Procimidona	WP	Dicarboximidias	Inhibe la síntesis de lípidos de la membrana celular
Cantus	Boscalid	WG	Carboximidias	Inhibe la respiración
Stroby	Kresoxim-metil	SC	Estrobilurinas	Bloquea el transporte de electrones

(Fuente: Fungicide Resistance Action Committee, 2006)

Kresoxim-metil y Boscalid

En la actualidad, se han desarrollado moléculas nuevas como Kresoxim-metil (1996) y Boscalid (2003) (Torkewitz, 2008). Kresoxim-metil es un fungicida sintético de amplio espectro, perteneciente a la familia de las estrobilurinas, una nueva clase de molécula biológica asociada a la estrobilurina A, un compuesto natural producido por el hongo *Strobilurus tenacellus* (International Programme on Chemical Safety, 2009). Las estrobilurinas interfieren en la disponibilidad de oxígeno para la célula y por ende en la formación de energía vital para el crecimiento de los hongos (Carmona, 2006). Estas moléculas impiden la respiración de las mitocondrias bloqueando el transporte de electrones en la posición del complejo citocromo *bc* (De Liñán, 1997) (Tabla 1).

Según los registros de venta de plaguicidas químicos de uso agrícola del ICA, únicamente se ha incluido un producto con Kresoxim-metil, Stroby WG registrado en el año 1999 (ICA, 2008).

El Kresoxim-metil actúa de modo protectante, curativo y erradicante, resulta efectivo en el control de varias enfermedades como el moho blanco y en general desarrolla excelente actividad en contra de la mayoría de los hongos fitopatógenos (Agro-Care Chemical Industry Group Limited, 2009; Terralia; 2009).

Por otro lado, Boscalid es un nuevo ingrediente activo de amplio espectro perteneciente al grupo químico de las anilidas, el cual inhibe la enzima succinato deshidrogenasa, importante en la cadena transportadora de electrones (Stammler y Speakman, 2006) (Tabla 1).

Recientemente en el país fueron incluidos en los registros dos productos con Boscalid, Cantus WG y Cumora SC (registrados en 1998) recomendados para el control de enfermedades en rosa y banano respectivamente (ICA, 2008)

Este fungicida ha demostrado eficacia en la inhibición de enfermedades causadas por *S. sclerotiorum*, como la pudrición de tallo en canola (Hanson y Lamey, 2001) y moho blanco en frijol (Dillard *et al.*, 2003). Stammler y Speakman (2006) informaron que hasta ese momento no se habían encontrado aislamientos de hongos resistentes a dicho ingrediente activo.

2.1.3.5.2. Riesgos de desarrollo de resistencia a fungicidas

Las aplicaciones indiscriminadas de fungicidas han aumentado los casos de tolerancia de los fitopatógenos a los productos químicos, generando como consecuencia problemas con mayor complejidad como el desarrollo de resistencia y favoreciendo la permanencia de la enfermedad en los campos por tiempo prolongado (Torrado, 2000; Sánchez y Moreno, 2004).

El uso de fungicidas constituye una herramienta económica y sencilla de control de fitopatógenos, por lo cual el agricultor se ve obligado a utilizar estos productos químicos para el manejo de las enfermedades sin tener que recurrir a técnicas más sofisticadas y costosas. Sin embargo, el esquema de control químico que implementa el agricultor, no es el más conveniente, pues hace caso omiso de las recomendaciones específicas de la casa comercial que provee los fungicidas (Hubbard *et al.*, 1997), pone en práctica sus conocimientos empíricos y deduce que si la incidencia de enfermedad en sus campos aumenta, debe incrementar la dosificación y la frecuencia con que se aplican los productos para contrarrestar la infección de una manera rápida, sin importar la etapa de crecimiento de la planta (factor crítico para la aplicación) (Martin *et al.*, 1991). Esto genera casos de insensibilidad o tolerancia a los productos químicos, debido a que los fitopatógenos son expuestos constantemente a estas moléculas durante tiempos prolongados (Martín *et al.*, 1991).

La tolerancia generada conlleva a la falta de eficacia de los fungicidas, al aumento en la incidencia de la enfermedad y por consiguiente de la severidad de la enfermedad en los cultivos (Subbarao, 1998).

La resistencia se intensifica a través de la supervivencia y la propagación de microorganismos mutantes durante la exposición a las moléculas fungicidas (Brent y Hollomon, 2007). Este incremento puede ser discreto (siendo el resultado de una sola mutación de un gen específico) o gradual (considerado poligénico). Los mecanismos de resistencia varían, pero principalmente involucran la modificación del sitio primario de acción del fungicida por parte del patógeno (Brent y Hollomon, 2007).

Bermejo *et al.* (2000), atribuyen el desarrollo de resistencia a los fungicidas, a la combinación de algunos factores como:

Por parte del agricultor

- Número elevado de aplicaciones.
- Aplicación de dosis incorrectas.
- Uso de productos equivocados.

Por parte del producto fungicida

- Alta persistencia.
- Modo de acción en un sitio simple.
- Facilidad de ser metabolizado el ingrediente activo.

Por parte del patógeno

- Ciclo de vida corto y muchas generaciones.
- Fecundidad alta y distribución amplia de la progenie.
- Alta variabilidad genética inherente.

2.1.3.5.3. Resistencia a fungicidas

La resistencia a fungicidas es considerada como la capacidad existente en la naturaleza de algunos individuos dentro de una población de hongos fitopatógenos, que les permite sobrevivir a la aplicación de un compuesto químico tóxico utilizado a niveles letales, que en condiciones normales resultaría eficaz contra ese hongo (Bermejo *et al*, 2000; Montesinos, 2005)

El fenómeno de resistencia de los fitopatógenos a los productos fitosanitarios, constituye actualmente el problema que más preocupa al sector agrícola de muchos países. Este acontecimiento comenzó a ser un problema en el manejo de enfermedades de los cultivos agrícolas, con el descubrimiento de los fungicidas sistémicos, cuyo modo de acción es mucho más específico que el de sus predecesores, los fungicidas protectantes (Guzmán, 2003). Estos productos actúan interrumpiendo el desarrollo del agente causal de la enfermedad después de la infección (Patiño y Rodríguez, 2001), exponiendo al fitopatógeno permanentemente al ingrediente activo. Por consiguiente, la respuesta de este microorganismo debe entenderse como la capacidad de sobrevivencia frente a un factor externo adverso del medio donde vive, de manera que el fitopatógeno tiene la necesidad de adaptarse a las condiciones desfavorables para favorecer la conservación de su especie (Mondino, 2001; Guzmán, 2003).

Origen de la resistencia

La habilidad de adaptación de una población está favorecida por la presencia de la variabilidad genética de algunos de sus individuos. Los individuos que son capaces de sobrevivir frente a nuevas condiciones adversas han adquirido un cambio a nivel genético basado en la mutación y la selección. La mutación es un cambio en la información genética que les permite resistir al fungicida y la selección determina los genotipos resistentes para que se incremente la población, hasta alcanzar niveles tales que posiblemente harán fracasar el control químico (Bermejo *et al.*, 2000).

Mecanismos de resistencia

Los principales mecanismos de resistencia que puede llevar a cabo un fitopatógeno resistente consisten en el desarrollo de una vía metabólica alternativa, la degradación metabólica del fungicida, la exclusión o eliminación del fungicida y la alteración del sitio bioquímico de acción, el cual parece ser el más desarrollado por los patógenos resistentes (Brent y Hollomon, 2007). Según Montesinos (2005), los mecanismos de resistencia a fungicidas también pueden incluir, disminución de la permeabilidad celular al producto, destoxificación bien sea por modificación química o por inmovilización, o por una disminución de la afinidad del producto.

Casos de resistencia de *S. minor* y *S. sclerotiorum*

Aunque el fenómeno de resistencia o tolerancia es novedoso, se han descrito algunos casos de resistencia por parte de *Sclerotinia* spp. en diferentes países.

Algunas cepas de *S. minor* aisladas de maní han presentado resistencia a moléculas dicarboximidas como el Iprodione y Procimidona (Brenneman *et al.*, 1987). Matheron y Porchas (2004), evaluaron algunos fungicidas, incluyendo Boscalid, frente a *S. minor* el cual, en concentración de 0,01 µg/mL, solamente inhibió su crecimiento en 12%.

En el caso de *S. sclerotiorum*, el crecimiento fue inhibido en 40%, al evaluar la dosis de 0,1 µg/mL de Boscalid. Este fungicida tuvo mayor control de la enfermedad moho blanco de la lechuga ocasionada por *S. minor* que aquella causada por *S. sclerotiorum*. En Colombia no se encuentran en la literatura estudios de resistencia de *Sclerotinia* spp. a fungicidas.

2.1.3.5.4. Líneas base de fungicidas

Según Rusell (2004), la línea base de sensibilidad se define como el perfil de sensibilidad de un determinado hongo al fungicida utilizado para su control, construido con técnicas biológicas y moleculares para evaluar la respuesta previa antes de la exposición de un individuo o una población al fungicida.

La línea base es una herramienta para el establecimiento y el monitoreo de las estrategias de manejo de la resistencia (Rusell, 2004). De igual forma permite una temprana detección de los cambios de sensibilidad de una población fitopatógena, lo que posibilita variar la estrategia de control teniendo en cuenta los mecanismos de acción de los ingredientes activos antes de que se produzcan pérdidas económicas (Muiño *et al.*, 2002).

Esta práctica consiste en la toma de muestras de la población de campo de un fitopatógeno para medir el grado de sensibilidad a uno o más fungicidas *in vitro* (Rusell, 2004). El desarrollo de pruebas de sensibilidad (líneas base) es una herramienta fundamental para establecer un punto de referencia sobre el nivel de tolerancia de un fitopatógeno bajo condiciones controladas en laboratorio sin embargo, es importante que estos estudios sean complementados con pruebas *in vivo* en campos experimentales, que permitan obtener datos equivalentes a los encontrados *in vitro*, que relacionen los datos hallados para poder generar algunas alternativas para un mejor uso del producto fungicida, sin ocasionar posibles casos de resistencia a los ingredientes activos que lo componen (Alfonso y Sandoval, 2008).

Formas de evaluar la sensibilidad de un fitopatógeno

Diversos autores han sugerido algunos métodos para la determinación de sensibilidad a productos fungicidas por parte de un hongo fitopatógeno (Georgopoulos, 1982; Staub y Sozzi, 1984; Muiño *et al.*, 2002; FRAC, 2009).

La elección de la técnica para llevar a cabo una prueba de sensibilidad depende del propósito del estudio y de la combinación hongo – fungicida (Staub y Sozzi, 1984). Estos métodos de detección de cepas fitopatógenas sensibles a los productos de control químico se han basado en bioensayos convencionales, en los cuales los organismos son expuestos a un gradiente de dosis o concentraciones de los plaguicidas evaluando crecimiento,

mortalidad, o aumento de la población y determinando el nivel de sensibilidad en que se encuentran (Georgopoulos, 1982).

Algunas herramientas simples y rápidas como pruebas de germinación de esporas sobre agar, son buenas en algunos casos, pues permiten analizar un gran número de esporas en pocos días, permitiendo la detección de niveles bajos de resistencia en poblaciones sensibles (Staub y Sozzi, 1984). Sin embargo, ésta técnica no podría utilizarse para aquellos hongos que no esporulan fácilmente, por esto es necesario buscar otras pruebas como la medición de crecimiento radial en medios adicionados con fungicida (Staub y Sozzi, 1984).

En Cuba, Muiño *et al.*, (2002) sugirieron algunos métodos para medir la sensibilidad a fungicidas por parte de los fitopatógenos (Tabla 2).

Tabla 2. Métodos estandarizados en Cuba para la evaluación de la sensibilidad a los fungicidas

Métodos <i>in vitro</i>	Métodos <i>in vivo</i>
Crecimiento del hongo en medio líquido con fungicida	Eficacia en cotiledones de la planta
Medición del tamaño del tubo germinativo	Eficacia sobre discos de hojas
Descarga de ascosporas	Eficacia en hojas completas
Crecimiento radial de la colonia del hongo en medio sólido	Eficacia en plantas completas

Fuente: Muiño *et al.* (2002)

Recientemente el Comité de Acción para la Resistencia a los Fungicidas (FRAC), publicó algunas herramientas útiles en la detección de resistencia con mayor especificidad para fitopatógenos y fungicidas (FRAC, 2009). Dentro de las técnicas empleadas para evaluar la sensibilidad *in vitro* se incluyen: germinación de conidios, microplacas, ensayos de germinación del tubo germinal, crecimiento diametral, entre otras. También se describen experimentos *in vivo* como pruebas de sensibilidad en segmentos de hojas, discos de hojas o plantas completas (FRAC, 2009). Un estudio realizado por Stammier *et al.* (2007) donde se evaluó la sensibilidad de *S. sclerotiorum* frente al ingrediente activo Boscalid mediante la técnica de crecimiento diametral modificado, permitió detectar de una manera rápida y confiable el nivel de tolerancia a esta molécula.

Organismos de control de productos fitosanitarios

Entidades como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) son las entidades ambientales encargadas de reglamentar y controlar el registro, venta y uso de productos químicos empleados en la producción agrícola (US EPA, 2009; ICA, 2009). Todos los agroquímicos vendidos o distribuidos en Estados Unidos o Colombia, deben estar registrados ante dichas instituciones, con los correspondientes estudios de sensibilidad y pruebas de eficacia, demostrando que estos productos pueden ser empleados en el control de plagas sin ocasionar riesgo para la salud humana o consecuencias para el medio ambiente (US EPA, 2009; ICA, 2009).

En el caso de la EPA, aquellos plaguicidas registrados antes de Noviembre 1 de 1984 deben ser nuevamente registrados ante esta autoridad, pues de esta forma los plaguicidas se someten a una evaluación más rigurosa y exigente asegurando la eficacia de los mismos en el control de las enfermedades y disminuyendo los riesgos para el ambiente y la salud de la población (US EPA, 2009).

Requisitos para el registro de plaguicidas químicos

Algunos requisitos exigidos por la Comunidad Andina de la cual hace parte Colombia para realizar el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola, se encuentran consignados en la Decisión 436: Norma Andina para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola, Capítulo VI: Del registro nacional de plaguicidas químicos de uso agrícola, Sección II: Requisitos para el registro, Artículos 17 al 21 (Comunidad Andina, 2009). Los cuales señalan que se debe presentar la solicitud de registro ante la Autoridad Nacional competente incluyendo los siguientes datos: Características del ingrediente activo; como el nombre común, el nombre químico, la fórmula estructural y el grupo químico. Propiedades físicas y químicas: el aspecto, el color, la densidad y la solubilidad. Aspectos relacionados a su utilidad: el mecanismo de acción, el efecto sobre los fitopatógenos, los organismos blanco, el modo de acción sobre las plagas, el ámbito de aplicación previsto, las condiciones fitosanitarias y ambientales para ser usado, la resistencia (información sobre desarrollo de resistencia y estrategias de monitoreo). Efectos tóxicos en especies mamíferas y otras especies. Información de seguridad, entre otras.

Además se debe incluir características generales del producto formulado: el nombre del producto, el nombre del ingrediente activo, el tipo de formulación. La composición: contenido de sustancia activa. Datos de aplicación: efecto sobre plagas y cultivos, la dosis recomendada, los métodos de aplicación. Datos de seguridad, entre otros (Comunidad Andina, 2009).

Una vez cumplido este requisito, la Autoridad Nacional competente otorgará el Certificado de Registro Nacional del plaguicida químico de uso agrícola, una vez se hayan obtenido los resultados de la valoración del producto y se hayan presentado los datos del bioensayo de eficacia que demuestren que los beneficios son mayores que los riesgos que puede ocasionar el empleo de dicho producto (Comunidad Andina, 2009).

La persona natural o jurídica que solicite el Registro Nacional de un plaguicida es el encargado de realizar el seguimiento de la eficacia de productos bajo las solicitudes y procedimientos establecidos y autorizados por la Autoridad Nacional competente la cual finalmente supervisa el desarrollo de los ensayos de eficacia. Estos ensayos deben ser realizados por personas naturales o jurídicas, públicas o privadas que contengan el aval de la Autoridad Nacional competente quien demuestra que el producto continúa cumpliendo con los fines propuestos sin ocasionar efectos perjudiciales al cultivo (Comunidad Andina, 2009).

3. Formulación del problema y justificación de la investigación

3.1. Formulación del problema

La lechuga es una de las hortalizas con mayor importancia económica en Colombia, ocupa el segundo lugar después de la zanahoria y antes del cilantro (DANE, 2002). Es cultivada en los departamentos de Antioquia, Bolívar, Boyacá, Cesar, Córdoba y Cundinamarca (Velásquez y Giraldo, 2005), donde se destacan los extensos cultivos de la sabana de Bogotá, principal área productora del país, con el 72% del área sembrada a nivel nacional (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006). Sin embargo, el rendimiento promedio de 21.59 Ton/Ha obtenido en el país (DANE, 2002) es muy bajo, en comparación con los rendimientos de países como Estados Unidos con 34 Ton/Ha (Velásquez y Giraldo, 2005) y España con 28.74 Ton/Ha (Ryder, 1998). Esta diferencia podría deberse a la incidencia de un gran número de enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos y daños por insectos plaga y moluscos que disminuyen el número de plantas por cosechar (Davis *et al.*, 2002).

