



Universidad  
Nacional  
de Loja

# Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Agronomía

**Control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de  
microalgas del género *Chlorella* spp.**

Trabajo de Integración Curricular  
previo a la obtención del título de  
Ingeniero Agrónomo

**AUTOR:**

María Isabel Iñiguez Piedra

**DIRECTOR:**

Ing. Angel Rolando Robles Carrión PhD.

Loja – Ecuador

2023

## Certificación

Loja, 15 de agosto del 2022.

Ing. Agr. Angel Rolando Robles Carrión PhD.

**DIRECTOR TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

### **CERTIFICO:**

Que he revisado y orientado todo proceso de la elaboración de tesis del trabajo de Integración Curricular: **Control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de microalgas del género *Chlorella spp***, de autoría de la estudiante María Isabel Iñiguez Piedra, con cedula de identidad Nro.**1900859990** previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja , apruebo y autorizo su presentación para los tramites de titulación.



Ángel Rolando Robles Carrión PhD

**DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACION CURRICULAR**

## **Autoría**

“Yo, María Isabel Iñiguez Piedra, declaro ser el autor del presente Trabajo Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes Jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma. Declaro, que durante la investigación y elaboración de la tesis el uso de referencias publicadas por otros autores cumplió con las normas y regulaciones establecidas. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.”

**Firma:**



**Autor:** María Isabel Iñiguez Piedra

**Cédula de Identidad:** 1900859990

**Fecha:** 01/02/2023.

**Correo electrónico:** maria.i.iniguez@unl.edu.ec

**Teléfono o Celular:** 0980863328

**Carta de autorización de tesis por parte del autor(a) para la consulta de producción parcial o total, y publicación electrónica de texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.**

Yo, María Isabel Iñiguez Piedra , declaro ser la autora de la tesis titulada “**control biológico de *sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de microalgas del género *chlorella* spp.**” como requisito para optar al grado de Ingeniero Agrónomo, por lo que autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre a mundo la publicación intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Intitucional, en las redes de información del país y del exterior, con las que mantenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja al primer día del mes de febrero del dos mil vientesres

**Firma:**



**Autor:** María Isabel Iñiguez Piedra

**Cédula:** 1900859990

**Dirección:** Zamora.

**Correo electrónico:** mariaisabeliegezpiedra@gmail.com

**Teléfono: Celular:** 0980863328

**DATOS COPLEMENTARIOS**

**Director de Trabajo Integración Curricular:** Ing. Angel Robles Castillo.Ph.D.

## **Dedicatoria**

Dedico mi tesis primeramente a Dios por darme la salud y valentía para enfrentar las adversidades a lo largo de mi carrera y poder aprender de cada uno de los errores y sobre todo para no rendirme en el camino a esta meta.

A mi madre Mercy Piedra y mi abuelita Isabel, quienes con sus palabras de aliento no dejaron que decaiga y que siguiera adelante, por su paciencia y amor.

A mis hermanos Guigui, Alex y Jeremías quienes siempre estuvieron apoyándome y por haber impregnado en mí el deseo de superación.

A mi novio Johnso por su comprensión, amor, cariño y apoyo en cada uno de los pasos que he dado.

Y a todas las personas que de una u otra forma me brindaron su apoyo para lograr concluir con mi formación de pregrado y ser mejor persona cada día

*María Isabel Iñiguez Piedra*

## **Agradecimiento**

A la Universidad Nacional de Loja por abrirme las puertas de su alma mater, a la Carrera de Ingeniería Agronómica y a su personal docente, por los valiosos conocimientos impartidos y su apoyo para seguir adelante día a día en mi carrera por ser profesional.

Agradezco a mi director de tesis, PhD Angel Robles por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como por haber tenido toda la paciencia del mundo durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Mi agradecimiento al personal técnico del Laboratorio de Biotecnología, por su apoyo durante la ejecución de mi tesis, quienes me impartieron sus conocimientos y experiencias para que este trabajo culmine de la mejor forma.

*María Isabel Iñiguez Piedra*

## Índice de Contenidos

Portada.....	i
Certificación .....	ii
Autoría .....	iii
Carta de autorización .....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento .....	vi
Índice de Contenido.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas .....	xi
Índice de anexos.....	xii
<b>1. Resumen .....</b>	<b>2</b>
1.1. Abstract.....	3
<b>2. Introducción .....</b>	<b>4</b>
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
<b>3. Marco teórico .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Antecedentes.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Cultivo de Lechuga .....</b>	<b>7</b>
3.2.1. Origen y Generalidades.....	7
3.2.2. Taxonomía .....	7
3.2.3. Descripción botánica.....	7
3.2.4. Propiedades nutricionales de la lechuga .....	8
<b>3.3. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	<b>9</b>
3.3.1. Taxonomía .....	9
3.3.2. Botánica .....	9
3.3.3. Etiología y epidemiología .....	10
3.3.4. Biología del esclerocio.....	10
<b>3.4. Control de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>3.5. Microorganismos antagonistas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>3.6. Microalgas en la agricultura .....</b>	<b>12</b>

3.6.1. <i>Chlorella</i> spp.....	13
<b>4. Metodología.....</b>	<b>13</b>
4.1. Localización de la zona de estudio .....	13
4.2. Enfoque metodológico .....	14
4.3. Técnicas de obtención de datos.....	14
4.4. Tipo de diseño.....	14
<b>4.5. Metodología General.....</b>	<b>15</b>
4.5.1. Preparación de suelo .....	15
<b>4.5.2. Trabajo de laboratorio .....</b>	<b>15</b>
4.5.2.1. Aislamiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en laboratorio .....	15
4.5.2.2. Inoculación de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	16
4.5.2.3. Inoculación de <i>Chlorella</i> spp .....	16
<b>4.6. Metodología para el Primer objetivo: “Determinar los parámetros del progreso de la enfermedad, antes y después de la aplicación del biocontrol (Incidencia; Severidad Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad (ABCPE) y la Tasa de Progreso de la Enfermedad”</b>	
17	
4.6.1. Incidencia.....	17
4.6.2. Severidad.....	18
4.6.3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) .....	20
4.6.4. Tasa de Progreso de la Enfermedad .....	20
<b>3.7. Metodología para el segundo objetivo: “Evaluación de la aplicación de <i>Chlorella</i> spp. como biocontrolador de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en lechuga (Eficacia del Biocontrol (EB) y el Índice de Sanidad del Cultivo (ISC)”.....</b>	<b>21</b>
3.7.1. Eficacia del Biocontrol (EB).....	21
3.7.2. Índice de sanidad del cultivo (ISC).....	21
<b>3.8. Análisis estadístico .....</b>	<b>21</b>
<b>5. Resultados.....</b>	<b>21</b>
4.1. Parámetros Etiológicos antes de la aplicación del biocontrol .....	21
4.2. Parámetros Etiológicos después de la aplicación del biocontrol.....	23
<b>4.3. Evaluación de la aplicación de <i>Chlorella</i> spp. como biocontrolador de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en lechuga.....</b>	<b>25</b>
4.3.1. Eficacia del Biocontrol (EB).....	25
4.3.2. Índice de sanidad del cultivo (ISC).....	25
<b>6. Discusion.....</b>	<b>26</b>



<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
<b>8. Recomendaciones.....</b>	<b>27</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>28</b>
<b>10. Anexos.....</b>	<b>33</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diseño Experimental.....	13
<b>Figura 2.</b> Escala visual grafica de severidad de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en el cultivo de lechuga.....	17
<b>Figura 3.</b> Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) antes de la aplicación del biocontrol.....	21
<b>Figura 4.</b> Tasa del progreso de la enfermedad (TPE) antes de la aplicación del biocontrol...	22
<b>Figura 5.</b> Severidad de los tratamientos en el cultivo de lechuga después de la aplicación de <i>Chlorella</i> sp.....	23
<b>Figura 6.</b> Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) después de la aplicación del biocontrol.....	23
<b>Figura 7.</b> Tasa del progreso de la enfermedad (TPE) después de la aplicación del biocontrol.....	24
<b>Figura 8.</b> Índice de sanidad del cultivo (ISC).....	25

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Promedios por tratamientos de Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), antes de la aplicación de biocontrol ( <i>Chlorella</i> spp) y control químico. .....	39
<b>Tabla 2.</b> Promedios por tratamientos de Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), Tasa del progreso de la enfermedad (TPE), después de la aplicación de biocontrol ( <i>Chlorella</i> spp) y control químico.....	40
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la Prueba de ANAVA para área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) antes de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05) .....	42
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la Prueba de ANAVA para tasa del progreso de la enfermedad (TPE) antes de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05) .....	42
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la Prueba de ANAVA para área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) después de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05). .....	43
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la Prueba de ANAVA para tasa del progreso de la enfermedad (TPE) después de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05).....	43
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la Prueba de ANAVA para índice de sanidad del cultivo (ISC), (p valor significativo < 0,05).....	43

## Índice de anexos

<b>Anexos 1.</b> Evidencias fotográficas. ....	33
<b>Anexo 1.2.</b> A) Hongo <i>Sclerotinia sclerotium</i> en caja Petri. B) Hongo <i>Sclerotinia sclerotium</i> aislado en medio líquido. ....	34
<b>Anexo 1.3.</b> A) Elaboración del semillero. B) Plántulas luego de 10 días de realización del semillero. ....	34
<b>Anexo 1.4.</b> Inoculación de <i>Sclerotinia sclerotium</i> .A,B) Corte de raíces con guillette. C) Inmersión de raíces en disolución de <i>Sclerotinia sclerotium</i> . ....	35
<b>Anexo 1.5.</b> Plantas trasplantadas luego de la inoculación de <i>Sclerotinia sclerotium</i> . ....	35
<b>Anexo 1.6.</b> Inoculación de <i>Chlorella</i> sp. A,B) Inmersión de raíces en disolución de <i>Chlorella</i> spp. ....	35
<b>Anexo 1.7.</b> Primeros síntomas de <i>Sclerotinia sclerotium</i> en los tratamientos donde fue inoculada la enfermedad. A) T2R1 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> ). B) T3R1 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + <i>Chlorella</i> spp). C) T4R1 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + Control químico). ....	36
<b>Anexo 1.8.</b> Síntomas de <i>Sclerotinia sclerotium</i> después de la aplicación del biocontrol y control químico. A) T2R1 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> ) no se aplicó biocontrol. Pero los síntomas persistieron. B) T3R1 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + <i>Chlorella</i> spp). C) T4R1 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + Control químico). ....	37
<b>Anexo 1.9.</b> Severidad antes de la aplicación del Biocontrol, luego de la aplicación del hongo patógeno. A) T2 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> ). B) T3 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + <i>Chlorella</i> ). C) T4 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + Control químico). D) T1 (Testigo) ....	38
<b>Anexo 1.10.</b> Severidad luego de la aplicación del biocontrol. A) T2 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> ). B) T4 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + Control químico). C) T3 ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> + <i>Chlorella</i> ). D) T1 (Testigo). ....	39
<b>Anexo 2</b> .Tablas de datos y análisis estadístico. ....	39
<b>Anexo 3.</b> Certificación de traducción del abstract .....	44

## **1. Título**

**Control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de microalgas del género *Chlorella* spp**

## 1. Resumen

Entre las microalgas el género *Chlorella* es uno de los más estudiados y dentro de este, la especie *Chlorella vulgaris*. A partir de su biomasa se pueden extraer diversos extractos los cuales pueden ayudar en la erradicación de enfermedades fúngicas en los cultivos de mayor interés económico es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar el control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de microalgas del género *Chlorella* spp. El ensayo se realizó en la ciudad de Loja en la quinta experimental “La Argelia” de la Universidad Nacional de Loja la cual se encuentra a una Latitud de -3.98333 y Longitud: -79.2 3° 58' 60" Sur, 79° 12' 0" Oeste, con el propósito de realizar un control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en el cultivo de lechuga con el uso de microalgas del género *Chlorella* spp. Se establecieron 4 tratamientos: T1 (Testigo), T2 (*Sclerotinia sclerotiorum*), T3 (*Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella* spp), T4 (*Sclerotinia sclerotiorum* + Control químico). En donde se usó un diseño experimental totalmente al azar, se efectuó un análisis de varianza, pruebas de significación de Tukey al 5 % en donde del análisis de eficacia del Biocontrol se concluye que la aplicación de *Chlorella* spp como biocontrolador de *Sclerotinia sclerotiorum* tuvo una baja eficacia en su erradicación.

