UNIVERSIDAD NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR

ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN AGRONOMÍA CON ÉNFASIS AGRICULTURA ALTERNATIVA

Efecto de cuatro hongos biocontroladores sobre el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*) en condiciones *in vitro* e invernadero en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Trabajo Final de Graduación sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Agrarias de la Universidad Nacional bajo la modalidad de tesis para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

Estudiante

Bach. Alexandra Suárez Morales

Tutor

M. Sc. José Alonso Calvo Araya

Asesores

Ph.D. Martha Orozco Aceves

M. Sc. Mairon Madriz Martínez

Campus Omar Dengo

Heredia, Costa Rica, 2024

UNA
UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA

Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía con énfasis en Desarrollo Rural.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

M.Sc Johaner Rosales Flores

Representante Decanato de la Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

M. Sc. Andrés Alpízar Naranjo

Director de la Escuela de Ciencias Agrarias

M.Sc. José Alonso Calvo Araya

Tutor

MARTHA

PhD. Martha Orozco Aceves

Asesora 1

M.Sc. Mairon Madriz Martínez

Asesor 2

Alexandra Suárez M

Bach. Alexandra Suárez Morales

Postulante

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico primeramente a Dios quién me dio salud, paciencia y sabiduría para cumplir el sueño de ser profesional en tan importante sector y por avanzar en dicho proceso.

A mi madre que es motor y pilar importante en mi vida, que con su apoyo y amor me motivó a alcanzar mis metas, gracias por siempre confiar en mí e inculcarme amor y dedicación en todo lo que hago. Por las personas que ya no están, que de una u otra forma se alegraron de las metas alcanzadas en este proceso.

A mis hermanos por darme las fuerzas de salir adelante y permitirme mostrarles que con perseverancia se pueden lograr muchas cosas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al profesor tutor M. Sc. Alonso Calvo Araya, por su invaluable apoyo, por compartir sus conocimientos y ser una guía importante en la ejecución de dicha investigación.

A mis asesores: PhD. Martha Orozco Aceves y M. Sc. Mairon Madriz Martínez por sus valiosas contribuciones en el desarrollo de esta investigación, por su tiempo y atención a los detalles.

Al personal del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias por los recursos, el apoyo y las oportunidades que brindan a los estudiantes en la ejecución de diversos trabajos.

A los productores y colegas que fueron partícipes en la recolección de muestras, acompañamiento y motivación para salir adelante.

Gracias.

RESUMEN

En Costa Rica, el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) destaca por ser un cultivo tradicional en la dieta de los costarricenses, al consumirse fresco en ensaladas diariamente y además de generador de divisas y continuo crecimiento económico, desarrollándose en pequeños sistemas productivos ubicados en las zonas de Cartago y Zarcero principalmente. En los últimos años este cultivo ha sido afectado por la enfermedad conocida como moho blanco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum,* la cual se caracteriza por síntomas de pudrición blanca de la planta. En esta investigación se llevó a cabo un muestreo en una plantación de lechuga en Zarcero, Alajuela, en la cual se efectuaron inspecciones fitosanitarias y la recolección de plantas que evidenciaron la sintomatología del moho blanco. Por medio de análisis morfológicos del patógeno se identificó el agente causal de la enfermedad como *S. sclerotiorum*. Además, se realizó la purificación de este. Por último, se realizaron pruebas *in vitro* y en invernadero para evaluar la capacidad antagónica de cepas de *Clonostachys rosea*, *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*, sobre *S. sclerotiorum* con medición de la competencia por sustrato y antibiosis. En las pruebas duales, la competencia por sustrato se delimitó en la clase II para *T. asperellum* y *T. harzianum*, en la clase III para *T. longibrachiatum y C. rosea según* la escala utilizada. En cuanto a la antibiosis, los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC) se establecieron entre 66% y 81%, donde *T. harzianum* mostró los mejores valores con diferencias significativas (p=0,05) en todos los enfrentamientos. Los resultados obtenidos permiten identificar que los aislamientos de *Trichoderma* pueden ser utilizados en estrategias de manejo de la enfermedad del moho blanco en el cultivo de la lechuga en condiciones de ambiente controlado.

ABSTRACT

In Costa Rica, lettuce (*Lactuca sativa* L.) is a traditional crop in the Costa Rica diet, consumed fresh in salads on a daily basis, and is also a generator of foreign currency and continuous economic growth. lecttuce is cultivateded in small production systems located mainly in the Cartago and Zarcero areas. In recent years, the crop has been affected by the disease known as gray mold, which is characterized by symptoms of white rot in the plant. For this research I el e visited a lettuce plantation in Zarcero, Alajuela, in which phytosanitary inspections were carried out and plants that showed symptoms of white mold were collected. The disease causing agent was identified through morphological análisis as *S. sclerotiorum* and subsequiently purified. Finally, *in vitro* and greenhouse tests were performed to evaluate the antagonistic capacity of *Clonostachys rosea*, *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* strains on *S. sclerotiorum*, with measurement of substrate competition and antibiosis. In dual tests, substrate competition was delimited in class II for *T. asperellum* and *T. harzianum*, in class III for *T. longibrachiatum* and *C. rosea* according to the scale used. Regarding antibiosis, the growth inhibition percentages (GIP) were established between 66% and 81%, where *T. harzianum* showed the best values with significant differences (p=0,05) in all confrontations. The results obtained allowed to identify that *Trichoderma* isolates can be used as part of management strategies for white mold disease in lettuce cultivation under controlled environment conditions.

ÍNDICE

DEDICATORIA v
AGRADECIMIENTOS vi
RESUMEN vii
ABSTRACT viii
ÍNDICE DE FIGURAS xi
ÍNDICE DE TABLAS xiv
ÍNDICE DE ANEXOS xv
1.INTRODUCION 1
1.1. OBJETIVOS 3
1.1.1. Objetivo general 3
2. REVISIÓN DE LITERATURA 4
2.1. El cultivo de lechuga y su origen. 4
2.2. Importancia del cultivo de lechuga en Costa Rica. 4
2.3. Requerimientos nutricionales de la lechuga 5
2.4. Morfología de la planta. 5
2.5. Fenología del cultivo. 6
2.6. Enfermedades en el cultivo. 7
2.7. El moho blanco *(S. sclerotiorum).* 7
2.7.1. Importancia económica. 7
2.7.2. Clasificación taxonómica. 8
2.7.3. Ciclo de vida del moho blanco. 8
2.7.4. Sintomatología del moho blanco. 9
2.8. Control biológico de *S. sclerotiorum.* 10
2.8.1. Trichoderma spp. 11
2.8.2. Clonostachys rosea. 11
3.MATERIALES Y MÉTODOS 13
3.1. Localización del estudio. 13
3.2. Experimento en condiciones *in vitro.* 14
3.2.1. Aislamiento de *S. sclerotiorum.* 14
3.2.2. Obtención de los hongos biocontroladores. 16
3.2.3. Evaluación de antagonistas en pruebas *in vitro.* 16

3.2.4. Diseño experimental. 16
3.2.5. Variables por evaluar en las pruebas de antagonismo. 18
3.2.5.1. Evaluación de la competencia por sustrato. 18
3.2.5.2. Evaluación del efecto antibiótico. 19
3.2.6. Análisis estadístico. 19
3.3. Experimento en condiciones en invernadero. 20
3.3.1. Caracterización física y química del suelo. 20
3.3.2. Preparación del inóculo. 21
3.3.3. Establecimiento del proyecto en invernadero. 22
3.3.4. Inoculación del patógeno y aplicación de los tratamientos. 23
3.3.5. Manejo agronómico del cultivo. 24
3.3.6. Diseño experimental. 24
3.3.7. Variables para evaluar. 25
3.3.7.1. Incidencia 25
3.3.7.2. Severidad. 26
3.3.7.3. Desarrollo de la planta. 27
3.3.8. Análisis estadístico 27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 28
4.1. Evaluación de antagonistas en pruebas *in vitro.* 28
4.1.1. Evaluación de cultivos duales. 29
4.1.2. Evaluación de competencia por sustrato. 29
4.1.3. Evaluación del efecto antibiótico. 31
4.2.Evaluación de antagonistas en condiciones de invernadero. 33
4.2.1. Incidencia de la enfermedad. 33
4.2.2.Severidad. 35
4.2.3. Evaluación del desarrollo en plantas 36
5. CONCLUSIONES. 40
6. RECOMENDACIONES 41
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42
8.ANEXOS 50
8.1.Experimento en condiciones in vitro. 50
8.1.1. Preparación del Medio de cultivo PDA, papa dextrosa agar. 50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Requerimientos de nitrógeno, fósforo y potasio del cultivo de lechuga absorbidos en forma total y por cosecha.....**5**

Figura 2. Ciclo fenológico del cultivo de lechuga en sus fases de crecimiento **6**

Figura 3. Mapa de distribución de *S. sclerotiorum* **7**

Figura 4. Ciclo de vida de *S. sclerotiorum* en el cultivo de lechuga. **9**

Figura 5. Sintomatología y signos del moho blanco en el cultivo de lechuga. A). cuerpos de resistencia, micelio algodonoso de color blanco; B). esclerocios en formación; C). Sección transversal del esclerocio; D). Apotecios germinados; E). Sección longitudinal de apotecio; F). Ascas y ascosporas **10**

Figura 6. Mapa de ubicación del invernadero, Ujarrás Paraíso, Cartago. **13**

Figura 7. (A) Proceso de desinfección de muestras para el aislamiento de patógenos a partir de tejido vegetal. (B) Ejemplo de distribución equidistante de los esclerocios en platos de PDA. **15**

Figura 8. Croquis de la disposición de cultivos duales en cajas Petri, con el aislamiento de antagonistas y testigo en un diseño experimental completamente al azar (DCA).....**17**

Figura 9. Método de cultivo dual para la evaluación del efecto antibiótico. C1: crecimiento radial del testigo, C2 el crecimiento radial del patógeno en el cultivo dual, Tr: *Trichoderma* sp. **19**

Figura 10. Caracterización del suelo utilizado en el ensayo. **20**

Figura 11. Proceso de esterilización del suelo con vapor saturado para los tratamientos aplicados en invernadero. **21**

Figura 12. Aislamiento del hongo fitopatógeno *S. sclerotiorum.* a). inoculación de *S. sclerotiorum* en medio PDA, b). muestra obtenida en campo .c). patógeno aislado, d). esclerocios para su inoculación **22**

Figura 13. Establecimiento de ensayo en invernadero, Ujarrás en Paraíso de Cartago. **23**

Figura 14. Croquis de la disposición de las macetas con plantas de lechuga mediante un diseño completamente al azar (DCA). **25**

Figura 15. Colonias puras de los biocontroladores en medio de cultivo PDA. Cr *(Clonostachys rosea),* Ta *(Trichoderma asperellum),* Tl *(Trichoderma longibrachiatum)* y Th *(Trichoderma harzianum).*.....**28**

Figura 16. Evaluación de cultivos duales de diferentes tipos de hongos antagónicos en el manejo del hongo *S. sclerotiorum.* STa; *S. sclerotiorum* y *T. asperellum*, STh: *S. sclerotiorum* y *T. harzianum*, STl: *S. sclerotiorum* y T. *longibrachiatum*, SCr: *S. sclerotiorum* y *Clonostachys rosea* **29**

Figura 17. Crecimiento radial promedio (n=4) a los 7 días, de los antagonistas *T. asperellum* (STa), *T. harzianum* (STh), *T. longibrachiatum* (STl) y *C. rosea* (SCr) en las pruebas *in vitro*. **31**

Figura 18. Porcentaje de inhibición del crecimiento (% PIC) de *T. asperellum* (STa), *T. harzianum* (STh), *T. longibrachiatum* (STl) y *C. rosea* (SCr). **32**

Figura 19. Incidencia del fitopatógeno *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga a las que se aplicaron los antagonistas *T. asperellum* (Ta), *T. harzianum* (Th), *T. longibrachiatum* (Tl) y *C. rosea* (Tc) en condiciones de invernadero **34**

Figura 20. Clasificación del grado de severidad del moho blanco, según los síntomas de las plantas bajo condiciones de invernadero. Grado 1: plantas sanas sin síntomas visibles; Grado 2: síntoma inicial de caída de hojas basales; Grado 3: plantas con marchitamiento; Grado 7: muerte de la planta.....**35**

Figura 21. Distribución de frecuencias de grados de severidad de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero. **36**

Figura 22. Peso promedio de la parte aérea seca y fresca (± Error estándar) de los tratamientos aplicados para el control de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga. Sometido a 4 biocontroladores y control químico. (Ta) *Trichoderma asperellum*, (Th) T*richoderma*

harzianum, (Tl) *Trichoderma longibrachiatum*, (Tc) *Clonostachys rosea*, (St) Testigo comercial, (Sa) sin inoculación, (Si) Testigo absoluto **37**

Figura 23. Peso promedio de la raíz seca y fresca (± Error estándar) de los tratamientos aplicados para el control de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga. Sometido a 4 biocontroladores y control químico. (Ta) *Trichoderma asperellum*, (Th) *Trichoderma harzianum*, (Tl) *Trichoderma longibrachiatum*, (Tc) *Clonostachys rosea*, (St) Testigo comercial, (Sa) sin inoculación, (Si) Testigo absoluto**.** **38**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos en las pruebas *in vitro*. **17**

Tabla 2. Descripción de los tratamientos a utilizar.....**22**

Tabla 3. Escala visual de severidad para la evaluación de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero. **26**

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados evaluación de pruebas *in vitro*.....**50**

Anexo 2. Nivel de incidencia del Moho blanco *(S. sclerotiorum*) en plantas de lechuga en condiciones de invernadero **52**

Anexo 3. Severidad de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero. **52**

Anexo 4. Evaluación del desarrollo en plantas de *Lactuca sativa* L.....**53**

Anexo 5. ANOVA, de Crecimiento radial de las pruebas *in vitro.* **54**

Anexo 6. ANOVA, porcentaje de inhibición del crecimiento PIC (%). **54**

Anexo 7. Cálculo de distribución de Frecuencias para la evaluación de severidad de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero **55**

Anexo 8. ANOVA desarrollo del peso fresco de la parte foliar, plantas de lechuga. **55**

Anexo 9. ANOVA desarrollo del peso fresco de la parte radicular, plantas de lechuga. **56**

Anexo 10. ANOVA desarrollo del peso seco de la parte foliar, plantas de lechuga. **56**

Anexo 11. ANOVA desarrollo del peso seco de la parte radicular, plantas de lechuga. **57**

1.INTRODUCION

El cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) es originario de Asia, pertenece a la familia de las asteráceas, y es la principal especie cultivable de esta familia botánica. La importancia de esta planta radica en sus aportes nutricionales ya que es fuente de vitaminas A, C y K, además del contenido de minerales, fibra y el bajo contenido de calorías (Kole, 2011). La producción de esta y otras hortalizas en Costa Rica ha predominado a lo largo del tiempo, principalmente en regiones como Cartago y Zarcero. Para el año 2019, la producción de lechuga en el país fue de 568 toneladas (t), por lo que se considera que es un cultivo con un amplio interés económico a nivel nacional (Shatilov, Razin & Ivanova, 2019). Este cultivo es afectado por una serie de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus. Dentro de estas resalta la enfermedad conocida como moho blanco ocasionada por el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que afecta a más de 500 especies vegetales (O'Sullivan, Belt & Thatcher, 2021). *S. sclerotiorum* es considerado uno de los fitopatógenos más destructivos y cosmopolitas a nivel mundial (Bolton, Thommas & Nelson, 2006; Saharan & Mehta, 2008; Smolińska & Kowalska, 2018). Este hongo puede llegar a causar pérdidas en la producción, equivalentes a más de $200 millones anuales. Las pérdidas asociadas a este hongo en el cultivo de lechuga corresponden de un 10 a un 45% en sistemas intensivos (Vallalta & Porter, 2004).

El control de hongos fitopatógenos en cultivos hortícolas se ha basado en el uso de fungicidas tanto preventivos como curativos. El ~~a~~mplio uso de este tipo de biocidas en la horticultura llega a ser objeto de preocupación pública, debido a los efectos perjudiciales sobre el ambiente y salud (Tozlu, Mohammadi, Senol, Nadaroglu & Kotan, 2016). Actualmente los fungicidas más utilizados en hortalizas son los benzimidazoles, ditiocarbamatos y cloronitrilos; Sin embargo, cada vez más fungicidas están siendo restringidos en su uso en diversos cultivos debido a su toxicidad o impactos ambientales asociados a su aplicación. Además, fungicidas pertenecientes a estos grupos químicos han demostrado tener efectos sobre el desarrollo o la reproducción del ser humano y los dos primeros son sustancias reconocidas de causar disrupción endocrina (Ramírez, Fournier, Hidalgo y Ruepert, 2014).