La enfermedad moho blanco de la lechuga (Lettuce drop) es uno de los problemas fitosanitarios más importantes del cultivo, debido a que puede ocasionar grandes pérdidas económicas predominantemente cerca de la cosecha, es así como se ha estimado que a nivel mundial ocurren pérdidas cercanas a 150 millones de dólares anualmente (Suszkiw, 2003). En la Sabana de Bogotá, específicamente en la zona de Mosquera, la enfermedad ha causado pérdidas entre el 12%, y el 54% (Moreno *et al.*, 2009). Las dos especies de hongos del género *Sclerotinia* spp. (*S. minor* y *S. Sclerotiorum*) descritas como los agentes causales, también están presentes en los suelos donde se cultiva lechuga en la región Sabana de Occidente de Cundinamarca (Smith, 2007; Moreno *et al.*, 2009). Estos hongos pueden sobrevivir y persistir durante períodos prolongados de tiempo, gracias a la formación de estructuras de resistencia tales como los esclerocios (Abawi y Grogan, 1979; Purdy, 1979; Subbarao, 1998)

El control químico es la principal herramienta que utilizan los productores de lechuga para el control del moho blanco y en general, en el país se conoce que no hay fungicidas registrados ante el ICA para el control de *Sclerotinia* spp. en lechuga; aún así los agricultores los utilizan casi siempre de una forma incorrecta, obteniendo bajos niveles de eficacia. El uso excesivo de diferentes moléculas con dosificaciones erróneas, así como el uso del fungicida equivocado y el uso de un solo producto por mucho tiempo, ocasionan que los microorganismos nativos del suelo disminuyan su población y se favorece el desarrollo de

fitopatógenos tolerantes o resistentes. De igual forma, esta situación implica un aumento en los costos de producción por el malgasto de los agroquímicos y causa un grave deterioro ambiental y de salud pública.

El uso de fungicidas de síntesis química en el cultivo de lechuga en la Sabana de Bogotá se ha realizado por más de cuatro décadas (Nivia, 2007) y hasta ahora no se ha realizado un estudio para determinar el estado de sensibilidad de *Sclerotinia* spp. a estas sustancias. El conocimiento que se espera generar en el presente estudio aportaría recomendaciones de uso de los fungicidas para el desarrollo de pruebas de eficacia en campo contra *Sclerotinia* sp. en el cultivo de lechuga.

3.2. Justificación de la investigación

Actualmente la construcción de líneas base de fungicidas, es la principal herramienta utilizada por los investigadores que trabajan en la protección de cultivos frente a la aparición del fenómeno de resistencia de los fitopatógenos a dichos agroquímicos.

Esta herramienta, construida por medio de técnicas biológicas sencillas, rápidas, reproducibles, económicas y de resultados confiables, permite detectar y medir el nivel de sensibilidad o resistencia del fitopatógeno a un fungicida con el fin de obtener información sobre la respuesta de éste a la molécula inhibitoria de su crecimiento. Con los datos obtenidos puede diseñarse un perfil de sensibilidad para establecer un punto de referencia del comportamiento del microorganismo ante la exposición al fungicida establecido.

La provisión de datos de sensibilidad es un requisito fundamental para el registro de nuevas moléculas y la renovación del registro de las moléculas ya establecidas. Sin embargo, si al evaluar *in vitro* un producto, éste no es eficaz para el fin que se ha destinado, difícilmente lo será en campo (González, 2005). Es importante resaltar que aunque un producto sea efectivo *in vitro*, no necesariamente lo será en campo pues en su forma de actuar influyen factores como la degradabilidad, la persistencia, etc. (Alfonso y Sandoval, 2008).

Los ensayos *in vitro* sólo dan una estimación indirecta del valor práctico del producto (Alfonso y Sandoval, 2008), por esto es necesario realizar pruebas de eficacia bajo condiciones de campo de los fungicidas, para verificar que esta información coincide con lo obtenido en las líneas base de sensibilidad, con el propósito de implementar posibles mejores usos de los fungicidas, evitando el desarrollo de resistencia del hongo.

En Colombia, la lechuga es una de las hortalizas que ha conseguido un alto nivel de consumo en los últimos años. Igualmente, el aumento en el rendimiento de las cosechas, ha favorecido su permanencia en el mercado en varias épocas del año, lo que demuestra la importancia económica de este producto en el país. A pesar de la importancia que tiene el cultivo de esta hortaliza, *Sclerotinia* sp. patógeno que causa la enfermedad moho blanco en la lechuga, ha generado pérdidas devastadoras en las principales áreas de producción y ha incrementado los costos de manejo de la enfermedad.

Por lo anterior, surge la necesidad de realizar esta investigación con el propósito de obtener información sobre el estado de la sensibilidad de *Sclerotinia* sp. en los cultivos de la Sabana de Bogotá y de esta forma sugerir valores de concentraciones que se deben evaluar en pruebas de eficacia *in vivo* para el registro de productos en el cultivo de lechuga. A mediano plazo se espera que esta investigación contribuya a la disminución de los niveles de incidencia del moho blanco, a evitar el desarrollo de resistencia y a favorecer la competitividad del cultivo de la lechuga.

4. Objetivo

Determinar la sensibilidad de *S. minor* y *S. sclerotiorum* a fungicidas utilizados por los agricultores y otros recomendados para el control de la enfermedad moho blanco de la lechuga.

5. Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica (Mosquera, Cundinamarca).

5.1. Reactivación de aislamientos conservados

Los aislamientos Sc001 y Sc002 de *S. minor* y *S. sclerotiorum* respectivamente, conservados en el Banco de Germoplasma de microorganismos con interés en Control Biológico de Corpoica y que fueron aisladas previamente de campos comerciales en los municipios de Funza (finca Lagunilla) y Mosquera (finca La Fragua), se reactivaron inoculando esclerocios en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa sintético (PDA, 39 g/L; Scharlau Chemie S. A.), suplementado con Cloranfenicol (cf, 250 mg/L; Merck) y se incubaron a 25 °C hasta observar crecimiento de micelio del hongo. Estos aislamientos se emplearon en la prueba de sensibilidad a fungicidas *in vitro*.

5.2. Aislamiento de hongos a partir de material de campo

Para obtener otros aislamientos de *S. minor* y *S. sclerotiorum* se colectaron muestras de lechuga (hojas, raíces o plantas completas) con síntomas y/o signos de la enfermedad moho blanco, en tres cultivos de los municipios de Funza, Madrid y Mosquera, Cundinamarca. Estas muestras se procesaron en el laboratorio, seleccionando esclerocios de cada muestra por separado; con aquellas plantas que no presentaron esclerocios, sino únicamente micelio, se realizó indexación del tejido enfermo. Para esto se tomaron trozos de 5 mm por 5 mm de tejido vegetal enfermo y se desinfectaron en alcohol (75%) durante 30 segundos, luego en una solución de Hipoclorito de sodio (1%) durante un minuto y finalmente se lavaron con abundante agua estéril. Posteriormente, los trozos desinfectados se inocularon en medio de cultivo PDAcf. De igual manera, se procedió con la desinfección de los esclerocios seleccionados de las muestras y también se inocularon en medio de cultivo PDAcf. Las cajas de Petri se incubaron a 25 °C hasta observar crecimiento de micelio del hongo y se realizó la purificación de las colonias.

Una vez se aislaron los microorganismos se realizó la conservación según el procedimiento utilizado por el Banco de Germoplasma de microorganismos con interés en Control Biológico de Corpoica.

5.3. Selección de ingredientes activos y dosis para la prueba de sensibilidad

Se seleccionaron seis moléculas, de las cuales tres han sido empleadas en estudios de sensibilidad *in vitro* o recomendadas comercialmente para el control de *Sclerotinia* spp. en lechuga en otros países (Boscalid, Kresoxim-metil y Tebuconazole) y tres que han sido empleadas comúnmente por los agricultores de los municipios de Funza, Madrid y Mosquera (Benomil, Iprodione y Procimidona). Para la selección de las dosis por evaluar se tuvo en cuenta la dosis más alta de ingrediente activo recomendada en la etiqueta del producto comercial (Dosis 4), la mitad de la dosis comercial (Dosis 2), 2/3 partes de la dosis comercial (Dosis 3), 3/2 partes de la dosis comercial (Dosis 5) y el doble de la dosis comercial (Dosis 6). La Dosis 1 corresponde al testigo absoluto (Tabla 3).

Tabla 3. Fungicidas y dosis para la prueba de sensibilidad *in vitro*

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis (ppm i.a)					
		1	2	3	4	5	6
Benomil 50 WP Agricense (Agricense LTDA.)	Benomil	0	125	166,66	250	375	500
Cantus TM WG (BASF Química Colombiana S.A)	Boscalid	0	300	400	600	900	1200
Folicur [®] EW 250 (Bayer Cropscience S.A.)	Tebuconazole	0	0,5	0,66	1	1,75	2
Rovral [®] Flo (Bayer Cropscience S.A.)	Iprodione	0	0,25	0,33	0,5	0,75	1
Stroby [®] SC (BASF Química Colombiana S.A)	Kresoxim-metil	0	0,063	0,083	0,125	0,188	0,25
Sumilex 50 [®] WP (Fumitoro)	Procimidona	0	250	333,33	500	750	1000

5.4. Evaluación de la sensibilidad de *S. minor* y *S. sclerotiorum* a fungicidas

5.4.1. Obtención de inóculo

Con el fin de establecer una colección de trabajo se realizaron dos repiques consecutivos de los aislamientos de *Sclerotinia* sp. Para esto con un sacabocados se sacó un disco (5 mm) de medio de cultivo colonizado con micelio del margen de la colonia y se colocó en el centro de una caja de Petri con PDAcf para cada aislamiento. Las cajas se incubaron a 25 °C por 6 días. Después de este tiempo, se realizó un segundo pase de la colonia a medio de cultivo fresco (PDAcf) siguiendo la misma metodología, se colectaron los esclerocios con una pinza estéril y se conservaron en tubos eppendorf a temperatura ambiente. Con este último repique se realizó el montaje de la prueba de sensibilidad.

5.4.2. Preparación de los medios de cultivo con fungicida

Para la elaboración de los medios de cultivo con fungicida, se tuvo en cuenta las concentraciones de ingrediente activo por evaluar y el volumen final de medio de cultivo necesario para las unidades experimentales (Anexo 1). Teniendo en cuenta estos datos se preparó una solución stock, con base en la dosis recomendada de producto comercial y la solubilidad de cada uno de los fungicidas (Anexo 2). Para preparar dicha solución se utilizaron como solventes, agua destilada para los fungicidas Folicur, Rovral, Stroby y Cantus y acetona para Benlate y Sumilex.

Por ejemplo: para el fungicida Sumilex se seleccionó la dosis de 1 g/L, recomendada por la casa comercial, en este producto el ingrediente activo Procimidona está en concentración de 50% p/p.

Para preparar la solución stock del fungicida se utilizó como solvente la acetona en la cual, este ingrediente activo tiene una solubilidad de 180.000 ppm, ya que en agua dicho ingrediente no fue soluble. El volumen final de la solución stock necesario para adicionar a los medios de cultivo fue de 7 mL, la concentración de Procimidona en éste volumen fue de 170.000 ppm y para obtener esta concentración se adicionaron 2,4 g del producto Sumilex.

Al mismo tiempo, se preparó medio PDA sintético y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 PSI por 20 minutos. Una vez el agar bajó su temperatura a 45 °C aproximadamente, se adicionó el volumen requerido de la solución stock de fungicida al medio para obtener las

diferentes concentraciones a evaluar, se agitó para homogenizar y luego se sirvieron aproximadamente 15 mL del medio en las cajas de Petri y se dejó solidificar.

5.4.3. Prueba *in vitro* de sensibilidad

Con ayuda de un sacabocados estéril se sacó un disco de agar de 5,31 mm de diámetro del margen de un cultivo de 6 días de crecimiento; éste se inoculó en el centro de una caja de Petri con el medio preparado anteriormente y se llevó a incubar a 25 °C por 8 días. Diariamente se midió el crecimiento diametral de la colonia (dos diámetros perpendiculares que fueron promediados) y finalizado el ensayo se contaron los esclerocios producidos por cada hongo.

Los experimentos se realizaron mediante un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en una caja de Petri. Para cada aislamiento se utilizó como testigo el crecimiento del hongo en medio de cultivo PDA sin fungicida.

5.5. Análisis de la información

Con base en los datos de crecimiento de los aislamientos de *Sclerotinia* sp. obtenidos en el testigo y en la dosis recomendada de cada fungicida, se determinó la velocidad de crecimiento micelial (mm/día). Para esto se realizó un análisis de regresión lineal entre el diámetro de la colonia y el tiempo de crecimiento para cada repetición, con ayuda del programa Excel de Microsoft Office 2007®. Se aceptaron aquellos tratamientos que presentaron un $R^2 \geq 0,75$. Posteriormente, se calcularon las pendientes de cada recta, correspondientes a la velocidad de crecimiento de cada hongo, valores que fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando el programa Statistix® Version 1.0.

De la misma forma los datos de la cinética de crecimiento, permitieron determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislamientos debido a la acción del ingrediente activo mediante la siguiente fórmula:

$$IM (\%) = \left(\frac{(CML - CM) - (CMF - CM)}{(CML - CM)} \right) \times 100$$

IM (%): Porcentaje de inhibición crecimiento micelial

CML: Crecimiento diametral de la colonia en el testigo

CM: Diámetro inicial del inóculo (disco con micelio)

CMF: Crecimiento diametral de la colonia expuesta al fungicida

Adaptado de Patiño y Rodríguez, (2001).

También se estimaron los valores de la Concentración efectiva 50 (CE₅₀) (concentración requerida del fungicida para reducir el crecimiento del hongo en un 50%) mediante un análisis Probit (Finney, 1971).

6. Resultados y discusión

6.1. Aislamiento de *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum*

Los aislamientos Sc001 y Sc002 crecieron en el medio de cultivo después de inocular esclerocios. La morfología de los dos hongos correspondió a la descrita por Martínez (2008), corroborando las características de crecimiento de estos aislamientos en medio de cultivo. Particularmente, el aislamiento Sc001 presentó un micelio algodonoso de color blanco y después de 6 días de incubación se observó la formación de esclerocios pequeños (0.5 mm a 2 mm), de forma predominantemente redonda y con una distribución uniforme en la caja de Petri (Figura 3A). Por las características morfológicas, se determinó que la especie de este hongo corresponde a *S. minor* (Hawthorne, 1975; Davis *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2003).

En el caso del aislamiento Sc002, la morfología macroscópica de la colonia también coincidió con las características descritas por Martínez (2008), quien señala que el crecimiento de *S. sclerotiorum* en medio de cultivo se caracteriza por la formación de micelio blanco, de textura algodonosa y forma esclerocios de tamaño grande (>2 mm), de forma irregular, ubicados en los márgenes de crecimiento de la colonia (Figura 3B) (Kohn, 1979; Davis *et al.*, 2002).

A partir de las muestras de lechuga con síntomas y/o signos de la enfermedad moho blanco colectadas en los municipios de Funza, Madrid y Mosquera, se obtuvo un total de cuatro aislamientos de *Sclerotinia* sp. Dos aislamientos se identificaron como *S. minor* y los otros dos como *S. sclerotiorum*, según las características macroscópicas observadas en el medio de cultivo.

De las fincas Hacienda Villa Amparo (Funza) y Parcelas II (Mosquera) se obtuvieron dos aislamientos correspondientes a las especies *S. minor* y *S. sclerotiorum* respectivamente, mientras que de la finca San Nicolás (Madrid) se aislaron las dos especies (Tabla 4). El crecimiento del aislamiento de la finca Hacienda Villa Amparo en medio de cultivo se caracterizó por presentar un micelio blanco algodonoso después del día 2 de inoculación y por la producción de esclerocios de color negro, de tamaño pequeño y de forma regular, distribuidos de manera uniforme sobre el medio de cultivo después del día 6 de crecimiento, características que sugieren que la especie encontrada en esta finca es *S. minor*, pues coincide con las descripciones de Hawthorne (1975), Hao *et al.*, (2003) y Davis *et al.*, (2002) (Figura 3C).

Tabla 4. Codificación de los aislamientos de *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum*

Municipio	Vereda	Finca	Especie	Código asignado
Funza	Tres esquinas	Lagunilla	<i>S. sclerotiorum</i>	Sc002
	La Isla	Hacienda Villa Amparo	<i>S. minor</i>	Sc005
Madrid	El Corso	San Nicolás	<i>S. sclerotiorum</i>	Sc006
	El Corso	San Nicolás	<i>S. minor</i>	Sc007
Mosquera	San José	Parcelas II	<i>S. sclerotiorum</i>	Sc008
	San Jorge	La Fragua	<i>S. minor</i>	Sc001

Por otra parte, el aislamiento obtenido de la finca Parcelas II presentó características semejantes a las descritas para *S. sclerotiorum*, con micelio de color blanco y de textura algodonosa al segundo día de crecimiento. Posteriormente, se produjeron esclerocios negros de forma irregular y de tamaño relativamente grande, cualidades parecidas a las descritas por Kohn (1979) y Davis *et al.*, (2002) (Figura 3D). En los aislamientos de la finca San Nicolás (Madrid) se observaron dos tipos diferentes de crecimiento, ya que uno de ellos compartió las características descritas para *S. sclerotiorum*, mientras que el otro presentó propiedades semejantes a las descritas para *S. minor* (Figura 3E, F).

El crecimiento de los aislamientos Sc005 y Sc007 coincidió con las descripciones realizadas por Hawthorne (1975), Davis *et al.*, (2002) y Hao *et al.*, (2003) para la especie *S. minor*, mientras que las características de los aislamientos Sc006 y SC008 fueron similares a aquellas descritas por Kohn (1979) y Davis *et al.*, (2002) para la especie *S. sclerotiorum*.

