

**FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Estrategias de manejo sustentable de *S. sclerotiorum* en lechuga
con microorganismos benéficos

PÍA MARTINA GONZÁLEZ BROWNE

QUILLOTA, CHILE

2019

Índice

1. Resumen	1
2. Definición del problema	2
3. Hipótesis	4
3.1. Justificación de la hipótesis.....	4
4. Objetivos	5
4.1. Objetivo general	5
4.2. Objetivos específicos	5
5. Estado del Arte	6
5.1. La lechuga es el segundo cultivo hortícola de mayor superficie en Chile, abasteciendo totalmente la demanda interna.....	6
5.1.1. Los agroquímicos son ampliamente utilizados en el cultivo de lechuga, pudiendo ocasionar daños en la salud.....	6
5.1.2. La mayoría de los productores pertenecen a la agricultura familiar campesina, presentando problemas de inocuidad en sus productos	7
5.1.3 Será necesario disminuir el uso de agroquímicos en la AFC para cumplir las exigencias del mercado.....	8
5.2. La pudrición blanca de la lechuga genera pérdidas económicas en cultivos de otoño-invierno en distintos grados	10
5.2.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> afecta el cultivo de lechuga en diversos estados de desarrollo, generando distintos grados de daño.....	10
5.2.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> produce la infección en forma de micelio o ascospora, dificultando el control.....	11
5.3. Las estrategias de control son principalmente químicas, induciendo el desarrollo de resistencia del patógeno a ingredientes activos.....	12

5.3.1. El control químico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no representa un potencial daño si es realizado de manera adecuada	13
6. Metodología	15
6.1. Ubicación del ensayo	15
6.3. Obtención de microorganismos	15
6.3.1. Multiplicación de microorganismos benéficos	15
6.4. Ensayos in vitro	17
6.4.1. Evaluación de la compatibilidad entre los microorganismos benéficos.....	17
6.4.2. Evaluación del antagonismo de los microorganismos benéficos contra el patógeno.....	18
6.5. Ensayos <i>in vivo</i>	19
6.5.1. Evaluación del control de la podredumbre del tallo con microorganismos benéficos bajo condiciones controladas	19
6.5.2. Evaluación del control de la podredumbre del tallo con microorganismos benéficos bajo condiciones de campo	22
8. Bibliografía	23
9. Plan de trabajo	29
9.1. Carta Gantt.....	30
10. Resultados esperados	31
11. Cargos y funciones.....	32
12. Presupuesto	34

1. Resumen

El cultivo de lechuga representa el 9,2% de la superficie cultivada con hortalizas a nivel nacional, con 6.518 hectáreas. La principal causa de pérdida en campo se debe a la podredumbre del tallo, enfermedad causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, causando pérdidas de producción de hasta un 10%, las que pueden alcanzar valores cercanos al 78% cuando no es controlada, siendo más frecuente en los meses de otoño-invierno. La implementación de estrategias de control sustentable permitirían reducir las pérdidas ocasionadas por el hongo, siendo una alternativa inocua para el medio ambiente y los consumidores. El presente proyecto pretende contribuir a la disminución de la incidencia de la enfermedad podredumbre del tallo en un cultivar de lechuga escarola en la V región durante los meses de otoño-invierno, a través de la investigación del uso de dos cepas nativas de hongos que son considerados potenciales biocontroladores de *S. sclerotiorum*. Para lograr los objetivos propuestos se realizarán experimentos en laboratorio para evaluar la compatibilidad entre los microorganismos benéficos, evaluar el control de las cepas nativas en el crecimiento micelial y germinación de esclerocios, esperando que los microorganismos benéficos sean compatibles entre sí y que las cepas nativas de los hongos inhiban exitosamente el crecimiento del micelio y la germinación de esclerocios de *S. sclerotiorum*. Además, se realizarán ensayos bajo condiciones de campo en los meses de otoño-invierno en un predio agrícola que posea historial de la presencia del hongo fitopatógeno, de los que se espera que en presencia de arroz inoculado con los microorganismos benéficos, las plantas disminuyan drásticamente la incidencia de la podredumbre del tallo. Paralelo al avance de las investigaciones, se realizarán actividades de difusión, con el fin de promover el uso de estrategias de control sustentables, las que una vez implementadas disminuirían las pérdidas de lechuga escarola por el ataque de este hongo fitopatógeno en al menos 10 puntos porcentuales. El proyecto tiene una duración de 4 años y un costo total de 314,4 MM\$, de los cuales se solicitan 209,03 MM\$ a FONDEF, cubriendo la diferencia con el aporte institucional de la PUCV.

2. Definición del problema

El cultivo de lechuga representa el 9,2% de la superficie cultivada con hortalizas a nivel nacional, con 6.518 hectáreas. La producción se concentra principalmente en las regiones de Coquimbo, Metropolitana y Valparaíso (INE, 2017). La principal causa de pérdida en campo en el cultivo se debe a la enfermedad pudrición del cuello provocada por *Sclerotinia sclerotiorum*, siendo más frecuente en cultivos cosechados entre los meses de junio y agosto (Saavedra *et al.*, 2017). Esta enfermedad genera daños en distintos grados, desde una disminución de la masa de la cabeza hasta la muerte de la planta (INIA, 2016). En ensayos de variedades de lechuga realizados en la región de Coquimbo entre los años 2006 y 2009, se demostró que la incidencia de la enfermedad podía alcanzar un 78,9% cuando esta no es controlada (Navarro *et al.*, 2010). Para el año 2009 las pérdidas por hongos, principalmente *S. sclerotiorum* eran equivalentes a 700 hectáreas (Sepúlveda y Rebufel, 2009).

Existen estrategias de control químicas, culturales y biológicas, siendo la primera la más utilizada (Correa *et al.*, 2017). INIA (2016) recomienda el control químico con un enfoque preventivo con Boscalid, Piraclostrobin e Iprodiona, entre otros. Sin embargo, su aplicación se restringe al período de verano por la naturaleza de los químicos, dificultando el control durante los meses de otoño-invierno, que es cuando la enfermedad es más frecuente. La estrategia de control puede dejar residuos de los productos químicos utilizados en las hortalizas de hoja (Correa *et al.*, 2017), que posteriormente son consumidos por los compradores, pudiendo ocasionar problemas para la salud (Del Puerto *et al.*, 2014; Camino *et al.*, 2011). De esta manera, es necesario explorar nuevas alternativas de control que además de ser eficaces, no signifiquen un riesgo para la salud de los consumidores.

La aplicación conjunta de estrategias de control químico con prácticas culturales y control biológico contribuyen a disminuir la aplicación de agroquímicos en el cultivo de lechuga, y, en consecuencia, podrían disminuir el riesgo que significan sus residuos en las hortalizas de hoja para la salud humana. Se ha estudiado el control de *S. sclerotiorum* mediante el uso de diversos microorganismos como *Aspergillus piperis*, *Bacillus pumilus*, *Streptomyces albulus*, *Trichoderma harzianum*, entre otros, la mayoría bajo condiciones *in vitro*. *Coniothyrium minitans* bajo condiciones de campo produjo resultados significativos en el

control de la enfermedad (Chitrampalam *et al.*, 2010) y ya existe un producto comercial a base de este hongo llamado Contans WG que está siendo evaluado en Chile.

Existen productos de control biológico comerciales disponibles en nuestro país a base de *Trichoderma* spp. para *Sclerotinia sclerotiorum*. Entre ellos se pueden mencionar Trichonativa, Harztop y 3 TAC (Montealegre, 2013). Sin embargo, estos productos están orientados al control de una variedad de hongos fitopatógenos, incluido *S. sclerotiorum*, sin embargo, no se ha reportado un control tan eficaz de *S. sclerotiorum* como el obtenido con productos químicos bajo condiciones de campo.

En consecuencia, existe un gran número de posibles controladores biológicos que han demostrado su efectividad bajo condiciones *in vitro* y bajo condiciones controladas, siendo necesario evaluar su eficacia bajo condiciones de campo en nuestro país, considerando las condiciones edafoclimáticas y las variedades utilizadas. En el presente proyecto se evaluará la eficacia en el control de *S. sclerotiorum* con los microorganismos benéficos nativos *Clonostachys rosea* y *Trichoderma viride* bajo condiciones de campo en la región de Valparaíso. Los resultados de este proyecto eventualmente permitirían desarrollar productos inocuos para el control de la pudrición del cuello en lechuga, que puedan ser usados por los productores de la región en sus predios, minimizando las pérdidas económicas provocadas por la enfermedad de una manera sustentable.