**Palabras clave:** Microalgas, *Chlorella* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, lechuga, control biológico

## 1.1. Abstract

Within agriculture, biological control is used to eradicate pests and diseases that are common and harmful to crops. Various extracts of *Chlorella vulgaris* can be extracted from its biomass, which can be used to eradicate fungal diseases in crops of major economic interest, improving quality and quantity of production. Therefore, this work examined how microalgae of the genus *Chlorella* could be used to control *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce.. The trial was conducted in the city of Loja in the experimental farm "La Argelia" from National University of Loja, which is located at a Latitude of -3.98333 and Longitude: -79.2 3° 58' 60" South, 79° 12' 0" West. Four treatments were established: T1 (Control), T2 (*Sclerotinia sclerotiorum*), T3 (*Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella* spp), T4 (*Sclerotinia sclerotiorum* + Chemical control). In this study, a totally randomized experimental design was used, and an analysis of variance and Tukey's significance test were applied. Based on the analysis of the efficacy of the biocontrol, it was concluded that *Chlorella* sp was ineffective in eradicating *Sclerotinia sclerotiorum* as a biocontroller.

**Key words:** Microalgae, *Chlorella* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, lettuce, biological control.

## 2. Introducción

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una planta herbácea de la familia Compositae, se cultiva en la mayoría de los países de América y requiere de suelos bien drenados y ricos en fertilizantes orgánicos (Terry et al., 2010). Es uno de los vegetales con mayor utilización en la población mundial y sus importantes características son la frescura, digestibilidad y los beneficios que aporta a la salud (Boris et al., 2016).

*Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo que pertenece a la familia Sclerotiniaceae. Algunas variedades del género *Sclerotinia* son agentes fitopatógenos que producen daños significativos en numerosos cultivos de interés económico a nivel mundial (Mora et al., 2020). Al presentar cultivos con este hongo, los agricultores intentan manejar la enfermedad mediante aspersiones de fungicidas convencionales cuya eficacia frecuentemente es baja, ya que no se usan los ingredientes adecuados, son aplicados con una mala cobertura sobre las plantas y es probable que exista resistencia a estos plaguicidas (Ayala Armenta et al., 2015).

Los trabajos desarrollados para generar diversas alternativas de manejo por diversos investigadores se han dirigido hacia la búsqueda de nuevas formas de control de esta enfermedad, de ahí que se hayan evaluado alternativas de control biológico, destacando el uso de algas desde los años 50 donde se han generado extractos de macroalgas (López Padrón et al., 2020). Actualmente, estos extractos han ganado aceptación como bioestimuladores de las plantas (López Padrón et al., 2020), ya que originan respuestas fisiológicas en las plantas y además estimulan la tolerancia de las plantas a un amplio rango de estrés abiótico (Battacharyya et al., 2015).

También actúan en procesos que desencadenan mecanismos de defensa e inmunidad de las plantas, reduciendo la infestación por nemátodos e incrementando la resistencia a enfermedades fúngicas y bacterianas (López Padrón et al., 2020). En estudios recientes, se ha demostrado el potencial de los extractos de algas para el control de diversos tipos de hongos, los cuales están contenidos en extractos o en los productos extracelulares liberados al medio. Se ha documentado que estos compuestos presentan efectos antibacteriales, antifúngicos, antiplasmodial y antiprotozoarios (Valdés Santiago et al., 2018).

Las microalgas son organismos con gran potencial biotecnológico que podrían utilizarse para sustituir pesticidas químicos (Valdés Santiago et al., 2018). El control biológico se ha convertido en una herramienta importante en la búsqueda de una mayor eficiencia en el control de plagas y enfermedades (Viera et al., 2020), lo que conlleva a una producción inteligente, sin el uso indiscriminado de plaguicidas. *Sclerotinia sclerotiorum* es una enfermedad fitopatógena muy expresiva, además de que puede persistir durante varios años en el suelo y el control



químico no es eficaz (Fiquitiva et al., 2020). Por lo tanto, existe la necesidad de complementariedad en el sistema de producción, y el control biológico es una alternativa a este problema, logrando así minimizar el efecto e incidencia de esta enfermedad.

Debido a esta problemática que surgió por consecuencia del uso irracional de plaguicidas y la resistencia generada de los patógenos, se ha propuesto como pregunta de investigación ¿Cuál es el efecto de *Chlorella* spp y su uso potencial en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga?

Por todo lo expuesto, se propone realizar un Control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de microalgas del género *Chlorella* spp. Dado que en la actualidad existen muy pocos estudios en nuestro país sobre el uso de *Chlorella* spp como controlador biológico de enfermedades fúngicas. Con esta investigación se planea aportar una nueva alternativa de producción sostenible a bajo costo para así evitar el uso indiscriminado de fungicidas químicos. Por ellos se han planteado los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

- Determinar el efecto del control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de microalgas del género *Chlorella* spp en el cantón Loja, sector La Argelia

### **Objetivos Específicos**

- Determinar los parámetros del progreso de la enfermedad, antes y después de la aplicación del biocontrol (Incidencia; Severidad; Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad (ABCPE) y la Tasa de Progreso de la Enfermedad).
- Evaluación de la aplicación de *Chlorella* spp. como biocontrolador de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga (Eficacia del Biocontrol (EB) y el Índice de Sanidad del Cultivo (ISC).

### 3. Marco teórico

#### 3.1. Antecedentes

De acuerdo con Jiménez (2011), extractos acuosos y etanólicos obtenidos de nueve macroalgas marinas chilenas recolectadas en diferentes temporadas se examinaron in vitro e in vivo en busca de propiedades que reduzcan el crecimiento de patógenos de plantas o disminuyan la gravedad de las lesiones de los tejidos foliares de las plantas después de la infección por patógenos. Los extractos orgánicos o acuosos crudos particulares mostraron efectos sobre el crecimiento de bacterias patógenas, mientras que otros mostraron efectos importantes contra hongos o virus patógenos, ya sea inhibiendo el crecimiento del micelio fúngico o reduciendo los síntomas de la enfermedad en las hojas causada por el desafío del patógeno. Extractos orgánicos obtenidos del alga parda *Lessonia trabeculata* inhibió el crecimiento bacteriano y redujo tanto el número como el tamaño de la lesión necrótica en las hojas de tomate después de la infección con *Botrytis cinerea*. Los extractos acuoso y etanólico del alga roja *Gracillaria chilensis* previenen el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*, mostrando una respuesta que depende de las dosis y el tiempo de recolección. De manera similar, los extractos acuoso y etanólico del alga parda *Durvillaea antártica* lograron disminuir el daño causado por el virus del mosaico del tabaco (TMV) en hojas de tabaco, y el procedimiento acuoso es, además, más efectivo e independiente de la estacionalidad. Estos resultados sugieren que las macroalgas contienen compuestos con diferentes propiedades químicas que podrían ser considerados para el control de patógenos específicos de plantas.

Esserti (2017), en un ensayo realizado donde evaluó in vitro y en invernadero el efecto de extractos de las algas pardas *Cystoseira myriophylloides*, *Laminaria digitata* y *Fucus spiralis* contra los patógenos del tomate *Verticillium dahliae* y *Agrobacterium tumefaciens*. Se observó una inhibición significativa del crecimiento solo con extractos metanólicos de algas (MSE). Se evaluó la resistencia a enfermedades en invernadero contra *Verticillium marchitez* mediante la aplicación por aspersión de extractos acuosos de algas marinas (ASE) en toda la planta o mediante imbibición de semillas. Ambos métodos redujeron significativamente la gravedad de la enfermedad independientemente de la especie de alga, aunque la protección observada después de los tratamientos con semillas fue mayor que la observada después del tratamiento con rociadores. La aplicación por aspersión de ASE de *C. myriophylloides* y *F. spiralis* también resultó en una reducción significativa de la enfermedad de la agalla de la corona causada por el patógeno bacteriano *A. tumefaciens*. Las plantas tratadas con ASE tenían niveles significativamente más altos de actividad de las enzimas de defensa polifenol oxidasa y

peroxidasa en comparación con el control. ASE no inhibió el crecimiento del micelio de *V. dahliae* ni el desarrollo de *A. tumefaciens* in vitro; por lo tanto, se sugiere que la resistencia inducida es probablemente el principal mecanismo de protección proporcionado por ASE.

### **3.2.Cultivo de Lechuga**

#### **3.2.1. Origen y Generalidades**

La lechuga es un cultivo que la humanidad domesticó desde hace unos 2 500 años. Su centro de origen se encuentra en las regiones templadas de Europa, Asia y América del Norte. El cultivo de la lechuga comenzó con los egipcios, que producían aceite a partir de sus semillas y fue la representación de una planta sagrada de Min, Dios de la reproducción. De los egipcios el cultivo pasó a los griegos, quienes a su vez lo dieron a conocer a los romanos. Fue tal la importancia que los romanos le dieron a su cultivo que prevalece hasta nuestros días la llamada lechuga romana, de gran importancia, aunque no es el tipo más extendido (Casseres, 1980).

#### **3.2.2. Taxonomía**

Según la USDA (2010), la clasificación taxonómica de la lechuga es la siguiente:

**Reino:** Plantae

**División:** Spermatophyta

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** Sinandrales

**Familia:** Compositaceae

**Género:** *Lactuca*

**Especie:** *L. sativa*

#### **3.2.3. Descripción botánica**

La lechuga es una hortaliza de hojas sueltas o acogolladas. Es una planta anual o bienal (Florez et al., 2012). La lechuga es una planta Autógama, que posee una raíz pivotante, relativamente gruesa en la corona que se adelgaza gradualmente en profundidad, la cual puede alcanzar más de 60 cm de profundidad (Jackson, 1995).