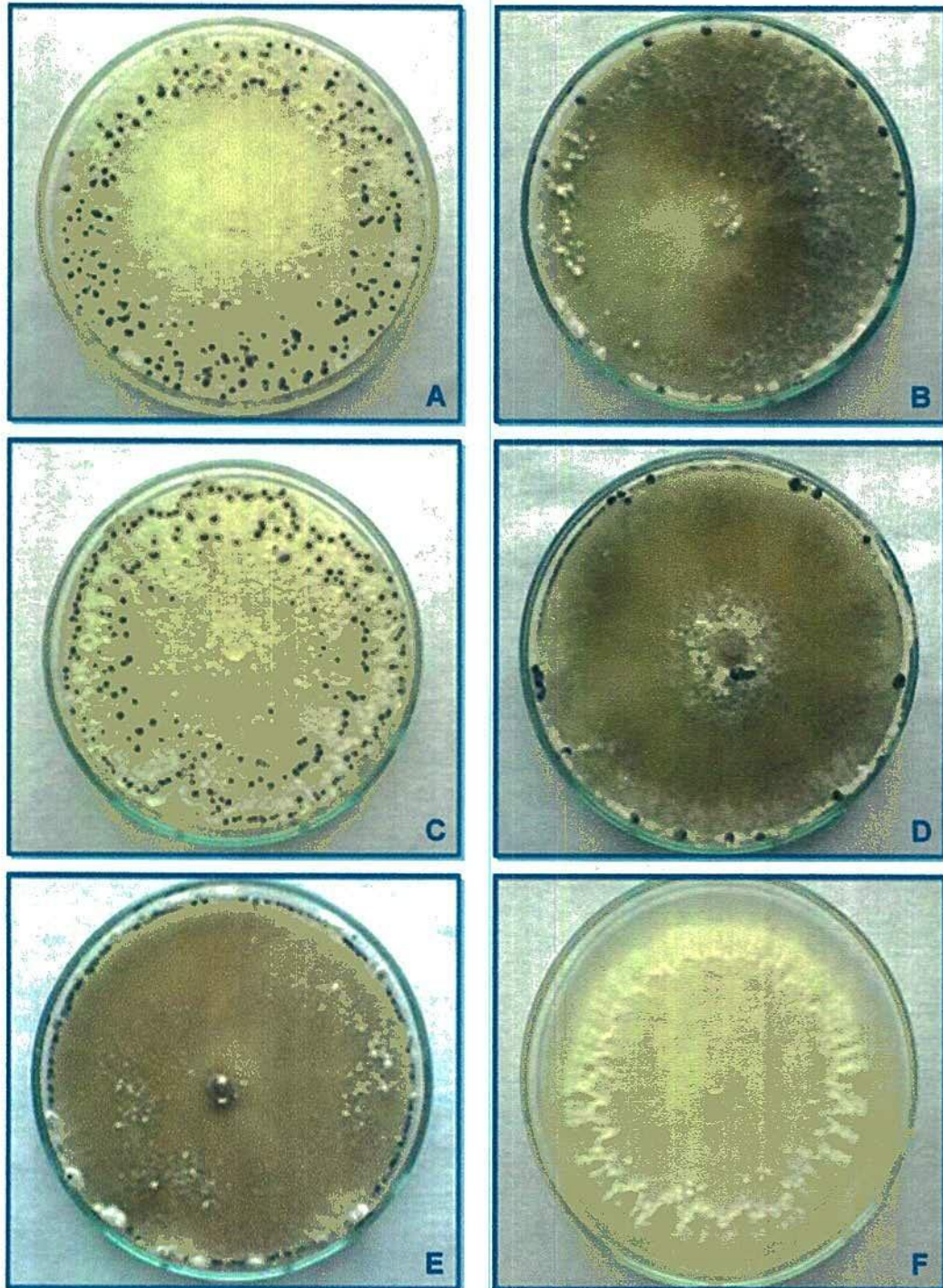


Figura 3. Características morfológicas de los aislamientos nativos de *Sclerotinia* sp. después de 8 días de incubación a 25°C. **A.** Aislamiento Sc001 (*S. minor*). **B.** Aislamiento Sc002 (*S. sclerotiorum*). **C.** Aislamiento Sc005 (*S. minor*). **D.** Aislamiento Sc006 (*S. sclerotiorum*). **E.** Aislamiento Sc007 (*S. sclerotiorum*). **F.** Aislamiento Sc008 (*S. minor*).

6.2. Evaluación de la sensibilidad de *S. minor* y *S. sclerotiorum* a fungicidas

La prueba *in vitro* de sensibilidad a fungicidas se realizó con los seis aislamientos de *Sclerotinia* sp., descritos en la tabla 4. Este experimento permitió observar el comportamiento en el crecimiento de dichos aislamientos provenientes de los municipios de Funza, Madrid y Mosquera (Cundinamarca), cuando se condicionó su desarrollo con la adición de fungicidas al medio de cultivo.

Con los fungicidas Iprodione (Rovral®), Procimidona (Sumilex®) y Tebuconazole (Folicur®), todos los aislamientos presentaron la misma tendencia en cuanto la inhibición del crecimiento de la colonia, la restricción en la producción de esclerocios y la velocidad de crecimiento.

Después de 8 días de contacto, los compuestos Iprodione y Procimidona inhibieron totalmente el crecimiento de todos los aislamientos del hongo en las cinco concentraciones evaluadas. Estos ingredientes activos pertenecen al grupo químico de las dicarboximidaz, moléculas que afectan principalmente el crecimiento de los hongos y en menor razón la germinación de las esporas (De Liñán, 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).

Las dicarboximidaz (Iprodione y Procimidona) forman el radical peróxido u otras especies reactivas de oxígeno de forma directa o indirecta, lo que genera estrés oxidativo en la célula al acumularse en grandes cantidades. Dicha acumulación causa la peroxidación de los lípidos insaturados de las membranas biológicas (Lee *et al.*, 1998 citado por Beltrán *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 1996 citado por Beltrán *et al.*, 2006) lo cual, es favorecido por la abundancia de ácidos grasos en dichas estructuras celulares (Melo y Cuamatzi, 2007).

Los dobles enlaces de las cadenas de los ácidos grasos son muy vulnerables a las reacciones con agentes oxidantes fuertes (Melo y Cuamatzi, 2007), los cuales pueden ser otorgados por las moléculas dicarboximidaz (Beltrán *et al.*, 2006). La reacción entre los agentes oxidantes y los lípidos de las membranas conlleva a la formación de moléculas como el hidropéroxido (Melo y Camatzi, 2007), un producto altamente tóxico difícil de degradar, que altera el gradiente iónico celular ocasionando la pérdida de la permeabilidad

selectiva de la membrana y de la fluidez de la misma (Pérez, 2009b), y genera efectos graves sobre su estructura y funcionamiento (Hisada *et al.*, 1978; Melo y Cuamatzi, 2007).

La molécula de Iprodione ha sido empleada 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 Liñán (1997) 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 este ingrediente activo, 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.

En países como España la Procimidona está recomendada para el control del moho blanco causado por las especies de *S. sclerotiorum* y *S. minor* (Terralia, 2009). De igual forma, De Liñán (1997) indica que este ingrediente activo está recomendado para el manejo de *S. sclerotiorum* en cultivos de lechuga (De Liñán, 1997). En Colombia la Procimidona se encuentra registrada para el control de *Botrytis* sp. en clavel, pero no para el manejo de *Sclerotinia* sp. en lechuga.

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una inhibición total del crecimiento de los aislamientos evaluados, lo que sugiere una alta sensibilidad de estos a dicha molécula; por lo que la Procimidona podría ser un fungicida con alto potencial para el control eficiente de *Sclerotinia* sp. en cultivos de lechuga.

Al igual que con Iprodione y Procimidona, el ingrediente activo Tebuconazole causó una inhibición notoria del crecimiento de todos los aislamientos, aún con la concentración más baja evaluada. Este ingrediente activo impidió el desarrollo de *Sclerotinia* sp., posiblemente debido a que su mecanismo de acción se fundamenta en el cambio de la morfología de la membrana citoplasmática de los hongos, la cual adopta una estructura excesivamente permeable, ocasionando la pérdida de fluidez, generando inestabilidad y fragilidad, e impidiendo la nutrición y el desarrollo del microorganismo y desencadenando finalmente la lisis celular. Este efecto se debe a la inhibición de la biosíntesis del ergosterol, componente constitutivo de la membrana celular (De Liñán, 1997).

La ruta metabólica asociada a la formación del ergosterol inicia con el lanosterol como precursor. La enzima lanosterol-demetilasa (dependiente de citocromo P-450), la cual cataliza la reacción de desmetilación de esta molécula y da origen a la de ergosterol (Saavedra, 2007). El Tebuconazole impide de forma selectiva la actividad de la enzima, pues por medio de un mecanismo indirecto, éste actúa sobre el grupo hemo presente en el citocromo P-450, cofactor enzimático de la reacción de catálisis y en consecuencia, ocurre acumulación de trimetilesteroles dentro de la célula. Posteriormente se bloquea la deshidrogenación en el Δ^7 del lanosterol y se produce la acumulación de 3 Δ^5 esteroles como Δ^5 estigmastenol $\Delta^{5,22}$ estigmastediol y Δ^5 – ergostenol (De Liñán, 1997).

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 producto 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.

Mueller *et al.*, (2002) también evaluaron el efecto de algunos fungicidas (incluyendo Tebuconazole) en el crecimiento de *S. sclerotiorum* aislado de plantas de soya con síntomas de pudrición del tallo. Estos autores determinaron el crecimiento radial del hongo en el medio de cultivo suplementado con fungicida, evaluando las dosis 0.1, 1, 10, 50, 100 y 500 ppm, determinando que todos los fungicidas redujeron el crecimiento micelial del hongo en comparación con el testigo absoluto, y en el caso de Tebuconazole éste inhibió el desarrollo del hongo a partir de la concentración de 10 ppm de ingrediente activo.

Las dosis de Tebuconazole evaluadas en el presente estudio, las cuales inhibieron el crecimiento del hongo, fueron más bajas que las evaluadas por Mueller *et al.*, (2002). Sin embargo, en ambos estudios se observó la restricción del desarrollo de *Sclerotinia* sp. por parte de este ingrediente activo.

En contraste con los ingredientes activos Iprodione, Procimidona y Tebuconazole, el principio activo Kresoxim-metil produjo diferentes comportamientos en todos los aislamientos. En cuanto al desarrollo del hongo, esta molécula permitió el crecimiento en todas las dosis evaluadas, pero afectó la producción de esclerocios (Tabla 5) y las

características morfológicas de las colonias (Figura 4) en todos los aislamientos, efecto que se acentuó al incrementar la concentración del ingrediente activo.

Tabla 5. Efecto del ingrediente activo Kresoxim-metil sobre la producción de esclerocios (\pm la desviación estándar $n=3$) de los 6 aislamientos de *Sclerotinia* sp. en medio de cultivo

Aislamiento	Esclerocios producidos (No.)	
	Sin fungicida	Con fungicida a una concentración de 0,125 ppm
Sc001	170 \pm 4,6	532 \pm 24,7
Sc002	27 \pm 9,9	18 \pm 0,6
Sc005	157 \pm 21,0	253 \pm 9,0
Sc006	24 \pm 6,5	23 \pm 7,1
Sc007	38 \pm 4,0	10 \pm 2,1
Sc008	0	62 \pm 9,3

Los aislamientos Sc001 y Sc005 correspondientes a la especie *S. minor*, crecidos en presencia del ingrediente activo Kresoxim-metil presentaron características de la colonia similares a las del testigo sin fungicida (Figura 4A, C). Sin embargo, el número de esclerocios obtenido en el medio con la dosis recomendada del fungicida, fue mayor al observado en el testigo. Este comportamiento podría estar relacionado con la producción de estas estructuras de resistencia del hongo como respuesta a las condiciones ambientales desfavorables para el microorganismo. Algunos autores afirman que los esclerocios son cuerpos latentes que mantienen inactivo el hongo por extensos períodos de tiempo en el suelo, cuando las condiciones del ambiente son adversas para el desarrollo de las estructuras vegetativas del hongo (Chet y Henis, 1975; Adams y Ayers, 1979). Además, dos de los aislamientos de la especie *S. sclerotiorum* (Sc002 y Sc006) tuvieron cambios en la textura, el tamaño, y el color de la colonia del hongo (Figura 4B, D).

En relación con la formación de esclerocios, se observó que estos dos últimos aislamientos produjeron menor cantidad en comparación con el testigo, posiblemente debido a que el micelio de estos dos hongos se produjo de una manera más lenta con respecto a los otros tratamientos.

Los aislamientos Sc007 (*S. sclerotiorum*) y Sc008 (*S. minor*) se afectaron drásticamente con el incremento de la concentración de Kresoxim-metil en el medio de cultivo (Figura 4E, F). Los cambios morfológicos fueron más evidentes que los observados en los aislamientos

Sc002 y Sc006, pues no solamente se alteró la textura, el tamaño, y el color, sino también la forma de la colonia, la cual cambió de circular a irregular. De la misma forma, los aislamientos presentaron variabilidad en el número de esclerocios producidos. Mientras que el aislamiento Sc007 presentó menor número de esclerocios en comparación con el testigo, el aislamiento Sc008 produjo esclerocios en presencia del fungicida en un tiempo menor al requerido por el testigo.

En general, la molécula de Kresoxim-metil, no inhibió el crecimiento de la mayoría de los aislamientos en las dosis evaluadas, únicamente restringió el desarrollo del aislamiento Sc007 a partir de la dosis recomendada (Figura 4E).

Dentro de las Estrobilurinas existe un derivado denominado methoxymino-a-(o-toliloxi)-o-tolietato de metilo, molécula correspondiente al Kresoxim-metil (De Liñán, 1997). Este compuesto 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 Adenosin 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).

El mecanismo de acción de este principio activo consiste específicamente en bloquear el flujo de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria de los hongos (Pesticide Safety Directorate, 1997). Esto puede deberse a la unión del Kresoxim-metil a una de las proteínas oxido-reductasas de la cadena transportadora de electrones, impidiendo el flujo de electrones hasta el aceptor final que es el oxígeno molecular, de tal forma que se inhibe la fosforilación del Adenosin Difosfato (ADP) en la mitocondria y la consecuente reducción del nivel de Adenosin Trifosfato (ATP) (Pesticide Safety Directorate, 1997). Esta proteína es el complejo III de la mitocondria, la cual normalmente acepta electrones de la proteína ubiquinona reducida y a su vez ésta los utiliza para reducir el citocromo c y continuar con el flujo de electrones a través de la cadena. Sin embargo, cuando el Kresoxim-metil se une al sitio Qo del citocromo bc1 del complejo III, donde se encuentra la ubiquinona, se inhiben las reacciones de oxidación-reducción y por consiguiente la síntesis de ATP (De Liñán, 1997; Sauter *et al.*, 1999 citado por Rusell, 2004; Lyr, 1995 citado por Rusell, 2004; Yamaguchi, 2005; Beltrán, 2006).

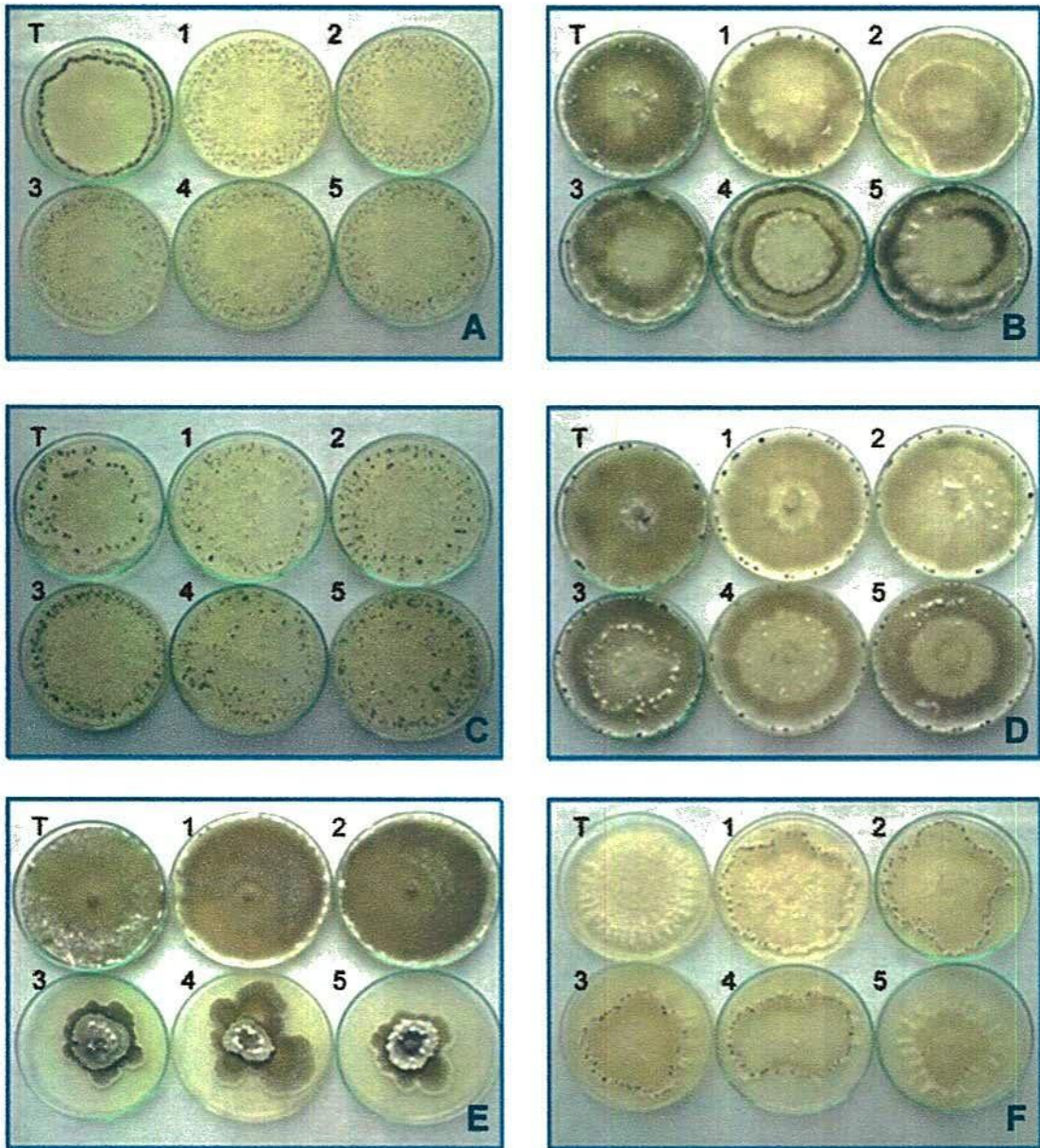


Figura 4. Efecto del ingrediente activo Kresoxim-metil en la morfología de las colonias de los 6 aislamientos de *Sclerotinia* sp. de la Sabana de Bogotá. (T = Testigo absoluto, 1 = 0,063 ppm, 2 = 0,083 ppm, 3 = 0,125 ppm, 4 = 0,188 ppm, 5 = 0,25 ppm). A. Aislamiento Sc001 (*S. minor*). B. Sc002 (*S.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

En este estudio Kresoxim-metil permitió el crecimiento de los aislamientos de *Sclerotinia* sp., pero produjo cambios morfológicos, lo que sugiere que este compuesto no tuvo un efecto fungicida a las dosis evaluadas. Es posible que los aislamientos de *Sclerotinia* sp. evaluados tengan algún nivel de tolerancia a este compuesto ya que los fungicidas QoI (inhibidores de la enzima respiratoria ubiquinona reductasa) son más propensos a generar este problema, debido a que esta molécula posee un único sitio de acción (Maché, 2005).