Consecuentemente un mayor uso de plaguicidas contribuye a agravar problemas ambientales como la contaminación y degradación de los recursos naturales (Viera, Tello, Martínez, Navia, Medina, Delgado y Jackson, 2020) En Costa Rica, el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la Universidad Nacional, ha evidenciado cómo el sector agro del país ha llegado a ser un importante demandante de estos insumos y justifica su uso ante los problemas que muchos productores sufren actualmente, como lo es el aumento e incidencia de enfermedades fúngicas, bacterianas y virales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2011). Por otro lado, los consumidores expresan su descontento debido a la presencia de residuos de plaguicidas en las hortalizas; asimismo, se percibe una animadversión de la población contra la aplicación de productos químicos que dañan al ser humano y al ambiente. La preocupación pública por la presencia de residuos de plaguicidas en los productos agrícolas, razones ambientales y problemas de resistencia a plaguicidas por parte de plagas y enfermedades ha intensificado en los últimos años la búsqueda de alternativas de manejo de estos problemas fitosanitarios (Calvo, 2011).

La implementación de alternativas como el control biológico, se considera una herramienta de manejo de fitopatógenos, cuidando las condiciones medioambientales y evitando la residualidad de sustancias en los alimentos, requisito que exigen muchos mercados en su comercialización. Los microorganismos que cumplen la función de un biocontrolador generan una interacción antagónica que mejora la funcionalidad de las plantas y puede llegar a ser más estable y duradera que un producto químico (Villareal, Villa, Cira & Estrada, 2017). Ante el contexto anterior, el combate biológico aparece como una alternativa viable dentro del manejo ecológico de enfermedades. En el caso de la producción de lechuga, el control biológico se considera una herramienta para el manejo de *S. sclerotiorum;* sin embargo, el control biológico debe ser evaluado y validado debido a la gran oferta de controladores biológicos que están disponibles actualmente en el mercado, los cuales presentan calidades diversas. La evaluación y validación debe iniciarse con ensayos tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* del efecto antagónico de los antagonistas microbianos, para luego seleccionar los más eficientes (Calvo, 2011).

La presente investigación procuró evaluar el efecto de hongos biocontroladores en el cultivo de lechuga como un método alternativo para el control del moho blanco, para ofrecer alternativas de manejo y así disminuir el uso de fungicidas químicos.

Bajo la problemática aquí mostrada, el presente trabajo contempló los siguientes objetivos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antagónica de los hongos biocontroladores *Clonostachys rosea*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*, sobre el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*) mediante pruebas *in vitro* y en invernadero como estrategia biológica en el manejo de la enfermedad en cultivo de lechuga.

1.1.2. Objetivos específicos

- Realizar pruebas *in vitro* en laboratorio para evaluar la capacidad antagónica de *C. rosea*, *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* sobre *S. sclerotiorum*.

- Determinar el efecto antagónico de cuatro hongos biocontroladores (*C. rosea*, *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*) sobre el moho blanco en el cultivo de lechuga en condiciones de invernadero, mediante análisis de datos que permitan evaluar su efectividad.

- Analizar el efecto de cuatro hongos biocontroladores (*C. rosea*, *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*) en el desarrollo y producción del cultivo de lechuga, mediante análisis de datos que evidencien la efectividad de su uso.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo de lechuga y su origen.

El cultivo de lechuga es una planta anual perteneciente a la familia de las asteráceas (Asteraceae) y es la principal variedad cultivada de esta familia botánica. Es originaria de Asia, probablemente de Egipto, cerca de las regiones del Mediterráneo, pero la domesticación de la especie ocurrió en la región comprendida entre Egipto e Irán (De Vries, 1997).

En el siglo XV, fue introducida en Europa principalmente por sus propiedades culinarias y medicinales. Actualmente, se cultiva en todos los países del mundo. Para el año 2019 la producción mundial fue de 29.134.653 t, de estas 568 t fueron producidas en Costa Rica. Los principales países productores en orden de mayor producción corresponden a: China, USA e India (Shatilov *et al*., 2019).

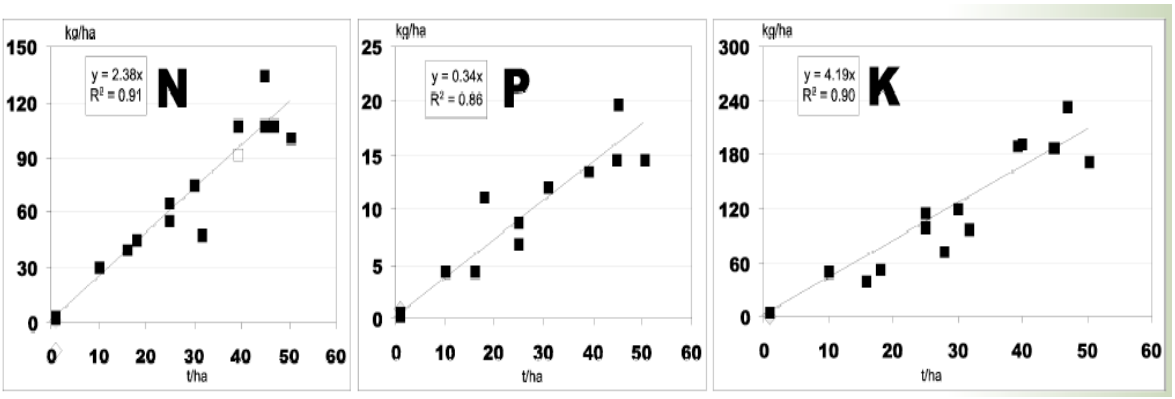
2.2. Importancia del cultivo de lechuga en Costa Rica.

Durante los últimos años en Costa Rica se ha observado un aumento en el consumo de lechuga. Esta hortaliza se cultiva principalmente en altitudes importantes donde los climas son frescos, siendo Cartago y Zarcero, las principales zonas productoras de lechuga, en los cuales se produce principalmente la lechuga tipo “americana”. Según los registros de oferta en nuestro país, la mayor oferta se da en los meses de julio y noviembre, y su precio alcanza su máximo valor en el mes de diciembre ya que es el mes de mayor demanda (Vásquez, 2015). La importancia y comercialización de esta hortaliza se relaciona con las tendencias de mercado, definidas por patrones de comportamiento del consumidor. Aspectos actuales sean del ámbito social, económico o salud definen el estilo de vida que hoy día lleva el ser humano. Las tendencias indican un incremento en el interés por tener un estilo de vida más saludable que simplifique las tareas del hogar (FAO, 2003). Según el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA, 2020), a partir de los patrones que definen al consumidor, surgen alternativas en la producción y comercialización de los alimentos. Se toman en cuenta diversos procesos de la cadena de comercialización donde a través de productos frescos se preparan alimentos enlatados, congelados y en este caso hortalizas empacadas en diversas presentaciones tal como las ensaladas ya listas para servir.

2.3. Requerimientos nutricionales de la lechuga.

En la figura 1, se presentan los requerimientos nutricionales del cultivo de la lechuga con respecto en cada macroelemento mineral, en este caso es el nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K). El nutriente que más absorben las plantas de lechuga es el K, seguido de N y P, respectivamente (Bertsch, 2009).

Figura 1. Requerimientos de nitrógeno, fósforo y potasio del cultivo de lechuga absorbidos en forma total y por cosecha.



Fuente: Bertsch (2009).

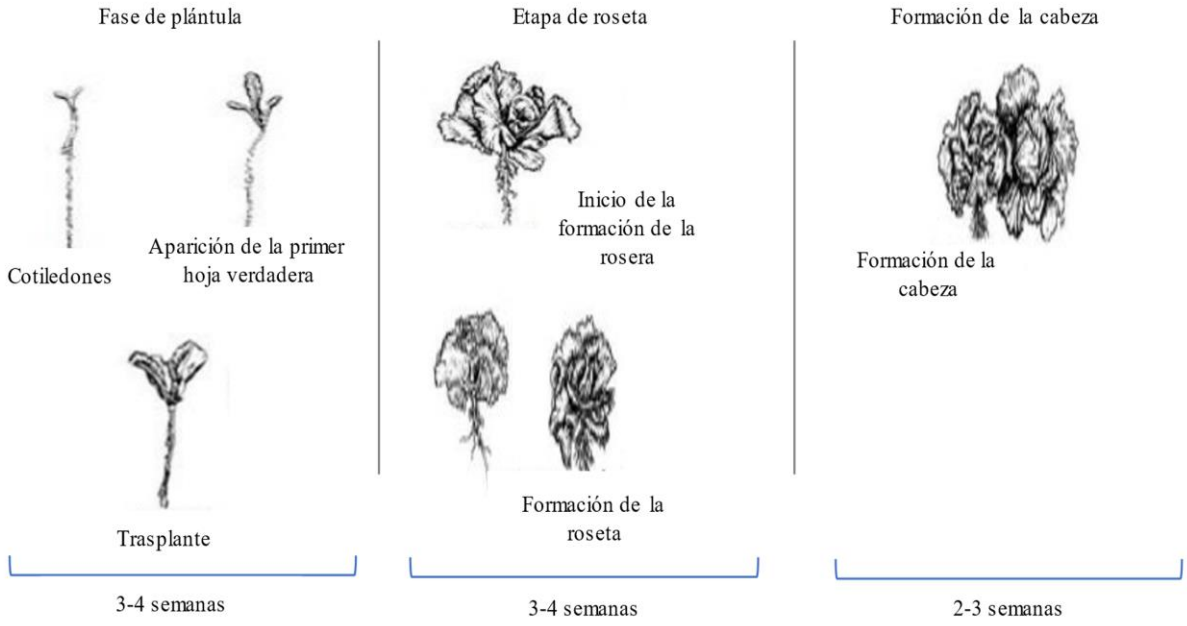
2.4. Morfología de la planta.

La lechuga es una planta herbácea y anual. Su órgano comestible son sus hojas, las cuales son glabras, brillantes, de color verde o rojo según la variedad. El sistema radical está compuesto por una raíz principal poco profunda que se caracteriza por su rápido crecimiento, las raíces laterales son horizontales. El tallo es corto de forma cilíndrica, aplastado (Carrasco y Sandoval, 2016). Las hojas se disponen en espiral formando roseta o un cogollo o cabeza. Son hojas simples (sin folíolos), sésiles, con láminas lisas, anchas. La inflorescencia de esta especie consta de 15 a 25 flores cada una. La flor se compone de androceo de 5 estambres unidos por las anteras formando un tubo que rodea el estilo. Es una flor autógama con alrededor de hasta un 3% de polinización cruzada (Carrasco y Sandoval, 2016).

2.5. Fenología del cultivo.

Fase de plántula: se da la aparición de la radícula y la emergencia de los cotiledones, seguidamente un crecimiento radicular en profundidad y luego la aparición de 3 a 4 hojas verdaderas, esta fase comprende una duración de entre 3 y 4 semanas. Fase de roseta: se da la aparición de nuevas hojas y una disminución en la relación largo-ancho de folíolos, se produce un acortamiento de los peciolos y finalmente la formación de una roseta con 12 a 14 hojas, la duración de esta fase varía de 3 a 4 semanas. Fase de formación de la cabeza: las hojas se vuelven más anchas que largas y toman cierta curvatura por el eje de la nervadura central, con lo que las nuevas hojas quedan envueltas por las formadas anteriormente, la duración de esta fase va de 2 a 3 semanas. Fase de floración: la cabeza pierde calidad, las hojas toman un sabor amargo y se alargan y el tallo comienza a alongarse y posteriormente se da la emisión de las inflorescencias (Vásquez, 2015).

Figura 2. Ciclo fenológico del cultivo de lechuga en sus fases de crecimiento.



Fuente: Valverde (2013).

2.6. Enfermedades en el cultivo.

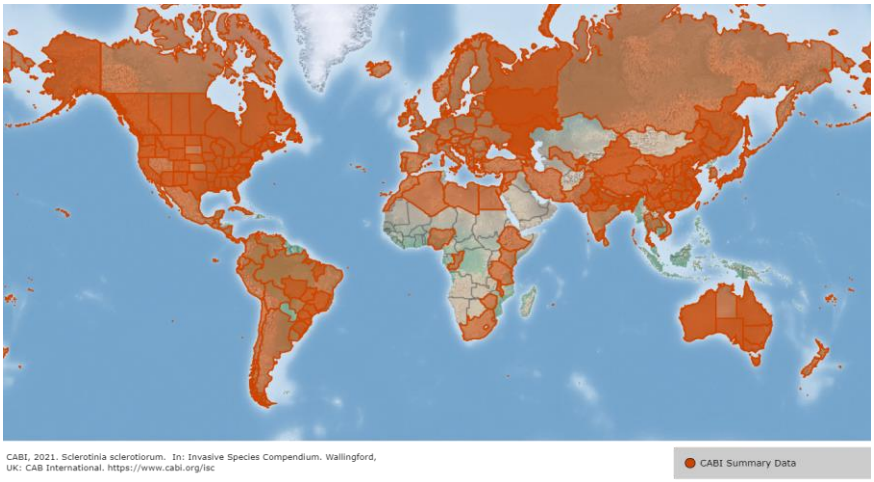
Dentro de las principales enfermedades que afectan el cultivo de lechuga se encuentran: el mal de talluelo (*Pythium* sp.), moho blanco (*S. sclerotiorum*), moho gris (*Botrytis cinerea*), mildiú velloso (*Bremia lactucae*) y tizón (*Alternaria alternata*), las cuales afectan tanto la calidad como la cantidad de la producción de este cultivo (McDougall, 2015).

2.7. El moho blanco *(S. sclerotiorum)*.

2.7.1. Importancia económica.

El moho blanco causado por *S. sclerotiorum,* es considerada una de las más importantes enfermedades en la producción de hortalizas debido a su distribución cosmopolita, gran número de especies vegetales afectadas (500), formación de estructuras de sobrevivencia (esclerocios) y su difícil manejo (O'Sullivan *et al.*, 2021; Saharan & Mehta, 2008). Dentro de los síntomas que provoca, están las lesiones en las hojas y tallos de las plantas, colapso del sistema vascular, muerte celular de los tejidos afectados y desintegración de los tejidos, producto de la acción enzimática. Los daños causados por este fitopatógeno representan una reducción del 20 al 35% de la producción (O'Sullivan *et al.*, 2021). Esta especie se ha logrado distribuir a lo largo del continente americano, y otros países alrededor del mundo (Figura 3).

Figura 3. Mapa de distribución de *S. sclerotiorum*.



Fuente: CABI, (2021).

La Figura 3, Mapa de distribución de *S. sclerotiorum*, representa diferentes estados del patógeno a nivel mundial que son: el grado de origen, invasión y distribución. Estos a su vez forman un conjunto de datos que se presentan por los diferentes tonos en naranja, donde el tono más oscuro representa un mayor nivel de incidencia de los diferentes estados del patógeno en estudio.

2.7.2. Clasificación taxonómica.

Según la base de datos especializada en hongos Index Fungorum (2021) la clasificación taxonómica de *S. sclerotiorum* es la siguiente:

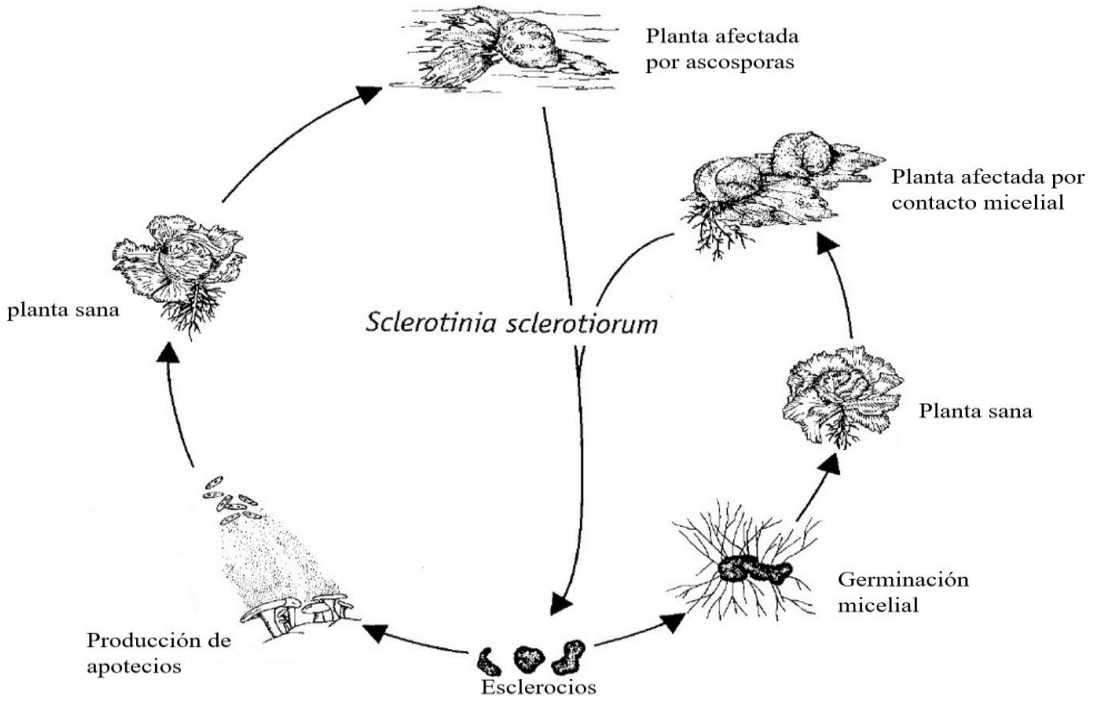
Taxonomía

- Phylum: Ascomycota.
- Clase: Leotiomycetes.
- Orden: Helotiales
- Familia: Sclerotiniaceae.
- Género: *Sclerotinia*
- Especie: *S. sclerotiorum*

2.7.3. Ciclo de vida del moho blanco.

En la figura 4, se representa el ciclo de vida de *S. sclerotiorum* en el cultivo de lechuga. Los esclerocios formados en la cosecha anterior, al contar con condiciones óptimas, pueden germinar produciendo hifas para invadir nuevas plantas por contacto, salpique de la lluvia o riego por aspersión. Así mismo en la fase sexual pueden producir apotecios, los cuales están llenos de ascas con ascosporas; estas últimas por medio del viento o corrientes de aire pueden ser dispersadas y alcanzar tejidos sanos y establecerse en ellos, originando abundante micelio blanco. Luego, esto puede dar origen a los apotecios sobre los esclerocios maduros.