La mayor densidad de raíces laterales está cerca de la superficie; por lo tanto, la absorción de nutrientes y agua ocurre mayormente en los niveles superiores del suelo (Jackson, 1995).

Las hojas sésiles están distribuidas en forma de espiral, en una roseta densa alrededor de un tallo corto. El desarrollo de la roseta puede continuar durante el periodo vegetativo de la planta como es en el caso de las lechugas de hoja, o formar una cabeza redondeada como en las escarolas y butterhead, o una cabeza elongada como en el caso de Costinas o Romanas. Hay

una considerable diversidad de colores, formas, tipos de superficies, márgenes y textura entre los diversos tipos y formas de lechuga. Los grados de color verde de las hojas pueden variar desde oscuros a claros, pero la cualidad de verde puede ser variado por tintes amarillentos. Además, la presencia de antocianinas puede estar en toda la hoja o en sectores dando tonalidades diferentes (Ryder, 1999).

Una vez que el periodo vegetativo llega a su madurez, se produce la elongación del tallo, que puede alcanzar 1 m de altura, y el periodo reproductivo comienza. Un tallo simple termina en una inflorescencia, la cual es una densa panícula corimbosa compuesta por muchos capítulos, cada uno consistiendo en varios floretes, que varían entre 12 a 20. Estos floretes son todos de tipo rayo, perfectos y fértiles, están rodeados de 3 o 4 filas de brácteas. Cada florete consiste en un simple, ligulado pétalo amarillo con cinco dientes. La parte baja está fusionada como un tubo y rodea los órganos sexuales. Cada florete tiene un carpelo doble, consistiendo en un estilo elongado y un estigma dividido (Ryder, 1999).

Hay cinco estambres, las anteras están fusionadas formando un tubo. Las flores abren una sola vez, en la mañana, permaneciendo abiertas por una hora si está calurosa la mañana, o bien por varias horas si está fresco y nublado. Cuando la flor se abre, el estilo se elonga mientras las anteras dehiscen desde adentro y el polen suelto es barrido hacia arriba por el estilo y los pelos del estigma (Ryder, 1999).

El ovario, que está bajo la corola, una vez que es fertilizado forma un embrión que está rodeado por tejido nucelar y endospermico y un delgado pericarpio, los cuales forman un fruto llamado aquenio, que está coronado en la parte superior por pelos. Los aquenios maduran aproximadamente 2 semanas después de la fertilización y pueden ser de diferentes colores, desde negro a gris, blanco, café o amarillos. Las semillas recién cosechadas normalmente tienen un periodo de dormancia corto, pero la mayoría de los cultivares presenta diferentes niveles de termodormancia (Mou, 2008).

#### **3.2.4. Propiedades nutricionales de la lechuga**

La lechuga presenta elevado contenido de agua del 90 al 95%, es rica en antioxidantes, como también en vitaminas A, C, E, B1, B2, B3, B9 y K; entre los principales minerales se tiene al fósforo, hierro, calcio, potasio y aminoácidos. Las hojas exteriores más verdes son las que tienen mayor contenido de vitamina C y hierro. Sin embargo, el aporte de nitrógeno en forma de proteína que se encuentra en las hojas de esta hortaliza es muy importante desde el punto de vista alimentario. A la vez es una fuente importante de folato (vitamina B9), esencial para aquellas mujeres embarazadas, debido a la prevención de los defectos congénitos en recién

nacidos. Contiene beta carotenos y antioxidantes que ayudan en la prevención de enfermedades degenerativas, entre las que se incluye el cáncer y la arterioesclerosis (Mamani et al., 2015).

### **3.3. Sclerotinia sclerotiorum**

El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* infecta cientos de especies de plantas y es una enfermedad mayor en cultivos hortícolas y oleaginosas, causando la podredumbre del tallo de *Sclerotinia* sp o también llamada moho blanco. La viabilidad a largo plazo de los esclerocios en el suelo, los cuales son estructuras que ayudan a la supervivencia del hongo en ausencia de plantas huésped, hace que el manejo de esta enfermedad sea complicado. Las estrategias de control actuales se basan en la utilización de agroquímicos y prácticas culturales adecuadas. Actualmente, todavía existen serias dificultades en el control de la enfermedad que requiere métodos alternativos, más ecológicos y sostenibles, como el uso de cultivares resistentes y biopesticidas. La investigación que se realiza actualmente sobre la interacción *Sclerotinia*-Brassica ha generado resultados interesantes y augura unas perspectivas de futuro prometedoras para el control de la podredumbre del tallo (Madloo et al., 2017).

#### **3.3.1. Taxonomía**

Según Bolton (2006) la taxonomía de *Sclerotinia sclerotiorum* es la siguiente:

**Reino:** *Fungi*

**Filo:** Ascomycota

**Subdivisión:** Leotiomycetes

**Clase:** Dothideomycetes

**Subclase:** Leotiomycetidae

**Orden:** Helotiales

**Familia:** Sclerotiniaceae

**Género:** *Sclerotinia*

#### **3.3.2. Botánica**

Esta especie produce esclerocios que en los medios de cultivo se producen en la parte del margen de las colonias, formando anillos concéntricos, líneas radiales u otros patrones. Individualmente los esclerocios alcanzan dimensiones que varían de 2–20 mm de longitud. La corteza esclerótica está compuesta de una textura prismática con células globosas, continuando más allá de la corteza en forma erecta (Smolińska y Kowalska, 2018).

### **3.3.3. Etiología y epidemiología**

*Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo que tiene la capacidad de producir esclerocios, los cuales son estructuras de resistencia que permanecen en el suelo por largos periodos de tiempo. Los esclerocios germinan miceliogénicamente o carpogénicamente (Hegedus y Rimmer, 2005). Cuando la germinación es carpogénica, forma unas estructuras llamadas apotecios, los cuales son formados en la superficie del suelo en donde son liberadas las ascosporas y dispersadas por el aire. En condiciones óptimas, un apotecio puede permanecer en el campo aproximadamente 10 días liberando 1600 esporas por hora (Clarkson et al., 2003), es por ello que la infección de la mayoría de las especies de cultivo está asociada principalmente a ascosporas (Young et al., 2004); sin embargo, estas no pueden iniciar la infección directa de hojas y tallos de plantas sanas, esto sólo ocurre cuando las ascosporas colonizan tejido muerto o senescente, usualmente flores senescentes que sirven como fuente de nutrientes para el desarrollo del hongo, antes de la formación de las estructuras de infección y penetración de otros tejidos sanos (Abawi et al., 1975). Los síntomas que causa este patógeno son la formación de lesiones oscuras y acuosas en las hojas y tallos de la planta infectada, en las cuales se desarrolla tejido necrótico con la aparición de micelio blanco y la subsecuente formación de esclerocios, el cual es el síntoma más evidente de que la planta está infectada por *S. sclerotiorum*. La germinación miceliogénica del esclerocio en la superficie del suelo puede resultar en la infección de las plantas adyacentes. El micelio puede penetrar la cutícula de la planta hospedera utilizando enzimas degradadoras de pared celular o de manera mecánica con la formación de un apresorio, el cual puede ser de estructura simple o compleja dependiendo de la superficie del hospedero (Tariq y Jeffries, 1987). El micelio del hongo invade a la planta hospedera formando esclerocios, los cuales, al término del cultivo, quedan dispersos en el suelo y pueden germinar carpogénico o miceliogénicamente y así iniciar un nuevo ciclo de infección. (Bolton et al., 2006). La incidencia de la enfermedad depende no sólo de los esclerocios, sino también de condiciones ambientales tales como la temperatura de suelo y la humedad, que afectan la producción de apotecios, y de la dirección y velocidad del viento que afecta la dispersión de ascosporas.

### **3.3.4. Biología del esclerocio**

Los esclerocios juegan un papel importante en el ciclo de la enfermedad ya que son fuentes de inóculo y además estructuras de resistencia que le permiten al hongo sobrevivir en el suelo por largos períodos de tiempo. Un esclerocio es una estructura dura y resistente formada por la agregación de hifas, usualmente consisten en capas continuas de células pseudoparenquimatosas melanizadas conocidas como corteza, las cuales se forman en la

superficie externa y encapsulan a las hifas protegiéndolas de condiciones adversas (Henson et al., 1999). El tamaño del esclerocio puede variar dependiendo de la planta hospedera, por ejemplo, en frijol presentan una forma alargada, con un tamaño que oscila entre 2-10 mm, aproximadamente. El desarrollo del esclerocio comprende tres etapas: iniciación, en la que la hifa comienza a agregarse; desarrollo o crecimiento a un tamaño determinado y maduración, la cual involucra la delimitación de la superficie y pigmentación de la hifa periférica (Willetts et al., 1997). Durante el desarrollo del esclerocio se acumulan reservas endógenas de trehalosa, manitol y arabinol, además de pequeñas cantidades de glucosa, fructosa y manosa que le sirven de sostén durante el período de latencia y eventualmente durante la germinación.

### **3.4. Control de *Sclerotinia sclerotiorum***

#### **3.4.1. Control químico**

La estrategia más utilizada para el control de la enfermedad del moho blanco es el uso de productos químicos. Los fungicidas más utilizados son: benomilo y el dicloran o metil tiofanato. Para que la aplicación de estos productos sea más efectiva para la prevención de la enfermedad es necesario cubrir bien las flores, ya que son los principales sitios de infección. Estudios previos han demostrado que asperjar con fungicida solamente las flores tienen el mismo efecto que rociar la planta completa, mientras que al asperjar el follaje si no se aplica el fungicida en el tejido floral no se observa ningún efecto positivo. Este aspecto es difícil de controlar para variedades de crecimiento indeterminado, ya que el periodo de floración se prolonga hasta cuatro semanas. En este tipo de cultivos es necesario realizar una buena cobertura de las flores en la primera aplicación de fungicida y si es necesario realizar una segunda aplicación siete días después. Cabe destacar que las aplicaciones deben realizarse antes de la aparición de la enfermedad ya que los tratamientos son preventivos no curativos. Aunque no se puede negar su efectividad, el uso prolongado de productos de origen sintético genera resistencia por parte del hongo a fungicidas tales como benomilo, dicloran y procimidona (Porter y Phipps, 1985). Esta resistencia aparece como consecuencia de los largos periodos de exposición del patógeno a estos productos de origen sintético, lo que comúnmente ocurre en esta región debido a la agricultura intensiva que aquí se practica.

#### **3.4.2. Prácticas culturales**

Debido a que los esclerocios de *S. sclerotiorum* se encuentran en el suelo, las prácticas como el arado y el riego afectan en gran medida su distribución (Wu y Subbarao, 2003). Sin embargo, el riego puede ser uno de los factores de mayor impacto para el desarrollo de la enfermedad, ya que proporciona las condiciones de temperatura y humedad favorables para la germinación

de los esclerocios. Por otra parte, el arado profundo es una estrategia muy utilizada para el manejo del moho blanco, y consiste en enterrar los esclerocios a profundidades de 25-30 cm de la superficie del suelo reduciendo así su viabilidad (Subbarao et al., 1996).