Di Rago *et al.* (1989) citado por Rusell, 2004, identificó molecularmente once posibles mutaciones puntuales para este mecanismo de acción, que pueden generar tolerancia. Probablemente, la disminución en la sensibilidad del fitopatógeno puede deberse a una modificación en el gen que codifica para el Citocromo b, en concreto una mutación en la posición 143, en la cual se sustituye el aminoácido Glicina por Alanina (G143A) confiriendo tolerancia al hongo (Gisi *et al.*, 2000 citado por Rusell, 2004; Heaney *et al.*, 2000 citado por Rusell, 2004; Sierotzki *et al.*, 2000a, b citado por Rusell, 2004).

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).

En la evaluación con Benomil, se observó una inhibición total y una restricción notable en el crecimiento de los aislamientos, así como también la inhibición en la producción de esclerocios. Con relación a las características del hongo, los aislamientos únicamente presentaron un cambio en la textura del micelio, pues en condiciones normales de crecimiento los aislamientos se caracterizaron por tener un micelio algodonoso, mientras que al adicionar el ingrediente activo la textura fue rugosa.

El aislamiento Sc007 fue completamente inhibido con todas las concentraciones de Benomil evaluadas, mientras que los aislamientos Sc002 y Sc008 fueron inhibidos desde las concentraciones de 250 ppm (dosis recomendada) y 166.66 ppm, respectivamente. Por otra parte, los aislamientos Sc001, Sc005 y Sc006 presentaron restricción en el desarrollo de la colonia durante la evaluación.

La molécula 1-(butilcarbamoilo) bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo denominada Benomil (De Liñán, 1997), es un ingrediente activo perteneciente al grupo químico de los Benzimidazoles el cual, inhibe la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio a bajas concentraciones (Leroux *et al.*, 2002; citado por Pérez, 2004), 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; Terralia, 2009).

La división celular es un proceso que depende del funcionamiento correcto de los filamentos del citoesqueleto. Este organelo está constituido por los microtúbulos, estructuras cilíndricas largas y huecas conformadas por dímeros repetidos de α y β -tubulina (Fungicide Resistance Committee, 2009) cuya función principal es la formación del huso cromático fundamental en la mitosis celular (Pérez, 2004).

El Carbendazim, producto de la conversión del Benomil dentro de la célula, es la molécula que interfiere en la organización de los microtúbulos inhibiendo la polimerización de la tubulina, la formación del huso cromático y la segregación de los cromosomas durante la mitosis celular (Pesticide Safety Directorate, 1992; De Liñán, 1997; Pérez, 2004; Carmona, 2006). En consecuencia, induce la desorganización de las finas estructuras de las hifas del hongo, específicamente en los corpúsculos de Spitzenkörper, encargados de la elongación de estas (Pesticide Safety Directorate, 1992).

Ferreira y Boyle (1992) determinaron que el Benomil controló satisfactoriamente las enfermedades causadas por *Sclerotinia* sp. en frijol, girasol y repollo, además de infecciones aéreas y basales en tomate, pero no se obtuvo ningún control en coliflor. De igual manera, De Liñán (1997) sugiere que esta molécula ofrece prevención y cura las enfermedades causadas por *Sclerotinia* spp. en diversas clases de hortalizas.

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).

Con el fungicida Boscalid (Cantus[®]) se observó una reducción parcial del crecimiento de los aislamientos Sc001, Sc002, Sc005, Sc007 y Sc008, mientras que el aislamiento Sc006 no evidenció un efecto en el desarrollo después de 8 días de incubación.

Con relación a la morfología de los hongos crecidos en presencia de Boscalid, estos conservaron las características observadas en los aislamientos crecidos en el medio sin adición de fungicida (testigo). Tanto la textura como el color del micelio se mantuvieron similares a las del testigo sin embargo, con respecto a la producción de esclerocios estos no se formaron en ninguno de los aislamientos. Se observó que un incremento en la dosis de Boscalid causó mayor restricción del crecimiento de todos los aislamientos de *Sclerotinia*.

Boscalid (2-cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamida) es una molécula que pertenece al grupo químico de las carboximidias, 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 la respiración de la mitocondria debido a la inhibición de la enzima succinato deshidrogenasa (Stammler y Speakman, 2006).

La enzima Succinato reductasa (Succinato ubiquinona reductasa) también conocida como complejo II de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial, es el sitio de acción donde la molécula Boscalid ejerce su actividad (Keon *et al.*, 1991 citado por Stammler *et al.*, 2007; Matsson y Hederstedt, 2001 citado por Stammler *et al.*, 2007).

Este complejo enzimático, compuesto por cuatro subunidades (desde la A a la D), forma parte fundamental del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos y en la cadena transportadora de electrones, pues cataliza las reacciones de oxidación del Succinato a Fumarato y de reducción de la Quinona (FRAC, 2007 citado por Zhang *et al.*, 2009). La acción de la molécula fungicida consiste en inhibir el complejo enzimático de la cadena respiratoria, con el fin de interferir en el transporte de electrones para la formación de ATP y la formación de los componentes de lípidos y aminoácidos del hongo (Anónimo, 2002 citado por Avenot *et al.*, 2008; Bartlett *et al.*, 2002 citado por Avenot *et al.*, 2008; BASF, 2006)

Varios autores han reportado algunos casos de resistencia por parte de varios fitopatógenos (Bochow *et al.*, 1971 citado por Stammler *et al.*, 2007; Ben-Yephet *et al.*, 1975 citado por Stammler *et al.*, 2007; Gunatilleke *et al.*, 1976 citado por Stammler *et al.*, 2007; Keon *et al.*, 1991 citado por Stammler *et al.*, 2007; Skinner *et al.*, 1998 citado por Stammler *et al.*, 2007), quienes encontraron algunas mutaciones que consisten en la sustitución de algunos aminoácidos en las regiones conservadas de las subunidades de la enzima Succinato deshidrogenasa. Sin embargo, Stammler *et al.*, 2007 expresaron que hasta ese momento no se había reportado ningún caso de resistencia por parte de *S. sclerotiorum*.

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 se encuentran registrados desde el año 1998, estos únicamente están recomendados para enfermedades en rosa y banano respectivamente y no para el control de *Sclerotinia* spp. en lechuga (ICA, 2008).

6.2.1. Efecto de los fungicidas sobre la velocidad de crecimiento de *Sclerotinia* sp.

Con los datos de crecimiento diametral se estimó la velocidad de crecimiento de los aislamientos de *Sclerotinia* obtenidos en la Sabana de Bogotá, al cultivarlos en medio PDA en presencia y ausencia de los fungicidas.

Para determinar la velocidad media del crecimiento de los aislamientos en las cinco concentraciones de los seis ingredientes activos evaluados, únicamente se tuvieron en cuenta los valores de crecimiento diametral registrados desde el día cero hasta el día cuatro de incubación, tiempo durante el cual la mayoría de los aislamientos se encontraban en la fase exponencial del crecimiento, después de dicho tiempo, la mayoría de los aislamientos mantuvieron estable el diámetro de la colonia debido a que éstas alcanzaron el diámetro total de la caja de Petri.

El diámetro promedio de la colonia medido en las tres repeticiones de los tratamientos Kresoxim-metil, Boscalid y Benomil en los diferentes tiempos de evaluación, fueron sometidos a un análisis de regresión lineal y se aceptaron aquellos tratamientos que presentaron un $R^2 \geq 0,75$. Posteriormente, se calcularon las pendientes de cada recta, correspondientes a la velocidad de crecimiento de cada hongo, valores que fueron sometidos a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%).

El aislamiento Sc001 presentó una velocidad de crecimiento de 20,72 mm/día cuando el hongo no se expuso a ningún fungicida (testigo), valor que fue estadísticamente superior ($P < 0,05$) a las velocidades obtenidas cuando el medio de cultivo se suplementó con los fungicidas, las cuales fueron de 18,82, 9,21 y 0,27 mm/día para Kresoxim-metil, Boscalid y Benomil respectivamente (Tabla 6).

El aislamiento Sc001 presentó una mayor velocidad de crecimiento cuando no estuvo en contacto con ningún fungicida, debido a que en este medio de cultivo se proporcionaron todas las condiciones nutricionales requeridas para la síntesis de sus constituyentes celulares y no se limitó el crecimiento con sustancias inhibitorias. Por el contrario, al adicionar las diferentes sustancias tóxicas al medio, la velocidad de crecimiento obtenida para el aislamiento fue significativamente menor, lo que podría indicar que el microorganismo requirió una fase de adaptación frente a las nuevas condiciones desfavorables del ambiente (Madigan *et al.*, 2004).

Tabla 6. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc001 expuesto a los 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	0,40	d
Iprodione	-	0,00	0,00	e
Procimidona	-	0,00	0,00	e
Tebuconazole	-	0,00	0,00	e

Aunque el Benomil ha sido aplicado desde hace varios años en los cultivos de lechuga de la Sabana de Bogotá, probablemente los esquemas de aplicación implementados por los agricultores en el mantenimiento de sus cultivos hayan sido bien empleados, ya que el aislamiento Sc001 mostró sensibilidad a ésta molécula, la cual redujo significativamente su velocidad de crecimiento, lo que sugiere que el fenómeno de tolerancia no se ha presentado. Sin embargo, este aislamiento fue menos sensible a los productos Kresoxim-metil y Boscalid, los cuales tienen un sitio de acción específico, que hace posible que los microorganismos desarrollen mutaciones puntuales, que a su vez puede generar un hongo

tolerancia a dichas moléculas (Rivera, 1999). Sin embargo, teniendo en cuenta que estos ingredientes activos no han sido utilizados por los agricultores de lechuga en la Sabana de Bogotá, es posible suponer que se necesita una dosis mayor a la evaluada en el presente estudio para reducir más eficientemente el crecimiento de los aislamientos de *Sclerotinia* utilizados.

El aislamiento Sc002 en ausencia de fungicidas también presentó la mayor velocidad media de crecimiento (24,02 mm/día) en comparación con los otros tratamientos evaluados. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el testigo y el tratamiento donde se utilizó el ingrediente activo Kresoxim-metil, en el cual el hongo creció a razón de 20,13 mm/día. Esto sugiere que dicha molécula no afectó el crecimiento diametral de la colonia, posiblemente debido a que este hongo desarrolló algún tipo de tolerancia al fungicida, que pertenece a los clasificados como QoI, los cuales tienen mayor predisposición a generar mutaciones al poseer un único sitio de acción (Maché, 2005).

Con los fungicidas Boscalid y Benomil, se obtuvieron velocidades significativamente menores ($P < 0,05$) con respecto a las obtenidas con el hongo sin fungicida, lo que sugiere que estos principios activos afectaron el crecimiento micelial, posiblemente debido a que interfieren procesos bioquímicos celulares como la respiración de la mitocondria y la división celular, los cuales son vitales en el desarrollo del microorganismo (De Liñán, 1997; Leroux *et al.*, 2002 citado por Pérez, 2004; BASF, 2006; Stammler y Speakman, 2006; Terralia, 2009)

Además, la velocidad de crecimiento del hongo en presencia de Benomil fue significativamente menor ($P < 0,05$) que la obtenida con los ingredientes Kresoxim-metil y Boscalid, lo que indica que el aislamiento Sc002 fue más sensible a dicha molécula. Este fungicida inhibe la mitosis celular e induce la desorganización de los corpúsculos de Spitzenkörper, lo que posiblemente inhibió la elongación de las hifas del hongo y por consiguiente el crecimiento de la colonia (Pesticide Safety Directorate, 1992; De Liñán, 1997; Carmona, 2006) (Tabla 7).

Tabla 7. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc002 expuesto a los diferentes fungicidas.

Tratamiento	Coefficiente de correlación (R ²)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)	Desviación estándar	Grupos homogéneos (Tukey 95%)
Testigo	0,93	24,02	0,39	a
Kresoxim-metil	0,95	20,13	3,68	a
Boscalid	0,96	6,07	0,52	b
Benomil	0,77	0,19	0,05	c
Iprodione	-	0,00	0,00	d
Procimidona	-	0,00	0,00	d
Tebuconazole	-	0,00	0,00	d

Con el aislamiento Sc005, se registraron velocidades de crecimiento superiores a 0 mm/día para los tratamientos con Kresoxim-metil, Boscalid, Benomil y el hongo sin fungicida (Tabla 8) las cuales fueron estadísticamente diferentes entre sí ($P < 0,05$).

Nuevamente, la velocidad del crecimiento del hongo en ausencia de fungicida fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la velocidad obtenida en presencia de los productos químicos, lo que indica que el crecimiento de este aislamiento fue afectado por todas las moléculas evaluadas. Sin embargo, este aislamiento fue más sensible al producto Benomil, moderadamente sensible a Boscalid y menos sensible a Kresoxim-metil. Este resultado sugiere que dicho aislamiento presenta diferente nivel de sensibilidad a estos productos, lo que podría estar relacionado con los diferentes mecanismos de acción de cada producto.

Tabla 8. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc005 expuesto a los diferentes fungicidas.

Tratamiento	Coefficiente de correlación (R ²)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)	Desviación estándar	Grupos homogéneos (Tukey 95%)
Testigo	0,96	19,75	1,73	a
Kresoxim-metil	0,92	15,85	1,48	b
Boscalid	0,94	4,19	1,31	c
Benomil	0,92	0,28	0,12	d
Iprodione	-	0,00	0,00	e
Procimidona	-	0,00	0,00	e
Tebuconazole	-	0,00	0,00	e

La velocidad de crecimiento del aislamiento Sc006 en ausencia de fungicidas (24,86 mm/día) fue significativamente mayor a la detectada en los tratamientos con Kresoxim-metil, Boscalid y Benomil. Sin embargo, la velocidad de crecimiento obtenida con Kresoxim-metil fue significativamente mayor que la obtenida con Boscalid y a su vez, ésta fue significativamente mayor que la obtenida con Benomil (Tabla 9). Posiblemente, la respuesta del hongo se deba a un efecto fungistático de los ingredientes activos Boscalid y Benomil, ya que estos permitieron el crecimiento del microorganismo pero a una menor velocidad en comparación con el testigo (Achicanoy, 1981 citado por Alfonso y Sandoval, 2008). Por el contrario, en presencia de Iprodione, Procimidona y Tebuconazole se produjo un efecto fungicida.

Tabla 9. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc006 expuesto a los diferentes fungicidas.

Tratamiento	Coefficiente de correlación (R²)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)	Desviación estándar	Grupos homogéneos (Tukey 95%)
Testigo	0,91	24,86	0,09	a
Kresoxim-metil	0,89	20,22	1,27	b
Boscalid	0,94	11,85	0,14	c
Benomil	0,82	0,31	0,11	d
Iprodione	-	0,00	0,00	e
Procimidona	-	0,00	0,00	e
Tebuconazole	-	0,00	0,00	e

El crecimiento de los aislamientos Sc007 y Sc008 en presencia de la molécula Benomil, fue totalmente inhibido en todas las concentraciones evaluadas para este ingrediente activo.

Con el aislamiento Sc007 se presentó la mayor velocidad de crecimiento cuando no se expuso a ningún fungicida (23,66 mm/día). Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas entre esta velocidad y la del tratamiento con el fungicida Kresoxim-metil, la cual a su vez no presentó diferencias significativas con respecto a la obtenida con Boscalid (Tabla 10).

Tabla 10. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc007 expuesto a los diferentes fungicidas.

Tratamiento	Coefficiente de correlación (R ²)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)	Desviación estándar	Grupos homogéneos (Tukey 95%)
Testigo	0,92	23,66	0,39	a
Kresoxim-metil	0,93	16,30	7,58	ab
Boscalid	0,92	11,07	0,90	b
Benomil	-	0,00	0,00	c
Iprodione	-	0,00	0,00	c
Procimidona	-	0,00	0,00	c
Tebuconazole	-	0,00	0,00	c

Para el aislamiento Sc008, no se detectaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre la velocidad de crecimiento del hongo cultivado sin fungicida y en presencia de Kresoxim-metil (Tabla 11), lo que sugiere que este microorganismo tuvo la capacidad de sobrevivir a la exposición a dicho compuesto tóxico en la concentración que normalmente sería letal para éste (Montesinos, 2005; Bermejo *et al.*, 2000).

Tabla 11. Velocidad media de crecimiento del aislamiento Sc008 expuesto a los diferentes fungicidas.