Figura 4. Ciclo de vida de *S. sclerotiorum* en el cultivo de lechuga.

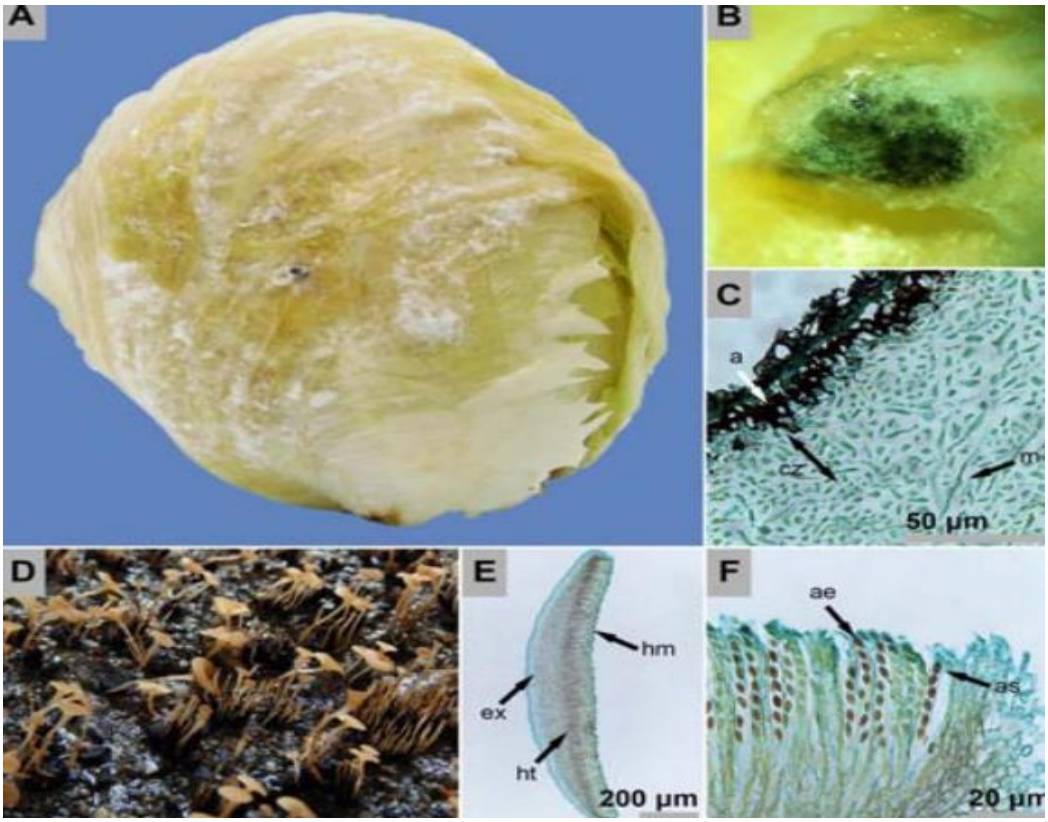


Fuente: Subbarao (1998).

2.7.4. Sintomatología del moho blanco.

Los principales síntomas de esta enfermedad son manchas rojas con irregularidad, marchitamiento y consistencia acuosa. Las condiciones que favorecen el desarrollo de este patógeno son principalmente de alta humedad, ya que le permiten extenderse y desarrollar un micelio blanco donde se encuentran los cuerpos de resistencia. El marchitamiento se debe al ingreso radicular de los esclerocios que ocasiona un colapso en el sistema vascular de la planta (Geabicoski, 2012).

Figura 5. Sintomatología y signos del moho blanco en el cultivo de lechuga. A). cuerpos de resistencia, micelio algodonoso de color blanco; B). esclerocios en formación; C). Sección transversal del esclerocio; D). Apotecios germinados; E). Sección longitudinal de apotecio; F). Ascas y ascosporas.



Fuente: Robledo, Aguirre y Castaño (2019).

2.8. Control biológico de *S. sclerotiorum*.

La función de un agente de control biológico se describe por el mecanismo que regula el crecimiento y desarrollo de los patógenos. El mecanismo de acción que ejerce este organismo sobre la planta hospedante se basa en espacio, disponibilidad de nutrientes, antibiosis y parasitismo. También se caracteriza por la secreción de enzimas y compuestos inhibidores, que promueven la defensa fisiológica y bioquímica en las plantas (Martínez, Infante y Reyes, 2013).

2.8.1. *Trichoderma* spp.

Brenes, Zúñiga, Villalobos, Zúñiga & Rivera. (2019), describen a este hongo como un organismo capaz de desarrollarse en el suelo de forma natural creando interacciones en la rizosfera, tiene capacidad antagónica sobre el desarrollo de otros organismos, estimula el crecimiento de la planta y desarrollo radicular mediante mecanismos de defensa y usa eficazmente los micronutrientes disponibles en el suelo. Este hongo supresor de enfermedades es uno de los organismos de mayor uso en la agricultura. Tiene diversos mecanismos de acción contra patógenos dependiendo de la especie, entre las especies más utilizadas están *T. virens, T. viride y T. harzianum* (Medina, 2016). El proceso de reproducción del hongo *Trichoderma* es por la vía asexual. García, García, Mamani, Chávez & Álvarez (2016) detallan que en la etapa inicial se da un desarrollo de estructuras aterciopeladas en color blanco y conforme comienza a desarrollarse el micelio la apariencia torna a un color verdoso formando anillos concéntricos. Los conidios propios de esta fase de reproducción asexual presentan hifas septadas en forma vegetativa, con tamaños entre los 3 a 5 µm de diámetro que pueden ser ovalados, unicelulares y verdes (Madloo, Rodríguez, Ramos y Lema, 2018). Se puede destacar que, tanto a nivel productivo como en investigación, el manejo de *S. sclerotiorum* y otras especies es amplio (Hernán, Gómez y Garcés, 2015). Zubieta, Echeverry & Zafra (2019), detallan que mediante pruebas *in vitro* donde se trata de evaluar la capacidad antagónica de este hongo contra dicho patógeno, la técnica de cultivos duales arroja resultados efectivos, se evidencia una tasa de inhibición de hasta un 95.6% y casi nula formación de esclerocios. Amerio, Castrillo, Bich, Zapata y Villalba (2020), evidencian como esta y otras investigaciones se vuelven el pilar y centralización de las futuras investigaciones y cómo la aplicación de estos agentes de control biológico contribuye a una economía más sostenible.

2.8.2. *Clonostachys rosea*.

Clonostachys rosea es un micoparásito que penetra y destruye los hongos patógenos, anteriormente se le conocía como *Gliocladium roseum*. Fue descrito por primera vez en 1907 por Bainier, diferencias en su morfología, ecología y secuencia del ADN influyeron en los cambios de su clasificación (Moreira, Franca, Borges & Mafia, 2014).

Moreira *et al*. (2014), hacen referencia que este organismo al formar las colonias de conidios llega a tomar colores blanco, naranja y rosa de ahí nace la particularidad en nombrar a esta especie *C. rosea.* Otra característica es la capacidad de dispersión y antagónica sobre fitopatógenos como *S. sclerotiorum.* El mecanismo de acción de este patógeno se basa en la secreción de CWDE, la cual está conformada por quitinasa, glucanasa y proteasas. La función de la quitinasa es degradar los enlaces 1,4-β-glicosídico de la pared celular, al romper estos enlaces las paredes celulares de los patógenos se destruyen. La función que cumplen las proteasas es romper los enlaces peptídicos por medio de la hidrolización (Musiet, 2015). Otro mecanismo utilizado por este biocontrolador es la producción de enzimas y metabolitos secundarios, que funcionan como antibióticos y toxinas con efectos negativos para los patógenos (Sun, Li, Ren, Xu, Sun, 2020). Rodríguez, Cabrera, Gozzo, Eberlin & Godeas (2011), mencionan que mediante pruebas *in vitro* en cultivos duales de *C. rosea* contra *S. sclerotiorum*, se observa inhibición en el crecimiento radial del patógeno de hasta un 25%, debido a la actividad micoparasítica del antagonista. El mismo detalla que este agente de control biológico posee un amplio potencial y ha mostrado un rendimiento significativo en el manejo de *S. sclerotiorum* (Rodríguez *et al*., 2011), por lo que en la metodología aplicada se buscó determinar una vez más el potencial biológico que posee *C. rosea* ante el manejo de enfermedades.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

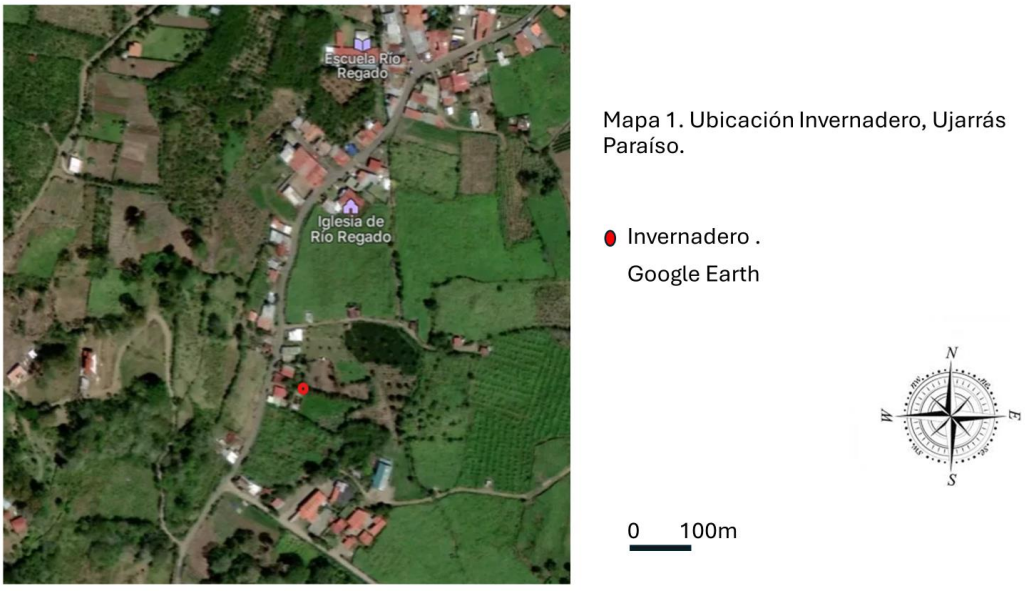
3.1. Localización del estudio.

La presente investigación consistió en dos etapas; una en condiciones *in vitro* y otra en condiciones de ambiente protegido.

a. El aislamiento del fitopatógeno y las pruebas de antagonismo *in vitro* con los hongos antagonistas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, Costa Rica (UNA).

b. La parte de la investigación correspondiente a las pruebas *in vivo*, se realizó en la localidad de Ujarrás, Paraíso de Cartago (Figura 6). Este lugar se encuentra entre las coordenadas 9.83333 latitud norte y -83.83333″longitud oeste; a una altitud de 1084 msnm. Presenta una precipitación promedio anual de 211 mm, con una temperatura promedio anual de 29°C, una humedad relativa de 84% y una velocidad del viento de 10 km/h (Instituto Meteorológico Nacional [IMN], 2024).

Figura 6. Mapa de ubicación del invernadero, Ujarrás Paraíso, Cartago.



Fuente: Google Earth (s.f.).

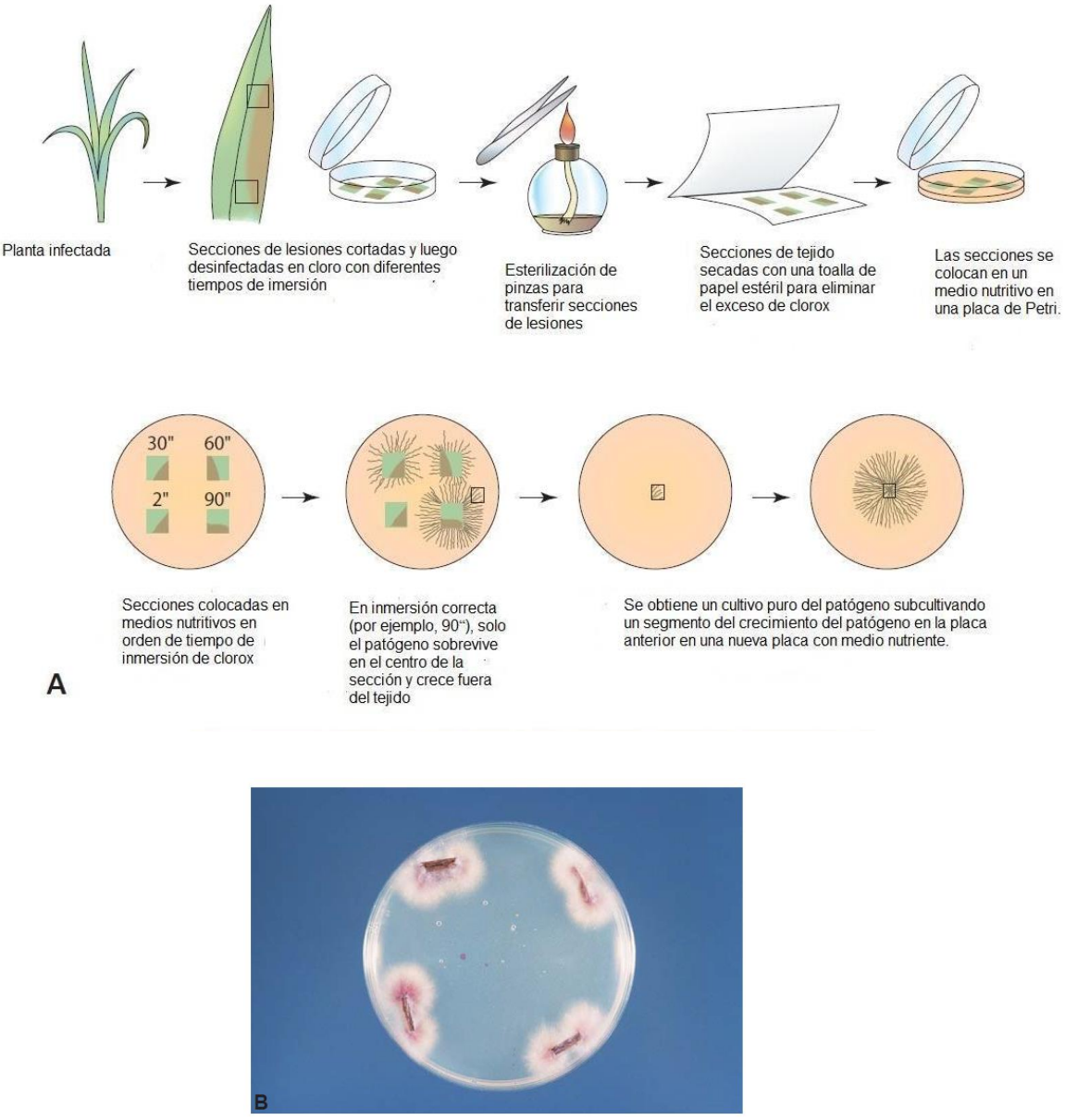
3.2. Experimento en condiciones *in vitro*.