### **3.4.3. Control biológico**

Para contrarrestar los daños al ambiente, a la salud humana y al desarrollo de resistencia por parte del hongo, causado por el uso prolongado de fungicidas de origen sintético, se han realizado estudios enfocados en la aplicación de agentes de biocontrol (Bardin y Huang, 2000). La supresión de la enfermedad ejercida por microorganismos se basa en antibiosis, competencia por fuente de nutrientes y espacio, micoparasitismo, inducción de resistencia de la planta huésped, reducción en la diseminación de esporas y restricción de los factores de patogenicidad. Se han realizado estudios con microorganismos antagonistas a *S. sclerotiorum*, en la mayor parte de las investigaciones se han estudiado a especies de hongos micoparásitos y bacterias antagonistas (Bardin y Huang, 2000).

### **3.5. Microorganismos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum***

Los hongos que se han demostrado como antagonistas a *S. sclerotiorum* son especies de *Trichoderma*, *Ulocladium atrum*, *Aspergillus terreus*, *Coniothyrium minitans* y *Clonostachys rosea*. Estos hongos han actuado de manera eficaz contra *S. sclerotiorum* al aplicarse en suelo donde parasitan y degradan esclerocios en invernadero y campo. Conidios de *T. virens* fueron utilizados para inocular semillas de girasol disminuyendo la incidencia de *Sclerotinia sclerotiorum* hasta un 59 % (Lopez Odet, 2010).

Los hongos endofíticos habitan en un nicho ecológico similar al que ocupan los fitopatógenos, por lo que pueden convertirse en una poderosa herramienta de control de estos patógenos a través de la competencia por los nutrientes, la producción de sustancias antagónicas, el parasitismo o incluso la inducción de la planta a desarrollar resistencia (Dukare et al., 2018). El control biológico de plagas y enfermedades se basa en el uso de microorganismos que actúan como antagonistas de la acción de los depredadores y agentes causantes de enfermedades (Syed Ab Rahman et al., 2018).

### **3.6. Microalgas en la agricultura**

Las microalgas son un grupo muy diverso de organismos unicelulares que al igual que las plantas, tienen la capacidad de transformar la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis. Hacen parte de la cadena alimenticia en aproximadamente el 70 % de la biomasa, con capacidad de adaptación y plasticidad bioquímica única. Son productoras primarias en los



ambientes acuáticos y son fotosintéticas. Igualmente, tienen la capacidad de regular el contenido de oxígeno y de dióxido de carbono en la atmósfera, aportando en el control de los efectos invernadero, lluvias ácidas y adelgazamiento de la capa de ozono (Burg, 2003).

Entre los compuestos de más interés obtenidos de las microalgas, se destacan los carotenoides, biodiesel, ficobiliproteínas, lípidos, polisacáridos, y compuestos con actividad biológica, conocidos como bioestimulantes o biofertilizantes (Hernández et al., 2014).

### **3.6.1. Chlorella spp.**

*Chlorella* spp es una microalga unicelular de color verde que crece en agua dulce. Dentro de las especies más estudiadas encontramos a *Chlorella vulgaris* y a *Chlorella pyrenoidosa*. Suele ser administrada como suplemento nutricional debido al amplio rango de nutrientes que posee como son los minerales, proteínas, vitaminas, fibra, ácidos grasos omega-3, clorofila y carotenoides (Fallan et al., 2018).

Las microalgas verdes del género *Chlorella* spp son organismos unicelulares que tienen forma esférica y no presentan flagelos. Pertenecen al orden Chlorelalles, clase Trebouxiophyceae, filo Chlorophyta. Fueron descritas inicialmente por Martinus W. Beyerinck, en 1890, como un género que contenía cuatro especies (Abed et al., 2018), pero en la actualidad se conocen varias especies de algas pertenecientes al género, siendo aceptadas taxonómicamente 43 especies (Darienko et al., 2019). Su clasificación taxonómica es difícil debido a su sencilla morfología, siendo objeto de constantes investigaciones (Ievina y Romagnoli, 2020). La reproducción se produce de forma asexual, con la formación de autosporas y no se ha observado reproducción sexual en las microalgas de este género (Coronado Reyes et al., 2020). Las microalgas del género *Chlorella* sp acumulan carbono principalmente en forma de almidón, que se encuentra dentro de sus cloroplastos (Coronado Reyes et al., 2020).

## **4. Metodología**

### **4.1. Localización de la zona de estudio**

El experimento para evaluar el uso de microalgas del genero *Chlorella* spp en el biocontrol de *Sclerotinia* en el cultivo de lechuga se realizó en las quintas experimentales” La Argelia” de la Universidad Nacional de Loja del cantón Loja de la provincia de Loja, con coordenadas 3°59'35.3" S 79°12.253' O, a una altura de 2160 msnm, cuenta con una precipitación media anual de 900 mm y una humedad media de 78 % (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Loja, 2020).

#### 4.2. Enfoque metodológico

El enfoque que tiene esta investigación es de tipo cuantitativa, ya que se recopiló información numérica cuantificable, para ser utilizada en análisis estadísticos con el fin de poder probar e interpretar hipótesis.

#### 4.3. Técnicas de obtención de datos

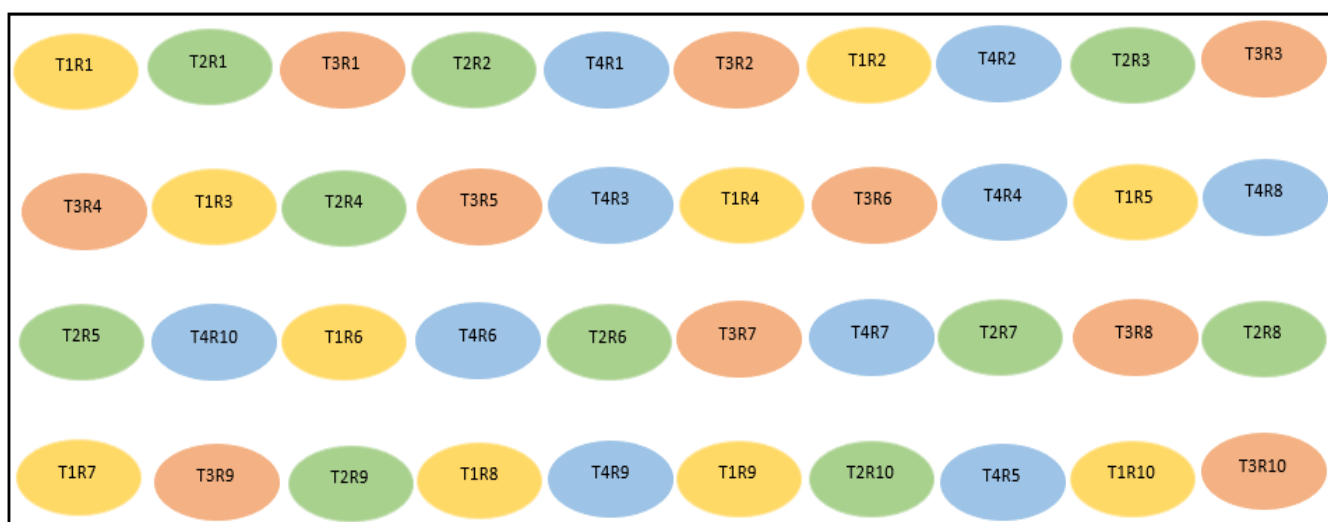
Se evaluaron los siguientes parámetros: incidencia y severidad, el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), y la tasa del progreso de la enfermedad (TPE), el índice de sanidad del cultivo (ISC) y la eficacia del biocontrol (EB). Para la toma de datos se utilizó una escala visual (figura 2) en donde se observaron hojas y tallos, se aplicaron fórmulas, los datos se recolectaron desde el inicio del ensayo (Inoculación de *Sclerotinia sclerotiorum*) 3 veces por semana, hasta el final del ensayo (2 meses luego de haberse montado el ensayo).

#### 4.4. Tipo de diseño

Para efectuar la presente investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en el cual se aplicó un total de 4 tratamientos distribuidos en 10 repeticiones (figura 1). Los tratamientos aplicados fueron: T1: Testigo (sin aplicación del hongo ni del biocontrol), T2: *Sclerotinia sclerotiorum*, T3: *Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella* y T4: *Sclerotinia sclerotiorum* + Control Químico (Prevalor). Cada unidad experimental estuvo conformada por una maceta.

#### Figura 1

*Diseño experimental del estudio "Control biológico de Sclerotinia sclerotiorum en lechuga con el uso de microalgas del género Chlorella spp."*



## **4.5. Metodología General**

### **4.5.1. Preparación de suelo**

Se recolectó tierra negra de montaña, arena amarilla y turba, se trituró la tierra para obtener más uniformidad, luego se esterilizó con aire seco, se cernió la arena con el fin de conseguir un material más fino y que no presentara algún tipo de material que no sirviera para la preparación del sustrato. Luego en proporción 2:1:1 de tierra negra de montaña, arena y turba se realizó la mezcla para la preparación del suelo para la colocación en macetas. Para la realización del semillero se utilizó solamente turba en donde se procedió a sembrar semillas de lechuga (Anexo 3).

### **4.5.2. Trabajo de laboratorio**

#### **4.5.2.1. Aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en laboratorio**

Se elaboró PDA (papa dextrosa agar), donde se realizó la rehidratación de 3,51 g del medio en 90 ml de agua destilada. A continuación, se disolvió el medio realizando movimientos circulares. Posteriormente se calentó el medio agitando frecuentemente con la ayuda de un imán hasta lograr su ebullición, esto por aproximadamente 2 min. Luego se procedió a realizar la esterilización del medio en autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Finalmente se colocó aproximadamente 20 ml de medio en cajas Petri para la siembra del hongo.

Para el aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum*, se recolectaron tallos y hojas de plantas de lechugas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad en los cultivos y se llevaron al laboratorio donde se realizaron cortes en el tallo de aproximadamente 3 cm, luego se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio al 2,5% por 1 minuto, se realizaron dos lavados consecutivos con agua destilada estéril. Se procedió a colocar los trozos de tallos lavados sobre toallas de papel absorbente. Una vez secos los trozos se procedió a realizar trozos más pequeños de aproximadamente 5 mm, evitando dañar el tejido infectado, estos fueron tomados con una pinza estéril y sembrados en una caja Petri donde previamente fue puesto el medio de cultivo (PDA). Las cajas Petri fueron ubicadas en una cámara húmeda donde se dejó incubar el hongo de 3 a 4 días a una temperatura de 26° C.