Tratamiento	Coefficiente de correlación (R ²)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)	Desviación estándar	Grupos homogéneos (Tukey 95%)
Testigo	0,97	10,61	1,45	a
Kresoxim-metil	0,93	11,95	0,86	a
Boscalid	0,86	2,78	0,74	b
Benomil	-	0,00	0,00	c
Iprodione	-	0,00	0,00	c
Procimidona	-	0,00	0,00	c
Tebuconazole	-	0,00	0,00	c

En general los aislamientos de *Sclerotinia* sp. obtenidos de cultivos de lechuga de la Sabana de Bogotá presentaron sensibilidad a las moléculas fungicidas Iprodione, Procimidona y Tebuconazole los cuales, por medio de sus mecanismos de acción inhibieron el crecimiento micelial de todos los hongos evaluados (Tabla 12).

Por otra parte se observó que únicamente tres de los aislamientos de *Sclerotinia* sp. evaluados (Sc002, Sc007 y Sc008) no presentaron sensibilidad al Kresoxim-metil, ya que no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las velocidades de crecimiento de estos hongos en presencia del fungicida y en ausencia del mismo. Los aislamientos Sc001, Sc005 y Sc006 fueron moderadamente sensibles al Kresoxim-metil, pues sus velocidades de crecimiento fueron significativamente menores a las obtenidas en el desarrollo de los microorganismos sin fungicida. De igual manera, con el Boscalid se obtuvo una sensibilidad moderada por parte de todos los aislamientos a esta molécula, debido a que el desarrollo de la colonia de los hongos se limitó notablemente en presencia del ingrediente activo (Tabla 12).

Finalmente, Benomil produjo un efecto altamente nocivo en cuatro de los aislamientos de *Sclerotinia* sp. (Sc001, Sc002, Sc005 y Sc006), sugiriendo que este ingrediente activo tuvo un efecto fungistático en estos hongos. Sin embargo, los aislamientos Sc007 y Sc008 fueron sensibles a dicha molécula, lo que podría estar relacionado con un efecto fungicida para los microorganismos (Tabla 12).

Tabla 12. Sensibilidad *in vitro* de los aislamientos de *Sclerotinia* sp. a la dosis recomendada de fungicidas.

Tratamiento	Sc001	Sc002	Sc005	Sc006	Sc007	Sc008
Kresoxim-metil	2	1	2	2	1	1
Boscalid	2	2	2	2	2	2
Benomil	3	3	3	3	4	4
Iprodione	4	4	4	4	4	4
Procimidona	4	4	4	4	4	4
Tebuconazole	4	4	4	4	4	4

1 = No sensible. 2 = Moderadamente sensible. 3 = Altamente sensible. 4 = Sensible

6.2.2. Inhibición del crecimiento micelial de *Sclerotinia* sp. por los ingredientes activos

Para los aislamientos Sc001, Sc002 y Sc005 expuestos a los productos Benomil, Iprodione, Procimidona y Tebuconazole los porcentajes de inhibición obtenidos no fueron significativamente diferentes entre sí, valores que en todos los casos fueron superiores al 96,40% para todas las concentraciones de dichos tratamientos (Figura 5). Este resultado indica que dichos aislamientos fueron muy sensibles a estos principios activos, los cuales ejercieron eficientemente su modo de acción inhibiendo el crecimiento, posiblemente mediante la intervención de procesos metabólicos importantes para el desarrollo del hongo, como el bloqueo de la división celular, la peroxidación de los lípidos de membrana y la inhibición de la síntesis de ergosterol en la célula (Choi *et al.*, 1996 citado por Beltrán *et al.*, 2006; De Liñán, 1997; Lee *et al.*, 1998 citado por Beltrán *et al.*, 2006; Terralia, 2009).

Los porcentajes de inhibición micelial obtenidos con Boscalid para los aislamientos Sc001, Sc002 y Sc005, fueron significativamente menores ($P < 0,05$) que los obtenidos con los fungicidas Benomil, Iprodione, Procimidona y Tebuconazole, indicando una menor sensibilidad de los aislamientos a estas moléculas (Figura 5). Además, se observó que al incrementar la dosis de este ingrediente activo, la inhibición del crecimiento fue mayor, sugiriendo una relación directa entre la dosis y la inhibición del crecimiento de los aislamientos Sc001 y Sc002. Aunque al incrementar las dosis de Boscalid el crecimiento de los microorganismos se inhibió notablemente, todas las concentraciones evaluadas permitieron el desarrollo de los hongos, lo que sugiere que estos aislamientos presentaron una sensibilidad moderada a este ingrediente activo, lo que podría estar relacionado con el posible desarrollo de tolerancia (Muiño *et al.*, 2002). Por el contrario con el aislamiento Sc005, no se observó una relación entre la dosis y la respuesta, ya que no se detectaron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición obtenidos para todas las concentraciones de Boscalid.

Por otra parte, el ingrediente Kresoxim-metil no inhibió el crecimiento de los aislamientos Sc001, Sc002 y Sc005 en ninguna de las concentraciones evaluadas, los cuales presentaron los menores porcentajes de inhibición del crecimiento (0%), valores que fueron estadísticamente inferiores con respecto a los obtenidos con los otros fungicidas evaluados (Figura 5). Este resultado sugiere que dichos aislamientos no fueron sensibles a ninguna de las dosis evaluadas de esta molécula, lo que podría estar relacionado con la aparición de mecanismos de resistencia como la disminución de la permeabilidad de la membrana celular

a la molécula inhibitoria, a la modificación química del producto o al desarrollo de mutaciones (Montesinos, 2005; Brent y Hollomon, 2007).

Las moléculas Iprodione, Procimidona y Tebuconazole inhibieron totalmente el crecimiento de los aislamientos Sc006 y Sc008 en todas las concentraciones y los porcentajes de inhibición micelial de estos tratamientos no fueron diferentes significativamente entre sí (Figura 6). Nuevamente, estas moléculas inhibieron en su totalidad el crecimiento del hongo, lo que sugiere que las dosis evaluadas fueron altamente tóxicas para los aislamientos, al actuar específicamente sobre algunos de los sitios blanco más importantes para inhibir el crecimiento de un hongo, como la división celular y la estructuración de la membrana citoplasmática (Choi *et al.*, 1996 citado por Beltrán *et al.*, 2006; De Liñán, 1997; Lee *et al.*, 1998 citado por Beltrán *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2004; Terralia, 2009).

Los porcentajes de inhibición del crecimiento con el fungicida Benomil fueron significativamente menores que los obtenidos con Iprodione, Procimidona y Tebuconazole, y mayores que los presentados con Boscalid y Kresoxim-metil (Figura 6). Además los porcentajes de inhibición obtenidos con las tres dosis más altas (para el aislamiento Sc006) y con las cuatro dosis más altas (para el aislamiento Sc008) fueron significativamente mayores que las obtenidas con las dosis más bajas de Benomil, lo que sugiere que hay una relación entre la dosis y la respuesta.

Por otro lado los fungicidas Boscalid y Kresoxim-metil no inhibieron el crecimiento de los microorganismos (inhibición del crecimiento 0%) (Figura 6). Este comportamiento indica que los aislamientos Sc006 y Sc008 no presentaron sensibilidad a estos dos ingredientes activos a las dosis evaluadas. La baja sensibilidad podría sugerir el desarrollo de tolerancia que ha sido descrita para hongos con alta variabilidad genética, los cuales son capaces de alterar el sitio de acción, evitando la interacción de éste con la molécula fungicida (Bermejo *et al.*, 2000; Brent y Hollomon, 2007). Dichas alteraciones podrían estar relacionadas con la sustitución de algunos aminoácidos en las regiones conservadas de la enzima Succinato ubiquinona deshidrogenasa, en el caso del Boscalid (Bochow *et al.*, 1971 citado por Stammler *et al.*, 2007; Ben-Yephet *et al.*, 1975 citado por Stammler *et al.*, 2007; Gunatilleke *et al.*, 1976 citado por Stammler *et al.*, 2007; Keon *et al.*, 1991 citado por Stammler *et al.*, 2007; Skinner *et al.*, 1998 citado por Stammler *et al.*, 2007) y de la sustitución de un aminoácido en el gen que codifica para la proteína Citocromo b, en el caso de Kresoxim-metil (Di Rago *et al.*, 1989 citado por Rusell, 2004; Sierotzki *et al.*, 2000a, b citado por Rusell, 2004; Heaney *et al.*, 2000 citado por Rusell, 2004; Gisi *et al.*, 2000 citado por Rusell, 2004).

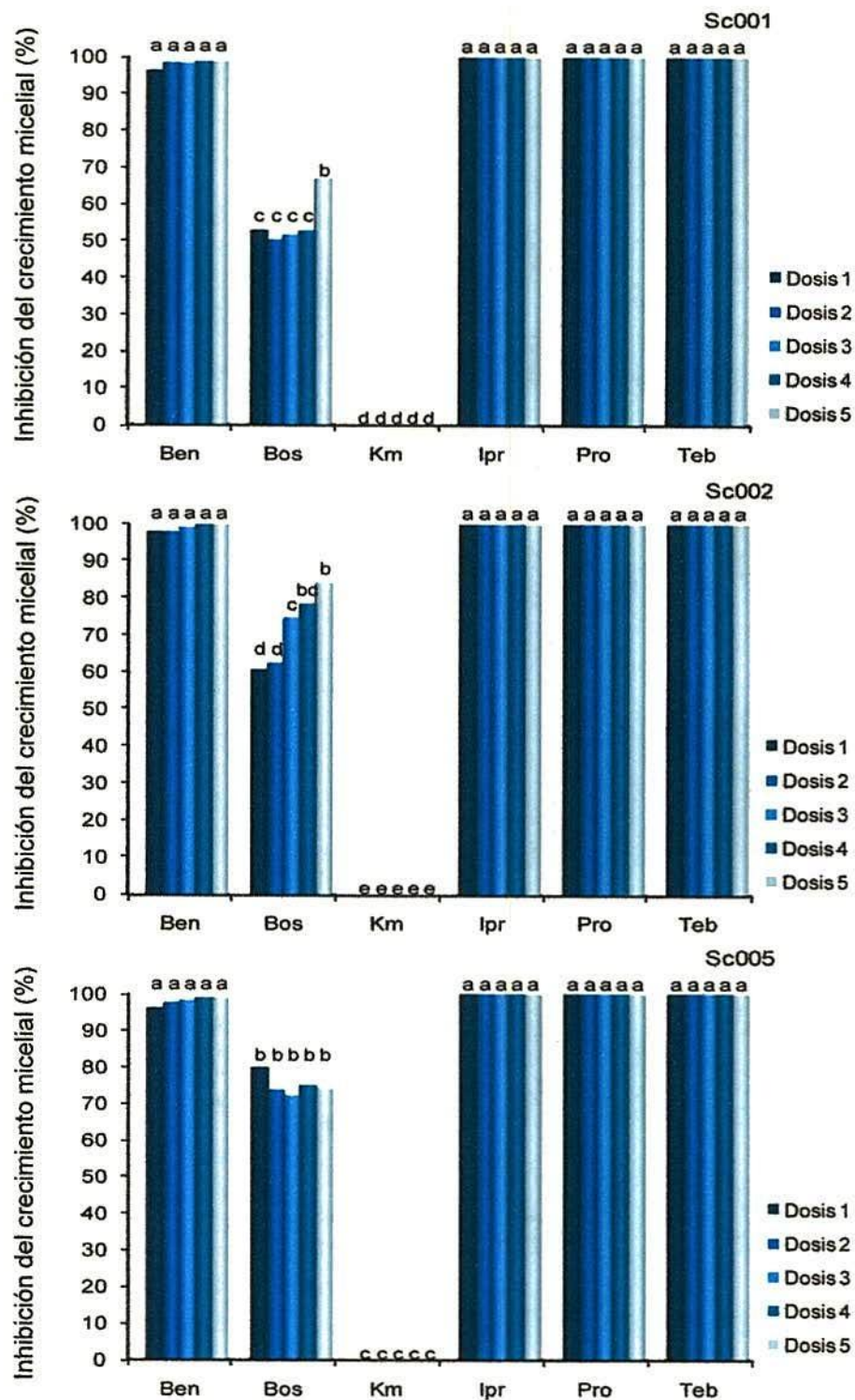


Figura 5. Inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos Sc001, Sc002 y Sc005 expuestos a diferentes dosis fungicidas. **Ben** (Benomil). **Bos** (Boscalid). **Km** (Kresoxim-metil). **lpr** (Iprodione). **Pro** (Procimidona). **Teb** (Tebuconazole). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas según la prueba de Tukey (95%).

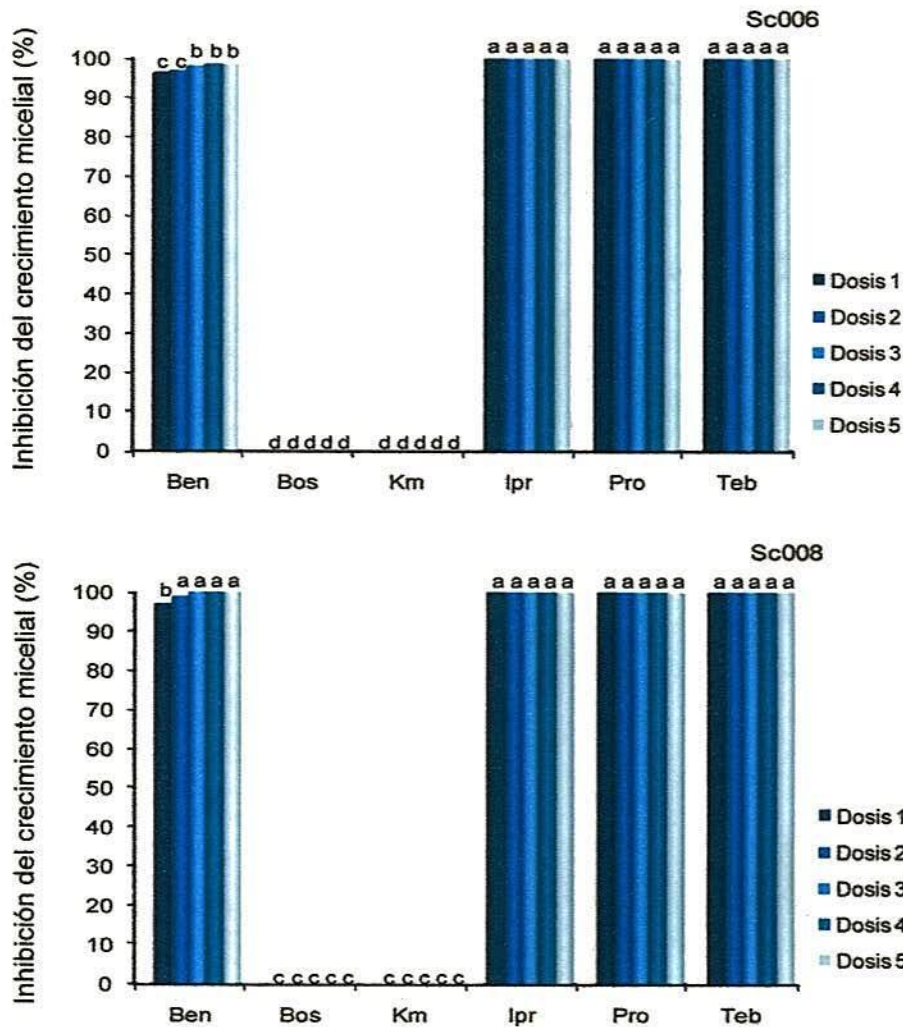


Figura 6. Inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos Sc006 y Sc008 expuestos a diferentes dosis fungicidas. **Ben** (Benomil). **Bos** (Boscalid). **Km** (Kresoxim-metil). **Ipr** (Iprodione). **Pro** (Procimidona). **Teb** (Tebuconazole). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas según Prueba de Tukey (95%).

Los fungicidas Benomil, Iprodione, Procimidona y Tebuconazole presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento (100%) del aislamiento Sc007 los cuales, no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 7). Para este aislamiento, todas las concentraciones evaluadas de estos ingredientes activos fueron altamente tóxicas, lo que significa que el microorganismo es muy sensible a estos fungicidas y posiblemente no ha desarrollado mecanismos para superar su acción, como la degradación metabólica de las moléculas, su eliminación o la alteración del sitio bioquímico de acción (Brent y Hollomon, 2007).

Con las dos concentraciones más bajas del fungicida Kresoxim-metil no se observó inhibición del crecimiento del aislamiento Sc007, pero al aumentar la concentración del principio activo, el microorganismo presentó porcentajes de inhibición significativamente mayores que los obtenidos con las concentraciones bajas, evidenciando una relación directa entre la dosis y la inhibición. Los porcentajes de inhibición obtenidos con todas las concentraciones de Boscalid no fueron estadísticamente diferentes de los obtenidos con las dosis más altas del Kresoxim-metil (Figura 7). Para Boscalid, no se detectaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre los porcentajes de inhibición con las diferentes dosis evaluadas, es decir que se obtuvo la misma inhibición al incrementar la dosis. Este aislamiento (Sc007) mostró una moderada sensibilidad a los ingredientes activos Boscalid y Kresoxim-metil, con porcentajes de inhibición que oscilaron entre 15,39% y 24,40% para Boscalid y entre 14,71% y 18,06% para las dosis más altas de Kresoxim-metil.

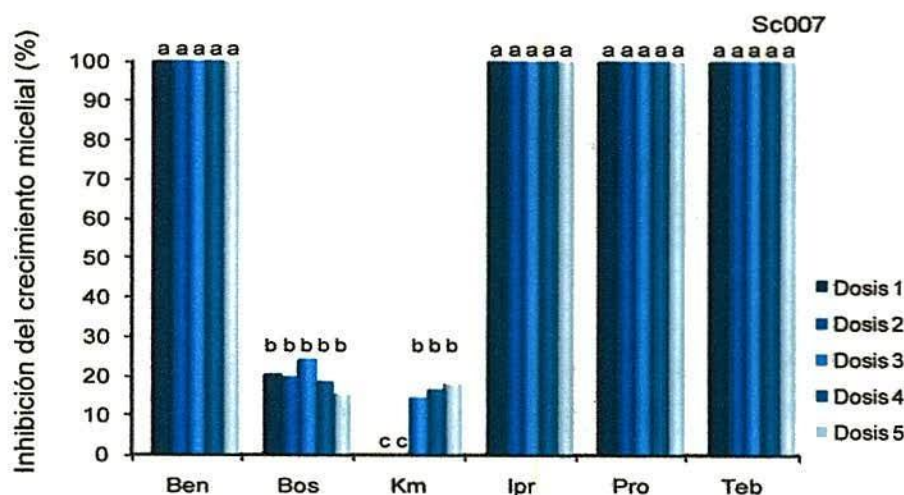


Figura 7. Inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos Sc007 expuestos a diferentes dosis fungicidas. Ben (Benomil). Bos (Boscalid). Km (Kresoxim-metil). Ipr (Iprodione). Pro (Procimidona). Teb (Tebuconazole). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas según Prueba de Tukey (95%).