3.2.1. Aislamiento de *S. sclerotiorum*.

Se realizó un muestreo de manera dirigida en una finca ubicada en Zarcero, Alajuela, dedicada a la producción de hortalizas entre estas la lechuga con antecedentes de la enfermedad, donde se han observado plantas afectadas con moho blanco. Se extrajeron cinco plantas enteras con síntomas externos en las hojas, tales como: necrosis y moho blanco, las cuales se colocaron en papel servilleta húmeda, y se introdujeron en bolsas plásticas para ser guardadas en una hielera y ser transportadas al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional, lugar donde se realizaron los aislamientos como se describe a continuación. Se tomaron los esclerocios contenidos en la muestra, se lavaron con agua destilada estéril para su respectiva inoculación. Cada estructura se sometió a un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio (NaCl) al 1,0% por 60 segundos, posteriormente se hicieron tres lavados con agua destilada estéril por 60 segundos y finalmente se depositaron en papel toalla estéril para su secado (Figura 7).

Finalizado el proceso de desinfección, se tomaron los esclerocios para ser colocados en platos Petri con 20 ml de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Todos los platos Petri se sellaron utilizando Parafilm y se colocaron en incubación por un periodo de cuatro días a una temperatura de 25°C (Prajapati *et al*., 2020). Este proceso se realizó según Agrios (2005), donde se realizó el aislamiento del fitopatógeno usando como material de inoculación los esclerocios contenidos en las muestras.

Figura 7. (A) Proceso de desinfección de muestras para el aislamiento de patógenos a partir de tejido vegetal. (B) Ejemplo de distribución equidistante de los esclerocios en platos de PDA.



Fuente: Agrios (2005).

3.2.2. Obtención de los hongos biocontroladores.

Para la elaboración de pruebas *in vitro* e invernadero, los biocontroladores de la cepa de *Trichoderma asperellum* y *Clonostachys rosea* se obtuvieron en Laboratorios Dr. Obregón, la cepa de *Trichoderma harzianum* se obtuvo en Seracsa quien distribuye productos de Humitec y por otra parte la cepa de *Trichoderma longibrachiatum* se obtuvo por medio de un productor que lo utiliza para el manejo de enfermedades en hortalizas. La dosis aplicada en el ensayo se basó en las recomendaciones y ficha técnica de cada producto.

3.2.3. Evaluación de antagonistas en pruebas *in vitro.*

La evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* se efectuó por medio de la técnica de cultivos duales. Esta técnica consiste en colocar en un extremo del plato Petri con 20 ml de medio PDA un disco de 5,0 mm de diámetro de medio de cultivo conteniendo el antagonista (*Clonostachys rosea*, *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*) y en el otro extremo de la caja un disco igual al anterior, pero en este caso con el fitopatógeno, como se aprecia en la figura 8 (Singh & Sati, 2020). Las placas fueron incubadas a (26 ± 2ºC) en condiciones de oscuridad hasta que se desarrollaron colonias fúngicas.

3.2.4. Diseño experimental.

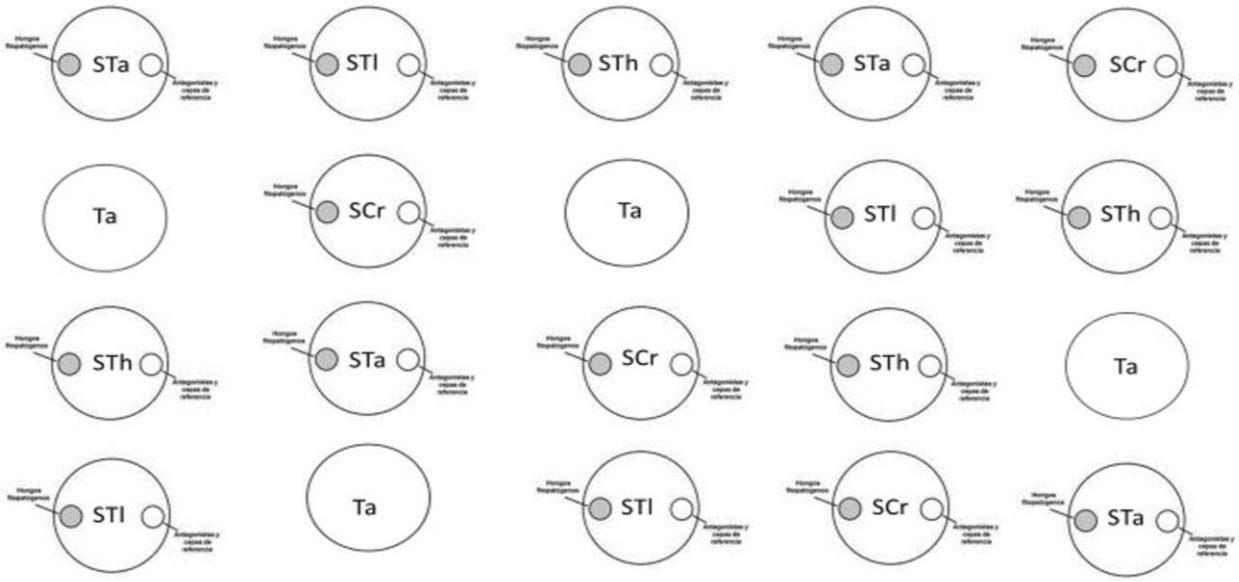
Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones por tratamiento (cada uno de los aislamientos de antagonistas) y un testigo absoluto del patógeno sin antagonista (Tabla 1).

La unidad experimental consistió en una caja de Petri de 9,0 cm de diámetro. Una vez realizado el método de cultivo dual (Figura 9) en las cajas Petri, se sellaron con Parafilm y se dejaron en incubación en condiciones ambientales (26 ± 2 ºC) con una distribución completamente al azar (Figura 8).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos en las pruebas *in vitro*.

Tratamientos	Código	Repeticiones
S. sclerotiorum + *T. asperellum*	STa	4
S. sclerotiorum + *T. harzianum*	STh	4
S. sclerotiorum + *T. longibrachiatum*	STl	4
S. sclerotiorum + *C. rosea*	SCr	4
S. Sclerotiorum (testigo absoluto)	Ta	4

Figura 8. Croquis de la disposición de cultivos duales en cajas Petri, con el aislamiento de antagonistas y testigo en un diseño experimental completamente al azar (DCA).



3.2.5. Variables por evaluar en las pruebas de antagonismo.

Se analizaron los principales tipos de antagonismo de acuerdo con lo propuesto por Ríos-Velasco *et al*. (2016), estos son: a) competencia por sustrato que comprende: el tipo de antagonismo de acuerdo con la escala de Bell (Bell, Well & Markham, 1982), el tiempo en el cual las colonias patógeno-antagonista entraron en contacto, y el crecimiento radial. Y, la inhibición del crecimiento radial de la colonia formada por el fitopatógeno y b) evaluación del efecto antibiótico mediante el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC).

3.2.5.1. Evaluación de la competencia por sustrato.

Dentro de las variables evaluadas para determinar la competencia por sustrato se midió lo siguiente:

a. Ubicación en la escala de clases de cinco grados planteada por Bell *et al.* (1982). Esta escala consta de cinco clases; en la clase uno el antagonista llega a ocupar completamente la superficie del medio de cultivo, en la clase dos el antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo. En la clase tres el antagonista y el patógeno coloniza cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ningún organismo parece dominar al otro, en la clase cuatro el patógeno crece (sobrepasa) tres cuartas partes de la caja Petri y en clase cinco el fitopatógeno llega a cubrir totalmente el plato Petri. Esto con el fin de determinar cuál hongo antagoniza más eficientemente al fitopatógeno. La observación para determinar la competencia por sustrato se realizó siete días después de cultivados los platos.

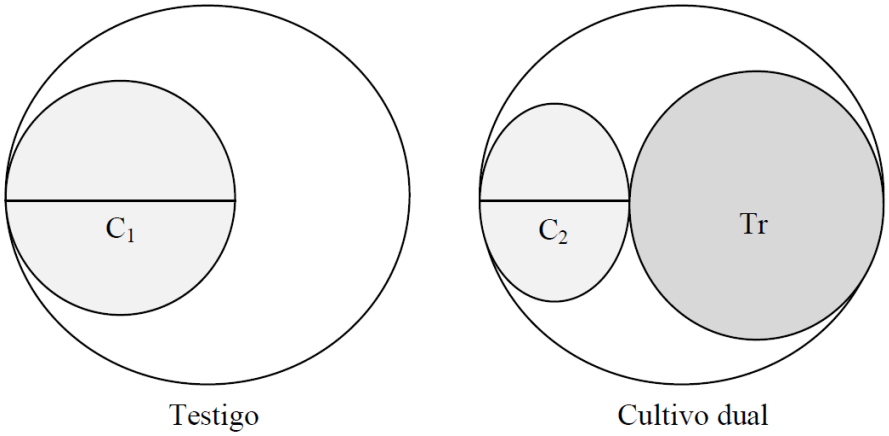
b. Lapso (número de días) en el cual las cepas de antagonista y fitopatógeno entran en contacto.

c. Crecimiento radial de las cepas de los biocontroladores, expresado en centímetros (cm) para determinar el grado de colonización y crecimiento de estas. La medición del crecimiento radial se realizó a los cuatro días.

3.2.5.2. Evaluación del efecto antibiótico.

Para la comprobación del efecto antibiótico se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC): Este se calculó mediante la fórmula utilizada por Singh & Sati (2020) y; Calvo, Rivera, Orozco y Orozco (2012), donde PIC= [(C1-C2) /C1]×100, siendo Cl el crecimiento radial del testigo y C2 el crecimiento radial del patógeno en los tratamientos de cultivo dual (Figura 8). El PIC fue evaluado a los siete días.

Figura 9. Método de cultivo dual para la evaluación del efecto antibiótico. C1: crecimiento radial del testigo, C2 el crecimiento radial del patógeno en el cultivo dual, Tr: *Trichoderma* sp.



Fuente: Calvo *et al*. (2012).

3.2.6. Análisis estadístico.

Los resultados de PIC, lapso y crecimiento radial se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y comparación de medias de Tukey para determinar diferencias significativas entre tratamientos. La variable del tipo de antagonismo de acuerdo con la escala de Bell se analizó mediante una distribución de frecuencias.

3.3. Experimento en condiciones en invernadero.

3.3.1. Caracterización física y química del suelo.

El suelo que se utilizó en la presente investigación se recolectó de la parcela de cultivos anuales de la Finca Experimental Santa Lucía, ubicada en Santa Lucía de Barva, Heredia. Se colectaron aproximadamente 25 muestras de suelo de 10 Kg cada una a una profundidad de 20 cm, las muestras colectadas se homogeneizaron y se tomó una submuestra de un Kg para el respectivo análisis químico, esta fue enviada al Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

El suelo utilizado presentó las siguientes características (Figura 10), un pH superior al 5,5%, por lo tanto, no existen probabilidades que el aluminio se encuentre soluble; esto se comprueba con la acidez extraíble o intercambiable, menor de 0,5 cmol (+) /L y el bajo porcentaje de saturación de acidez (2%). Las bases intercambiables y la CICE se encuentran en la categoría media, las relaciones de bases muestran que la relación Ca/Mg se encuentra por encima del rango considerado adecuado (2-5), las relaciones Ca/K, Mg/K y Ca+Mg/K están en el rango considerado adecuado, el P se encuentra en una categoría media (mayor de 10 mg/L), el Cu y Mn están en una categoría media y el Fe en una categoría alta. El N del análisis de suelo no es un indicador de la disponibilidad de nitrógeno (N), su relación C: N se encuentra dentro del rango de 10:1 - 12:1, considerado como adecuado.

Figura 10. Caracterización del suelo utilizado en el ensayo.

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS													
Solución Extractora:		pH	cmol(+)/L					%	mg/L				
KCl-Olsen Modificado		**H2O**	**ACIDEZ**	**Ca**	**Mg**	**K**	**CICE**	**SA**	**P**	**Zn**	**Cu**	**Fe**	**Mn**
ID USUARIO	**ID LAB**	**5.5**	**0.5**	**4**	**1**	**0,2**	**5**		**10**	**3**	**1**	**10**	**5**
MUESTRA UNICA	S-22-06997	5.7	0.14	6.87	1.27	0.50	8.78	2	13	2.4	6	103	9

Fuente: CIA, 2022.

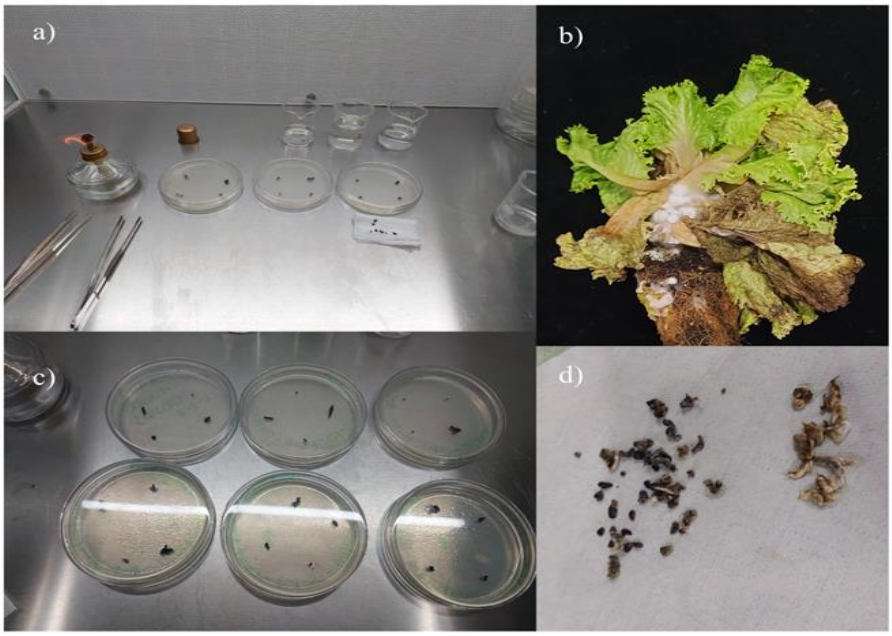
Este suelo fue tamizado (tamiz de 2,0 mm) y posteriormente se sometió a un proceso de esterilización con vapor saturado a una presión de 121°C y 1 atm por un periodo de 30 minutos (Vitorino *et al.*, 2020). Lo anterior, para eliminar cualquier microorganismo fitopatógeno presente en el suelo que pudiera afectar los resultados del experimento (Figura 11).

Figura 11. Proceso de esterilización del suelo con vapor saturado para los tratamientos aplicados en invernadero.

3.3.2. Preparación del inóculo.

Se utilizaron muestras de lechuga con *S. sclerotiorum* obtenidos en las pruebas de antagonismo *in vitro* para hacer una reproducción de estructuras, se seleccionaron los esclerocios contenidos en la muestra, se sometieron a un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,0% por 60 segundos, posteriormente se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril por 60 segundos y finalmente se depositaron en papel toalla estéril para su secado (figura 12), una vez finalizado el proceso de desinfección se tomaron los esclerocios en platos Petri con 20 ml de PDA. Los platos se sellaron con Parafilm y se colocaron en incubación por un periodo de 7 días a una temperatura de 25°C según Agrios (2005).

Figura 12. Aislamiento del hongo fitopatógeno *S. sclerotiorum.* a). inoculación de *S. sclerotiorum* en medio PDA, b). muestra obtenida en campo. C). patógeno aislado, d). esclerocios para su inoculación.



3.3.3. Establecimiento del proyecto en invernadero.

Se acondicionó un invernadero en la zona de Ujarrás en Paraíso de Cartago, el cual implementó riego manual separado por dos tiempos de aplicación, un riego a las 5:00 am y el segundo riego a las 6:30 pm; para una descarga total de 0,4 L/ m^2 al día. Se establecieron 4 repeticiones por tratamiento, lo cual corresponde a 4 macetas por cada tratamiento. Los tratamientos por evaluar fueron los siguientes (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los tratamientos a utilizar.

Tratamientos	Código	No. de repeticiones
S. sclerotiorum + *T. asperellum*	Ta	4
S. sclerotiorum + *T. harzianum*	Th	4

S. sclerotiorum + *T. longibrachiatum*	Tl	4
S. sclerotiorum + *C. rosea*	Tc	4
S. sclerotiorum+ testigo comercial benomil	St	4
S. sclerotiorum sin aplicación	Sa	4
Testigo absoluto sin inoculación	Si	4
Total		28

Figura 13. Establecimiento de ensayo en invernadero, Ujarrás en Paraíso de Cartago.