Una vez que el hongo tuvo crecimiento dentro de la cámara húmeda, se procedió a la elaboración de medio líquido o Caldo de papa dextrosa, el cual se utilizó para la propagación de *Sclerotinia sclerotiorum* por agitación, para ello se realizó una rehidratación de 24 g de medio en medio litro de agua destilada. Se mezcló y disolvió calentando con agitación constante, se hirvió durante 5 min hasta realizar una disolución completa, se distribuyó en matraces de 250 ml y se realizó esterilización en autoclave al igual que el medio PDA, una vez

esterilizado el medio se procedió a tomar con un asa micelios del hongo obtenidos del crecimiento en cajas Petri con medio PDA, luego se llevó a cámara de agitación por 7 días a una temperatura de 26° C a 250 rpm (revoluciones por minuto), (Anexo 2).

#### **4.5.2.2. Inoculación de *Sclerotinia sclerotiorum***

Una vez realizada la propagación de *Sclerotinia sclerotiorum* por agitación se procedió a realizar un conteo de esporas en cámara de Neubauer, para lo cual se tomó una muestra del biorreactor con un factor de dilución de  $10^{-1}$  (1 ml de *Sclerotinia sclerotiorum* y 90 ml de Agua Destilada) el cual se agitó y se tomó una muestra de solución con una pipeta de 0,01 ml. Se colocó el cubreobjetos sobre la cuadrícula de la cámara de Neubauer, se insertó la punta de la pipeta en la ranura ubicada entre el cubreobjetos y la superficie de la cuadrícula en ángulo de 45° y se dejó reposar durante 3 minutos. Seguidamente se observó al microscopio óptico y se contabilizaron todas las células presentes en 5 cuadrantes seleccionados de 25, que en nuestro caso fueron 148 esporas en los 5 cuadrantes. Ya que para inocular el patógeno se requiere  $1 \times 10^6$  esporas/ml, se multiplicó el número total de esporas por 5 y por 10 000; entonces, dado un volumen final del inóculo y dada la concentración de esporas del inóculo original, se utilizó la siguiente fórmula para hallar el volumen de este inóculo original que se necesitó para preparar el de la solución:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

En donde V1: volumen inicial; V2: volumen final; C1: concentración inicial y C2: concentración final.

$$148 \times 5 \times 10\,000 = 7,4 \times 10^6$$

$V1 = 500 \text{ ml} \times 1 \times 10^6 / 7,4 \times 10^6 = 67,56 \text{ ml}$  de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio de cultivo líquido.

$$500 \text{ ml} - 67,56 \text{ ml} = 432,43 \text{ ml de Agua destilada.}$$

Una vez realizado el conteo y cálculos respectivos se procedió a realizar la disolución, seguidamente se realizó inoculación por inmersión de raíces (con herida en el sistema radical), las cuales fueron nuestras plántulas de lechuga 20 días luego de la emergencia de sus hojas verdaderas en semillero, evitando el daño mecánico de las raíces con la ayuda de una guillet (Anexo 1.4) luego fueron trasplantadas a las unidades experimentales (Anexo 1.5).

#### **4.5.2.3. Inoculación de *Chlorella* spp**

Se usaron soluciones ya previamente aisladas y seriadas en laboratorio, seguidamente se realizó un conteo de *Chlorella* spp en cámara de Neubauer, para lo cual se tomó una muestra del biorreactor la cual se agitó y de ella se tomó 50 ml junto con 100 ml de agua destilada, teniendo

un factor de dilución de 0,5. Se colocó el cubreobjetos sobre la cuadrícula de la cámara de Neubauer, se insertó la punta de la pipeta en la ranura ubicada entre el cubreobjetos y la superficie de la cuadrícula en ángulo de 45° y se dejó reposar durante 3 minutos. Seguidamente se observó al microscopio óptico y contabilizaron todas las células presentes en los 4 cuadrantes señalados como A, B, C y D y se hizo un promedio.

Se calculó la concentración celular de acuerdo a la fórmula:  $C = (N) \times (10^4) \times FD$  Donde: C= células/ml, N= promedio de células contadas en un cuadrante y FD= factor de dilución.

Se diluyeron las concentraciones de *Chlorella* spp mediante la siguiente fórmula:  $C1V1 = C2V2$ , donde C1 = concentración de la solución concentrada (solución madre o inicial), V1 = volumen necesario de la solución concentrada, C2 = concentración de la solución diluida (solución final), V2 = volumen final de la solución diluida. Las concentraciones de *Chlorella* se diluyeron en 100 ml de agua destilada por tratamiento.

La aplicación del biocontrol y control químico se realizó 12 días después de haber aplicado el hongo, se volvió a aplicar la técnica de inmersión de raíces en soluciones de *Chlorella* de  $1 \times 10^6$  (Anexo 1.6).

#### **4.6. Metodología para el Primer objetivo: “Determinar los parámetros del progreso de la enfermedad, antes y después de la aplicación del biocontrol (Incidencia; Severidad Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad (ABCPE) y la Tasa de Progreso de la Enfermedad”**

Para la realización del primer objetivo se evaluaron parámetros del progreso de la enfermedad, los cuales fueron:

##### **4.6.1. Incidencia**

Se evaluó en cada individuo la presencia o ausencia de enfermedad. El uso de este parámetro en el cultivo se usó particularmente para estudiar la velocidad y patrón de avance de la enfermedad. Se utilizó la siguiente fórmula descrita por Ivancovich (1998):

$$I = \frac{n}{N} \times 100$$

Donde: **I** (%) = Incidencia; **n** = número de plantas enfermas y **N** = número de plantas totales evaluadas.



#### 4.6.2. Severidad

Fue medido por el porcentaje de la superficie del órgano enfermo, ya sea de hojas o tallos por la enfermedad, y varía entre 0 y 100. Para ello se utilizó una escala gráfica visual (Figura 2), de igual forma se usó la siguiente fórmula (Ivancovich et al., 1998):

$$S (\%) = \frac{\sum(a \times b)}{(N \times K)} \times 100$$

Donde: S (%) = Severidad, **a** = total de plantas en cada grado de la escala; **b** = grado de la escala correspondiente; **N** = número total de plantas evaluadas **K** = grado máximo de la escala (K=7).

**Figura 2:** Escala gráfica visual para evaluar la severidad de *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de lechuga, tomado de Romero (2015).

<p>Clase 2= &lt;5% Síntoma inicial (caída de hojas basales)</p>	
<p>Clase 3= 5-25% de síntomas (Marchitamiento de la planta)</p>	

Clase 4= 25-50% de síntomas  
(Pudrición acuosa)



Clase 5= 50-70% de síntomas  
(Pudrición + micelio)



Clase 6= 70-80% de síntomas  
(micelio "formación de esclerocios")





Clase 7= >80% de síntomas (muerte de la planta “esclerocios maduros”)



#### 4.6.3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)

El área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) se realizó luego de haber evaluado el alcance de la enfermedad por medio de su incidencia y severidad, la técnica nos ayudó a ver si existe algún tipo de relación entre el progreso de la enfermedad y el periodo de duración del área foliar, respecto al impacto sobre el rendimiento. Para ello se usó la fórmula descrita por Campbell y Madden (1990):

$$ABCPE = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{(Y_{i+n1} + Y_i) (X_{i+n1} - X_i)}{2} \right]$$

Donde  $Y_i$  = severidad de la enfermedad en la  $i$  observación,  $X_i$  = tiempo en días a la  $i$ -ésima observación y  $n$ = número total de observaciones.

#### 4.6.4. Tasa de Progreso de la Enfermedad

La tasa de progreso de la enfermedad representa la velocidad con que se desarrolló la enfermedad y se expresó en % día<sup>-1</sup>:

$$TPE = \frac{1}{t_2 - t_1} \left[ \ln \left( \frac{y_2}{1 - y_2} \right) - \ln \left( \frac{y_1}{1 - y_1} \right) \right]$$

Donde:  $\ln$ = logaritmo natural,  $y_1$  = severidad del tejido afectado al inicio de la evaluación,  $y_2$  = severidad del tejido afectado al final del período evaluado,  $t_1$  = Tiempo de inicio de la evaluación y  $t_2$  = Tiempo de la última evaluación.



**3.7. Metodología para el segundo objetivo: “Evaluación de la aplicación de *Chlorella* spp. como biocontrolador de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga (Eficacia del Biocontrol (EB) y el Índice de Sanidad del Cultivo (ISC)”.**

**3.7.1. Eficacia del Biocontrol (EB)**

Esto permitió ver si la aplicación de *Chlorella* spp fue efectiva sobre el cultivo.

Se determinó empleando la fórmula:

$$EB (\%) = \left[ \frac{STC - STB}{STC} \right] \times 100$$

Donde: **STC** es la severidad en tratamiento control al final del periodo de evaluación y **STB** es la severidad en tratamiento de biocontrol.

**3.7.2. Índice de sanidad del cultivo (ISC)**

Este parámetro ayudó a determinar cuán sano fue el cultivo luego de la aplicación del biocontrol (*Chlorella* spp) y el control químico.

Se determinó empleando la fórmula:

$$ISC = \ln \left[ \frac{y_0}{y_{ft}} \right] * \frac{1}{r}$$

Donde: **y<sub>0</sub>** es el nivel del inóculo inicial; **y<sub>ft</sub>** es inóculo final con el tratamiento y **r** es la tasa de desarrollo de la enfermedad.

**3.8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con la utilización del programa INFOSTAT, donde se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) para determinar si existían o no diferencias significativas, también se realizó una verificación de los supuestos de homogeneidad y normalidad de varianzas. Una vez comprobada la presencia de diferencias significativas se hizo una prueba de Tukey al 5% para evaluar entre qué tratamientos se daban las diferencias.