3. Hipótesis

Las plantas de lechuga trasplantadas en suelos inoculados con *Clonostachys rosea* y *Trichoderma viride* presentan una menor incidencia de la podredumbre del tallo, permitiendo reducir las pérdidas de plantas provocadas por la enfermedad durante todo el cultivo.

3.1. Justificación de la hipótesis

Sclerotinia sclerotiorum es el principal hongo fitopatógeno en lechuga, agente causal de la pudrición del cuello (Sepúlveda y Rabufel, 2009), enfermedad que provoca distintos niveles de daño en el cultivo. Puede generar desde una disminución en el peso de la cabeza hasta la pérdida total de la planta. Actualmente se recomienda una estrategia de control químico con Boscalid, Piraclostrobin e Iprodiona (INIA, 2016). Estos productos pueden dejar residuos en las hojas (Correa *et al.*, 2017), que al ser consumidos podrían ocasionar problemas en la salud humana (Del Puerto *et al.*, 2014; Camino *et al.*, 2011). El control con microorganismos no representa un riesgo para la salud de los consumidores y puede ser tan eficaz como la estrategia de control química (Chitrampalam *et al.*, 2010). *Clonostachys rosea* y *Trichoderma viride* han demostrado una importante inhibición en el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* bajo condiciones *in vitro*, pero no han sido evaluados *in vivo*, presentándose como una posible alternativa para el control de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2011; Santos and Dhingra, 2011).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Reducir la incidencia de la podredumbre del tallo en lechuga escarola en la V región en los meses de otoño-invierno a través del uso de microorganismos benéficos.

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la compatibilidad entre los microorganismos benéficos *in vitro*.
2. Evaluar la inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por la acción de dos microorganismos benéficos.
3. Evaluar la incidencia de la enfermedad en plantas trasplantadas a sustrato inoculado con microorganismos benéficos y *S. sclerotiorum* bajo condiciones controladas y condiciones de campo.

5. Estado del Arte

5.1. La lechuga es el segundo cultivo hortícola de mayor superficie en Chile, abasteciendo totalmente la demanda interna

Prácticamente la totalidad de la superficie de lechuga en Chile tiene como destino el mercado interno. El cultivo de lechuga representa cerca del 10% de la superficie de hortalizas a nivel nacional (INE, 2017), cuyos volúmenes en las exportaciones representan menos del 1% de la producción nacional y no se registran importaciones (ODEPA, 2017). En el año 2011 se registró como la hortaliza más consumida en Chile (Correa *et al.*, 2017), cuyos principales mercados son ferias agrícolas, supermercados, ferias libres y restaurantes (Correa *et al.*, 2017). El cultivo de lechuga en Chile es de gran importancia en el mercado nacional. La mayor parte de la producción se emplea en abastecer la alta demanda interna.

5.1.1. Los agroquímicos son ampliamente utilizados en el cultivo de lechuga, pudiendo ocasionar daños en la salud

Los fungicidas, entendidos como todo producto químico aplicado a un cultivo con el fin de eliminar o impedir el crecimiento de los hongos en los cultivos, son sumamente utilizados en la producción de lechuga. Los residuos de fungicidas se acumulan en las hojas y pueden provocar daños a la salud del consumidor. Dependiendo de la dosis y naturaleza química, pueden tener efectos agudos y crónicos en la salud, como intoxicaciones producto de una exposición de corto tiempo y patologías vinculadas a la exposición a bajas dosis por un largo tiempo, respectivamente (Del Puerto *et al.*, 2014). Se han definido los límites máximos de residuos (LMRs), entendidos como la máxima concentración de residuos de un plaguicida para que se permita su presencia al interior de productos alimenticios de consumo humano, a partir del Codex Alimentarius (Correa *et al.*, 2017). Un 76% de las muestras de lechuga analizadas por INIA de producciones de las regiones Metropolitana, de O'Higgins y Coquimbo, contienen residuos de Metamidofodos, Imidacloprid, Iprodione, Ditiocarbamato, Boscalid, entre otros, y un 34% de estas muestras presentan concentraciones de los residuos mencionados superiores a los LMRs (Correa *et al.*, 2017).

La demanda nacional de hortalizas se concentra principalmente por los quintiles más altos del país (Araneda *et al.*, 2016), los que comienzan a tomar conciencia de la necesidad de consumir productos de mayor calidad que involucren un bajo contenido de residuos de agroquímicos que no tengan repercusiones en su salud. El principal desafío en cuanto a producción es minimizar el uso de agroquímicos, de forma que las concentraciones de residuos en los alimentos se mantengan dentro de los LMRs y que sean mínimas.

5.1.2. La mayoría de los productores pertenecen a la agricultura familiar campesina, presentando problemas de inocuidad en sus productos

Los principales productores de lechuga pertenecen a la agricultura familiar campesina (AFC), los que se enfrentan a un mercado cada vez más exigente. La agricultura familiar campesina, definida como un modelo productivo agrícola cuya organización se basa principalmente en la mano de obra familiar (Berdegué, 2014), presenta problemas en cuanto a producción, comercialización, calidad e inocuidad de las especies hortícolas cultivadas (Correa *et al.*, 2017). La inocuidad es entendida desde el punto de vista de cómo los alimentos son producidos, elaborados y manipulados, como aquellos que no ocasionen problemas para la salud, ya sea por la presencia de patógenos o por la acumulación de sustancias químicas en los tejidos (ODEPA, 2005). Este último factor es de mayor importancia en la actualidad, debido al uso indiscriminado de agroquímicos en la agricultura. De acuerdo con una encuesta realizada por INIA a productores de lechuga de las regiones Metropolitana, Coquimbo y de O'Higgins, la mayor parte de la producción de lechuga se realiza al aire libre, por lo que su control sobre las variables climáticas es nulo, lo que ocasiona que la incidencia de plagas y enfermedades pueda ser muy alta (Correa *et al.*, 2017). Por otra parte, son producidas bajo condiciones de monocultivo, con nula o escasa rotación de cultivos, favoreciendo la alta incidencia de plagas y enfermedades, provocando en consecuencia que se utilicen productos químicos muy potentes para su control. Sobre el 50% de los productores encuestados por INIA reconocen no utilizar un manejo integrado de enfermedades, entendido como una estrategia que previene el daño económico a través de diferentes técnicas como el control biológico, prácticas culturales, conocimiento de la biología y condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, permitiendo reducir el uso de productos químicos, los que son utilizados como último recurso (Correa *et al.*, 2017). Al utilizar el control químico como primera alternativa, los

residuos acumulados en hortalizas de hoja son muy superiores a lo que serían si se implementara un manejo integrado de enfermedades. Los productores de la agricultura familiar deberán encontrar nuevas soluciones al control de enfermedades, que complementen las utilizadas actualmente. A través del manejo integrado se podrán mejorar los problemas de inocuidad a los que se enfrentan los agricultores.

5.1.3 Será necesario disminuir el uso de agroquímicos en la AFC para cumplir las exigencias del mercado

El uso de agroquímicos en la agricultura familiar es intensivo, siendo un riesgo para su inserción en el mercado futuro. Correa et al. (2017) señalan que el uso inadecuado de agroquímicos se debe principalmente a un desconocimiento de las condiciones en que se está trabajando el cultivo, realizando excesivas aplicaciones de estos productos, cuyos ingredientes permanecen como residuos en la planta. Ello es especialmente crítico en las especies de consumo de hojas como la lechuga, repollo, acelga, espinaca y apio. A nivel mundial, los consumidores comienzan a exigir cada vez más información respecto a cómo son producidos los alimentos y que estos sean inocuos y seguros (ODEPA, 2005). La tendencia mundial respecto a producciones sin agroquímicos ha ido en aumento, mientras que en Chile la superficie de hortalizas orgánicas ha tenido fluctuaciones importantes desde el año 2014 con 683 hectáreas, para alcanzar su máxima en el 2015 con 1.155 hectáreas y disminuir drásticamente el año 2016 con 499 hectáreas, mientras que la importación de productos orgánicos va en alza (Eguillor, 2017), lo que muestra una tendencia en el país al consumo de productos inocuos. Esto representa un desafío para el manejo de los sistemas productivos como los de la agricultura familiar campesina, ya que se deberán implementar nuevas formas de controlar las plagas y enfermedades para cumplir con las exigencias de calidad de los consumidores, disminuyendo el uso de agroquímicos. El uso indiscriminado de agroquímicos significará una limitante para el ingreso de los productos de la AFC a los canales de comercialización en un futuro cercano.