3.3.4. Inoculación del patógeno y aplicación de los tratamientos.

Se depositaron 2.0Kg de suelo estéril en macetas (N°1200), estas se humedecieron hasta que el suelo alcanzó su capacidad de campo, 5 horas después se realizó la inoculación del

patógeno. La inoculación se realizó utilizando micelio obtenido en el proceso antes mencionado, se colocó el inoculo en diferentes puntos del suelo contenido en la maceta

Veinticuatro horas después se sembró una plántula de lechuga (obtenida en Almácigos Villalta de la variedad Lechuga América BG) por macetera, realizando previamente un hoyo de aproximadamente 5,0 cm de profundidad. El benomil (Afungil 50 WP de Seracsa) y los hongos biocontroladores se inocularon al suelo 2 días después del trasplante. La aplicación de los biocontroladores fue en una suspensión de 10 ml de la concentración comercial (2×10^7 UFC·ml^{-1}). La dosificación del fungicida comercial (benomil) se empleó de acuerdo con las recomendaciones generales de la ficha técnica del producto, el cual es de 600 g· ha^{-1}.

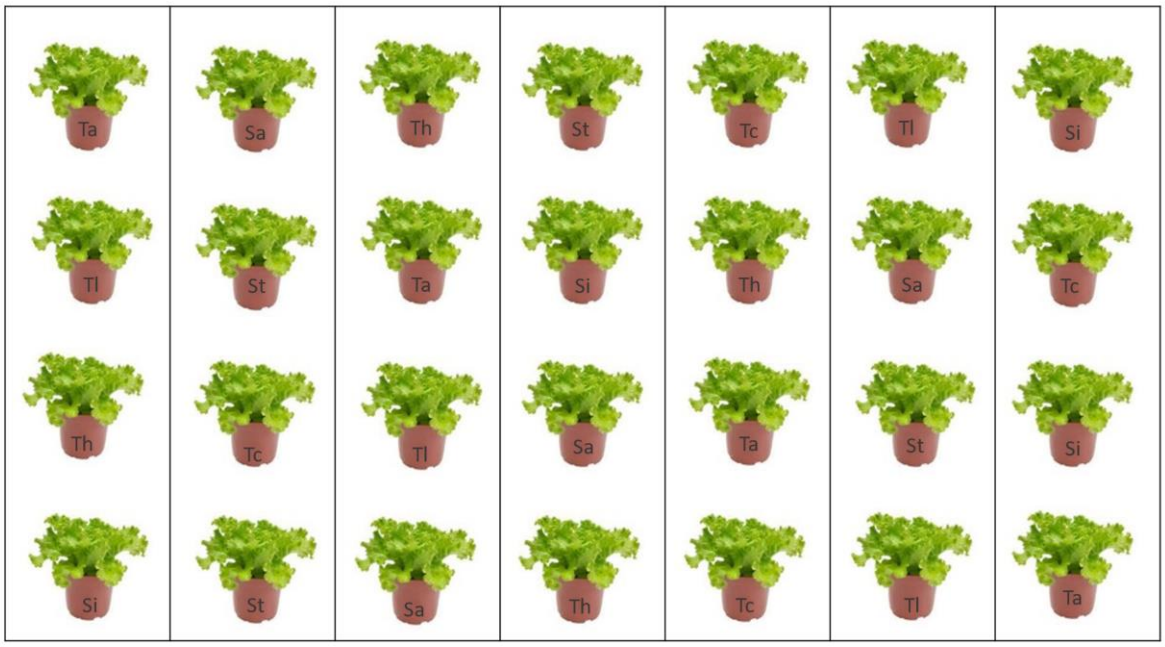
3.3.5. Manejo agronómico del cultivo.

Para la fertilización se siguieron las recomendaciones planteadas por Richmond (2015) donde la aplicación de minerales fue a través de una solución nutritiva mediante un sistema de riego por aspersión al suelo y vía foliar. Se realizaron 2 riegos separados para una descarga de 0,4 L por metro cuadrado por día. La concentración de nutrimentos expresada en partes por millón (ppm) aplicada durante el ciclo del cultivo fue de 195,27 de nitrógeno, 56,51 de fósforo, 280,79 de potasio, 143,16 de calcio, 52,43 de magnesio, 71,05 de azufre, 1,05 de hierro, 0,01 de manganeso, 0,05 de boro, 0,05 de zinc, 0,004 de cobre, 0,004 de molibdeno y 0,001 de cobalto. Además, se aplicó calcio vía foliar a la dosis recomendada a los diez días después del trasplante (ddt) y a los 18 ddt.

3.3.6. Diseño experimental.

La unidad experimental se conformó por una maceta de 2,0 L sembrada con una planta de lechuga c.v Great Lake. Se utilizó un diseño completo al azar (DCA) como se observa en la figura 14.

Figura 14. Croquis de la disposición de las macetas con plantas de lechuga mediante un diseño completamente al azar (DCA).



3.3.7. Variables para evaluar.

Se evaluó la incidencia de la enfermedad, severidad de la enfermedad, peso fresco y seco de la parte aérea y radical en las cuatro repeticiones por tratamiento.

3.3.7.1. Incidencia.

La incidencia de la enfermedad expresada en porcentaje (%) se evaluó mediante la observación de los síntomas mostrados por las plantas de lechuga inoculadas con el patógeno, se calculó como el número de plantas enfermas que presentaron los síntomas característicos de la pudrición del cogollo, expresado como porcentaje, según lo indicado en la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Total, de plantas evaluadas}} \times 100$$

3.3.7.2. Severidad.

La severidad de la enfermedad se evaluó en plantas individuales utilizando una escala visual de siete grados (Tabla 3) de acuerdo con la metodología de Romero (2015).

Tabla 3. Escala visual de severidad para la evaluación de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero.

Grado	Descripción
1	Sin síntomas visibles (planta sana)
2	<5% Síntoma inicial (caída de hojas basales)
3	5-25% de síntomas (marchitamiento de la planta)
4	25-50% de síntomas (pudrición acuosa)
5	50-70% de síntomas (pudrición + micelio)
6	70-80% de síntomas (con formación de esclerocios)
7	>80% de síntomas (muerte de la planta "esclerocios maduros")

Fuente: Romero (2015).

3.3.7.3. Desarrollo de la planta.

Las variables que se mencionan a continuación se evaluaron a los 45 ddt.

Peso fresco de la raíz y parte aérea (g): Se procedió a separar la parte área y el sistema radicular de la planta. Las raíces fueron lavadas con agua corriente y posterior a eso se pesaron de manera individual con una balanza mecánica.

Peso seco de la raíz y parte aérea (g): el sistema radicular previamente lavado y la parte aérea de las plantas se sometieron a un proceso de secado en una estufa a una temperatura de 60°C por un lapso de tres días y se pesaron posteriormente en una balanza granataria.

3.3.8. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las variables de respuesta estudiadas (incidencia, peso fresco y seco de la parte aérea de la planta, peso fresco y seco de la raíz), se realizó un análisis de varianza (ANDEVA). Para analizar el porcentaje de severidad que es otra de las variables analizadas se realizó un análisis de distribución de frecuencias.

El modelo lineal para el experimento unifactorial será el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ijk}$$

$$con: i = 1 \dots 4, \qquad j = 1 \dots 7$$

Con

Y_{ijk}: variable de respuesta del i-ésimo tratamiento, j-ésimo tiempo de evaluación y la k-ésima repetición.

μ: media general

α_i: efecto de la i-ésimo tratamiento.

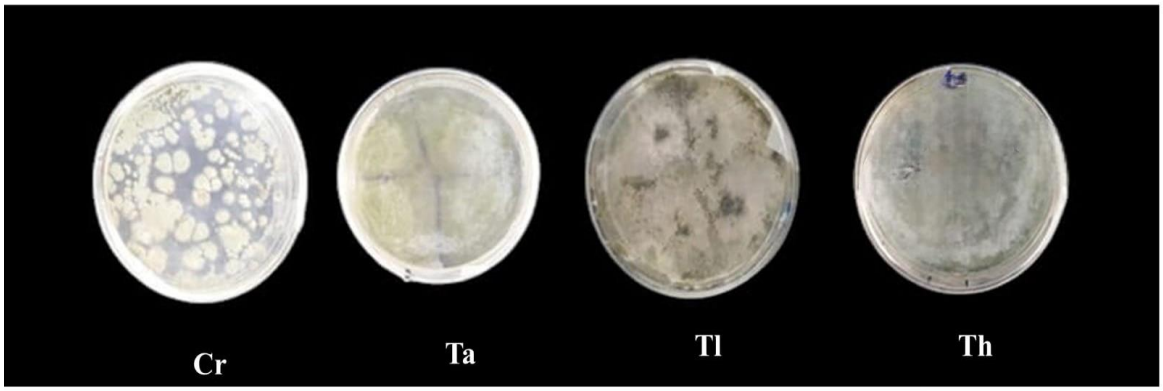
ε_{ijk}: término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de antagonistas en pruebas *in vitro.*

Para la evaluación *in vitro* de antagonistas se hizo la selección de los géneros *Trichoderma* spp. de diferentes especies y *Clonostachys rosea* (Figura 15). Los hongos del género *Trichoderma* son de los antagonistas más utilizados, ya que son fácilmente aislados y cultivados, además de tener un rápido crecimiento en diversidad de sustratos. Los mecanismos por los cuales las cepas del género *Trichoderma* antagonizan a patógenos son; por competición directa por espacio y nutrientes, por la producción de metabolitos antibióticos y parasitismo (Ezziyyani, Pérez, Sid, Requena &Candela, 2004).

Figura 15. Colonias puras de los biocontroladores en medio de cultivo PDA. Cr *(Clonostachys rosea),* Ta *(Trichoderma asperellum),* Tl *(Trichoderma longibrachiatum)* y Th *(Trichoderma harzianum).*

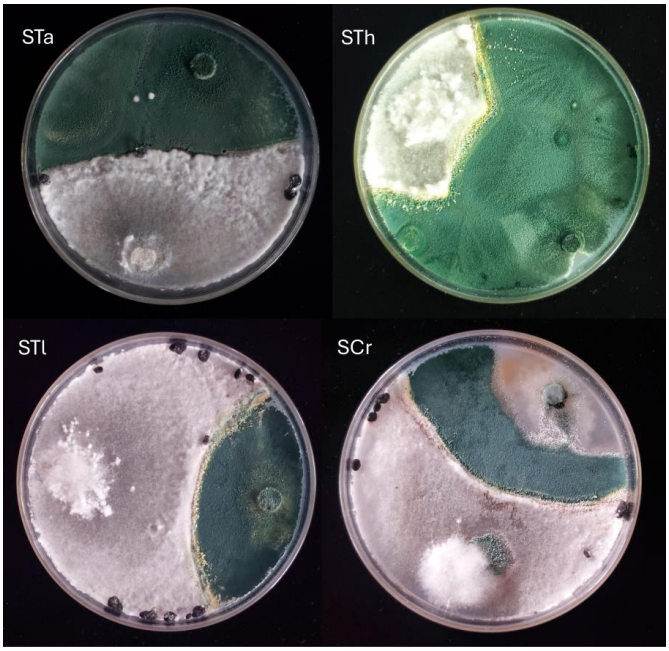


Por otra parte, el género *Clonostachys* forma parte de un grupo de hongos con diversos estilos de vida entre estos micoparásitos destructivos. Aunque es un género poco evaluado, existen estudios que citan a *C. rosea* parasitando patógenos de importancia económica (Belingheri, Mendel, Salinas & Trejos, 2024). Por lo que se consideran hongos que deben ser evaluados en el manejo de enfermedades en cultivos de importancia económica.

4.1.1. Evaluación de cultivos duales.

La evaluación de cultivos duales se utiliza para medir la competencia por sustrato y el grado de antibiosis que tienen los hongos biocontroladores en el manejo de diversos patógenos, con el fin de cuantificar la capacidad por competencia. Se toma en cuenta la escala de clases planteada por Bell, el lapso en que el antagonista y patógeno entran en contacto y el crecimiento radial con el fin de determinar el grado de colonización (Marín, Rivera, *et al*. 2017).

Figura 16. Evaluación de cultivos duales de diferentes tipos de hongos antagónicos en el manejo del hongo *S. sclerotiorum.* STa; *S. sclerotiorum* y *T. asperellum*, STh: *S. sclerotiorum* y *T. harzianum*, STl: *S. sclerotiorum* y T. *longibrachiatum*, SCr: *S. sclerotiorum* y *Clonostachys rosea.*



4.1.2. Evaluación de competencia por sustrato.

Para la evaluación de competencia por sustrato se utilizó la escala desarrollada por Bell *et al*. (1982). Calvo, *et al*. (2012) mencionan que es una de las metodologías más utilizadas por diversos autores; los resultados del grado de antagonismo derivados de la escala de clases confirman la capacidad antagónica por espacio y nutrientes de los tratamientos STa y STh, que se clasificaron en el grado II de la escala de Bell *et al.* (1982). Esto indica que las cepas de *T.*

asperellum y T. harzianum colonizaron dos terceras partes del medio del cultivo limitando el crecimiento de *S. sclerotiorum*, permitiendo colocarlos en la categoría de antagonistas. Por otro lado, los tratamientos STl y SCr (*T. longibrachiatum* y *C. rosea* respectivamente), se ubicaron en el grado III, indicando que no hubo efecto antagónico contra *S. sclerotiorum.*

Se determinó el tiempo de contacto entre las cepas de los antagonistas y el fitopatógeno. El tiempo en que un antagonista entra en contacto con el fitopatógeno demuestra el grado de agresividad del biocontrolador. Michel (2001) indica que entre menor sea dicho lapso, mayor será la agresividad antagonista. En este trabajo, en todos los casos el antagonista y el patógeno hicieron contacto inicial a los 3 días. Por lo anterior no hubo diferencias entre los tratamientos para esta variable. Osorio, *et al.* (2008), mencionan resultados similares en la evaluación de *Trichoderma* sp vs. *P. capsici*. Otros autores mencionan un contacto inicial entre antagonista y patógeno entre el día uno y tres (Arzate, et al. 2006; Hernández, 2008).

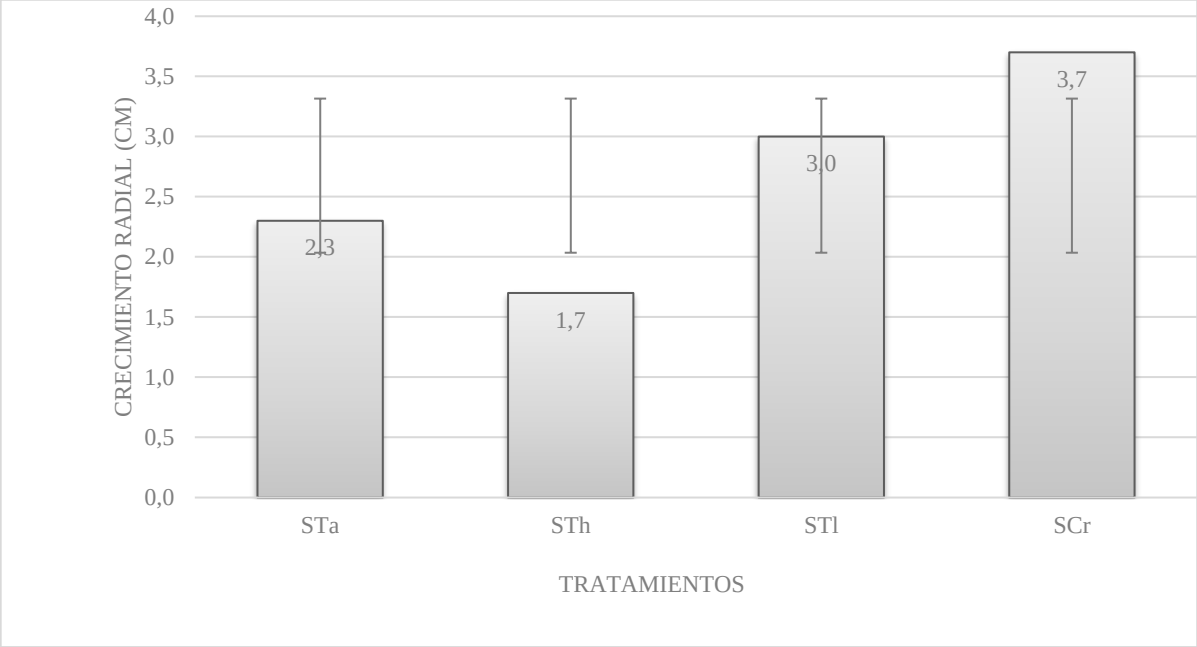
Sumado a lo anterior Tarazona (2009), Mattos y Torres (2024), mencionan el comportamiento de *Trichoderma* como un micoparásito pasivo, ya que el mismo una vez entrado en contacto con el suelo debe adaptarse a las condiciones ambientales para tener un comportamiento agresivo contra en fitopatógeno.

Flores, *et al.* (2015) mencionan que en la evaluación de actividad antagónica de *C. rosea* contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*, el resultado de inhibición y crecimiento micelial de *Clonostachys* fue de los más bajos y lentos, comportamiento observado en esta investigación. Los mismos autores atribuyen lo anterior a que el micoparasitismo de *C. rosea* es un proceso complejo e incluye un proceso de reconocimiento, penetración de la hifa, invasión y secreción de las enzimas hidrolíticas que propician la función de biocontrolador.