**5. Resultados**

**4.1. Parámetros Etiológicos antes de la aplicación del biocontrol**

De acuerdo con la evaluación del ensayo se observó que *S. Sclerotiorum* tuvo presencia en la planta a partir del día 7 luego de la inoculación, mostrando sintomatología como podredumbre, marchitamiento y caída de hojas basales (Anexo 1.7)

En cuanto a la severidad encontrada antes de la aplicación del biocontrol, un 9,1 % de plantas que presentaron síntomas por *Sclerotinia sclerotiorum* se encontraron en grado 2 de severidad

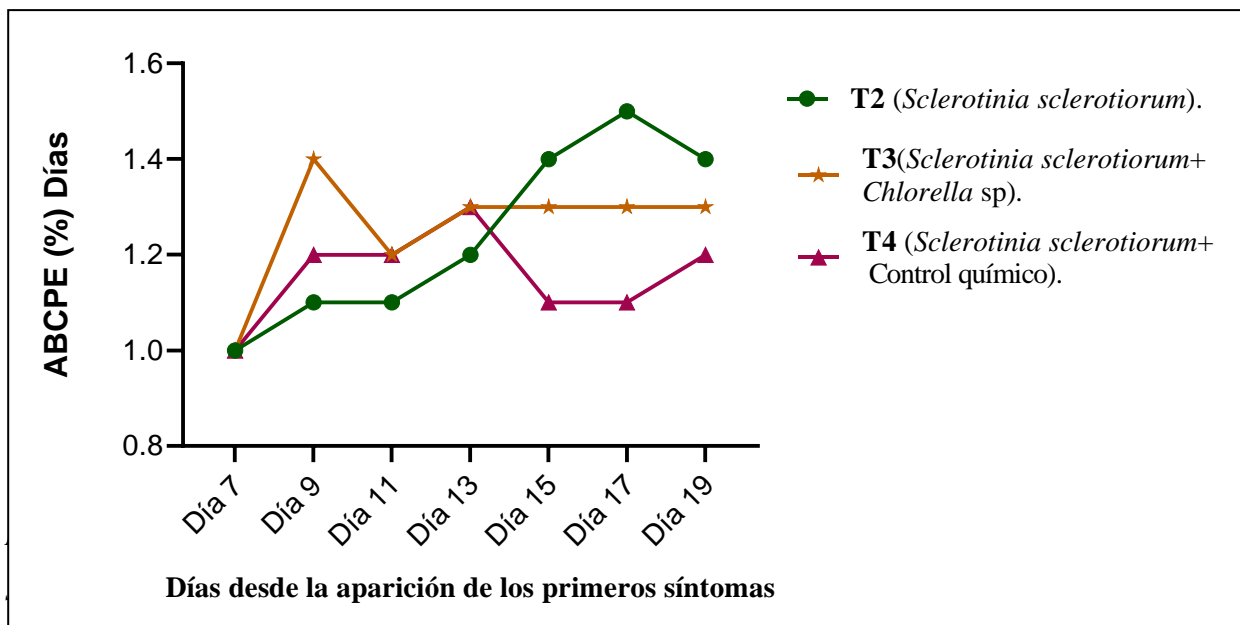
dentro de la escala visual gráfica, (Anexo 1.8) a excepción de las plantas testigos las cuales no fueron inoculadas y no presentaron ningún grado de sintomatología.

Con respecto al ABCPE se notó un progreso de la enfermedad en un 0,20, 0,30 y 0,40 % en los tratamientos a los cuales se les inoculó *S. sclerotiorum*, desde el día que se presentó la enfermedad hasta la aplicación del biocontrol (Figura 3). El valor del ABCPE para los tratamientos en conjunto antes de la aplicación de *Chlorella* no mostró diferencias significativas ( $p = 0,43$ ), (Anexo 2, tabla 3).

Así mismo en la tasa del progreso de la enfermedad antes de la aplicación del biocontrol se observó un crecimiento del 0,00025 para el T2, 0,00027 para el T3 y 0,0004 % por día para el T4, desde el momento que se presentó la enfermedad hasta la aplicación del biocontrol. La TPE para los tratamientos en conjunto antes de la aplicación de *Chlorella* no mostró diferencias significativas ( $p = 0,1838$ ), (Anexo 2, tabla 4), la figura 4 muestra cuánto creció el inóculo de la enfermedad en cada uno de los tratamientos desde su aparición hasta la aplicación de *Chlorella* spp.

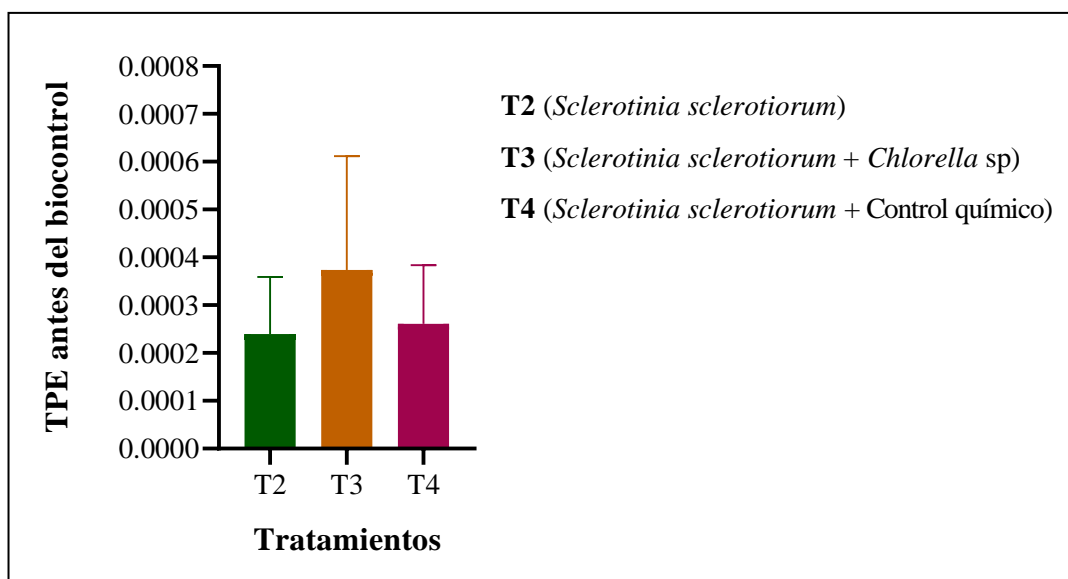
**Figura 3**

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) antes de la aplicación del biocontrol.



**Figura 4**

Tasa del progreso de la enfermedad (TPE) antes de la aplicación del biocontrol.



#### 4.2. Parámetros Etiológicos después de la aplicación del biocontrol

Luego de la aplicación de *Chlorella* spp (Biocontrol) se registró una reducción de la presencia de *Sclerotinia sclerotiorum* en su totalidad, pero pasados 5 días tras de haber aplicado el biocontrol con *Chlorella* y realizado el control químico se volvió a registrar sintomatología en el cultivo (Anexo 1.8).

En cuanto a incidencia se observó un porcentaje del 100% de *Sclerotinia sclerotiorum* al final del ensayo en los 3 tratamientos en los cuales se aplicó el hongo, a diferencia del T1 (Testigo), (Anexo 1.9). Con respecto a la severidad después de la aplicación de *Chlorella* sp se encontró una severidad de grado 3 dentro de la escala visual gráfica al momento del levantamiento del ensayo, en donde se sustrajeron las plantas de las unidades experimentales para una observación de sus raíces en donde se encontró sintomatología (Figura 5). También se encontraron síntomas en las hojas, las cuales presentaban podredumbre, marchitamiento y caída de las mismas.

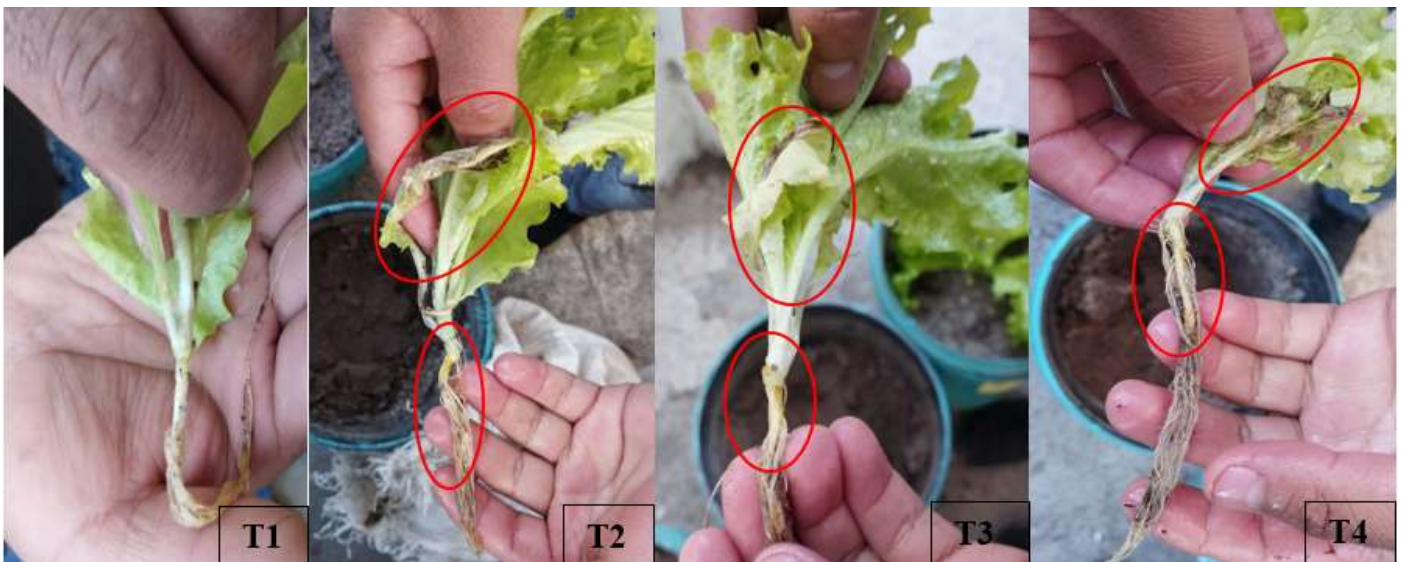
Realizada el ABCPE se evidenció un progreso de la enfermedad partiendo de 1,0 en el T2 (*Sclerotinia sclerotiorum*) y 1,50 % en los tratamientos T3 (*Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella* spp) y T4 (*Sclerotinia sclerotiorum* + Control químico) y al final del ensayo se evidencia un progreso del 3,0 % en todos los tratamientos. El valor del ABCPE para los tratamientos en conjunto después de la aplicación de *Chlorella* no mostró diferencias significativas ( $P = 0,5322$ ), (Anexo 2, tabla 5).

En cuanto a la tasa del progreso de la enfermedad la figura 7 muestra un crecimiento del 0.3 % por día del inóculo de la enfermedad en todos los tratamientos donde se aplicó *Sclerotinia sclerotiorum* luego de la aplicación del biocontrol. Realizado el análisis estadístico para TPE

en los tratamientos en conjunto después de la aplicación de Chlorella, no mostraron diferencias significativas ( $P = 0.5727$ ), (Anexo2 ,tabla 6).