5.1.3.1. El control biológico de enfermedades disminuye el uso de agroquímicos al realizar un manejo integrado de enfermedades

El uso de biocontroladores como parte de un manejo integrado puede suplir y disminuir las aplicaciones de agroquímicos. El manejo integrado involucra un conjunto de prácticas culturales, químicas y biológicas orientadas a prevenir y controlar el desarrollo de organismos que ocasionen daños económicos al cultivo, teniendo en cuenta el uso de plaguicidas químicos únicamente cuando sea estrictamente necesario (FAO, 2018). Los productos desarrollados a partir de biocontroladores para el control de una enfermedad son altamente específicos contra el organismo objetivo y a diferencia de los productos químicos representan un bajo o nulo riesgo para la salud de las personas y medio ambiente (Nava *et al.*, 2012). El control biológico consiste en regular o suprimir el potencial reproductivo de organismos a través del uso de parásitos, depredadores y patógenos (González & Rojas, 1966). Este tipo de control ha estado presente en Chile desde 1915, sin embargo, desde 1992 ha incrementado de manera significativa y ha estado enfocado en el control de hongos mediante el uso de hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Bacillus* (Montealegre, 2013). Sabaté *et al.* (2018) realizaron ensayos de control biológico en poroto infestado con *Sclerotinia sclerotiorum* con una bacteria del género *Bacillus* bajo condiciones controladas. Dentro de los resultados relevantes obtenidos por los autores, se destaca una incidencia significativamente menor de la enfermedad en semillas inoculadas con *Bacillus*. Chitrampalam *et al.* (2010) estudiaron el uso de *Coniothyrium minitans* en el control de *Sclerotinia minor* en lechuga bajo condiciones de campo; dentro de los resultados obtenidos destacan una reducción importante en el desarrollo de la enfermedad, siendo necesarias menos aplicaciones de agroquímicos para su control, las que podrían incluso no ser necesarias. Rabeendran *et al.* (2006) estudiaron el uso de biocontroladores para *Sclerotinia* spp. en lechuga bajo condiciones controladas, obteniendo un mejor control que el obtenido con el producto químico más usado para controlar la enfermedad. Actualmente cada vez son más los productos biológicos para el control de hongos elaborados a partir de microorganismos, los que comienzan a aparecer en formatos comerciales (Nava *et al.*, 2012) como Contans WG. El control biológico de enfermedades puede representar una alternativa eficaz y un complemento al control químico; sin embargo, no se han realizado ensayos en Chile que demuestren su efectividad en las condiciones de cultivo locales.

5.2. La pudrición blanca de la lechuga genera pérdidas económicas en cultivos de otoño-invierno en distintos grados

Sclerotinia sclerotiorum ocasiona pérdidas importantes en el cultivo de lechuga, ya que puede provocar la muerte de plantas. INIA (2016) describe la enfermedad como una pudrición blanca y acuosa con presencia de un micelio blanco algodonoso abundante, cuya incidencia normalmente aumenta a medida que se acerca la madurez de la planta, pudiendo observarse daños en distintos grados desde precosecha a cosecha, los que pueden ser disminución en la masa de la cabeza y pérdida total de plantas. Para el año 2009, las pérdidas ocasionadas por hongos alcanzaban el equivalente a 700 hectáreas, siendo *S. sclerotiorum* el principal hongo fitopatógeno en lechuga (Sepúlveda y Rebufel, 2009). INIA (2016) recomienda principalmente el control químico con un enfoque preventivo con Boscalid, Piraclostrobine, Iprodiona, entre otros. Sin embargo, su aplicación se restringe al periodo de verano por la naturaleza de los químicos, dificultando el control durante los meses de otoño-invierno. Navarro *et al.* (2010) señalan que *Botrytis* y *Sclerotinia* son los patógenos que ocasionan los mayores problemas en cuanto a enfermedades en lechuga, por lo que llevaron a cabo un estudio para determinar los productos químicos más eficaces en el control de estos patógenos, los que resultaron ser Boscalid y Pyraclostrobin. Las pérdidas económicas por *S. sclerotiorum* son significativas, cercanas al 10%, y el control está orientado mayoritariamente en aplicaciones químicas.

5.2.1. *Sclerotinia sclerotiorum* afecta el cultivo de lechuga en diversos estados de desarrollo, generando distintos grados de daño

El hongo puede afectar a la planta desde la germinación de la semilla hasta su almacenamiento en postcosecha. Se ha registrado muerte de plantas desde el estado de plántula pre-trasplante hasta el momento de la venta (Delhey *et al.*, 2009). Subbarao (1998) señala que la enfermedad normalmente se desarrolla luego de tres a cuatro semanas desde la emergencia o en la madurez del cultivo, ocasionando la muerte de la planta en ambos casos. El hongo es capaz de generar daños en cualquier estado de desarrollo, ocasionando pérdidas de distintas dimensiones dependiendo de las condiciones climáticas y la variedad de lechuga utilizada.

5.2.2. *Sclerotinia sclerotiorum* produce la infección en forma de micelio o ascospora, dificultando el control

S. sclerotiorum ingresa desde el cuello o la parte aérea en forma de micelio o ascospora, respectivamente. Hasta el año 2009 en Chile solo estaba presente la fase asexual del hongo, por lo que era necesario realizar control sobre los micelios únicamente, pero ahora es necesario tener en cuenta el control de micelios y ascosporas (Sepúlveda y Rebufel). Arias *et al.* (2007) realizaron ensayos enfocados en el control de la germinación de esclerocios de *S. sclerotiorum* en el suelo bajo condiciones de campo en Colombia, obteniendo que el control con productos químicos es el más eficaz, sin embargo, se puede complementar con controles culturales y biológicos obteniendo un nivel aceptable de eficacia. El uso de *Trichoderma asperelloides* disminuye hasta en un 30% la cantidad de ascosporas en el apotecio de *S. sclerotiorum* en condiciones *in vitro*, demostrando ser un potencial bioantagonista para su uso en campo (Sumida *et al.*, 2018). Es necesario desarrollar estrategias de manejo capaces de controlar simultáneamente ascosporas y esclerocios y evaluar su eficacia en condiciones de campo.

5.2.2.1. El control a nivel micelial puede realizarse con bioantagonistas, disminuyendo las pérdidas por la enfermedad

Diversos estudios sobre el control de crecimiento micelial se han llevado a cabo bajo condiciones *in vitro*, exponiendo un gran número de posibles bioantagonistas para su uso en campo. *Bacillus pumilus* inhibe totalmente el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* bajo condiciones *in vitro*, siendo requeridos más estudios para determinar su efectividad en el control de la enfermedad bajo condiciones de campo (Kaushal *et al.*, 2017), al igual que *Streptomyces albulus* (Wu *et al.*, 2015). El uso de *Bacillus cereus* fue utilizado en Australia por Kamal *et al.* (2015) y logró inhibir en un 100% la enfermedad cuando los almácigos eran sumergidos en una solución con el bioantagonista y luego trasplantados en sustrato inoculado con *S. sclerotiorum*. El- Dabaiky (2017) evaluó la inhibición del micelio de *S. sclerotiorum* con *Aspergillus piperis*, obteniendo un 74% de inhibición bajo condiciones *in vitro*. Por otra parte, los extractos vegetales también pueden presentar una actividad antagónica contra *S. sclerotiorum*. Extractos vegetales de *Byrsonima crassifolia* han sido

evaluados para medir su control en el crecimiento del micelio de *S. sclerotiorum* bajo condiciones *in vitro*, obteniendo resultados satisfactorios a altas concentraciones (Andrade *et al.*, 2018). Warmington y Clarkson (2015) realizaron ensayos *in vitro* con materia seca de *Brassica juncea*, logrando disminuir la tasa de crecimiento del micelio de *S. sclerotiorum*. Existe un gran número de organismos con potencial para ser utilizados como bioantagonistas de *S. sclerotiorum*; sin embargo, aún faltan estudios para comprobar su eficacia en condiciones de campo.