6.2.3. Concentración efectiva media (CE_{50}) de los fungicidas sobre *Sclerotinia* sp.

Con el fin de determinar la concentración de los fungicidas necesaria para inhibir el 50% del crecimiento del micelio, de los aislamientos de *Sclerotinia* que mostraron tolerancia al efecto de los fungicidas bajo condiciones *in vitro*, se realizó un análisis Probit con el programa Biostat 2007®.

El programa estadístico no determinó una correlación lineal entre la dosis y la respuesta para todos los aislamientos con los fungicidas Benomil, Kresoxim-metil, Iprodione, Procimidona y Tebuconazole, además de los aislamientos SC006 y Sc008 con el fungicida Boscalid, lo cual puede deberse a que no hubo una relación entre las dosis evaluadas y la inhibición del crecimiento micelial.

Por el contrario, con los aislamientos restantes, Sc001, Sc002, Sc005 y Sc007, en presencia del fungicida Boscalid, se obtuvieron porcentajes de crecimiento micelial que permitieron realizar el análisis de regresión lineal y mediante éste se determinaron las CE_{50} que se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentración efectiva 50 (CE_{50}) del fungicida Boscalid sobre los aislamientos de *Sclerotinia* sp.

Aislamiento	CE_{50} (ppm)	P
Sc001	303,25	0,58
Sc002	194,19	0,98
Sc005	21.662.501,82	0,96
Sc007	0,26	0,66

Los valores de CE_{50} obtenidos no permitieron determinar un punto de referencia sobre el nivel de tolerancia de los aislamientos bajo condiciones controladas en laboratorio. Rusell (2004) describió que para la construcción del perfil de sensibilidad, se requiere evaluar un número mayor de muestras (aislamientos) de un mismo sitio, que permita establecer la variabilidad entre ellas.

7. Conclusiones

- Los fungicidas Iprodione y Procimidona, utilizados comúnmente por los productores de lechuga en la Sabana de Occidente y el Tebuconazole que no se ha utilizado en los cultivos de lechuga, inhibieron el crecimiento *in vitro* de todos los aislamientos de *S. minor* y *S. sclerotiorum* utilizados.
- Aunque el Benomil no inhibió totalmente el crecimiento de los aislamientos, estos presentaron alta sensibilidad a dicho fungicida, utilizado con alta frecuencia en los cultivos de la Sabana de Occidente.
- Los aislamientos de *S. minor* y *S. sclerotiorum* fueron tolerantes a las concentraciones evaluadas de los fungicidas Kresoxim-metil y Boscalid, poco utilizados en la producción de lechuga en los municipios de Funza, Madrid y Mosquera, Cundinamarca.

8. Recomendaciones

- Evaluar la sensibilidad de los aislamientos de *Sclerotinia* sp. utilizados en este trabajo frente a un rango más amplio de concentraciones de fungicidas para estimar la CE₅₀.
- Hacer seguimiento durante un tiempo prolongado de la tolerancia de aquellos aislamientos con baja sensibilidad con el fin de determinar si existe resistencia a los fungicidas.
- Establecer un plan de alerta fitosanitaria para determinar el riesgo de desarrollo de resistencia de los fitopatógenos a los fungicidas.

9. Referencias bibliográficas

- Abawi, G. S. y Grogan, G. 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 899-904.
- Abawi, G. S., Grogan, G. y Duniway, J. M. 1985. Effect of water potential on survival of sclerotia of *Sclerotinia minor* in two California soils. *Phytopathology* 75: 217-221.
- Abawi, G. S., Robinson, R. W., Cobb, A. C. y Sali, J. W. 1980. Reaction of lettuce germplasm to artificial inoculation with *Sclerotinia minor* under greenhouse conditions. *Plant Dis* 64: 668-671.
- Adams, P. B. 1975. Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Plant Dis. Rep* 59: 599-603.
- Adams, P. B. 1989. Comparison of antagonists of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 79:1345-1347.
- Adams, P. B. y Ayers, W. A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 896-899.
- Adams, P. B. y Fravel, D. R. 1990. Economical biological control of *Sclerotinia* lettuce drop by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology* 80: 1120-1124.
- Adams, P. B. y Tate, C. J. 1975. Factors affecting lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis. Rep* 59: 140-143.
- Adams, P. B. y Tate, C. J. 1976. Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. *Plant Dis. Rep.* 60: 515-518.
- Agrios, G. 1991. Fitopatología. Primera edición. Editorial Limusa. Ciudad de México. México. 336-389.
- Agrocadenas (Montevideo). *Agrocadenas* [en línea]: Inteligencia de mercados. [Uruguay]: Exploración de mercados. <www.montevideo.gub.uy/mvd_rural/hortaliza.pdf>, [Consulta: 15 feb. 2009]

Agro-Care Chemical Industry Group Limited (Changyi Road). *Agrochemical* [en línea]: Fungicidas. [China]: Kresoxim-metil. <<http://www.agrocare.com.cn/Products/Kresoxim-methyl.htm>>, [Consulta: 27 feb. 2009]

Alfonso, D. P. y Sandoval, E. R. 2008. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 113.

Arbeláez, G. y Borda, F. 1993. Determinación del antagonista del aislamiento T95 de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* en plantas de pepino cohombro. *Fisiopatología colombiana* 11: 45-51.

Avenot, H., Morgan, D. P. y Michailides, T. J. 2008. Resistance to pyraclostrobin, Boscalid and multiple resistance to Pristine® (pyraclostrobin + boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. *Plant Path* 57: 135-140.

Ávila de Moreno, C. 1991a. Control biológico de *S. sclerotiorum* en lechuga I. Determinación del método, dosis y época de aplicación de *T. harzianum*. *Revista ICA* 26: 35-42.

Ávila de Moreno, C. 1991b. Control biológico de *S. sclerotiorum* en lechuga II. Determinación del método, dosis y época de aplicación de *T. harzianum*. *Revista ICA* 26: 43-51.

Ávila de Moreno C. y Buriticá, C. 1985. *Sclerotinia* spp. en malezas de clima frío. Bogotá. Colombia. *ASCOLFI INFORMA* 11: 22-23.

Ávila de Moreno, C. y Velandia, J. 1992. Enfermedades de algunas especies hortícolas y su manejo. 101-103. En: Primer curso nacional de hortalizas de clima frío (Conferencias). ICA. Bogotá. Colombia. 18.

BASF. 2006. Cantus: Eficaz acción Bottriticida. *Boletín Técnico Zeppelin*. 11:2.

Bayer CropScience S. A. (Santiago de Chile). *Bayer CS* [en línea]: Rovral Flo [Chile]: Folleto Rovral Flo. <<http://www.bayercropscience.cl/soluciones/fichaproducto.asp?id=89>>, [Consulta: 04 mar. 2009]

Bell, A. A., Liu, L., Reidy, B., Davis, R. M. y Subbarao, K. V. 1998. Mechanisms of subsurface drip irrigation-mediated suppression of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology* 88: 252-259.

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(1): 50-58.

Ben-Yephet, Y., Bitton, S. y Greenberger, A. 1986. Control of lettuce drop disease, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, with metham-sodium soil treatment foliar application of benomyl. *Plant Pathol* 35: 146-151.

Ben-Yephet, Y., Genizi, A. y Siti, E. 1993. Sclerotial survival y apothecial production by *Sclerotinia sclerotiorum* following outbreaks of lettuce drop. *Phytopathology* 83: 509-513.

Bermejo, P., Guerra, J. A. y Martínez, F. 2000. Gestión de riesgo de resistencia de patógenos a los fungicidas. 12. En: Pascualena, J. y Ritter, E. (Ed) 2000. Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata. Vitoria-Gasteís, España. 493-503.

Beute, M. K., Porter, D. M. y Hadley, B. A. 1975. *Sclerotinia* blight of peanut in North Carolina y Virginia y its chemical control. *Plant Dis Rep* 59: 697-701.

Boland, G. y Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can J Plant Pathol* 16:93-108.

Bolton, M. D., Thomma, B. y Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: biology y molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol* 7: 1-16.

Bowen, C., Melouk, H. A., Jackson, K. E. y Payton, M. E. 2000. Effect of a select group of seed protectant fungicides on growth of *Sclerotinia minor in vitro* and its recovery from infested peanut seed. *Plant Dis* 84: 1217-1220.

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 Dis* 90: 1129-1134.

Braicovich, B. 2004. Solarización. Estación Experimental Agropecuaria Bordenave. Buenos Aires. Argentina. 80 p.

Brenneman, T. B., Phipps, P. M. y Stipes, R. J. 1987. *In vivo* dicarboximide resistance in *Sclerotinia minor* from peanut. *Phytopathology* 77: 639.

Brent, K. J. y Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens. Second edition. Ed Fungicide Resistance Action Committee. Bruselas. Bélgica. 60 p.

Budge, S. P. y Whipps, J. M. 1991. Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathol* 40: 59-66.

Burnside, O. C., Wiens, M. J., Krause, N. H., Weisberg, S., Ristau, E. A., Johnson, M. M. y Sheets, R. A. 1998. Mechanical y chemical weed control systems for kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Weed technology* 12: 174-178.

CABI/EPPO (United Kingdom). Crop Protection Compendium [en línea]: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. [Wallingford]: CABI/EPPO <<http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>>, [Consulta: 25 ene. 2009]

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]

Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B. y Low, P.S. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant cell*. 87.

Chávez, M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Chen, Ch., Harel, A., Gorovits, R., Yarden. y Dickman, M. 2004. MAPK Regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH y cAMP sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(4): 404-413.

Chet, I. 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonist in combination with soil treatments. Wallingford CAB international. 12.

Chet, I. y Henis, Y. 1975. Sclerotial morphogenesis in fungi. *Annu Rev Phytopathol* 13: 169-192.

Comunidad Andina (Bogotá). *Secretaría general* [en línea]: Normatividad andina. [Colombia]: Decisiones. <<http://www.comunidadandina.org/normativa/dec/d436.htm>>, [Consulta: 15 abr. 2009]

Cotes, A. M., Moreno, C. A., Molano, L. F., Villamizar, L. F., Piedrahita, W. 2007. Prospects for integral management of *S. sclerotiorum* in lettuce. *IOBC/wprs Bulletin* 30(6): 391-394.

Coyne, D. P., Steadman, J. R. y Anderson, F. N. 1974. Effect of modified plant architecture of Great Northern dry bean varieties (*Phaseolus vulgaris*) on white mold severity and components of yield. *Plant Dis Rep* 58: 379-382.

Chupp, C. y Sherf, F. A. 1960. Vegetable diseases and their control. The Ronal press company. New York. United States. 693 p.

Damicone, J. 2000. Fungicide Resistance Management. Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Science and Natural Resources. OSU Extension. Oklahoma, USA. Facts 7663: 8.

Davet, P. y Martin, C. 1993. Resistance of *S. minor* isolates to cyclic imides in lettuce field soils of Rousillon, France. *J Phytopathol* 138: 331-342.

Davis, R., Subbarao, K., Raid, R., y Kurtz, E. 2002. Plagas y enfermedades de la lechuga. Primera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. pp 1-100.

De la Isla, M. 1991. Fitopatología. Editorial Limusa. Ciudad de México. México. pp 323-326.

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. LITOFINTER, S.A. 110-999.

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 Hortícola de la Sabana de Bogotá. p 28.

Detweiler, A. R., Vargas, J. M. y Danneberger, T. K. 1983. Reliable Resistance of *Sclerotinia homeocarpa* to Iprodione and Benomyl. Plant Dis 67: 627-630.

Dillard, H. R. 1987. Sclerotinia rot cabbage, in vegetable crops. Cornell Cooperative Extensión 730.

Dillard, H. R. y Grogan, R. G. 1985. Relationship between sclerotial spatial pattern and density of *Sclerotinia minor* and the incidence of lettuce drop. Phytopathology 75: 90-94.

Dillard, H. R., Cobb, A. C., Amsel, N. A., Spratley, T. M. y Witt, E. P. 2003. Evaluation of foliar sprays for control of white and gray mold in snap beans. In: Geneva, N. Y. 2002. Fungic Nematocide Tests. 58:(13) 4.

Dow, R. L., Porter, D. M. y Powell, N. L. 1988. Effect of environmental factors on *Sclerotinia minor* and Sclerotinia blight of peanut. Phytopathology 78: 672-676.

Economic Research Service (Estados Unidos). ERS [en línea]: Commodity Spotlight: United States Department of Agriculture. [California]: Economic Research Service. <<http://www.ers.usda.gov/publications/AgOutlook/April2001/AO280d.pdf>>, [Consulta: 11 feb. 2009].

Environmental Protection Agency (Washington, D.C). EPA [en línea]: Iprodione RED Facts. [Estados Unidos]: November 1998 EPA-738-F-98-017. < <http://www.epa.gov/>>, [Consulta: 04 mar. 2009]

Environmental Protection Agency (Washington, D.C). 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, D.C). *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/opprd001/factsheets/boscalid.pdf>>, [Consulta: 12 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/manualtomate.pdf>>, [Consulta: 13 may. 2009].

Finney, D. J. 1971. Probit analysis. (3rd ed.). New York: Cambridge University Press. 333 p.

Ferreira, S. A. y Boley, R. A. 1992. *Sclerotinia sclerotiorum*. Crop Knowledge Master Department of Plant Pathology, CTAHR. University of Hawaii at Manoa. 5.

Galea, V. J. y Price, T. V. 1988. Survival of the lettuce antrachnosis fungus (*Michodochium panattonianum*) in Victoria. *Plant Pathology* 37: 54-63.

Georgopoulos, S. G. 1982. Genetical and biochemical background of fungicide resistance. 46-52. En: Dekker, J. and Georgopoulos, S. G (eds). 1982. Fungicide Resistance in Crop Protection. Wageningen, Netherlands: Centre for Agricultural Publishing and Documentation.

Global Biodiversity Information Facility (Denmark). *GBIF* [en línea]: Catalogue of Life: 2007 Annual Checklist: The Integrated Taxonomic Information System. [Copenhague]: Global Biodiversity Information Facility. <<http://data.gbif.org/species/14376265/>>, [Consulta: 13 ene. 2009]

Global Biodiversity Information Facility (Denmark). *GBIF* [en línea]: Catalogue of Life: 2007 Annual Checklist: The Integrated Taxonomic Information System. [Copenhague]: Global

Biodiversity Information Facility. <<http://data.gbif.org/species/14378354/>>, [Consulta: 13 ene. 2009]

Godoy, G., Steadman, J., Dickman, M. B. y Dam, R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Mol Plant Pathol* 37: 179-192.

González, A. 2005. Ensayos de efectividad de fungicidas *in vitro* frente a hongos de suelo. Utilidad para el conocimiento de las resistencias y el establecimiento de una pauta terapéutica adecuada. *Phytoma* 173: 15-19.

Grogan, R. G., Sall, M. A. y Punja, Z. K. 1980. Concepts for modeling root infection by soilborne fungi. *Phytopathology* 70: 361-363.

Grube, R. y Ryder, E. 2004. Identification of lettuce (*Lactuca sativa* L.) germplasm with genetic resistance to drop caused by *Sclerotinia minor*. *J American Society Hort Sci* 129(1): 70-76.

Guzmán, M. 2003. Resistencia a fungicidas en *Mycosphaerella fijiensis*: situación actual y perspectivas para el manejo de la Sigatoka negra. *Corporación Bananera Nacional* 33-34.

Hanson, B. K. y Lamey, H. A. 2001. Evaluation of foliar fungicides on canola for control of *Sclerotinia* stem rot. *Fungic Nematocide Test* 56: FC1.

Hartman, G. L., Sinclair, J. B. y Rupe, J. C. 1999. *Compendium of Soybean Diseases*. Fourth edition. Ed. American Phytopathological Society. Minnesota. Estados Unidos. 200 p.

Hao, J. J. y Subbarao, K. V. 2005. Comparative analyses of lettuce drop epidemics caused by *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Plant Dis* 89: 717-725.

Hao, J. J. y Subbarao, K. V. 2006. Dynamics of lettuce drop incidence and *Sclerotinia minor* inoculum under varied crop rotations. *Plant Dis* 90: 269-278.

Hao, J. J., Subbarao, K. V. y Duniway, J. M. 2003. Germination of *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. *Phytopathology* 90: 443-450.

Hawthorne, B. T. 1975. Observations on the development of apothecia of *Sclerotinia minor* Jagg. in the field. N. Z. J. Agric. Res. 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.

Huang, H. C. 1980. Control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by hyperparasites. Can J Plant Pathol 2: 26-32.

Huang, H. C. 1991. Control of soilborne pathogens by mycoparasites: prospects and constraints. En: Komada, H., Kiritani, K. y Bay-Peterson, J. (eds). 1991. The biological Control of Plant Diseases. FFTC (Food y Fertilizer Technology Center for the Asian y Pacific Region) Book Series 42. Taipei. Taiwan. pp 130-141.

Huang, H. C. y Kokko, E. G. 1993. *Trichothecium roseum*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J Bot 71: 1631-1638.

Huang, H. C. y Erickson, R. 2008. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. Phytopathology 156: 628-634.