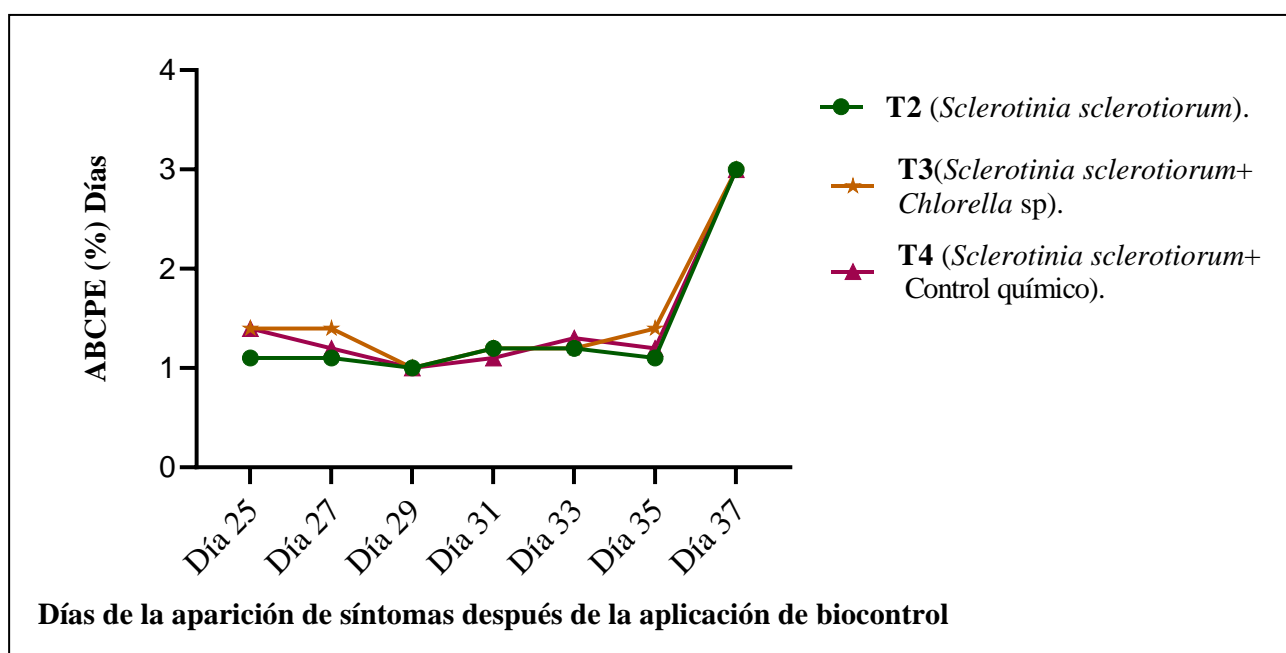
**Figura 5**

*Severidad luego de la aplicación del Biocontrol (Chlorella spp)*



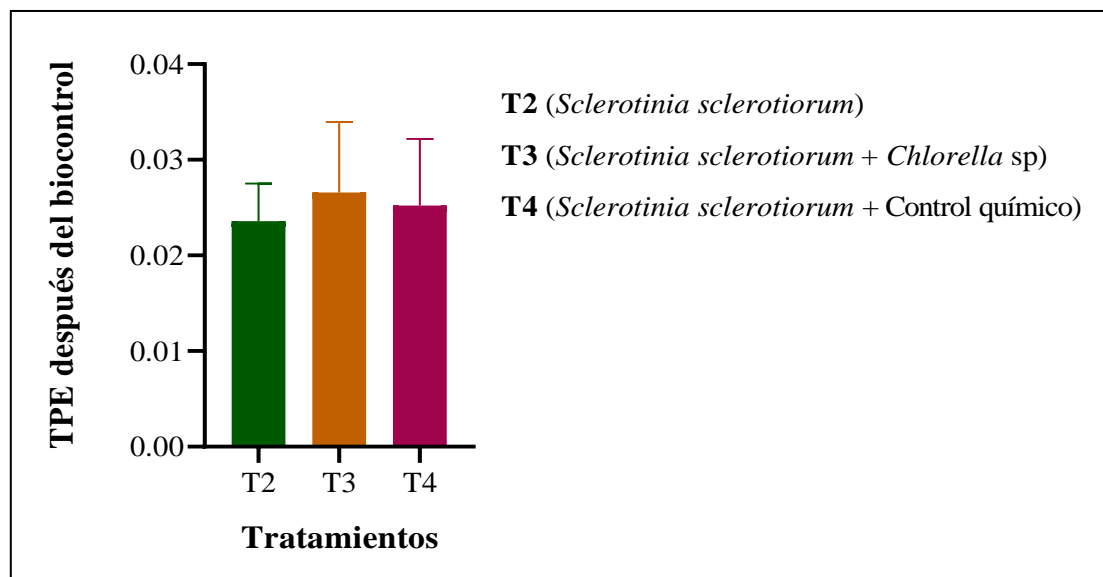
**Figura 6**

*Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) después de la aplicación del biocontrol (Chlorella spp).*



## Figura 7

Tasa del progreso de la enfermedad (TPE) después de la aplicación del biocontrol (*Chlorella* spp).



### 4.3. Evaluación de la aplicación de *Chlorella* spp. como biocontrolador de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga

#### 4.3.1. Eficacia del Biocontrol (EB)

Los resultados obtenidos en la aplicación del biocontrolador, para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), en el cultivo de lechuga, permitieron observar la poca eficacia para su control ya que luego de la aplicación de *Chlorella* se observó una reincidencia de la enfermedad en las plantas de lechuga.

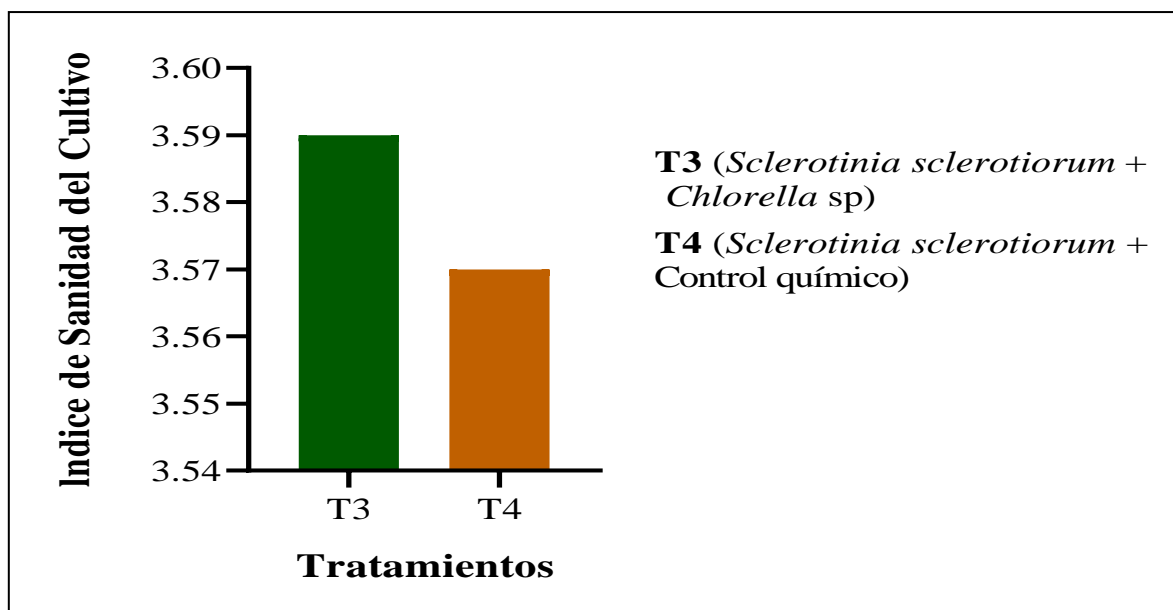
#### 4.3.2. Índice de sanidad del cultivo (ISC)

En la Figura 8 se puede observar el índice de sanidad del cultivo de lechuga luego de la aplicación del *Chlorella* spp para el control de *Sclerotinia sclerotiorum* donde se determinó que *Chlorella* spp tuvo un índice de sanidad de 3,59 % en el cultivo, mientras el control químico tuvo un 3,57 % es decir un índice similar al del biocontrol esto muestra valores similares en la sanidad del cultivo.

Realizado un análisis de varianzas (ANDEVA) después de la aplicación del biocontrol no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el ISC del cultivo en función de los tratamientos aplicados.

## Figura 8

Índice de sanidad del cultivo (ISC) después de la aplicación del biocontrol.



*Nota:* Para la realización del Índice de Sanidad del cultivo se tomó en cuenta aquellos tratamientos los cuales luego de la inoculación de la enfermedad se aplicó un controlador en este caso biológico (T3) y químico (T4).

## 6. Discusion

De acuerdo con los resultados obtenidos se evidenció una reincidencia en la propagación de *Sclerotinia sclerotiorum* en los tratamientos en los cuales se aplicó un control tanto biológico como químico, esto pudiéndose deber a que *Sclerotinia* es un hongo del suelo el cual al no tener un control en este, puede permanecer durante mucho tiempo, hasta encontrar un hospedero y propagarse esto de acuerdo a lo dicho por Madloo (2017), los esclerocios germinan en el suelo y las hifas infectan directamente el tallo basal.

De acuerdo con Velásquez (2011), *S. sclerotiorum* es una enfermedad que representa una gran amenaza, ya que prácticas como la rotación de cultivos no resultan eficaces, no existen variedades resistentes y el combate químico no es factible, porque se necesitan dosis muy altas que no aseguran una adecuada cobertura de los sitios de infección. A más de ello Algunos compuestos que pueden mencionarse como fungicidas incluyen a la antrazina y propamocarb que tendría efecto sobre la formación de apotecios, reduciendo la germinación carpogénica (Leroux, 2003), Es así que al realizar un ensayo en donde solo se realizó una sola aplicación se evidenció un control en primera estancia y luego una reincidencia de la enfermedad, del mismo modo la aplicación del control se realizó al nivel de la planta y no del suelo lo que pudo haber influido en la reincidencia.

Un estudio realizado por López et al (2020) mostró que las algas actúan en procesos que desencadenan mecanismos de defensa e inmunidad en las plantas, creando resistencia a

enfermedades fúngicas, reduciendo diversos tipos de hongos como *Fusarium* spp., *Botrytis* spp., y *Alternaria* spp, estos efectos se lograron con concentraciones bajas de los extractos, llegando a utilizar cantidades de  $2 \times 10^3$  y forma de aplicación ya sea directamente al suelo, mediante aspersión foliar etc. En el ensayo, el tratamiento sometido al biocontrol con *Chlorella* spp tuvo una reincidencia del 3,5 % esto pudiéndose deber a la concentración usada de  $2 \times 10^6$  mostrando así una actividad lenta y poca velocidad de acción sobre la enfermedad, de igual forma pudo deberse a la patogenicidad bajo condiciones favorables, la alta capacidad de supervivencia de sus esclerocios y el alto rango de hospedero tal como menciona Adams y Ayers (1979).

## **7. Conclusiones**

- De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a los parámetros del progreso de la enfermedad antes y después de la aplicación del biocontrol no se encontraron diferencias significativas en las variables evaluadas, se encontró un mismo grado de severidad en todas las plantas infectadas, por lo que es necesario más estudios en donde se pueda ver los efectos de distintos tratamientos sobre esta misma enfermedad en un periodo de tiempo más largo que permita conocer el mecanismo de acción por el cual actúan.
- En cuanto a la eficacia del biocontrol y el índice de sanidad del cultivo, *Chlorella* spp no mostró un control efectivo para el manejo de *Sclerotinia sclerotiorum*, a pesar de utilizar una dosis alta ya que a través de la aplicación del Biocontrol no se lograron inactivar los esclerocios de *S. sclerotiorum* y por ello se evidenció un aumento considerable del inóculo de la enfermedad en los tratamientos.

## **8. Recomendaciones**

- Para un futuro ensayo se debería probar con diferentes concentraciones de *Chlorella* spp en donde se pueda encontrar alguna diferencia significativa en la aplicación sobre el control de *Sclerotinia sclerotiorum* ya que en el presente estudio solo hubo la utilización de una dosis.
- De igual manera si se realiza en una sola concentración realizar varias aplicaciones y de esa forma ver si influye en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* A sí mismo es necesario continuar con la búsqueda de otros agentes controladores para mitigar esta enfermedad ante las pérdidas generadas por este patógeno en el cultivo de lechuga.