Con relación al crecimiento radial de los antagonistas se observó que el aislamiento SCr presentó el mayor crecimiento radial, con un crecimiento promedio de 3,7 cm, (Figura 17). El crecimiento radial de *C. rosea* presentó diferencias significativas (p=0,05) con respecto a los demás tratamientos. Esta cepa llegó a cubrir más de las dos terceras partes del plato Petri en 7 días, seguido del tratamiento STl, donde el hongo tuvo un crecimiento de 3,0 cm. Por lo que, según el ANDEVA, existen diferencias entre las medias de los tratamientos. El tratamiento STh

alcanzó un crecimiento de 1.7cm, teniendo un menor crecimiento radial en comparación con los otros antagonistas.

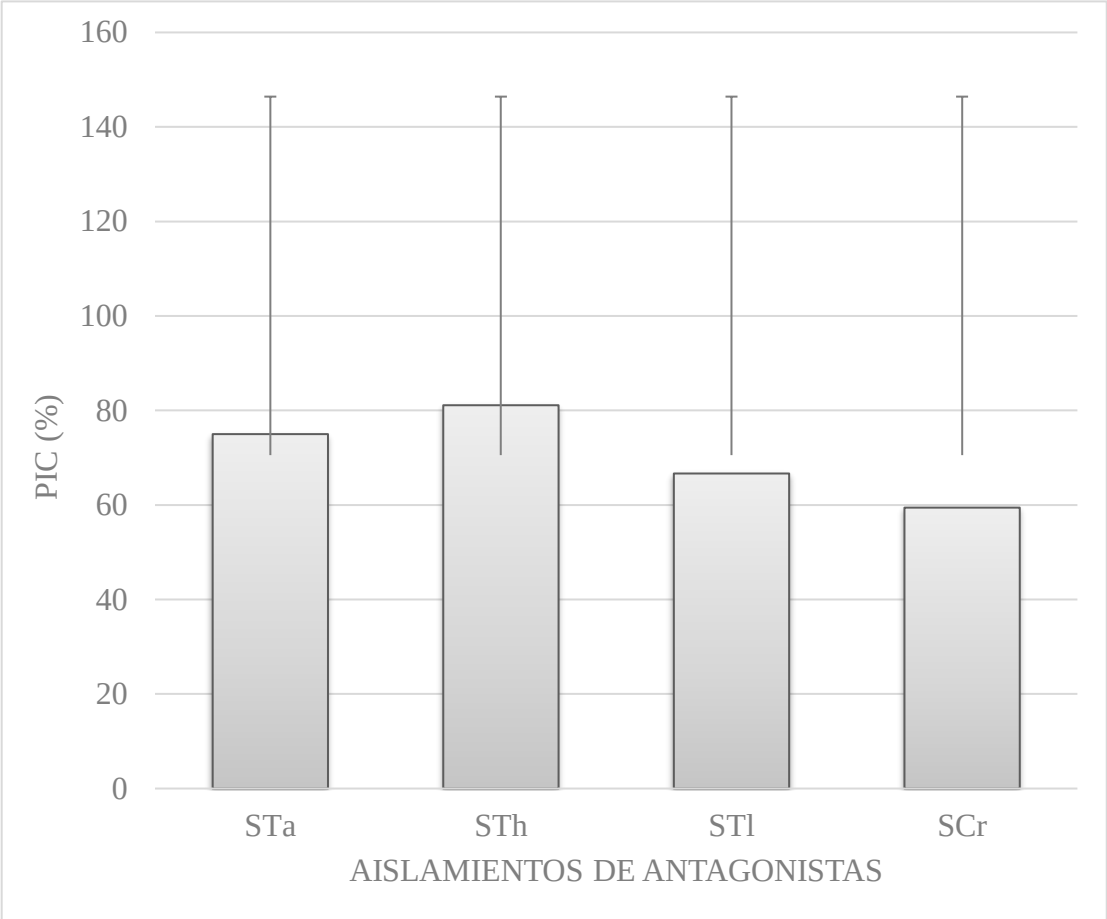
Figura 17. Crecimiento radial promedio (n=4) a los 7 días, de los antagonistas *T. asperellum* (STa), *T. harzianum* (STh), *T. longibrachiatum* (STl) y *C. rosea* (SCr) en las pruebas *in vitro*.



4.1.3. Evaluación del efecto antibiótico.

La capacidad antagónica de los tratamientos por antibiosis se expresó por medio del porcentaje de inhibición del crecimiento (%PIC). El tratamiento STh presentó los valores más altos de inhibición de crecimiento de *S. sclerotiorum* con un PIC de 81% (Figura 18), existiendo una diferencia significativa con respecto a los otros antagonistas evaluados (p=0,05). Los tratamientos de STa, STl y SCr se ubicaron en un rango del PIC de entre 55% y 75%.

Figura 18. Porcentaje de inhibición del crecimiento (% PIC) de *T. asperellum* (STa), *T. harzianum* (STh), *T. longibrachiatum* (STl) y *C. rosea* (SCr)



Rivera, *et al.* (2016) encontraron valores altos en el % del PIC de *S. cepivora* vrs *T. asperellum*, indicando que la rapidez y efecto inhibitorio de los biocontroladores se debe a las diversas tasas de crecimiento y el proceso enzimático que pasan para cumplir el efecto antibiótico o por factores externos, que les permite controlar el patógeno con éxito. Del mismo modo autores como Belanger, *et al*. (1995) y Calvo (2011) demostraron que diferentes aislamientos de *Trichoderma* sp. produjeron antibiosis *in vitro*, lo cual inhibió al patógeno, indicando lo siguiente:

"*La capacidad antibiótica desarrollada por el género Trichoderma se debe principalmente a la producción de los antibióticos peptaibol, trichozianinas A1 y B1. Mediante*

la producción de estas sustancias Trichoderma spp. logra inhibir la germinación de las esporas y la elongación de las hifas de B. cinerea".

Por lo que se determina que la efectividad y capacidad antagónica de STh se debió al efecto micoparasitario que tiene este hongo y a los factores externos que favorecieron en los resultados obtenidos.

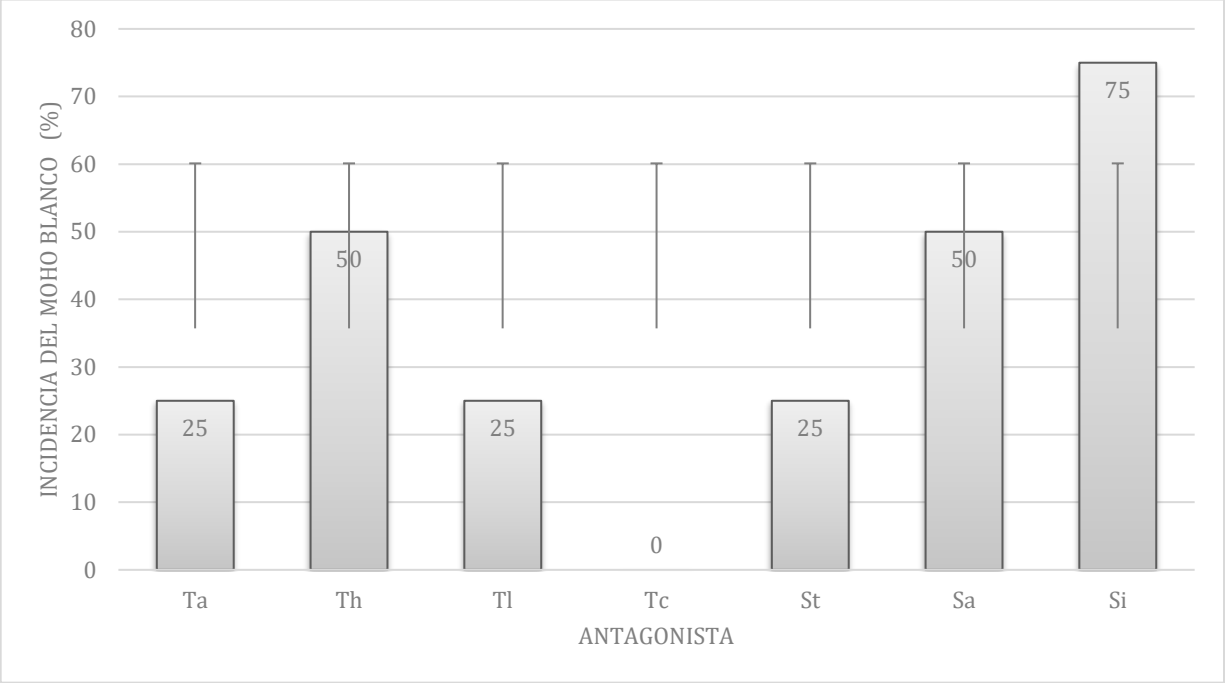
4.2. Evaluación de antagonistas en condiciones de invernadero.

4.2.1. Incidencia de la enfermedad.

En la figura 19 se muestra que el tratamiento con incidencia nula del moho blanco es el tratamiento Tc, los tratamientos Ta, Tl y St mostraron un 25% de incidencia de la enfermedad y los tratamientos Th y Sa tuvieron un 50% de incidencia. El tratamiento con mayor incidencia de la enfermedad es el tratamiento Si, a pesar de no haberse inoculado con el patógeno; Madloo *et al*. (2018) mencionan que el patógeno *S. sclerotiorum* tiene la capacidad de infectar plantas de diversas maneras, entre estas está la infección micelar que consiste en la germinación de esclerocios, infectando las plantas por medio de sus hifas y la infección carpogenéticamente, que consiste en la formación de apotecios por medio de los esclerocios, por lo que al formar apotecios aumenta la formación ascosporas que se diseminan por medio del viento causando mayor incidencia de la enfermedad en las plantas sanas, por lo que se estima que parte del manejo e implementación de equipo pudo ser vector para tener infección de plantas carpogenéticcamente.

Musiet (2015) demostró la efectividad de *Clonostachys* para el control de otros patógenos como *Botrytis cinerea* en plantas de *Eucalyptus* spp. en bioensayos *in vitro* a temperaturas controladas. Constató la eficacia en el control del patógeno, con mejores resultados en comparación con fungicidas químicos. El autor hace la salvedad sobre la variabilidad de la eficiencia del biocontrolador cuando se somete a temperaturas variables.

Figura 19. Incidencia del fitopatógeno *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga a las que se aplicaron los antagonistas *T. asperellum* (Ta), *T. harzianum* (Th), *T. longibrachiatum* (Tl) y *C. rosea* (Tc) en condiciones de invernadero.

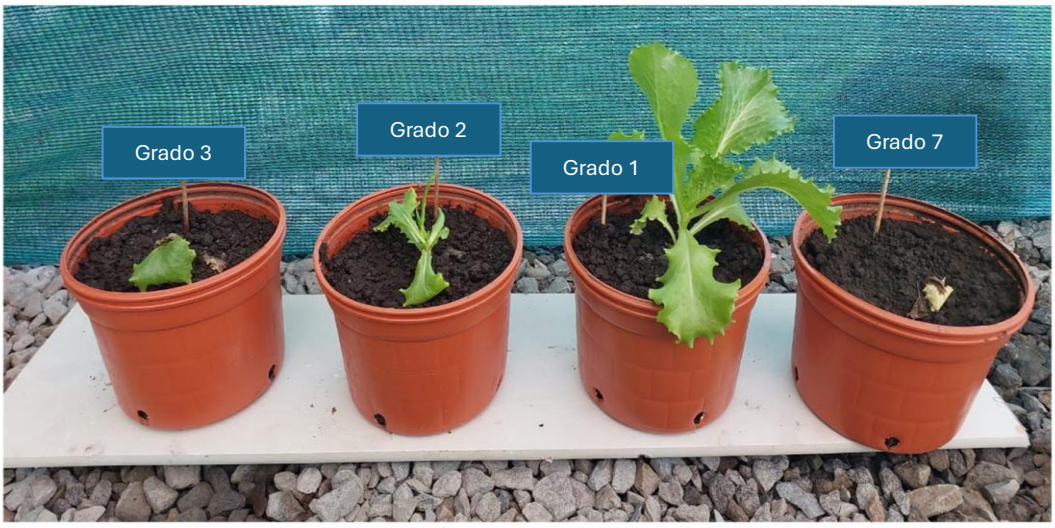


En el caso de *Trichoderma* Seng, *et al.* (2014) evidenciaron la efectividad de este hongo para controlar moniliasis en árboles de cacao en la zona de Guácimo de Limón, e indican la reducción de incidencia de esta enfermedad en un 11% en tan solo 35 días, representando un aumento de 198 Kg/ha de fruta. Por otra parte, cepas de *T. viride, T. harziamun* y *T. asperellum* provenientes de la rizosfera de los árboles de aguacate mostraron un alto porcentaje de inhibición de tres fitopatógenos; *P. capsici, F. oxysporum y R. solani* obtenidos de la raíz de plantas de chile con síntomas de marchitez, *T. asperellum* mostró el 88,25% de PIC *T. viride* un 87.22% y *T. harzianum* 87.8%. Se concluye que estos microhongos son eficientes contra los fitopatógenos evaluados (Andrade, Castrillo, Osorio, *et al*., 2020)

4.2.2. Severidad.

Después de 15 días desde el trasplante (ddt), las plantas de lechuga inoculadas con el fitopatógeno *S. sclerotiorum* mostraron grado 7 en la escala de severidad, lo que representa la mortalidad de la planta. A los 45 días ddt uno de los principales síntomas observados en la evaluación y que se asocia con la enfermedad del moho blanco es el marchitamiento. Según Velásquez y Reveles (2017) el síntoma inicial de la enfermedad ocurre cuando la planta se acerca a la etapa de madurez y donde es notable la presencia de lesiones de consistencia acuosa en la base del tallo, formando un micelio blanco abundante que al compactarse forma los esclerocios, estructuras de coloración negra que diseminan la enfermedad en el campo (Figura 20).

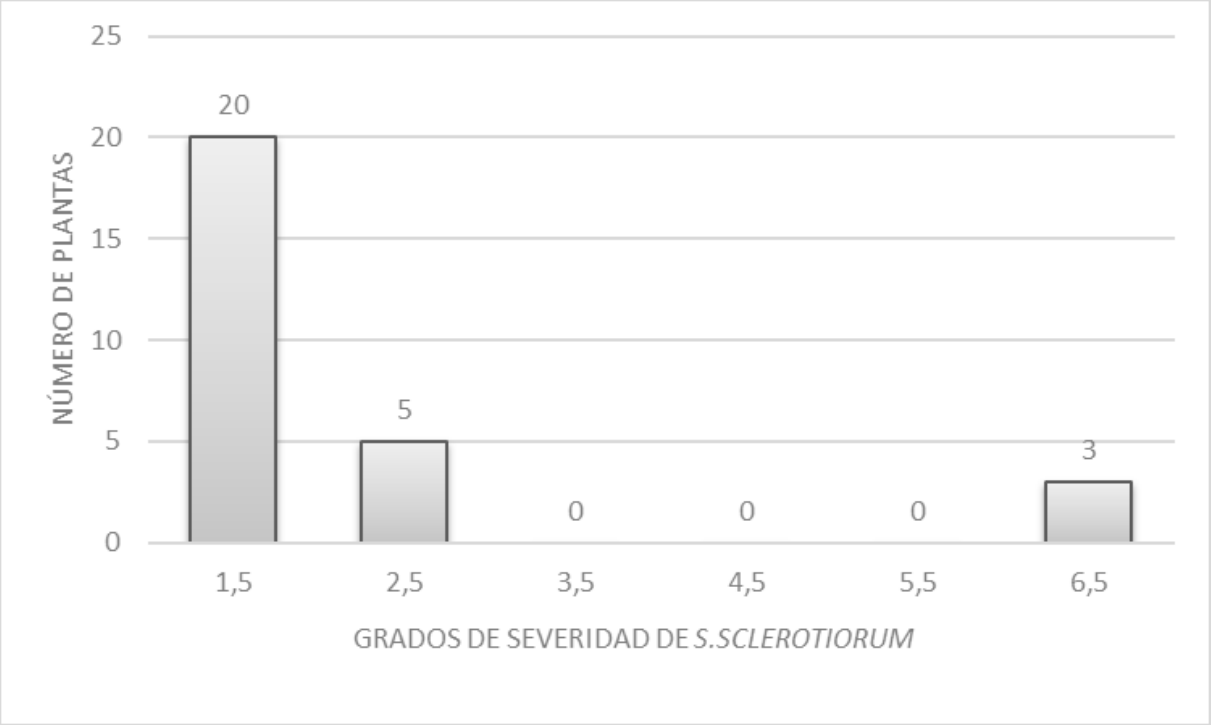
Figura 20. Clasificación del grado de severidad del moho blanco, según los síntomas de las plantas bajo condiciones de invernadero. Grado 1: plantas sanas sin síntomas visibles; Grado 2: síntoma inicial de caída de hojas basales; Grado 3: plantas con marchitamiento; Grado 7: muerte de la planta.