Hubbard, J. C., Subbarao, K. V. y Koike, S. T. 1997. Development and significance of dicarboximide resistance in *Sclerotinia minor* isolates from commercial lettuce fields in California. Plant Disease 81:148-153.

Imolehin, E. D. y Grogan, R. G. 1980. Effect of oxygen, carbon dioxide, and ethylene on growth, sclerotial production, germination, and infection by *Sclerotinia minor*. Phytopathology 70: 1158-1161.

Imolehin, E. D., Grogan, R. G. y Duniway, J. M. 1980. Factors affecting survival of sclerotia, and effects of inoculum density, relative position, and distance of sclerotia from the host on infection of lettuce by *Sclerotinia minor*. Phytopathology 70: 1161-1167.

International Programme on Chemical Safety (Quebec). *IPCS* [en línea]: Chemical safety information from intergovernmental organizations. [Canadá]: Kresoxim-metil. <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr10.htm>>, [Consulta: 27 feb. 2009]

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-faebd50f758e/Registro_venta_PQUA_Julio152008.aspx>, [Consulta: 12 feb. 2009]

Jarvis, W. R. y Hawthorne, B. T. 1972. *Sclerotinia minor* on lettuce: progress of an epidemic. *Ann Appl Biol.* 70: 207-214.

Katan, J. 1981. Solar heating of soil for control of soilborne pests. *Annual reviews* 119: 211-236.

Kohn, L. 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 881-886.

Kull, L. S., Pedersen, W. L., Palmquist, D. y Hartamn, G. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis* 88: 325-332.

Laemmlen, F. 2002 (Estados Unidos). UC Davis [en línea]: *Sclerotinia* diseases [California]: *Sclerotinia* diseases: Symptoms, signs y management. <www.cesantabarbara.ucdavis.edu/ipm2.htm>, [Consulta: 01 feb. 2009]

Lumsden, R. D. 1979. Histology y physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69:890-896.

Maché, R. 2005. (Madrid). *Jhon Deere* [en línea]: Contrarrestar la resistencia a los fungicidas [España]:http://www.deere.com/es_ES/images/library/publications/furrow/2005/2005_p1.pdf> [Consulta: 18 may. 2009].

Madigan, M., Martinko, J., Parker, B. 2004. Brock, *Biology of Microorganisms*. Tenth edition. Ed Pearson – Prentice Hall. Illinois. United States. 1089.

Marciano, P., Di Lenna, P. y Magro, P. 1983. Oxalic acid, cell wall degrading enzymes and pH in pathogenesis y their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol. Plant Pathol* 22: 339-345.

- Marcum, D. B., Grogan, R. G. y Greathead, A. S. 1977. Fungicide control of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* 'minor'. Plant Dis Rep 61: 555-559.
- Martin, C., Pierre, D., Vega, D. y Cote, C. 1991. Field effectiveness and biodegradation of cyclic imides in lettuce field soils. Pestic Sci 32:427-438.
- Martínez, Z. 2008. Algunos aspectos epidemiológicos del moho blanco de la lechuga (*Lactuca sativa*) en dos municipios productores de Cundinamarca. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Matheron, M. E. y Porchas, M. 2004. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. Plant Dis 88: 665-668.
- McLaren, D. L., Huang, H. C. Rimmer, S. R. 1994. Control of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minutans* and *Talaromyces flavus*. Plant Dis 80: 1373-1378.
- Melo, V. y Cuamatzi, O. 2007. Bioquímica de los procesos metabólicos. Editorial Reverté. Xochimilco, México. pp 124-125.
- Melzer, M. S. y Boland, G. J. 1994. Epidemiology of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. Can J Plant Pathol 16: 170-176.
- Melzer, M. S., Smith, E. A. y Boland, G. J. 1997. Index of plants hosts of *Sclerotinia minor*. Can J Plant Pathol 19: 272-280.
- Messiaen, C. M. y Lafon, R. 1968. *Sclerotinia* and *Botrytis*. En: Enfermedades de las hortalizas. Editorial Oikos-tau S.A. Barcelona. España. 29-32.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2006. Acuerdo de competitividad para el sector hortícola. Bogotá. Colombia.
- Mondino, P. 2001. Manejo de la resistencia a fungicidas. Cursos de Protección Vegetal Hortícola y Protección Vegetal Frutícola, Universidad de la República de Uruguay 12.

Montesinos, E. 2005. La resistencia a fungicidas y bactericidas. Factores de riesgo asociados al mecanismo de acción y al potencial evolutivo del patógeno. *Phytoma* 173: 10-15.

Moreno, C. A., Martínez, A., Smith, A., Díaz, N. y Cotes, A. 2009. Estado de la enfermedad moho blanco de la lechuga en tres municipios de Cundinamarca. *Memorias 29 Congreso Nacional Ascolfi*. Medellín, Colombia. pp 86-87.

Mueller, D. S., Dorrance, A. E., Derksen, R. C., Ozkan, E., Kurle, J. E., Grau, C. R., Gaska, J. M., Hartamn, 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 Dis* 86: 26-31.

Muiño, B., Pérez, L., Pollanco, A., Ponciano, I., Lorenzo, M., Martín, E., González, M., Arévalo, R., Rodríguez, M. y Santana, Y. 2002. El monitoreo y manejo de la resistencia a los fungicidas en Cuba. *Boletín fitosanitario* 1-14.

Nivia, E. 2007. Impactos sociales y ambientales del uso de plaguicidas en Colombia. Seminario Internacional: Agroquímicos, Transgénicos y sus alternativas en América Latina y el Caribe. Red de Acción de plaguicidas y sus alternativas para América Latina. 28.

Newton, H. C. y Sequeira, L. 1972. Possible sources of resistance in lettuce to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis Rep* 56: 875-878.

Noyes, R. D. y Hancock, J. G. 1981. Role of oxalic acid in *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiol Plant Pathol* 18: 123-132.

Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* y *Gliocadium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 23: 53-54.

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(3): 239-246.

Patiño, L. Rodríguez, M. 2001. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y evaluación de fungicidas frente a los hongos más relevantes en vid (*Vitis vinifera*), variedad

chardonnay en el viñedo San Martín en el municipio de Sogamoso, Departamento de Boyacá. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Patterson, C. L. 1983. The comparative biology, epidemiology, and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*, and the genetic analysis of vegetative and sexual compatibility in *S. minor*. Ph. D. Thesis. University of California. California. United States. 98.

Patterson, C. L. y Grogan, G. 1985. Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis* 69: 766-770.

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.

Pérez, D. (Madrid). *Instituto Biológico de la Salud* [en línea]: Antioxidantes. [España]: Radicales libres. <<http://www.institutobiologico.com/seminarios/radicales%20libres.htm>>, [Consulta: 28 abr. 2009]

Pesticide Safety Directorate. 1997. Evaluation of fully approved or provisionally approved products: Benomyl. Department for Environment, Food and Rural Affairs. York. United Kingdom. 295.

Pesticide Safety Directorate. 1997. Evaluation of fully approved or provisionally approved products: Kresoxim-metil. Department for Environment, Food and Rural Affairs. York. United Kingdom. 295.

Phillips, A. J. L. 1987. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*: A review. *Phytophylactica* 19: 279-283.

Purdy, L. H. 1958. Some factors affecting penetration and infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 48: 605-9.

Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, disease and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* 69: 875-880.

Raabeendran, N., Jones, E. y Steward, A. 2006. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological control* 39: 352-362.

Rahe, J. E. y Utkhede, R. S. 1990. Integrated biological and chemical control of sclerotial pathogens. En: Singleton, M. 1990. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. Edited by: Singleton, Mihail y Rush. pp 124-126.

Rivera, G. *Conceptos introductorios a la fitopatología*. 1999. Ed. EUNED. Costa Rica. 301.

Red de acción de alternativas al uso de agroquímicos (Perú). RAAA [en línea]: Alternativas al bromuro de metilo. [Lima]: Red de acción el alternativas al uso de agroquímicos. <www.raaa.org/bol42c.html>, [Consulta: 02 feb. 2009]

Rossier, F. 2003. *Colombia, política, sociedad, economía*. Editorial Biblioteca Nueva SL. Madrid. España. 93-95

Rusell, P. 2004. *Sensitivity baselines in fungicide resistance research y management*. AIMPRINT. Bruselas. Bélgica. 60 p.

Ryder, E. 1998. *Lettuce, Endive and Chicory*. CAB Internacional. Cambridge. Inglaterra. 12.

Saavedra, V. 2007 (Barcelona). *Medicina integral* [en línea]: Azoles. [España]: <<http://vicentesaavedra.blogia.com/>>, [Consulta: 28 abr. 2009].

Sánchez y Moreno, G. D. y Moreno, M. 2004. *Manejo integrado de plagas de crucíferas y lechuga en la Sabana de Bogotá*. C. I. Tibaitatá, Corpoica Programa MIP. Bogotá. 20 p.

Statewide Institute of Pest Management Program, Agriculture y Natural Resources University of California (Estados Unidos). *UC IPM* [en línea]: Pest Management Guidelines [California]: Lettuce drop. <<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r441100711.html>>, [Consulta: 01 feb. 2009.]

Stammler, G. y Speakman, J. 2006. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. *J. Phytopathology* 154: 508-510.

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.

Staub, T. y Sozzi, D. 1984. Fungicide resistance. *Plant Disease* 68(12): 1026-1031.

Stevens, F. L. y Hall, J. G. 1911. A serious lettuce disease (sclerotiniose) and a method of control. *N. C. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull* 8: 85-145.

Subbarao, K. V. 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. *Plant Dis* 82: 1068-1078.

Subbarao, K. V. Hubbard, J. C. y Schulbach, K. F. 1997. Comparison of lettuce diseases and yield under subsurface drip and furrow irrigation. *Phytopathology* 87: 877-883

Subbarao, K. V., Koike, S. T. y Hubbard, J. C. 1996. Effects of deep plowing on the distribution and density of *Sclerotinia minor* sclerotia and lettuce drop incidence. *Plant Dis* 80: 28-33.

Suszkiw, J. 2003 (Estados Unidos). *USDA* [en línea]: Una iniciativa nueva de investigación en el control del moho blanco. United States Department of Agriculture. [California]: Agricultural Research Service. <<http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2003/030311.es.htm>>, [Consulta: 07 feb. 2009]

Terralia (Madrid). *Terralia* [en línea]: *Vademecum*. [España]: Kresoxim-metil y Procimidona. <http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=876>, [Consulta: 25 abr. 2009]

Torkewitz, R. 2008. Chronology of fungicides. Syngenta Crop protection. APS Office of Industry Relations. 1.

Torneau, D. L. 1979. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology* 69: 887-890.

Torrado, A. 2000. Uso de plaguicidas y exigencias del Mercado agroalimentario. *Boletín técnico ICA*. 1.

- Vannacci, G., Triolo, E. y Materazzi, A. 1988. Survival of *Sclerotinia minor* Jagger sclerotia in solarized soil. Plant and soil 109: 49-55.
- Velásquez, J. A. y Giraldo, P. A. 2005. Posibilidades competitivas de productos prioritarios de Antioquia frente a los acuerdos de integración y nuevos acuerdos comerciales. Secretaria de Productividad y Competitividad. Departamento de Planeación. Gobernación de Antioquia. Medellín. Colombia. pp 1-169.
- Vivas C, L. E. y Astudillo, D. 2006. El Control Físico de las Plagas Agrícolas I: Métodos Pasivos. Revista Digital CENIAP HOY 11: 1-12.
- Wadsworth, D. F. 1979. Sclerotinia blight of peanuts in Oklahoma and occurrence of the sexual stage of the pathogen. Peanut Sci 6: 77-79.
- Walker, J. C. 1959. Enfermedades de las hortalizas. Salvat editores S.A. Barcelona. España. 259-260.
- Willettts, H. J. y Bullock, S. 1992. Developmental biology of sclerotia. Mycol Res 69: 801-816.
- Wu, B. M. y Subbarao, K. V. 2006. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. Phytopathology 96: 1322-1329.
- Yamaguchi, I. y Fujimura, M. 2005. Recent topics on action mechanisms of fungicides. J. Pestic Sci 30(2): 67-74.
- Zadoks, J. C. 1993. Antipodes on crop protection in sustainable agriculture. En: Corey, S., Dall, D. Milne, W. (eds).1993. Pest Control y Sustainable Agriculture. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Victoria, Australia, 3-12.
- Zhang, C. Q., Liu, Y. H. Ma, X. Y., Zheng, Z. Ma Z. H. 2009. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice rice sheath blight, to mepronil and boscalid. Crop Protection 28: 381-386.

10. Anexos

Anexo 1. Dosis recomendada de producto comercial e ingrediente activo

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis recomendada					Solución stock			
		Solubilidad (A o a) Ppm	Producto comercial		Ingrediente activo		Volumen final	ppm	mg o mL/1000mL PC	mg o mL/Volumen final
			Concentración	ppm	%	ppm				
Benlate	Benomil	14285,71 a	50g/100L	500	50	250	40,48	14000	28000	1133,44
Cantus	Boscalid	180000 A	1,2kg/1000L	1200	50	600	8	170000	340000	2720
Folicur	Tebuconazole	32 A	0,8L/200L	4	25	1	75	30	120	9,00
Rovral	Iprodione	13 A	0,3L/300L	1	50	0,5	113,2	10	20	2,26
Stroby	Kresoxim- metil	2 A	0,25mL/L	0,25	50	0,125	149	1,9	3,8	0,57
Sumilex	Procimidona	180000 a	1g/L	1000	50	500	7	170000	340000	2380

A= Agua; a= acetona

Anexo 2. Cálculos para preparación de soluciones stock de fungicida (Benomil, Boscalid y Tebuconazole) y medios de cultivo

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis	Vi (mL)	Ci (ppm)	Vf (mL)	Cf (ppm)	V medio (mL)
Benlate	Benomil	1	0	14000	400	0	400
		2	3,57	14000	400	125	396,43
		3	4,76	14000	400	166,66	395,24
		4	7,14	14000	400	250	392,86
		5	10,71	14000	400	375	389,29
		6	14,29	14000	400	500	385,71
		V stock (mL)	40,48				
Cantus	Boscalid	1	0	170000	400	0	400
		2	0,71	170000	400	300	399,29
		3	0,94	170000	400	400	399,06
		4	1,41	170000	400	600	398,59
		5	2,12	170000	400	900	397,88
		6	2,82	170000	400	1200	397,18
		V stock (mL)	8				
Folicur	Tebuconazole	1	0	30	400	0	400
		2	6,67	30	400	0,50	393,33
		3	8,80	30	400	0,66	391,20
		4	13,33	30	400	1	386,67
		5	20	30	400	1,50	380
		6	26,67	30	400	2	373,33
		V stock (mL)	75				

Vi= Volumen de solución stock, Ci= Concentración de solución stock, Vf= Volumen final de medio, Cf= Concentración final de medio, V stock= Volumen total de solución stock, V medio= Volumen total de medio

Anexo 3. Cálculos para preparación de soluciones stock de fungicida (Iprodione, Kresoxim-metil y Procimidona) y medios de cultivo

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis	Vi (mL)	Ci (ppm)	Vf (mL)	Cf (ppm)	V medio (mL)
Rovral	Iprodione	1	0	10	400	0	400
		2	10	10	400	0,25	390
		3	13,20	10	400	0,33	386,80
		4	20	10	400	0,5	380
		5	30	10	400	0,75	370
		6	40	10	400	1	360
		V stock (mL)	113,2				
Stroby	Kresoxim-metil	1	0	1,9	400	0	400
		2	13,16	1,9	400	0,06	386,84
		3	17,47	1,9	400	0,08	382,53
		4	26,32	1,9	400	0,13	373,68
		5	39,47	1,9	400	0,19	360,53
		6	52,63	1,9	400	0,25	347,37
		V stock (mL)	149				
Sumilex	Procimidona	1	0	170000	400	0	400
		2	0,59	170000	400	250	399,41
		3	0,78	170000	400	333,33	399,22
		4	1,18	170000	400	500	398,82
		5	1,76	170000	400	750	398,24
		6	2,35	170000	400	1000	397,65
		V stock (mL)	7				

Vi= Volumen de solución stock, Ci= Concentración de solución stock, Vf= Volumen final de medio, Cf= Concentración final de medio, V stock= Volumen total de solución stock, V medio= Volumen total de medio

Anexo 4. Análisis de varianza para el número de esclerocios producidos por los aislamientos de *Sclerotinia* sp. en ausencia de fungicida

ONE-WAY AOV FOR: SC001 SC002 SC005 SC006 SC007

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	65144.0	16286.0	131.76	0.0000
WITHIN	10	1236.00	123.600		
TOTAL	14	66380.0			

CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	6.42	4 0.1696

COCHRAN'S Q	0.7141
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	27.583

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 5387.47
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
SC001	170.00	3	4.5826
SC002	26.667	3	9.8658
SC005	156.67	3	21.008
SC006	23.667	3	6.5064
SC007	38.000	3	4.0000
TOTAL	83.000	15	11.118

CASES INCLUDED 15 MISSING CASES 0

Anexo 5. Análisis de varianza para el número de esclerocios producidos por los aislamientos de *Sclerotinia* sp. en presencia de Kresoxim-metil

ONE-WAY AOV FOR: SC001 SC002 SC005 SC006 SC007 SC008

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	652610	130522	936.01	0.0000
WITHIN	12	1673.33	139.444		
TOTAL	17	654284			

CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	16.83	5 0.0048

COCHRAN'S Q	0.7327
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	1839.0

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	43460.9
EFFECTIVE CELL SIZE	3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
SC001	532.00	3	24.759
SC002	17.667	3	0.5774
SC005	253.33	3	9.0738
SC006	23.333	3	7.0946
SC007	9.6667	3	2.0817
SC008	62.333	3	9.2916
TOTAL	149.72	18	11.809