5.3. Las estrategias de control son principalmente químicas, induciendo el desarrollo de resistencia del patógeno a ingredientes activos

Los hongos son capaces de mutar y adaptarse rápidamente a cambios en el medio, generando resistencia a los fungicidas. Los fungicidas químicos generan contaminación, residuos en los alimentos e inducen el desarrollo de cepas resistentes del patógeno debido a un uso repetitivo del ingrediente activo (Belete *et al.*, 2015). La resistencia a fungicidas es provocada por las reiteradas aplicaciones de agroquímicos que poseen un mismo ingrediente activo; de esta forma, el producto actúa como una presión selectiva que irá seleccionando los genes de resistencia de los individuos sobrevivientes a las generaciones siguientes, en las cuales existirán cada vez un mayor número, hasta que el compuesto químico no proporcione un nivel aceptable de control (FAO, 2012). Zamorano (2005) evaluó la resistencia de *Botrytis cinerea* a distintos fungicidas, señalando que el uso de un mismo producto químico por más de 30 años puede no provocar poblaciones masivas con resistencia, ya que al alternar el ingrediente activo con otros de distinta acción estos genes de resistencia adquiridos se pierden en ausencia de la presión selectiva. Landschoot *et al.* (2017) describen la presencia de poblaciones resistentes de *Alternaria solani* a fungicidas; en el ensayo se extrajeron muestras de poblaciones de *A. solani*, resultando que un 40% de ellas manifestaban resistencia a las aplicaciones de Boscalid. Ensayos realizados en China señalan que *S. sclerotiorum* posee la capacidad de desarrollar poblaciones resistentes a Cipronidil bajo condiciones *in vitro* (Hou *et al.*, 2018). Es necesario evaluar la resistencia de *Sclerotinia sclerotiorum* a los productos químicos utilizados para su control en Chile, ya que no existe información publicada al respecto.

5.3.1. El control químico de *Sclerotinia sclerotiorum* no representa un potencial daño si es realizado de manera adecuada

Debido al desconocimiento de las condiciones bajo las que se desarrolla el cultivo, ya sean condiciones climáticas, como características de la variedad cultivada e historial de enfermedades y aplicaciones en el campo utilizado, se aplican grandes cantidades de fungicidas, pudiendo haber controlado la enfermedad con dosis más bajas. Ayala *et al.* (2015) lograron inhibir el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum in vitro* a todas las concentraciones utilizadas de Boscalid, Carbenzadima y Pyraclostrobin, lo que sugiere que disminuir las dosis utilizadas actualmente podría generar el mismo control que con las dosis altas. Liu *et al.* (2017) analizaron la sensibilidad de poblaciones *S. sclerotiorum* obtenidas de un campo en presencia del hongo a Boscalid, señalando que no habrían poblaciones resistentes al compuesto químico, el cual además controla de manera eficaz la enfermedad a todas las dosis utilizadas. Martínez (2008) reportó una baja inhibición del crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* al ser tratado con fungicidas de ingrediente activo Trifloxibotrin bajo condiciones *in vitro*. De esta manera, no se ha reportado en Chile una resistencia generalizada a los agroquímicos utilizados; sin embargo, se sabe que el patógeno tiene la capacidad de generar resistencia, por lo que es necesario mantener ciertos cuidados en el control químico, sin repetir demasiadas veces el mismo ingrediente activo y teniendo en cuenta las condiciones del cultivo. El conocimiento de las condiciones del propio cultivo, como la presión existente de la enfermedad, las condiciones climáticas a las que se ha estado expuesto, entre otros, evita un uso excesivo de agroquímicos.

5.3.1.1. El uso de controladores biológicos puede disminuir las resistencias a plaguicidas, facilitando el control de la enfermedad

El uso alternado de productos químicos y biocontroladores evita la presión selectiva generada por el fungicida, evitando inducir resistencias. Smolinska *et al.* (2016) evaluaron bajo condiciones de invernadero el uso de enmiendas orgánicas inoculadas con *Trichoderma harzianum* sobre un sustrato con presencia de *S. sclerotiorum*. Si bien no se obtuvieron resultados en relación con el control de la enfermedad, se observaron efectos positivos sobre el peso de la cabeza de la lechuga, el cual aumentó. Esto sugiere la

actividad de *T. harzianum* como un bioestimulante, que podría tener efectos sobre el control de la enfermedad si se realizara bajo otras condiciones, pudiendo lograr aumento en la germinación y sobrevivencia de plantas en sustratos con *S. sclerotiorum* (Haddad *et al.*, 2015). Elias *et al.* (2016) aumentaron la sobrevivencia de plantines de lechuga en suelo inoculado con *S. sclerotiorum* al tratarlo con *Trichoderma asperelloides*; sin embargo, la sobrevivencia del control no inoculado con el patógeno fue muy superior. Esto sugiere que es posible utilizar un controlador biológico como *T. asperelloides* como complemento a un manejo más eficaz como podría ser el químico en el control de *S. sclerotiorum* en lechuga. Es posible compatibilizar el control biológico con las aplicaciones de químicos, donde un fungicida puede disminuir drásticamente la población y luego continuar con un bioantagonista que mantenga la población de *S. sclerotiorum* baja.

6. Metodología

6.1. Ubicación del ensayo

El proyecto se llevará a cabo en las dependencias de la Escuela de Agronomía de la PUCV, La Palma, Quillota, V región de Valparaíso. La ejecución constará de tres etapas experimentales, siendo la primera un ensayo *in vitro* en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela; la segunda un ensayo *in vivo* bajo un invernadero ubicado en la Estación Experimental; y la tercera un ensayo en condiciones de campo en un predio agrícola ubicado en Quillota con historial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

6.2. Obtención del material vegetal

Para cada experimento *in vivo* se realizará la siembra de lechugas escarola un mes antes del experimento, utilizando el sustrato comercial Turba DSM2P (PROTEKTA) en bandejas de polipropileno con alveolos de 50 cc. Las bandejas se mantendrán bajo invernadero a una temperatura de 20 °C y 70% de humedad relativa (INIA, 2017).

6.3. Obtención de microorganismos

La cepa de *Sclerotinia sclerotiorum* será aislada desde plantas infectadas en campo, mientras que las cepas de *Clonostachys rosea* y *Trichoderma viride* serán adquiridas desde la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM) del Banco de Recursos Genéticos Microbianos ubicada en Chillán, Chile.

6.3.1. Multiplicación de microorganismos benéficos

La multiplicación de cada microorganismo benéfico se realizará a partir de colonias de 5 mm de diámetro en medios de cultivo MEA, las que serán sembradas en 100 ml de medio de cultivo MEB contenidos en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml. El matraz será incubado a 25°C por una semana, para luego utilizar la solución para inocular 1 L de MEB contenido en un matraz de Erlenmeyer de 5 L, el que será llevado a una incubadora por 21 días a 25°C (Rodríguez *et al.*, 2011). La solución obtenida será utilizada en las etapas siguientes.

6.3.1.1. Preparación de inóculos de microorganismos benéficos

La preparación de inóculos de *C. rosea* será realizada mediante una adaptación de la metodología descrita por Viccini *et al.* (2007). Se extraerán 200 ml de la solución del microorganismo benéfico en MEB previamente preparada y serán llevados a un matraz de

Erlenmeyer de 4 L con 3 L de agua destilada con una concentración de 0,001 % de polisorbato 20, se ajustará la concentración de esporas de *C. rosea* a 10^9 esporas/ml mediante un hematocitómetro (Musiet, 2015).

Por otra parte, la preparación de inóculos de *T. viride* se realizará mediante una adaptación de la metodología descrita por Pineda *et al.* (2017). Se extraerán 200 ml de la solución del microorganismo benéfico en MEB previamente preparada, se llevarán a 3 L de agua destilada contenida en un matraz de Erlenmeyer de capacidad 4 L con polisorbato 80 al 0,1%, se agitará y se realizarán diluciones seriadas con polisorbato 80 0,1% hasta obtener una concentración de 10^9 esporas/ml, la que será ajustada mediante un hematocitómetro (Musiet, 2015).

Será necesario elaborar 15 L de solución de inoculación de cada microorganismo benéfico para todos los experimentos del proyecto. Esta actividad se efectuará cuatro veces durante el proyecto: la primera para los experimentos *in vitro*, la segunda para el experimento bajo condiciones controladas, la tercera para el experimento bajo condiciones de campo y la cuarta para la parcela demostrativa.

Tiempo estimado: 2 meses

6.3.1.2. Inoculación de microorganismos benéficos en granos de arroz

Para realizar la inoculación de microorganismos benéficos en granos de arroz es necesario hidratar el grano por 40 minutos en agua esterilizada (Krauss *et al.*, 2002). La inoculación será realizada de acuerdo con la metodología descrita por Viccini *et al.* (2007); se inoculará con una alícuota de 2,5 ml por cada 50 g de granos de arroz previamente esterilizados e hidratados en una bolsa de PE de alta densidad, se agitará manualmente para una adecuada distribución del inóculo y será llevado a una incubadora a 24°C por 60 días (Viccini *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2011).