Del total de las plantas evaluadas, 20 se clasificaron en el grado 1 (plantas sanas sin sintomatología o daños por la enfermedad (Figura 21). Por otra parte, se clasificaron 5 plantas

con grado 2 (mostraron marchitamiento o caída de las hojas) y, por último, del total de muestras solo 3 plantas se ubicaron en grado 7, representando la mortalidad en plantas.

Figura 21. Distribución de frecuencias de grados de severidad de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero.



En la figura 21 se expresa el grado de severidad de *S. sclerotiorum* en las plantas de *Lactuca sativa*, se observa que del total de plantas (28 plantas) tan solo 3 plantas se presentaron en grado 7 según la escala visual, misma que representa la presencia de síntomas de mortalidad en plantas. Según Finquitiva, Santos y Sánchez, (2020), el grado de severidad expresado se debe a la producción de ácido oxálico y a la expresión de enzimas que van degradando la pared celular de la planta y causando lesiones que se expanden y liberan moléculas (péptidos) e inducen a la expresión de enzimas degradativas observados en varios tejidos de las plantas.

4.2.3. Evaluación del desarrollo en plantas.

El tratamiento con mayor peso promedio de la parte aérea es el tratamiento con *C. rosea* (12 g) seguido del tratamiento con control químico (9.75 g). Por otra parte, el tratamiento con menor desarrollo fue el Si que corresponde al tratamiento sin inoculación (2.75 g). Mismo

comportamiento en la evaluación del desarrollo radicular de la planta. Como se puede observar en las figuras 22 y 23 los tratamientos en los que se utilizaron distintas especies de *Trichoderma* no presentaron un desarrollo significativo y superior a los tratamientos St y Sa. Según el ANDEVA de los resultados obtenidos no existe diferencia significativa (p=0.05) entre las medias de los tratamientos.

Figura 22. Peso promedio de la parte aérea seca y fresca (± Error estándar) de los tratamientos aplicados para el control de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga. Sometido a 4 biocontroladores y control químico. (Ta) *Trichoderma asperellum*, (Th) T*richoderma harzianum*, (Tl) *Trichoderma longibrachiatum*, (Tc) *Clonostachys rosea*, (St) Testigo comercial, (Sa) sin inoculación, (Si) Testigo absoluto

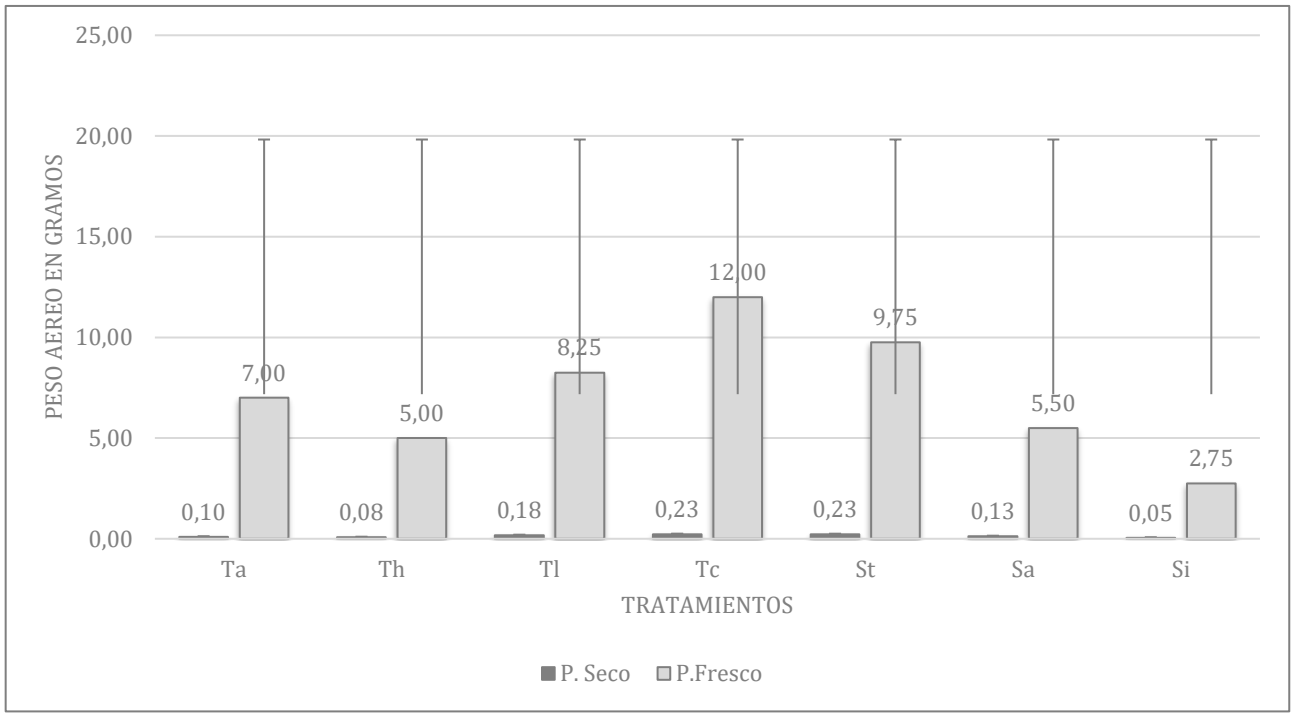
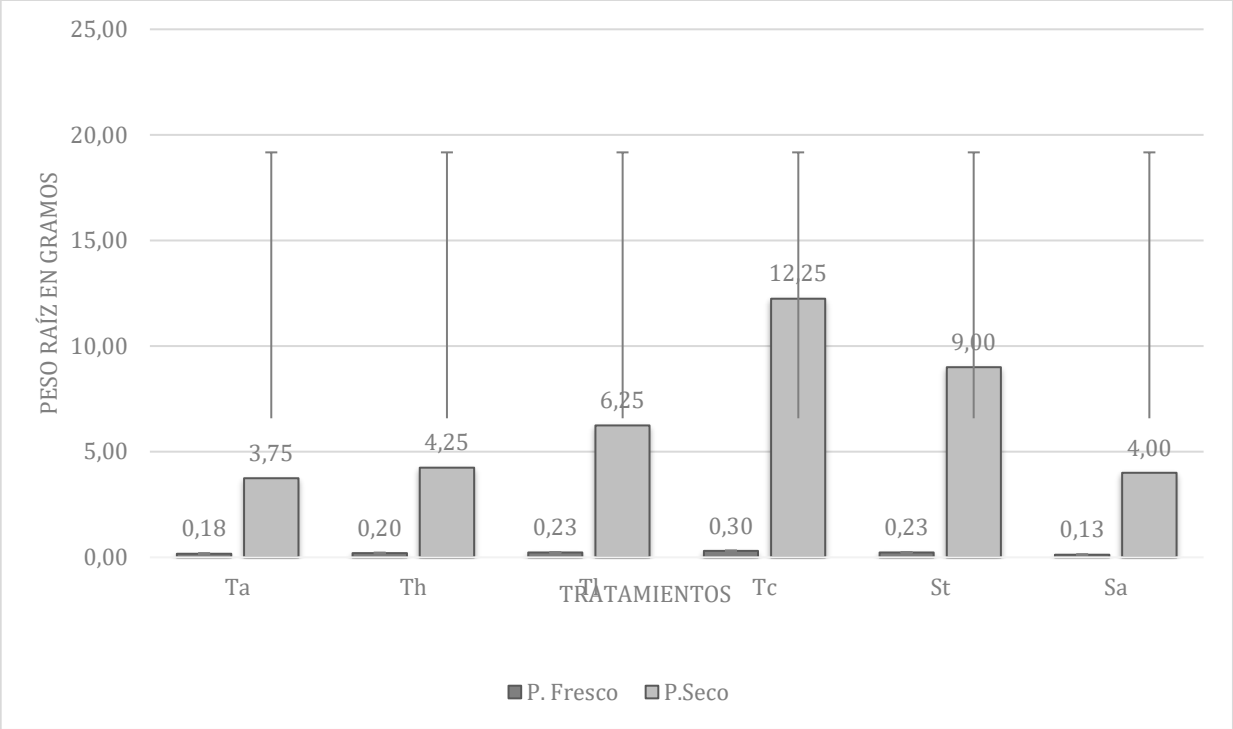


Figura 23. Peso promedio de la raíz seca y fresca (± Error estándar) de los tratamientos aplicados para el control de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga. Sometido a 4 biocontroladores y control químico. (Ta) *Trichoderma asperellum*, (Th) *Trichoderma harzianum*, (Tl) *Trichoderma longibrachiatum*, (Tc) *Clonostachys rosea*, (St) Testigo comercial, (Sa) sin inoculación, (Si) Testigo absoluto.



Martínez *et al*. (2013) confirman que algunos de los hongos del género *Trichoderma* tienen la capacidad de conferir resistencia y promover el crecimiento en plantas, cumpliendo la función de promotores de crecimiento. Esta multifuncionalidad se debe a la simbiosis que se da con los cultivos y el potencial mecanismo de acción que permite la síntesis de fitohormonas, producción de vitaminas y solubilización de nutrientes, haciendo de este último se da la traslocación de nutrientes, desarrollo radicular y aumento de la tasa metabólica (Lanna *et al*.2021).

Como se muestra en esta investigación con algunos de los tratamientos evaluados y como lo mencionan Lobo, *et al*. (2018), la efectividad y acción de los biocontroladores está determinada por condiciones favorables en el medio ambiente para tener un adecuado

establecimiento; por lo que se considera una de las principales causas de tener variación y eficiencia en el biocontrol de *S. sclerotiorum*.

García y Rojas (2022) en su evaluación obtuvieron resultados con una mayor cantidad de altura y biomasa en la evaluación de diferentes cepas de *Trichoderma* en plantas de tomate, destacan la efectividad obtenida por la especie *T. asperellum* y mencionan la existencia de cepas que promueven el crecimiento longitudinal de la raíz y número de hojas por planta.

5. CONCLUSIONES.

- En la evaluación de competencia por sustrato los tratamientos STa y STh se clasificaron dentro del grado II en la escala de Bell, lo que significa que colonizaron dos terceras partes del sustrato, permitiendo clasificarlos como antagonistas de *S. sclerotiorum*.

- El uso de los hongos *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum* en las pruebas *in vitro* fueron los que tuvieron un mejor rendimiento en cuanto al % PIC calculado.

- La evaluación bajo condiciones de invernadero permitió identificar la incidencia de la enfermedad en la unidad experimental demostrando la capacidad antagónica de *C. rosea* y el comportamiento similar de las cepas de *T. asperellum* y *T. longibrachiatum.*

- Se puede recalcar que las cepas utilizadas como agentes de control biológico tienen un potencial en el manejo de enfermedades, la viabilidad en los resultados obtenidos pudo estar determinado por manejo y condiciones ambientales que mostró una inhibición de su potencial.

- En términos de peso fresco, el peso promedio más alto alcanzado es con el tratamiento *C. rosea* y el testigo comercial, por lo que se puede determinar que la implementación de este antagonista versus un control químico es una excelente alternativa que no solo inhibe los daños ocasionados, sino que promueve un mejor desarrollo de la planta y genera una reducción de la contaminación ocasionada por los productos químicos.

- Se recomienda la aplicación de *T. asperellum* en el manejo de la enfermedad del moho blanco, ya que es uno de los géneros más utilizados como agente de control biológico sumado a los resultados obtenidos que respaldan la efectividad en el control de dicho patógeno.

6. RECOMENDACIONES

- Para aplicar agentes de control biológico en campo se recomienda realizar pruebas tanto *in vivo* en laboratorio como en invernadero. Con el fin de conocer mejor el comportamiento de los agentes evaluados y hacer aplicaciones más acertadas.

- Realizar evaluaciones en diferentes épocas del año y de esta forma medir el comportamiento de los agentes que, por temas de temperatura, humedad, radiación, viento pueden incidir tanto en el control de enfermedades como sobrevivencia de los microorganismos antagonistas en el medio.

- Desarrollar investigaciones que se enfoquen en la búsqueda de vectores causales del moho blanco, con el objetivo de establecer estrategias de manejo integrado que permitan disminuir el uso de insumos químicos dentro de los sistemas agrícolas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. (5th ed.). New York, USA.: Academic Press.

Amerio, N., Castrillo, M., Bich, G., Zapata, P. y Villalba, L. (2020). *Trichoderma* de la Argentina: estudio del arte. Ecología Austral, 30,113-124. https://doi.org/10.25260/EA.20.30.1.0.945

Andrade, P., Luna. A., Osorio, E., Molina, E., Landero, N. & Barrales, H. (2020). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. Rev. Mex. Cien. Agrícola. Vol. 10.n.6

Arzate, J., Michel, A., Domínguez, V. & Santos, O. (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del plátano (Musa sp.) in vitro e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 24: 98-104p.

Bell, D., Well, H. & Markham, C. (1982). "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:379-382p.

Belingueri,M., Mendel,R., Salinas,A. & Trejo,D.(2024). Antagonismo *in vitro* de *Clonostachys* sp. contra hongos asociados a enfermedades en cultivos de importancia económica. Revista Mexicana de Fitopatología, 42(3)23. Doi: https://doi.org/10.18781/R. MEX.FIT.2401-1

Bertsch, F. (2009). Absorción de nutrientes por los cultivos. (en línea). San José. ACCS. Recuperado de Requerimiento de Nutrientes Por Los Cultivos | PDF | Costa Rica | Residuos (scribd.com)

Brenes, J., Zúñiga, C., Villalobos, M., Zúñiga, C. y Rivera, W. (2019). Efectos de *Trichoderma asperellum* en la estimulación del crecimiento en chile dulce (*Capsicum annum*) variedad Nathalie en ambientes protegidos. Revista Tecnología En Marcha, 32(3), 79–86. Doi: https://doi.org/10.18845/tm.v32i3.4481

Belanger, R., Dufour, N., Caron, J. & Benhamou, N. (1995). Chronological events associated with antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*:

Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. Biocontrol SciTectmol 5:41-53.

Bolton, M.D., Thomma, B.P. & Nelson, B.D. (2006).*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, 7, 1-16.

CABI (Centro for Agriculture and Bioscience International). (2021). *Sclerotinia sclerotiorum* (podredumbre suave algodonosa). *Sclerotinia sclerotiorum* (podredumbre suave algodonosa) (cabi.org)

Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S. y Orozco, R. (2012). Aislamiento y evaluación In vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en Mora. Agronomía Mesoamericana, 23(2), 225-231.

Calvo, A. (2011). Aislamiento, identificación y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* pers. Ex nocca & balb., en el cultivo de la mora (*Rubus* spp.) en Costa Rica. Tesis Lic. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional. 57 p.

Carrasco, G. y Sandoval, C. (2016). Manual práctico del cultivo de la lechuga. Mundi-Prensa, Madrid, España.

CEDRSSA (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria).(2020). Análisis de la producción y consumo de hortalizas. México. 43p.

De Vries, I.M. (1997). Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. Genetic Resources and Crop Evolution 44: 165–174, 1997.

Ezziyani, M., Pérez, C., Sid, A. Requena, E. & Candela, M. (2004). Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol *de Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (Capsicum annum L.). Facultad de Biología, Universidad de Murcia. España. 12p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2011). Actualidad agropecuaria en América Latina y el Caribe. San José, CR.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2003).Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Balcarce, Argentina.

Finquitiva,K., Santos, D. & Sánchez, L. (2020). Alternativa de manejo biológico de la pudrición producida por *Sclerotinia sclerotiorum* en cultivos de lechuga en el municipio de Cota, Cundinamarca en la vereda Parcelas, La Moya y Pueblo Viejo. 26p. Doi: https://doi.org/10.22490/26194759.4344

Flores,W., Chico,J. & Cerna, L. (2015). Actividad antagónica in vitro de C*lonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum, Alternaria solani* y *Botrytis cinerea.* Revista Cientifica de la Facultad de Ciencias Biologicas. Universidad Nacional de Trujillo, 35(1),34-42.

García, C., Mamani, M., Chávez, G. & Álvarez, M. (2016). Evaluation of the enzymatic activity of *Trichoderma inhamatum* (BOL-12QD) as bio controller. Journal of the Selva Andina Research Society, 7(1), 20-32.

García, D & Rojas, J. (2022). Efecto de la inoculación con *Trichoderma* sobre el crecimiento vegetativo del tomate *(Solanum lycopersicum*). Agronomía Costarricense. Vol. 46. San José Costa Rica. Doi: http://dx.doi.org/10.15517/rac.v46i2.52045

Grabicoski, E. (2012). Caracterização Morfológica e Patogênica de Isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e Detecção em sementes de soja. Ponta Grossa, Brasil. 136p.