CASES INCLUDED 18 MISSING CASES 0

Anexo 6. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc001

ONE-WAY AOV FOR: BENOMIL BOSCALID KRESOXIM TESTIGO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	802.632	267.544	886.71	0.0000
WITHIN	8	2.41380	0.30173		
TOTAL	11	805.046			

CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	3.38	3 0.3373

COCHRAN'S Q	0.6009
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	15.354

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	89.0808
EFFECTIVE CELL SIZE	3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BENOMIL	0.2767	3	0.2173
BOSCALID	9.2133	3	0.5853
KRESOXIM	18.820	3	0.3032
TESTIGO	20.723	3	0.8516
TOTAL	12.258	12	0.5493

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Anexo 7. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc001

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS VARIABLE	MEAN	GROUPS
TESTIGO	20.723	I
KRESOXIM	18.820	.. I
BOSCALID	9.2133 I
BENOMIL	0.2767 I

ALL 4 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	4.527	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.4357		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.4485		

Anexo 8. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc002

ONE-WAY AOV FOR: BENOMIL BOSCALID KRESOXIM TESTIGO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	1156.50	385.501	110.05	0.0000
WITHIN	8	28.0225	3.50282		
TOTAL	11	1184.53			

CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	16.19	3 0.0010

COCHRAN'S Q	0.9680
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	939.67

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	127.333
EFFECTIVE CELL SIZE	3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BENOMIL	0.1233	3	0.1201
BOSCALID	6.0700	3	0.5272
KRESOXIM	20.130	3	3.6827
TESTIGO	24.023	3	0.3955
TOTAL	12.587	12	1.8716

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Anexo 9. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc002

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS VARIABLE	MEAN	GROUPS
TESTIGO	24.023	I
KRESOXIM	20.130	I
BOSCALID	6.0700	.. I
BENOMIL	0.1233 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	4.527	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	4.8919		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.5281		

Anexo 10. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc005

ONE-WAY AOV FOR: BENOMIL BOSCALID KRESOXIM TESTIGO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	772.944	257.648	148.47	0.0000
WITHIN	8	13.8830	1.73537		
TOTAL	11	786.827			

CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	6.44	3 0.0922

COCHRAN'S Q	0.4317
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	183.86

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	85.3042
EFFECTIVE CELL SIZE	3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BENOMIL	0.2800	3	0.1277
BOSCALID	4.1933	3	1.3121
KRESOXIM	15.853	3	1.4854
TESTIGO	19.757	3	1.7312
TOTAL	10.021	12	1.3173

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Anexo 11. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc005

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS VARIABLE	MEAN	GROUPS
TESTIGO	19.757	I
KRESOXIM	15.853	.. I
BOSCALID	4.1933 I
BENOMIL	0.2800 I

ALL 4 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	4.527	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	3.4432		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.0756		

Anexo 12. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc006

ONE-WAY AOV FOR: BENOMIL BOSCALID KRESOXIM TESTIGO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	1044.73	348.245	840.76	0.0000
WITHIN	8	3.31360	0.41420		
TOTAL	11	1048.05			

CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	14.71	3 0.0021

COCHRAN'S Q 0.9740
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 180.64

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 115.943
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BENOMIL	0.3167	3	0.1185
BOSCALID	11.850	3	0.1418
KRESOXIM	20.227	3	1.2703
TESTIGO	24.863	3	0.0945
TOTAL	14.314	12	0.6436

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Anexo 13. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc006

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS VARIABLE	MEAN	GROUPS
TESTIGO	24.863	I
KRESOXIM	20.227	.. I
BOSCALID	11.850 I
BENOMIL	0.3167 I

ALL 4 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.527 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.6822
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.5255

Anexo 14. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc007

ONE-WAY AOV FOR: BENOMIL BOSCALID KRESOXIM TESTIGO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	891.415	297.138	20.33	0.0004
WITHIN	8	116.946	14.6182		
TOTAL	11	1008.36			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 94.1733
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BENOMIL	0.0000	3	0.0000
BOSCALID	11.077	3	0.9056
KRESOXIM	16.300	3	7.5829
TESTIGO	23.667	3	0.3907
TOTAL	12.761	12	3.8234

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Anexo 15. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc007

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS VARIABLE	MEAN	GROUPS
TESTIGO	23.667	I
KRESOXIM	16.300	I I
BOSCALID	11.077	.. I
BENOMIL	0.0000 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.527 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 9.9934
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 3.1218

Anexo 16. Análisis de varianza para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc008

ONE-WAY AOV FOR: BENOMIL BOSCALID KRESOXIM TESTIGO

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	307.822	102.607	120.67	0.0000
WITHIN	8	6.80253	0.85032		
TOTAL	11	314.625			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 33.9190
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BENOMIL	0.0000	3	0.0000
BOSCALID	2.7833	3	0.7407
KRESOXIM	11.950	3	0.8660
TESTIGO	10.617	3	1.4500
TOTAL	6.3375	12	0.9221

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Anexo 17. Comparación de medias de Tukey para las velocidades de crecimiento obtenidas en la concentración recomendada del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc008

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS VARIABLE	MEAN	GROUPS
KRESOXIM	11.950	I
TESTIGO	10.617	I
BOSCALID	2.7833	.. I
BENOMIL	0.0000 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.527 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 2.4102
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.7529

Anexo 18. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc001

ONE-WAY AOV FOR: BE1 BE2 BE3 BE4 BE5 BO1 BO2 BO3 BO4 BO5 IP1 IP2 IP3 IP4 IP5 PR1 PR2 PR3 PR4 PR5 TE1 TE2 TE3 TE4 TE5

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	24	24368.5	1015.35	398.70	0.0000
WITHIN	50	127.333	2.54666		
TOTAL	74	24495.8			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 337.603
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BE1	96.397	3	1.0090
BE2	98.570	3	0.2524
BE3	98.283	3	1.5010
BE4	98.817	3	0.9295
BE5	98.857	3	0.4130
BO1	53.140	3	0.7632
BO2	50.330	3	1.1505
BO3	51.817	3	1.0159
BO4	52.810	3	2.7622
BO5	67.180	3	6.9806
IP1	100.00	3	0.0000
IP2	100.00	3	0.0000
IP3	100.00	3	0.0000
IP4	100.00	3	0.0000
IP5	100.00	3	0.0000
PR1	100.00	3	0.0000
PR2	100.00	3	0.0000
PR3	100.00	3	0.0000
PR4	100.00	3	0.0000
PR5	100.00	3	0.0000
TE1	100.00	3	0.0000
TE2	100.00	3	0.0000
TE3	100.00	3	0.0000
TE4	100.00	3	0.0000
TE5	100.00	3	0.0000
TOTAL	90.648	75	1.5958

CASES INCLUDED 75 MISSING CASES 0

Anexo 19. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc001

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS		
VARIABLE	MEAN	GROUPS
-----	-----	-----
IP1	100.00	I
IP2	100.00	I
IP3	100.00	I
IP4	100.00	I
IP5	100.00	I
PR1	100.00	I
PR2	100.00	I
PR3	100.00	I
PR4	100.00	I
PR5	100.00	I
TE1	100.00	I
TE2	100.00	I
TE3	100.00	I
TE4	100.00	I
TE5	100.00	I
BE5	98.857	I
BE4	98.817	I
BE2	98.570	I
BE3	98.283	I
BE1	96.397	I
BO5	67.180	.I
BO1	53.140	..I
BO4	52.810	..I
BO3	51.817	..I
BO2	50.330	..I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.465	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	5.0351		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.3030		

Anexo 20. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc002

ONE-WAY AOV FOR: BE1 BE2 BE3 BE4 BE5 BO1 BO2 BO3 BO4 BO5 IP1 IP2 IP3 IP4 IP5 PR1 PR2 PR3 PR4 PR5 TE1 TE2 TE3 TE4 TE5

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	24	10309.8	429.577	90.60	0.0000
WITHIN	50	237.079	4.74159		
TOTAL	74	10546.9			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 141.612
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BE1	98.107	3	0.5771
BE2	98.030	3	0.2381
BE3	99.167	3	0.7218
BE4	100.00	3	0.0000
BE5	100.00	3	0.0000
BO1	60.873	3	2.2496
BO2	62.830	3	2.7628
BO3	74.867	3	3.9950
BO4	78.573	3	6.3432
BO5	84.323	3	6.9813
IP1	100.00	3	0.0000
IP2	100.00	3	0.0000
IP3	100.00	3	0.0000
IP4	100.00	3	0.0000
IP5	100.00	3	0.0000
PR1	100.00	3	0.0000
PR2	100.00	3	0.0000
PR3	100.00	3	0.0000
PR4	100.00	3	0.0000
PR5	100.00	3	0.0000
TE1	100.00	3	0.0000
TE2	100.00	3	0.0000
TE3	100.00	3	0.0000
TE4	100.00	3	0.0000
TE5	100.00	3	0.0000
TOTAL	94.271	75	2.1775

CASES INCLUDED 75 MISSING CASES 0

Anexo 21. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc002

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS		
VARIABLE	MEAN	GROUPS
-----	-----	-----
BE4	100.00	I
BE5	100.00	I
IP1	100.00	I
IP2	100.00	I
IP3	100.00	I
IP4	100.00	I
IP5	100.00	I
PR1	100.00	I
PR2	100.00	I
PR3	100.00	I
PR4	100.00	I
PR5	100.00	I
TE1	100.00	I
TE2	100.00	I
TE3	100.00	I
TE4	100.00	I
TE5	100.00	I
BE3	99.167	I
BE1	98.107	I
BE2	98.030	I
BO5	84.323	.I
BO4	78.573	.II
BO3	74.867	..I
BO2	62.830	...I
BO1	60.873	...I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.465	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	6.8704		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	1.7779		

Anexo 22. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc005

ONE-WAY AOV FOR: BE1 BE2 BE3 BE4 BE5 BO1 BO2 BO3 BO4 BO5 IP1 IP2 IP3 IP4 IP5 PR1 PR2 PR3 PR4 PR5 TE1 TE2 TE3 TE4 TE5

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	24	7325.50	305.229	20.66	0.0000
WITHIN	50	738.675	14.7735		
TOTAL	74	8064.17			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 96.8185
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BE1	96.427	3	2.0512
BE2	97.717	3	0.5450
BE3	98.363	3	0.5235
BE4	99.087	3	1.5217
BE5	98.957	3	1.1904
BO1	80.000	3	3.4643
BO2	73.900	3	7.2606
BO3	72.310	3	6.8937
BO4	75.153	3	12.204
BO5	74.070	3	9.9823
IP1	100.00	3	0.0000
IP2	100.00	3	0.0000
IP3	100.00	3	0.0000
IP4	100.00	3	0.0000
IP5	100.00	3	0.0000
PR1	100.00	3	0.0000
PR2	100.00	3	0.0000
PR3	100.00	3	0.0000
PR4	100.00	3	0.0000
PR5	100.00	3	0.0000
TE1	100.00	3	0.0000
TE2	100.00	3	0.0000
TE3	100.00	3	0.0000
TE4	100.00	3	0.0000
TE5	100.00	3	0.0000
TOTAL	94.639	75	3.8436

CASES INCLUDED 75 MISSING CASES 0

Anexo 23. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc005

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS		
VARIABLE	MEAN	GROUPS
-----	-----	-----
IP1	100.00	I
IP2	100.00	I
IP3	100.00	I
IP4	100.00	I
IP5	100.00	I
PR1	100.00	I
PR2	100.00	I
PR3	100.00	I
PR4	100.00	I
PR5	100.00	I
TE1	100.00	I
TE2	100.00	I
TE3	100.00	I
TE4	100.00	I
TE5	100.00	I
BE4	99.087	I
BE5	98.957	I
BE3	98.363	I
BE2	97.717	I
BE1	96.427	I
BO1	80.000	.I
BO4	75.153	.I
BO5	74.070	.I
BO2	73.900	.I
BO3	72.310	.I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.465	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	12.127		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	3.1383		

Anexo 24. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc006

ONE-WAY AOV FOR: BE1 BE2 BE3 BE4 BE5 IP1 IP2 IP3 IP4 IP5 PR1 PR2 PR3 PR4 PR5 TE1 TE2 TE3 TE4 TE5

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	19	67.0497	3.52893	36.88	0.0000
WITHIN	40	3.82713	0.09568		
TOTAL	59	70.8769			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 1.14442
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BE1	96.593	3	0.4000
BE2	96.977	3	0.4020
BE3	98.117	3	0.6274
BE4	98.593	3	0.7859
BE5	98.437	3	0.7620
IP1	100.00	3	0.0000
IP2	100.00	3	0.0000
IP3	100.00	3	0.0000
IP4	100.00	3	0.0000
IP5	100.00	3	0.0000
PR1	100.00	3	0.0000
PR2	100.00	3	0.0000
PR3	100.00	3	0.0000
PR4	100.00	3	0.0000
PR5	100.00	3	0.0000
TE1	100.00	3	0.0000
TE2	100.00	3	0.0000
TE3	100.00	3	0.0000
TE4	100.00	3	0.0000
TE5	100.00	3	0.0000
TOTAL	99.436	60	0.3093

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

Anexo 25. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc006

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS VARIABLE	MEAN	GROUPS
IP1	100.00	I
IP2	100.00	I
IP3	100.00	I
IP4	100.00	I
IP5	100.00	I
PR1	100.00	I
PR2	100.00	I
PR3	100.00	I
PR4	100.00	I
PR5	100.00	I
TE1	100.00	I
TE2	100.00	I
TE3	100.00	I
TE4	100.00	I
TE5	100.00	I
BE4	98.593	.. I
BE5	98.437	.. I
BE3	98.117	.. I
BE2	96.977 I
BE1	96.593 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.352	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.9558		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2526		

Anexo 26. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc007

ONE-WAY AOV FOR: BE1 BE2 BE3 BE4 BE5 BO1 BO2 BO3 BO4 BO5 IP1 IP2 IP3 IP4 IP5 KM3 KM4 KM5 PR1 PR2 PR3 PR4 PR5 TE1 TE2 TE3 TE4 TE5

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	27	113905	4218.72	119.35	0.0000
WITHIN	56	1979.49	35.3481		
TOTAL	83	115885			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 1394.46
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BE1	100.00	3	0.0000
BE2	100.00	3	0.0000
BE3	100.00	3	0.0000
BE4	100.00	3	0.0000
BE5	100.00	3	0.0000
BO1	20.533	3	7.6426
BO2	19.783	3	4.0601
BO3	24.400	3	1.0209
BO4	18.813	3	3.5341
BO5	15.393	3	1.6316
IP1	100.00	3	0.0000
IP2	100.00	3	0.0000
IP3	100.00	3	0.0000
IP4	100.00	3	0.0000
IP5	100.00	3	0.0000
KM3	14.707	3	21.354
KM4	16.787	3	7.4946
KM5	18.057	3	19.659
PR1	100.00	3	0.0000
PR2	100.00	3	0.0000
PR3	100.00	3	0.0000
PR4	100.00	3	0.0000
PR5	100.00	3	0.0000
TE1	100.00	3	0.0000
TE2	100.00	3	0.0000
TE3	100.00	3	0.0000
TE4	100.00	3	0.0000
TE5	100.00	3	0.0000
TOTAL	76.731	84	5.9454

CASES INCLUDED 84 MISSING CASES 0

Anexo 27. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia minor* Sc007

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS		
VARIABLE	MEAN	GROUPS
-----	-----	-----
BE1	100.00	I
BE2	100.00	I
BE3	100.00	I
BE4	100.00	I
BE5	100.00	I
IP1	100.00	I
IP2	100.00	I
IP3	100.00	I
IP4	100.00	I
IP5	100.00	I
PR1	100.00	I
PR2	100.00	I
PR3	100.00	I
PR4	100.00	I
PR5	100.00	I
TE1	100.00	I
TE2	100.00	I
TE3	100.00	I
TE4	100.00	I
TE5	100.00	I
BO3	24.400	.I
BO1	20.533	.I
BO2	19.783	.I
BO4	18.813	.I
KM5	18.057	.I
KM4	16.787	.I
BO5	15.393	.I
KM3	14.707	.I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.522	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	18.953		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	4.8544		

Anexo 28. Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc008

ONE-WAY AOV FOR: BE1 BE2 BE3 BE4 BE5 IP1 IP2 IP3 IP4 IP5 PR1 PR2 PR3 PR4 PR5 TE1 TE2 TE3 TE4 TE5

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	19	26.4914	1.39428	7.53	0.0000
WITHIN	40	7.40267	0.18507		
TOTAL	59	33.8941			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.40307
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE VARIABLE	GROUP MEAN	SIZE	STD DEV
BE1	97.060	3	1.9172
BE2	99.023	3	0.1604
BE3	100.00	3	0.0000
BE4	100.00	3	0.0000
BE5	100.00	3	0.0000
IP1	100.00	3	0.0000
IP2	100.00	3	0.0000
IP3	100.00	3	0.0000
IP4	100.00	3	0.0000
IP5	100.00	3	0.0000
PR1	100.00	3	0.0000
PR2	100.00	3	0.0000
PR3	100.00	3	0.0000
PR4	100.00	3	0.0000
PR5	100.00	3	0.0000
TE1	100.00	3	0.0000
TE2	100.00	3	0.0000
TE3	100.00	3	0.0000
TE4	100.00	3	0.0000
TE5	100.00	3	0.0000
TOTAL	99.804	60	0.4302

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

Anexo 29. Comparación de medias de Tukey de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del aislamiento *Sclerotinia sclerotiorum* Sc008

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS		
VARIABLE	MEAN	GROUPS

BE3	100.00	I
BE4	100.00	I
BE5	100.00	I
IP1	100.00	I
IP2	100.00	I
IP3	100.00	I
IP4	100.00	I
IP5	100.00	I
PR1	100.00	I
PR2	100.00	I
PR3	100.00	I
PR4	100.00	I
PR5	100.00	I
TE1	100.00	I
TE2	100.00	I
TE3	100.00	I
TE4	100.00	I
TE5	100.00	I
BE2	99.023	I
BE1	97.060	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.352	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.3293		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.3513		