Se necesitarán 18 kg de granos de arroz inoculados de cada microorganismo benéfico para los experimentos *in vivo*. Esta actividad se efectuará tres veces durante el proyecto: la primera para el experimento bajo condiciones controladas, la segunda para el experimento bajo condiciones de campo y la tercera para la parcela demostrativa.

Tiempo estimado: 4 meses

6.4. Ensayos *in vitro*

Cada uno de los ensayos *in vitro* se asocia a un objetivo específico del proyecto.

6.4.1. Evaluación de la compatibilidad entre los microorganismos benéficos

Este ensayo se asocia al objetivo específico 1: Evaluar la compatibilidad entre los microorganismos benéficos.

Se realizará un experimento *in vitro* para determinar la compatibilidad de los microorganismos, donde será cultivada una colonia de 1 mm de diámetro de cada microorganismo en una placa Petri con un medio de cultivo PDA, a la que se le suministrará una alícuota de 2,5 ml de solución del otro microorganismo benéfico y será llevada a una cámara de crecimiento a 17°C por 4 días. Se tendrán cuatro tratamientos y dos variables, descritas en Tabla 1. Se realizarán mediciones cada 24 horas por 4 días.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos de experimento 1.

Tratamiento	Descripción	Variables
1	Colonia <i>T. viride</i> + agua destilada	1. Diámetro colonia (mm) 2. Inhibición del crecimiento micelial calculado como: (Diámetro colonia/diámetro colonia control) x100
2	Colonia de <i>C. rosea</i> + agua destilada	
3	Colonia <i>C. rosea</i> + solución con <i>T. viride</i>	
4	Colonia <i>T. viride</i> + solución con <i>C. rosea</i>	

Diseño experimental: se utilizará un diseño completamente al azar, en la cual la unidad experimental constará de 10 placas. Se realizarán 5 repeticiones.

Tiempo estimado: 2 meses.

6.4.2. Evaluación del antagonismo de los microorganismos benéficos contra el patógeno

6.4.2.1. Evaluación de la inhibición en el crecimiento micelial

Este ensayo se asocia al objetivo específico 2: Evaluar la inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* por acción de dos microorganismos benéficos.

Se realizará un experimento *in vitro* en una placa Petri en PDA que contenga una colonia del patógeno de 1 mm al centro, se le agregará una alícuota de 2,5 ml de microorganismos benéficos y será llevada a una incubadora a 17°C por 4 días en condiciones de oscuridad. La descripción de los tratamientos y variables se detalla en Tabla 2. Se realizarán mediciones cada 24 horas por 4 días.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos de experimento 2.

Tratamiento	Descripción	Variables
1	Colonia <i>S. sclerotiorum</i> + agua destilada	1.Crecimiento micelial en mm 2.Inhibición del crecimiento micelial
2	Colonia de <i>S. sclerotiorum</i> + solución de <i>C. rosea</i> (10 ⁹ esporas/ml)	
3	Colonia de <i>S. sclerotiorum</i> + solución de <i>T. viride</i> (10 ⁹ esporas/ml)	
4	Colonia de <i>S. sclerotiorum</i> + solución <i>T. viride</i> + solución <i>C. rosea</i> (10 ⁹ esporas/ml)	

Diseño experimental: se utilizará el mismo diseño experimental descrito en la sección 4.1.

Tiempo estimado: 2 meses

6.4.2.2. Evaluación de la inhibición en la germinación de esclerocios

Este ensayo se asocia al objetivo específico 2: Evaluar la inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* por acción de dos microorganismos benéficos. Se sembrarán diez esclerocios de *S. sclerotiorum* en una placa Petri con medio de cultivo PDA, serán incubados a 18°C por 7 días (Aguilar *et al.*, 2016) y se le añadirá una alícuota de 2,5 ml de microorganismos benéficos cada 24 horas, además se evaluará la germinación de los esclerocios cada 24 horas por 7 días. La descripción de los tratamientos y variables se detallan en Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los tratamientos y variables de experimento 4.

Tratamiento	Descripción	Variable
1	Esclerocios <i>S. sclerotiorum</i> + agua destilada	1. Germinación de esclerocios
2	Esclerocios <i>S. sclerotiorum</i> + solución de <i>C. rosea</i> (10^9 esporas/ml)	2. Inhibición de la germinación de esclerocios en %
3	Esclerocios <i>S. sclerotiorum</i> + solución de <i>T. viride</i> (10^9 esporas/ml)	
4	Esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> + solución <i>T. viride</i> + solución <i>C. rosea</i> (10^9 esporas/ml)	

Diseño experimental: se utilizará el mismo diseño experimental descrito en la sección 4.1.

Tiempo estimado: 2 meses

6.5. Ensayos *in vivo*

Para los ensayos *in vivo* se utilizarán almácigos de lechuga sembrados con un mes de anticipación al experimento, los que serán trasplantados en sustrato y suelo con guano (1 kg/m^2). Se realizarán dos experimentos: el primero será bajo condiciones controladas en un invernadero de la estación experimental entre los meses de abril y agosto de 2019, mientras que el segundo será bajo condiciones de campo entre los meses de abril y agosto de 2020.

6.5.1. Evaluación del control de la podredumbre del tallo con microorganismos benéficos bajo condiciones controladas

Se realizará el trasplante de los almácigos de lechuga en maceteros de 12 L que contengan sustrato (turba 70% y perlita 30%). El invernadero se mantendrá a $17^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ (temperaturas día/noche). Se fertilizará según el manejo propuesto por INIA (2017) y será regado mediante riego por goteo. La descripción de los tratamientos y variables se presenta en Tabla 4. Se realizarán mediciones cada 3 días para la variable 1, mientras que las mediciones para las variables 2 y 3 se realizarán una vez que las plantas estén listas para la cosecha, aproximadamente dos meses después del trasplante.

Tabla 4. Descripción de tratamientos y variables de experimento 4.

Tratamiento	Descripción	Variabes
1	200 g de granos de arroz esterilizados	1.Incidencia de la enfermedad (número de plantas con síntomas) 2.Sobrevivencia de plantas (número de plantas vivas al final del experimento) 3.Masa de la cabeza
2	Esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> + 200 g de granos de arroz esterilizados	
3	Esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> + 200 g de granos de arroz con <i>C. rosea</i>	
4	Esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> + 200 g de granos de arroz con <i>T. viride</i>	
5	Esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> + 200 g de granos de arroz con <i>C. rosea</i> y <i>T. viride</i>	

Diseño experimental: Se realizará en bloques completamente al azar, donde cada bloque de 210 m² contendrá los cinco tratamientos descritos anteriormente. Se realizarán tres repeticiones, ilustradas en figura 1, cada unidad experimental tendrá una superficie de 42 m², con 100 plantas distribuidas según figura 2.