Google (s.f.). Ubicación diseño experimental de Ujarrás, Paraíso, Cartago en Google maps. Recuperado el 10 de agosto, 2024 de: https://earth.google.com/web .

Hernán, C., Gómez, G. y Garcés, K.(2015). Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo. IICA, Paraguay. 28p.

Hernández, F. (2008). Estudios in vitro de *Trichoderma* como agente de control biológico de la costra negra de la papa *Rhizoctonia solani*. X Congreso Mundial de *Trichoderma* y *Gliocladium*, VII Congreso Nacional de Fitopatología, II Congreso Nacional de Fitoprotección, 2008. San José, CR. APEP. 86 p

IMN. (Instituto Meteorológico Nacional). (10 de diciembre del 2024). Datos meteorológicos en Ujarrás, Paraíso, Cartago. Recuperado de https://www.imn.ac.cr/

Index Fungorum. (4 de noviembre del 2021). Clasificación taxonómica de *Sclerotinia sclerotiorum*. Recuperado de http://www.indexfungorum.org/

Kole, C. (2011). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Vegetables. Springer, London: UK.

Lanna, A., da Silva, M., Moreira, A., Nascente, A., de Fillipi, M. (2021). Improved nutrient uptake in three Crotalaria species inoculated with multifunctional microorganisms. Rev. Bras. Eng. Agr. he Amb. 25(7):460-465

Lobo, J., Silva, L., Santos, P., Macedo, R. y Toledo, E. (2018). Desafíos do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. Recife. Universidad Federal Rural de Pernambuco.17-34p.

Madloo, P., Rodríguez, V. M., Ramos, M. y Lema, M. (2018). La Enfermedad del Moho Blanco. *Horticultura*, 14–18p.

Marín, M., Rivera, G., Keylor, V., Orozco, R. y Orozco, S. (2017). Evaluación de Hongos Antagonistas de *Botrytis cinerea Pers.*, en Plantaciones de Mora, Costa Rica. Agronomía Costarricense, vol. 41, núm. 1, pp. 7-18p.

Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg, 28(0), 1–11p.

McDougall, D. (2015). Pests, Beneficials, Diseases and Disorders in Lettuce: Field Identification Guide. NSW Agriculture. Sydney Australia.

Medina, S. (2016). Mecanismos de protección *Trichoderma* sp. y patogénesis de *Fusarium oxysporum* en el nardo (*Polianthes tuberosa)*.97p.

Michel, A. (2001). Cepas nativas de *Trichoderma* spp., (Euascomicetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum*

(Hyphomycetes: Hyphales). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 162 p.

Moreira, R., Franca, P., Borges, A. & Mafia, L. (2014). Use and prospect of *Clonostachys roseas* a biocontrol agent. Revista Ciencias Agrícolas. 31 (1),78 - 91.

Musiet, D. (2015). Eficacia de diferentes formulaciones de *Clonostachys rosea* en el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en condiciones operacionales de plantas de Eucalyptusspp. Tesis M.Sc.Concepción. Chile. Universidad de Concepción. 77p.

Osorio, E., Hernández, F., Garcia, J., Lara, F. y Gallegos, G. (2008). "Actividad antagonista in vitro de 31 cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici* agente causal de la marchitez del chile. X Congreso Mundial de *Trichoderma* y *Gliocladium*, VII Congreso Nacional de Fitopatología, II Congreso Nacional de Fitoprotección, 2008. San José, CR. APEP. 86 p.

O'Sullivan, C., Belt, K. & Thatcher, L. (2021). Tackling Control of a Cosmopolitan Phytopatogen: *Sclerotinia*. Sclerotinia. Front. Plant Sci. Doi: 10.3389/fpls.2021.707509.

Prajapati, S., Godika. S., Kumar, N., Lakhran, L., Maurya, S. & Sharma, J. (2020). Isolation, identification and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* causing *Sclerotinia* rot of chilli. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2020. 9(5): 20-23.

Ramírez, F., Fournier, M., Hidalgo, C. y Ruepert, C. (2014). Uso de agroquímicos en el cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas (IRET). Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica. Agronomía Mesoamericana, 25(2), 337- 345.

Richmond, F. (2015). Validación de variedades de lechuga tipo americana en sistema hidropónico: II. Producción en campo. Boletín del programa nacional sectorial de producción agrícola bajo ambientes protegidos. Boletín ProNAP 9(52).

Ríos, C., Caro, J., Berlanga, D., Ruíz, M., Ornelas, J., Salas, M., Villalobos, E. & Guerrero,V. (2016). Identification and antagonistic activity in vitro af *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates againts common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología 34, 84-99.

Robledo, J., Aguirre, C. y Castaño, J. (2019). Guía ilustrada de enfermedades en postcosecha de frutas y verduras y sus agentes causantes en Colombia. Academia Colombiana de Ciencias exactas, físicas y naturales colección Jorge Álvarez Lleras, N°30. Bogotá. D.C. 527p.

Rodríguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N. y Godeas, A. (2011). BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as abiocontrol agent. Journal of Applied Microbiology. 110, 1177- 1186. Doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x

Romero, J. (2015). Manejo integrado de la pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*) en lechuga, en Tenango del Valle, Estado de México (Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México). Recuperado de http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/65643

Saharan & Mehta (2008). Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. Springer. India

Seng, J., Herrera, G., Vaughan, C. & Mccoy, M. (2014). Uso de aspersión del fungicida *Trichoderma* para reducir la infección de frutos de *Theobroma* cacao por *Moniliophtora rorera* en el noreste de Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 3 (62) 900-907 p.

Shatilov, M., Razin, A. & Ivanova, M. (2019). Analysis of the world lettuce market. Earth and Environmental Science. Doi: doi:10.1088/1755-1315/395/1/012053

Singh, L. & Sati, S. (2020). Antagonistic Activity of Isolated Root Endophytic Freshwater Fungus Anguillospora Longissima Against Pathogenic Fungi. Natl. Acad. Sci. Lett. 43(2):201–205

Smolińska, U. & Kowalska, B. (2018). Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* - a review. J Plant Pathol 100, 1–12.

Sun, B., Li, S., Ren, Q., Xu, J…. Sun, M. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. Tesis Lic. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 140p.

Subbarao, K. (1998). Progress toward integrated management of lectucce drop. Plant disease. 82:1068-1078.

Tarazona, L. (2009). Control biológico y químico de Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary en alcachofa (*Cynara scolymus* L.). (Tesis para optar el grado de Magister Scientiae). Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú.

Torres, S. & Moattos, Luz (2024). Control de *Sclerotinia sclerotiorum* Mediante Tratamiento Químico, Biológico y con Organismo Macrobiótico en el Cultivo de Alcachofa Cynara Scolymus L. Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar Ciudad de México, México. (8)-1. 26p.

Tozlu, E., Mohammadi, P., Senol, M., Nadaroglu, H. & Kotan, R. (2016). Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, the Causal Agent of White Mould Disease in Red Cabbage, by Some Bacteria. Atatürk University, Erzurum, Turkey. Plant Protect Sci. 52 (3), 188-198. Doi: doi: 10.17221/96/2015-PPS.

Vallalta, O. & Porter, I. J. (2004). Development of biological controls for *Sclerotinia* diseases of horticultural crops in Australasia. Australia: Horticultural Australia Ltd. van Esse IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 395 (2019) 012053 IOP Publishing.

Valverde, J. (2013). Establecimiento de curvas de absorción para dos tipos de lechuga bajo el sistema hidropónico NFT modificado. Tesis Lic. San José, CR. Universidad de Costa Rica. 63p.

Vásquez, G. (2015). Evaluación agronómica de cinco variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en tres ciclos de siembra consecutivos, en San Miguel de la Tigra, San Carlos, Alajuela, C.R. 78 p.

Viera, W., Tello, C., Martínez, A., Navia, D., Medina, L., Delgado….Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. Journal of the Selva Biosphere. Bolivia,8(2),128-149.

Villareal, M., Villa, E., Cira, L. & Estrada, M. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Revista Mexicana de Fitopatología, 36(1), 95-130. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-5.

Vitorino, L. C., Silva, F. O. da, Cruvinel, B. G., Bessa, L. A., Rosa, M., Souchie, E. L. & Silva, F. G. (2020). Biocontrol Potential of *Sclerotinia sclerotiorum* and Physiological Changes in Soybean in Response to Butia archeri Palm Rhizobacteria. Plants, 9(1), 64

Zamani-Noor, N. (2021). Baseline Sensitivity and Control Efficacy of Various Group of Fungicides against *Sclerotinia sclerotiorum* in Oilseed Rape Cultivation. Agronomy, 11(9), 17-58.

Zubieta, D., Echeverry, L. & Zafra, C. (2019). In vitro antagonism by consortium of *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp. against the phytopathogen *Sclerotinia* sp. Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial, 19(1), 1-16. DOI: https://doi.org/10.18684/BSAA(19)16-31.

8.ANEXOS

8.1. Experimento en condiciones in vitro.

8.1.1. Preparación del Medio de cultivo PDA, papa dextrosa agar.

Por cada litro PDA se pesan 200 gramos de papa los cuales se cosen en 500 ml de agua, otros 500 ml de agua destilada se les agrega 20 gramos de agar y se ponen en agitación. Cuando la papa está cocida se recupera el líquido haciéndolo pasar a través de un colador y este se adiciona a los otros 500 ml para completar el litro de medio de cultivo. Por último se le adicionan 20 gramos de dextrosa, se agita y se distribuye entre varios frascos, para finalmente auto clavar a 121 °C y 15 psi (libras de presión por pulgada cuadrada), durante 15 minutos.

Anexo 1. Resultados evaluación pruebas *in vitro*.

Tratamiento	Repetición	Crecimiento	% PIC	Esc. Bell
T.asperellum	1	2,5	72,22	II
T.asperellum	2	2,5	72,22	II
T.asperellum	3	2,5	72,22	II
T.asperellum	4	1,5	83,33	II
T.harzianum	1	1,8	80,00	II
T.harzianum	2	1,5	83,33	II

T.harzianum	3	1,4	84,44	II
T.harzianum	4	2,1	76,67	II
T.longibrachiatum	1	3,1	65,56	III
T.longibrachiatum	2	3	66,67	III
T.longibrachiatum	3	2,9	67,78	III
T.longibrachiatum	4	3	66,67	III
C. rosea	1	3,5	61,11	III
C. rosea	2	3,4	62,22	III
C. rosea	3	3,8	57,78	III
C. rosea	4	3,9	56,67	III
S.sclerotiorum	1	9	0,00	
S.sclerotiorum	2	9	0,00	
S.sclerotiorum	3	9	0,00	
S.sclerotiorum	4	9	0,00	

Anexo 2. Nivel de incidencia del Moho blanco (*S. sclerotiorum*) en plantas de lechuga en condiciones de invernadero.

	Tratamientos						
	Ta	**Th**	**Tl**	**Tc**	**St**	**Sa**	**Si**
Total	4	4	4	4	4	4	4
P.Sanas	3	2	3	4	3	2	1
P. Enfermas	1	2	1	0	1	2	3
% Incidencia	25%	50%	25%	0%	25%	50%	75%

Anexo 3. Severidad de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero.

Tratamiento	M.1	M.2	M.3	M.4
Ta	2	1	1	1
Th	1	1	7	2
Tl	3	1	1	1
Tc	1	1	1	1
St	7	1	1	1

Sa	1	3	1	3
Si	3	3	7	1

Anexo 4. Evaluación del desarrollo en plantas de *Lactuca sativa* L.

Tratamientos	Parte aérea		Parte radicular	
	Peso Fresco	Peso Seco	Peso Fresco	Peso Seco
Ta	7	0.1	3.75	0.17
Th	5	0.07	4.25	0.2
Tl	**8.25**	**0.17**	**6.25**	**0.22**
Tc	**12**	**0.22**	**12.25**	**0.30**
St	**9.75**	**0.22**	**9**	**0.22**
Sa	5.5	0.12	4	0.12
Si	**2.75**	**0.05**	**2.5**	**0.07**

Anexo 5. ANOVA, de Crecimiento radial de las pruebas *in vitro.*

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Fila 1	4	9	2,25	0,25		
Fila 2	4	6,8	1,7	0,1		
Fila 3	4	12	3	0,006667		
Fila 4	4	14,6	3,65	0,056667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8,74	3	2,913333333	**28,19355**	1,02E-05	**3,490294819**
Dentro de los grupos	1,24	12	0,103333333			
Total	9,98	15				
Ftab>Fcal	**Acepto H0**					
Fcal>Ftab	**Acepto H1**					
H0: STa=STh=STl=SCr						
H1: las medias son diferentes						

Anexo 6. ANOVA, porcentaje de inhibición del crecimiento PIC (%).

					H0: STa=STh=STl=SCr	
					H1: las medias son diferentes	
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	**Ftab>Fcal**	**Acepto H0**
Fila 1	4	300	75	30,864198	**Fcal>Ftab**	**Acepto H1**
Fila 2	4	324,4444444	81,11111111	12,345679		
Fila 3	4	266,6666667	66,66666667	0,8230453		
Fila 4	4	237,7777778	59,44444444	6,9958848		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1079,012346	3	359,6707819	**28,19354**8	1,01984E-05	3,490294819
Dentro de los grupos	153,0864198	12	12,75720165			
Total	1232,098765	15				

Anexo 7. Cálculo de distribución de Frecuencias para la evaluación de severidad de *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero.

Clases		marca	Frecuencia	F.Acumulada	% frecuencia	% acumulado
1	2	1,5	20	20	0,714285714	71,43%
2	3	2,5	5	25	0,178571429	89,29%
3	4	3,5	0	25	0	89,29%
4	5	4,5	0	25	0	89,29%
5	6	5,5	0	25	0	89,29%
6	7	6,5	3	28	0,107142857	100,00%

Anexo 8. ANOVA desarrollo del peso fresco de la parte foliar, plantas de lechuga.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	4	28	7	65,33333333		H0: Ta=Th=Tl=Tc=St=Sa=Si	
Fila 2	4	20	5	34		H1: las medias son diferentes	
Fila 3	4	33	8,25	30,91666667			
Fila 4	4	48	12	22,66666667			
Fila 5	4	39	9,75	46,91666667		Ftab>Fcal	Acepto H0
Fila 6	4	22	5,5	43		Fcal>Ftab	Acepto H1
Fila 7	4	11	2,75	30,25			

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	232,8571429	6	38,80952381	0,994812328	0,454251193	2,572711641	
Dentro de los grupos	819,25	21	39,01190476				
Total	1052,107143	27					

Anexo 9. ANOVA desarrollo del peso fresco de la parte radicular, plantas de lechuga.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	4	15	3,75	26,91666667
Fila 2	4	17	4,25	24,25
Fila 3	4	25	6,25	21,58333333
Fila 4	4	49	12,25	33,58333333
Fila 5	4	36	9	40,66666667
Fila 6	4	16	4	22
Fila 7	4	10	2,5	25

H0: Ta=Th=Tl=Tc=St=Sa=Si

H1: la medias son diferentes

Ftab>Fcal **Acepto H0**

Fcal>Ftab **Acepto H1**

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	290	6	48,33333333	**1,743986254**	0,160068052	**2,572711641**
Dentro de los grupos	582	21	27,71428571			
Total	872	27				

Anexo 10. ANOVA desarrollo del peso seco de la parte foliar, plantas de lechuga.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	4	0,4	0,1	0,02
Fila 2	4	0,3	0,075	0,009166667
Fila 3	4	0,7	0,175	0,015833333
Fila 4	4	0,91	0,2275	0,021025
Fila 5	4	0,9	0,225	0,029166667
Fila 6	4	0,5	0,125	0,0225
Fila 7	4	0,2	0,05	0,01

H0: Ta=Th=Tl=Tc=St=Sa=Si

H1: las medias son diferentes

Ftab>Fcal **Acepto H0**

Fcal>Ftab **Acepto H1**

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,121021429	6	0,0201702	**1,105723422**	0,3919423	**2,572711641**
Dentro de los grupos	0,383075	21	0,0182417			
Total	0,504096429	27				

Anexo 11. ANOVA desarrollo del peso seco de la parte radicular, plantas de lechuga.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	4	0,7	0,175	0,055833333
Fila 2	4	0,8	0,2	0,053333333
Fila 3	4	0,9	0,225	0,029166667
Fila 4	4	1,21	0,3025	0,064691667
Fila 5	4	0,9	0,225	0,029166667
Fila 6	4	0,5	0,125	0,0225
Fila 7	4	0,3	0,075	0,0225

H0: Ta=Th=Tl=Tc=St=Sa=Si

H1: las medias son diferentes

Ftab>Fcal **Acepto H0**

Fcal>Ftab **Acepto H1**

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,131521429	6	0,0219202	**0,553558007**	0,7618338	**2,572711641**
Dentro de los grupos	0,831575	21	0,0395988			
Total	0,963096429	27				