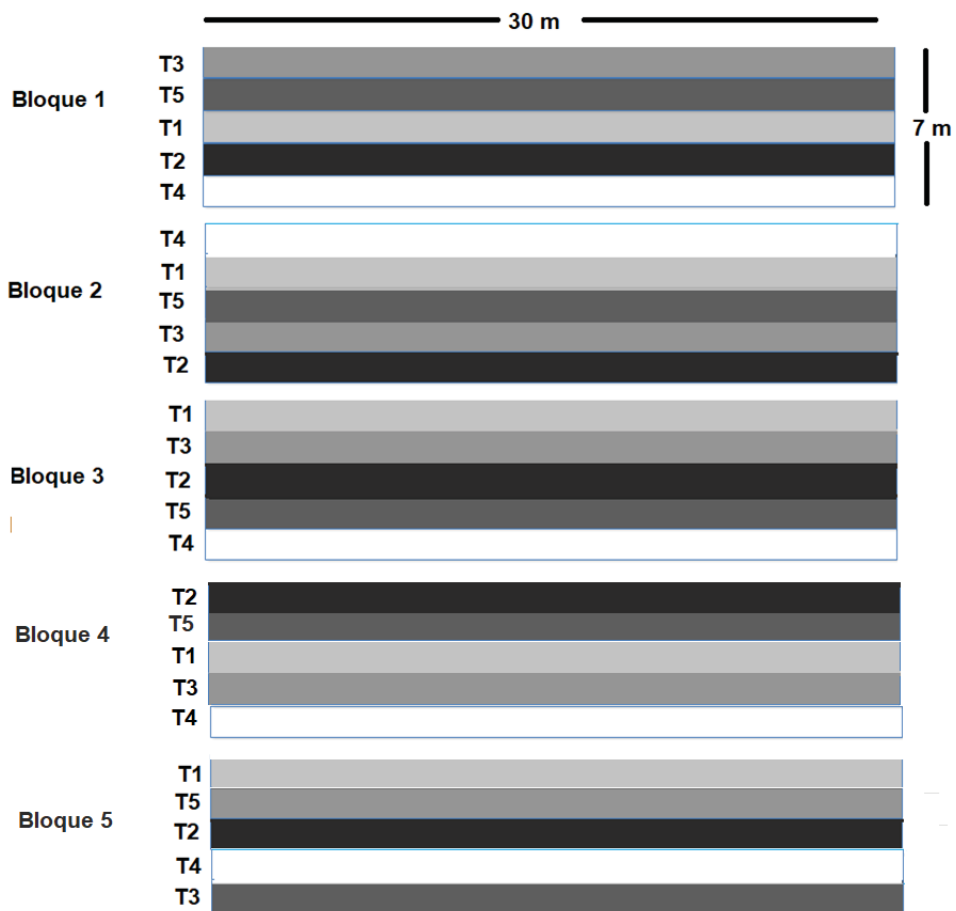


Figura 1. Bloques que contienen todos los tratamientos

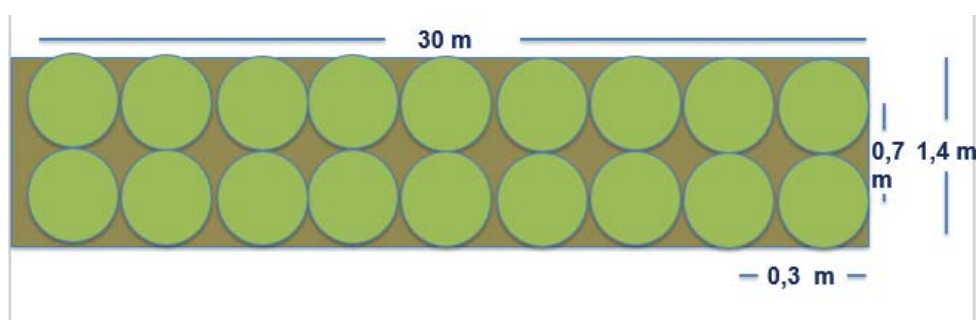


Figura 2. Distribución espacial de las plantas en la unidad experimental

Tiempo estimado: 5 meses

6.5.2. Evaluación del control de la podredumbre del tallo con microorganismos benéficos bajo condiciones de campo

Se realizará el trasplante de almácigos a un campo con historial de *S. sclerotiorum* entre los meses de abril y agosto. Los manejos como fertilización y riego serán realizados de acuerdo a las prácticas habituales del agricultor dueño del campo. Los tratamientos y variables se describen en Tabla 5.

Tabla 5. Descripción de los tratamientos y variables del experimento 5.

Tratamiento	Descripción	Variables
1	Granos de arroz esterilizados	1. Incidencia de la enfermedad (número de plantas con síntomas)
2	Granos de arroz inoculados con <i>C. rosea</i>	
3	Granos de arroz inoculados con <i>T. viride</i>	2. Supervivencia de plantas (número de plantas vivas al final del experimento) 3. Masa de la cabeza
4	Granos de arroz inoculados con <i>C. rosea</i> y <i>T. viride</i>	

Diseño experimental: Se utilizarán el mismo diseño experimental descrito en el experimento 4.

Tiempo estimado: 5 meses

7. Análisis estadístico

Tanto para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, se realizará un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existió efecto de los tratamientos sobre las variables. Si el valor $-p$ asociado al estadístico F es menor o igual a 0,05, se aplicará el test de Tukey ($\alpha=0.05$) para comparar las medias obtenidas. Para analizar los datos se utilizará el software GraphPad Prism 6.

8. Bibliografía

1. Aguilar, W., P. Arce, and W. Rivera. 2016. Isolation and identification of causal agent of white rot in *Allium cepa*, in Llano Grande Cartago, Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 47: 51-56.
2. Andrade, B., R. Matias, B. Corrêa, A. Oliveira, D. Guidolin, and A. Roel. 2018. Phytochemistry, antioxidant potential and antifungal of *Byrsonima crassifolia* on soil phytopathogen control. *Brazilian Journal of Biology* 78: 140-146
3. Araneda, J., A. Pinheiro, L. Rodríguez, and A. Rodríguez. 2016. Apparent intake of fruit, vegetables, and ultra-processed foods by the Chilean population. *Revista Chilena de Nutrición* 43: 271-278.
4. Arias, L., L. Tautiva, W. Piedrahíta, y B. Chaves. 2007. Evaluación de tres métodos de control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Agronomía Colombiana* 25: 131-141.
5. Ayala, Q., E. Cortez, M. Apodaca, V. Leal, F. Valenzuela, y C. Palacios. 2015. Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11: 2149-2156.
6. Belete, E., A. Ayalew, and S. Ahmed. Evaluation of local isolates of *Trichoderma* spp. against black root (*Fusarium solani*) on *Faba bean*. *Journal of Plant Pathology Microbiol.* 6:279.
7. Berdegué, J.A. 2014. "La Agricultura Familiar en Chile", Serie Documento de Trabajo N° 152, Grupo de Trabajo Desarrollo con Cohesión Territorial, programa Cohesión Territorial para el Desarrollo. RIMISP Santiago Chile.
8. Camino, J., A. Gómez, B. Rodríguez, O. Ballesteros, A. Navalon, G. Crovetto, and J. Vílchez. 2011. Accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 427-440.
9. Chitrampalam, P., C. Cox, T. Turini, and B. Pryor. 2010. Efficacy of *Coniothyrium minitans* on lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* in desert agroecosystem. *Biological Control* 55: 92-96.
10. Correa, A., C. Quiroz, P. Sepúlveda, C. Salas, S. Moyano, S. Elgueta, y C. Astudillo. 2017. Fortalecimiento de la inocuidad en hortalizas de hoja. 95 p. Boletín INIA N°348. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Santiago, Chile.

11. Correa, A., S. Elgueta, P. Sepúlveda, y C. Quiroz. 2017. Análisis de información primaria relacionada con la producción de hortalizas de hoja en Chile (lechuga, espinaca y acelga). 67 p. Boletín INIA N°343. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Santiago, Chile.
12. Del Puerto, A., S. Suárez, y D. Palacio. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 52: 372-387.
13. Delhey, R., M. Kiehr, M. Allievi, J. Lusto, S. Frayssinet, B. Sidoti, I. Kroger, P Paoloni, D. Zappacosta, and A. Servera. 2009. *Sclerotinia sclerotiorum* infecting cultivated and invasive plants in the southern pampas and northern Patagonia, Argentina. *International Journal of Experimental Botany* 78: 111-115.
14. Eguillor, P. 2017. Agricultura orgánica: agosto de 2017. Oficina de Estudios y Políticas Agraria, ODEPA, Chile.
15. El- Dabaiky, S. 2017. Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi *in vitro* in comparison with *Trichoderma harzianum*. *Microbial Pathogenesis* 113: 135-143.
16. Elias, L., M. Domingues, K.Moura, R. Harakava, and P. Flavia. 2016. Selection of *Trichoderma* isolates for biological control of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* in lettuce. *Summa Phytopathologica* 42: 216-221.
17. Food and Agriculture Organization (FAO). 2012. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-bt561s.pdf>. Leído el 6 de mayo de 2018.
18. Food and Agriculture Organization (FAO). 2018. El control de plagas. Disponible en: <http://www.fao.org/FOCUS/S/SpecIPr/spro12-s.htm>. Leído el 6 de mayo de 2018.
19. González, R., y Rojas, S. 1966. Estudio analítico del control biológico de plagas agrícolas en Chile. *Agricultura Técnica* 26: 133-147.
20. Haddad, P., L. Leite, L. Garrigós, M. Cleusa, and R. Harakava. 2017. Selection of *Trichoderma spp.* strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 52: 1140-1148
21. Hou, Y., X. Mao, X. Qu, J. Wang, C. Chen, and M. Zhou. 2018. Molecular and biological characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* resistant to the anilinopyrimidine fungicide cyprodinil. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 146: 80-89.

22. Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP). 2016. Ficha productiva de lechuga en Quillota. Disponible en: <https://www.indap.gob.cl/fichas-productivas-afcarica/fichas-productivas-afc-valparaiso>. Leído el 28 de mayo de 2018.
23. Instituto Nacional de Estadísticas (INE). 2017. Estadísticas agrícolas: superficie sembrada, producción y rendimiento año agrícola 2016-2017. Disponible en: <http://www.ine.cl/estadisticas/economicas/estad%C3%ADsticas-agropecuarias>. Leído el 25 de mayo de 2018.
24. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). 2016. Pudrición blanca de la lechuga (*Sclerotinia sclerotiorum*). Disponible en: <http://www.inia.cl/sanidadvegetal/2016/11/04/pudricion-blanca-de-la-lechuga-sclerotinia-sclerotiorum/>. Leído el 25 de mayo de 2018.
25. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 2017. Manual de producción de la lechuga. Boletín INIA N° 09. Santiago, Chile.
26. Kamal, M., K. Lindbeck, S. Savocchia, and G. Ash. 2015. Bacterial biocontrol of diseases caused by *Sclerotinia* in Australia. *Acta Horticulturae* 1105: 123-130.
27. Kaushal, M., A. Kumar, and R. Kaushal. 2017. *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biotechnology* 7: 90. doi: 10.1007/s13205-017-0732-7.
28. Krauss, U., A. Martínez, E. Hidalgo, M. Hoopen, and C. Arroyo. 2002. Two-step liquid/solid state scaled-up production of *Clonostachys rosea*. *Mycological Research* 106: 1449 – 1454.
29. Landschoot, S., J. Carrette, M. Vandecasteele, B. De Baets, M. Hofte, K. Audenaert, and G. Haesaert. 2017. Boscalid-resistance in *Alternaria alternate* and *Alternaria solani* populations: an emerging problem in Europe. *Crop Protection* 92: 49-59.
30. Liu, S., L. Fu, F. Hai, J. Jiang, Z. Che, Y. Tian, and G. Chen. 2017. Sensitivity to Boscalid in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from rapeseed in Henan Province, China. *Journal of Phytopathology* 166: 227-232.
31. López, S., M. Riquelme, E. Botto. 2010. Integración del control biológico y químico de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*. *Revista Colombiana de Entomología* 36: 190-194.
32. Martínez, Z. 2008. Algunos aspectos epidemiológicos del moho blanco de la lechuga (*Lactuca sativa*) en dos municipios productores de Cundinamarca. Tesis Ingeniero Agrónomo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

33. Montealegre, J. 2013. Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile. 145 p. Santiago, Chile.
34. Musiet, D. 2015. Eficacia de diferentes formulaciones de *Clonostachys rosea* en el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en condiciones operacionales de plantas de *Eucalyptus* spp. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Forestales. Universidad de Concepción, Chile.
35. Nava, E., C. García, J. Camacho, y E. Vázquez. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Revista Científica Ra Ximhai 8: 17-29.
36. Navarro, R., M. Aguilera, y S. Lara. 2010. Resultados y lecciones en diagnóstico y prevención de enfermedades en la lechuga. Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura.
37. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2005. Inocuidad de los alimentos: más que buenas prácticas agrícolas. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/publicaciones/articulos/inocuidad-de-los-alimentos-mas-que-buenas-practicas-agricolas-2>. Leído el 5 de mayo de 2018.
38. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2017. Boletín de hortalizas frescas, febrero 2017. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/contenidos-rubro/boletines-del-rubro/boletin-hortalizas-frescas-febrero-de-2017>. Leído el 5 de mayo de 2018.
39. Pineda, J., E. Benavides, A. Duarte, C. Burgos, C. Soto, C. Pineda, F. Fierro, E. Mora, y S. Álvarez. 2017. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar 51: 47-52.
40. Rabeendran, N., E. Jones, D. Moot, and A. Stewart. 2006. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. Biological Control 39: 352-362.
41. Rodríguez, M., G. Cabrera, F. Gozzo, M. Eberlin, and A. Godeas. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. Journal of Applied Microbiology 110: 1177 – 1186.
42. Saavedra, G., F. Corradini, A. Antúnez, S. Felmer, P. Estay, y P. Sepúlveda. 2017. Manual de producción de lechuga. Boletín INIA N° 09. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Santiago, Chile.

43. Sabaté, D., C. Brandan, G. Petroselli, R. Balsells, and M. Audisio. 2018. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological Research* 211: 21-30.
44. Santos, D., and O. Dhingra. 2011. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 60: 472 – 475.
45. Sepúlveda, P., y P. Rebufel. 2009. Presencia de apotecios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en cultivos de lechuga en la región Metropolitana, Chile. XVIII Congreso Nacional de Fitopatología.
46. Smolinska, U., B. Kowalska, W. Kowalczyk, M. Szczech, and A. Murgrabia. 2016. Erradication of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia from soil using organic waste materials as *Trichoderma* fungi carriers. *Journal of Horticultural Research* 24: 101-110.
47. Subbarao, K.V. 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. *Plant Disease* 82: 1068-1078.
48. Sumida, C., J. Daniel, A. Araujod, D. Peitl, L. Abreu. R. Dekker, and M. Cateri. 2018. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. *Biocontrol Science and Technology* 28: 142-156.
49. Viccini, G., M. Mannich, D. Fontana, R. Valdebenito, and D. Mitchell. 2007. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry* 42: 275-278.
50. Warmington, R., and J. Clarkson. 2015. Volatiles from biofumigant plants have a direct effect on carpogenic germination of sclerotia and mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant and Soil* 401: 213-229.
51. Wu, Y., J. Yuan, Y. E. W. Raza, Q. Shen, and Q. Huang. 2015. Effects of volatile organic compounds from *Streptomyces albulus* NJZJSA2 on growth of two fungal pathogens. *Journal of Basic Microbiology* 55: 1104-1117.
52. Zamorano, A. 2005. Determinación del grado de resistencia de aislamientos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. obtenidos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium ashei* Reade.) a los fungicidas iprodiona, benomilo y captan. 82 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

9. Plan de trabajo

El proyecto se llevará a cabo durante un período de cuatro años, comenzando en enero 2019 para terminar en diciembre de 2022. Constará de tres etapas experimentales (etapas 1, 2 y 3), más una de planificación al inicio (etapa 0) y otra de difusión de resultados obtenidos (etapa 4). La secuencia cronológica de las actividades se detalla en Figura 3.

Etapas 0

En la Etapa 0 se realizarán los procedimientos administrativos para la puesta en marcha del proyecto, como lo son la firma de contratos con los proveedores de servicios, con el agricultor para las pruebas de campo, además del arriendo, compra de insumos y selección, contratación y capacitación del personal. Tiempo estimado: 2 meses

Etapas 1

La etapa 1 está asociada al objetivo específico 1: Evaluar la compatibilidad entre los microorganismos benéficos *in vitro*. Para esto se realizarán las siguientes actividades: preparación de los inóculos de microorganismos y el experimento de compatibilidad entre microorganismos benéficos Tiempo estimado: 2 meses

Etapas 2

La etapa 2 está asociada al objetivo específico 2: Evaluar la inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* por acción de 2 microorganismos benéficos. Para esto se realizará un experimento para medir la inhibición del crecimiento micelial del patógeno y otro para medir su capacidad de inhibir la germinación de esclerocios. Tiempo estimado: 5 meses

Etapas 3

La etapa 3 está asociada al objetivo específico 3: evaluar la incidencia de la enfermedad en plantas trasplantadas a suelos con presencia de *S. sclerotiorum* e inoculados con microorganismos benéficos bajo condiciones controladas y condiciones de campo. Para esto se llevarán a cabo las siguientes actividades: inoculación de los microorganismos en granos de arroz, siembra de almácigos de lechuga, inoculación del sustrato y suelo con microorganismos benéficos, el experimento bajo condiciones controladas y el experimento bajo condiciones de campo. Tiempo estimado: 20 meses

Etapa 4

La etapa 4 está asociada a la difusión del proyecto, en la cual se llevarán a cabo las siguientes actividades: seminario de apertura, desarrollo de informes técnicos con los resultados obtenidos al término de cada experimento, un seminario de difusión una vez al año, parcelas demostrativas y un seminario de cierre. Tiempo estimado: 19 meses

9.1. Carta Gantt

La carta Gantt se presenta en figura 3.

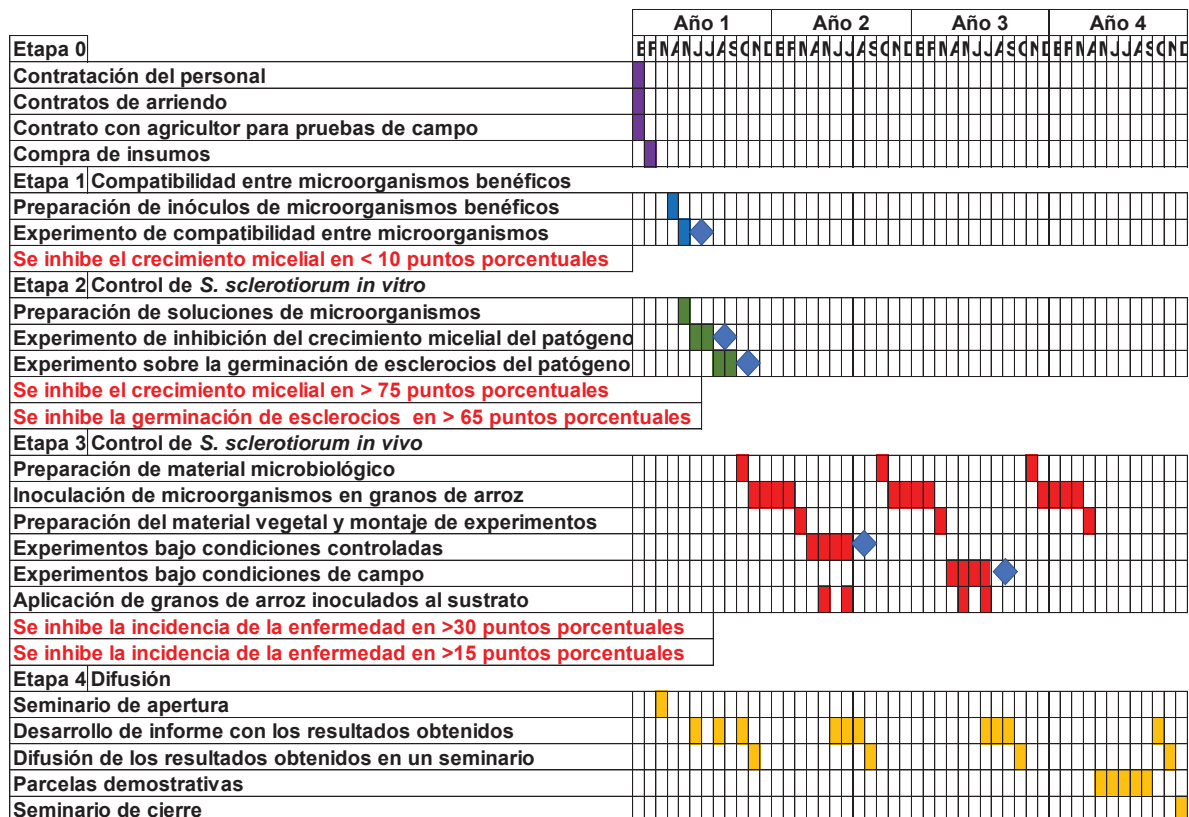


Figura 3. Carta Gantt

10. Resultados esperados

Cada resultado esperado se asocia a un objetivo específico, los cuales se detallan en Tabla 6.

Tabla 6. Resultados esperados.

Hipótesis	Objetivo general	Objetivos específicos	Resultados esperados
Las plantas de lechuga trasplantadas en suelos inoculados con <i>Clonostachys rosea</i> y <i>Trichoderma viride</i> presentan una menor incidencia de la podredumbre del tallo, permitiendo reducir las pérdidas de plantas provocadas por la enfermedad durante todo el cultivo	Reducir la incidencia de la podredumbre del tallo en cultivares de lechuga escarola en la V región en los meses de otoño-invierno a través del uso de microorganismos benéficos	Evaluar la compatibilidad entre los microorganismos benéficos <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> La aplicación de una solución de <i>C. rosea</i> en una colonia de <i>T. viride</i> disminuye en 10 puntos porcentuales o menos el crecimiento micelial (mm) del segundo. La aplicación de una solución de <i>T. viride</i> en una colonia de <i>C. rosea</i> disminuye en 10 puntos porcentuales o menos el crecimiento micelial (mm) del segundo.
		Evaluar la inhibición de cepas locales de <i>S. sclerotiorum</i> por acción de dos microorganismos benéficos	<ul style="list-style-type: none"> El crecimiento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> disminuye en 70 puntos porcentuales al aplicar una solución de microorganismos benéficos La germinación de los esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> disminuye en 65 puntos porcentuales al aplicar una solución de microorganismos benéficos.
		Evaluar la incidencia de la enfermedad en plantines trasplantados a sustrato inoculado con los microorganismos benéficos y <i>S. sclerotiorum</i> bajo condiciones controladas y condiciones de campo	<ul style="list-style-type: none"> La inoculación del sustrato con <i>S. sclerotiorum</i> y microorganismos benéficos reduce la incidencia de la enfermedad en 30 puntos porcentuales. La inoculación del suelo con microorganismos benéficos disminuye la incidencia de la enfermedad en 10 puntos porcentuales.

11. Cargos y funciones

En tabla 7 se detallan los cargos y funciones.

Tabla 7. Descripción de cargos y funciones

Formación/ grado académico	Cargo en el proyecto	Funciones
Ingeniero Agrónomo Ph. D. en Bioingeniería	Director	<ol style="list-style-type: none"> 1.Gestionar, dirigir y coordinar todas las actividades del proyecto 2.Realizar presentaciones del proyecto en la agencia de financiamiento tanto al inicio como al término 3.Gestionar arriendos de equipos, laboratorio e invernadero 4.Gestionar la firma de contratos con el agricultor donde se realizarán los experimentos <i>in vivo</i> bajo condiciones de campo 5.Gestionar contratos con la entidad que financia el proyecto 6.Aprobar la ejecución de experimentos planificados por los distintos agentes del proyecto 7.Elaborar informes de avance del proyecto 8.Realizará presentaciones en seminarios sobre los resultados obtenidos
Ingeniero Agrónomo Ph.D. en Fitopatología	Director alterno	<ol style="list-style-type: none"> 1.Apoyar al director en todas sus funciones, reemplazando a este en caso de ausencia 2.Seleccionar y contratar al personal científico 3.Coordinar charlas con instituciones agrícolas, productores y parcelas demostrativas 4.Adquirir materiales e insumos requeridos para todo el proyecto 5.Supervisar a los doctores jóvenes
Ingeniero Agrónomo Ph.D. en Fitopatología Doctor joven 1	Investigador principal	<ol style="list-style-type: none"> 1.Planificar y ejecutar todos los experimentos <i>in vivo</i> 2.Planificar todos los experimentos <i>in vitro</i> 3.Colectar y procesar datos obtenidos de experimentos <i>in vitro</i> 4.Asistir en la elaboración de informes de avance 5.Elaborar artículos científicos con la información generada 6.Asistir en la ejecución de los experimentos <i>in vivo</i>
Biólogo Ph.D. en Ciencias, mención Microbiología Doctor joven 1	Investigador asistente	<ol style="list-style-type: none"> 1.Ejecutar los experimentos <i>in vitro</i> 2.Mantener y multiplicar microorganismos 3.Inocular microorganismos benéficos en granos de arroz
Contador	Encargado de finanzas	<ol style="list-style-type: none"> 1.Mantener un registro de todos los flujos económicos del proyecto 2.Entregar informes mensualmente al director del proyecto

Ingeniero Agrónomo	Jefe de campo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Supervisar los manejos de los cultivos de lechuga para los experimentos <i>in vivo</i> 2. Trasladar materiales e insumos necesarios para los experimentos <i>in vivo</i> 3. Llevar datos del campo al laboratorio
Técnico Agrícola	Encargado de campo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Montar los experimentos <i>in vivo</i> 2. Colectar datos 3. Supervisar a los obreros
Técnico de laboratorio	Ayudante de laboratorio	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar y montar los experimentos <i>in vitro</i> 2. Colectar datos
Obrero	Encargado de plantas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar todos los manejos necesarios en el cultivo durante los experimentos <i>in vivo</i> 2. Realizar montaje de los experimentos bajo supervisión del técnico agrícola

12. Presupuesto

En figura 7 se presenta el presupuesto.

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

ITEM	COSTO TOTAL M\$	FINANCIAMIENTO	
		INSTITUCIONAL M\$	FONDEF M\$
HON, INC, REM	221.038	68.850	152.188
SUB.	1.400	0	1.400
EQUIPOS	20.452	3.332	16.620
SOFTWARE	150	0	150
M. FUNGIBLE	18.389	100	17.979
DIFUSIÓN	8.200	300	7.900
INFR	42.050	22.050	20.000
GASTOS GENERALES	800	500	800
GASTOS DE ADM. SUPERIOR	2.000	1.980	2.000
TOTAL	314.479	97.112	219.037
PORCENTAJE	100%	32%	68%
Validación % Aportes		Cumple Aportes Mínimos	Cumple Máx. FONDEF

Figura 7. Presupuesto.