## 9. Bibliografía

- R. M. A. Abedin and H. M. Taha, (2008). "Antibacterial and Antifungal Activity of Cyanobacteria and Green Microalgae. Evaluation of Medium Components by Plackett-Burman Design for Antimicrobial Activity of *Spirulina platensis*," *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 7(3), pp. 22-31.
- Abawi, G.S. y R.G. Grogan (1979). Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 899-904.
- Abawi, G. S., Polach, F. J., y Malin, W. T. 1975. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65: 673-678.
- Ajinath Shridhar Dukare, Sangeeta Paul, V. Eyarkai Nambi, Ram Kishore Gupta, Rajbir Singh, Kalyani Sharma & Rajesh Kumar Vishwakarma (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59:9, 1498-1513, DOI: 10.1080/10408398.2017.1417235.
- Adams P.B. y W.A. Ayers. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. Symposium of *Phytopathology*. 69: 896-899.
- Ayala Armenta, Quintín Armando; Cortez Mondaca, Edgardo; Apodaca Sánchez, Miguel Ángel; Leal León, Víctor Manuel; Valenzuela Escoboza, Fernando Alberto; Palacios Mondaca, César Arturo (2015). Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11. 2149-2156. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Bae, Y. S., y Knudsen, G. R. (2007). Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Applied Soil Ecology* 35: 21–24.
- Bardin, SD y Huang, HC (2001). Investigación sobre biología y control de enfermedades por esclerotinia en Canadá. *Revista canadiense de patología vegetal*, 23(1), 88–98. doi:10.1080/07060660109506914
- Bolton, M.L., B.P.H.J. Thomma y B.D. Nelson (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7: 1-16.
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*;30(196):39-48. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.012



- Boris, H., Zambrana, V., Almanza Vega, G., & Bello, A. (2016). Evaluation of the effect of macronutrients from human urine as fertilizer in the grow of lactuca sativa. In *Bolivian Journal of Chemistry* (Vol. 33, Issue 1).
- Campbell C.L y L.V Madden (1990). *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley. NY, USA
- Coronado Reyes, J., Salazar Torres, J., Juárez Campos, B. y González-Hernández, J. (2020). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*. 1-11. doi.org/10.1590/fst.37320.
- Cásseres, E. (1980). *Producción de hortalizas*. 3 ed. San José, C.R., IICA. 387 p.
- Clarkson, J. P., Staveley, J., Phelps, K., Young, C. S., y Wipps, J. M. 2003. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycology Research*. 107: 213-222.
- Darienko, T., Rad-Menéndez, C., Campbell, C. & Pröschold, T. (2019). Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov. *Systematics and Biodiversity*. 0(0), 1-19. dx.doi.org/10.1080/14772000.2019.1690597.
- Esserti, S.; Smaili, A.; Rifai, L.A.; Koussa, T.; Makroum, K.; Belfaiza, M.; Kabil, E.M.; Faize, L.; Burgos, L.; Albuquerque, N. (2017). Protective Effect of Three Brown Seaweed Extracts against Fungal and Bacterial Diseases of Tomato. *J. Appl. Phycol.* 29, 1081–1093.
- Fallah AA, Sarmast E, Habibian Dehkordi S, Engardeh J, Mahmoodnia L, Khaledifar A, et al. (2018). Effect of *Chlorella* supplementation on cardiovascular risk factors: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition* ;37(6):1892-1901.
- Florez, L. E., González, G., Pulido, S. P., Wyckhuys, K., Escobar, H., Salamanca, C., y otros. (2012). Lechuga (*Lactuca Sativa* L). En H. Pinzón Ramírez, *Manual para el cultivo de Hortalizas* (págs. 323-347). Bogotá: Produmedios.
- Fiquitiva García, K. T., Santos Estepa, D. C., & Sánchez Leal, L. C.. (2020). Alternativas de manejo biológico de la pudrición producida por *Sclerotinia sclerotiorum* en cultivos de lechuga en el municipio de Cota, Cundinamarca en las veredas Parcelas, La Moya y Pueblo Viejo. *Biociencias*, 3(1), 1–26.
- Ghasemi Y, Moradian A, Mohagheghzadeh A, Shokravi S, Morowvat MH.(2007) Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of *Chlorococcus dispersus*. *Journal of Biological Sciences*. (7):904-10.
- Hegedus, D. D. y Rimmer, S. R. 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? *MiniReview. FEMS Microbiology letters* 251: 177- 184C

Henson, J. M., Butler, M. J. y Day, A. W. 1999. The Dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathology*. 37: 447- 448

Hernández Pérez, Alexis, & Labbé, José I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* , 49 (2), 157-173. .

Ivancovich, A., Botta, G., Ploper, D.A., Laguna, I., Annone, J.G. (1998). IV Curso de diagnóstico y manejo de enfermedades de soja. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. EEA INTA Pergamino. 54 p

Ievina, B. Romagnoli, F. (2020). Potential of *Chlorella* Species as Feedstock for Bioenergy Production: A Review. *Environmental and Climate Technologies*. 24(2), 203-220. doi.org/10.2478/rtuect-2020-0067.

Jackson, L. E. (1995). Root architecture in cultivated and wild lettuce (*Lactuca* spp.). *Plant, Cell and Environ.* Vol. 18 (Nº 8). Pp. 885-897. 10.1111/j1365- 3040. 1995. tb00597. x.

Jiménez E, Dorta F, Medina C, Ramírez A, Ramírez I, Peña-Cortés H. (2011) Anti-phytopathogenic activities of macro-algae extracts. *Mar Drugs*.;9(5):739-56. doi: 10.3390/md9050739. Epub 2011 May 3. PMID: 21673886; PMCID: PMC3111179.

Jones, E, Mead, A. y Whipps, J (2003). Evaluación de diferentes fuentes de inóculo de *Coniothyrium minutans* y tasas de aplicación en la producción e infección de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biología y bioquímica del suelo*, 35(3), 409–419. doi:10.1016/s0038-0717(02)00292-4

Leroux, P. 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. CR. B/o/og/es326. pp. 9-21.

López Padrón, I., Martínez González, L., Pérez Domínguez, G., Reyes Guerrero, Y., Núñez Vázquez, M., & Cabrera-Rodríguez, J. A. (2020). Las algas y sus usos en la agricultura. Una visión actualizada. In *Cultivos Tropicales* (Vol. 41, Issue 2). <http://ediciones.inca.edu.cu>

Lopez Rodriguez Odet Dolores (2010). Microorganismos que utilizan oxalato de calcio como antagonistas potenciales de *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol. Instituto Politécnico Nacional. <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/10419/365.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Machado LP, Matsumoto ST, Jamal CM, da Silva MB, da Cruz Centeno D, Neto PC. (2014). Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(9):1739-44.

Mamani M, Virginia., Loza M, Manuel., Coronel Q, Laoreano., Sainz M, Humberto., Paye H, Victor., y Coronel, F. (2015). Uso de la orina humana como fertilizante en la producción de lechuga Waldmann green (*Lactuca sativa* L.). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 3(1), 24-38.

- Mora, M. L. M., Bernal Cabrera, A., Pérez Salinas, M. O., Muñoz Espinoza, M., Vasquez Freytez, C. L., & León Gordón, O. A. (2020). El complejo de especies de *Sclerotinia* y su importancia topatológica en cultivos tropicales. Obtenido de: <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v47s1/0253-5785-cag-47-s1-29.pdf>.(Consultado el 17 de diciembre).
- Mou, B. (2008). Lettuce. En Prohens, J. y Nuez, F. Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. Nueva York, EE.UU.: Springer Science + Business Media, LLC.
- Madloo, P., Rodríguez, V. M., Ramos, M., Lema, M., & Soengas, P. (2017). El manejo del moho blanco de las brásicas. 14–18. h
- Navarro, F., Forján, E., Vázquez, M., Toimil, A., Montero, Z., Ruiz D , Vega, J. M. (2016). Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycological Research*, 65(1), 38–43. doi:10.1111/pre.12158
- Porter, D. M., y Phipps, P. M. 1985. Effects of the fungicides on micelial growth, sclerotial production, and development of fungicide-tolerant isolates of *Sclerotinia minor*. *Plant Disease*. 69: 143-146
- Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, Singh P, Bux F. (2018) Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol Adv*.36(4):1255-1273. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.004.
- Romero Jose de Jesus. (2015). Manejo Integrado de la pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*) en lechuga, en Tenango del Valle, Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Subbarao, K. V., Koike, S. T., y Hubbard, J. C. 1996. Effects of deep plowing on the distribution and density of *Sclerotinia minor* sclerotia and lettuce drop incidence. *Plant Disease*. 80:28-33
- Smolińska, U., Kowalska, B. (2018). Control biológico del patógeno fúngico transmitido por el suelo *Sclerotinia sclerotiorum*: una revisión. *J Plant Pathol* .100, 1–12 <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2017.11.012>
- Tariq, V. N., y Jeffries, P. (1986). Ultra estructura of penetration of *Phaseolus* spp. by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*. 64: 2909- 2915.

USDA (2010). Unites States Department of Agriculture. disponible en URL: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=LASA3>.

Terry Alfonso, Elein, Ruiz Padrón, Josefa, Tejada Peraza, Tamara, Reynaldo Escobar, Inés, & Díaz de Armas, María Margarita. (2011). Respuesta del cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) A la aplicación de diferentes productos bioactivos. *Cultivos Tropicales*, 32(1), 28-37.

Valdés Santiago, L., Ayala Islas, A., & Colli Mull, J. G. (2018). Hacia el reemplazo de pesticidas químicos. explorando las microalgas para su uso en control biológico.

Velásquez, R., Reveles, M. & Medina, M. (2011). Ecología del hongo causante de la pudrición blanca del ajo y cebolla y saneamiento de parcelas infestadas. Folleto Técnico No. 32. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOCINIFAP

Viera A, W. F., Tello T, C. M., Martínez S, A. A., Navia S, D. F., Medina R, L. A., Delgado P, A. G., Perdomo Q, C. E., Pincay V, A. K., Báez C, F. J., Vásquez C, W. A., & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128–149. <https://doi.org/10.36610/J.JSAB.2020.080200128>.

Waggoner, E (1986). Progress curves of foliar diseases: Their interpretation and use. In: *Plant disease epidemiology* (J.K. Leonard and E.W. Fry, eds). *MacMillan Publishing*. USA.

Willetts, H. J., J. A. L. Wong, & G. D. Kirst. (1980). The Biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with Emphasis on Specific Nomenclature. *Botanical Review*, 46(2), 101–165.

Wu, B. M., y Subbarao, K. V. (2003). Effect of the irrigation and tillage on temporal and spatial dynamics of *Sclerotinia minor* sclerotia and lettuce drop incidence. *Phytopathology*. 93:1573-1580.

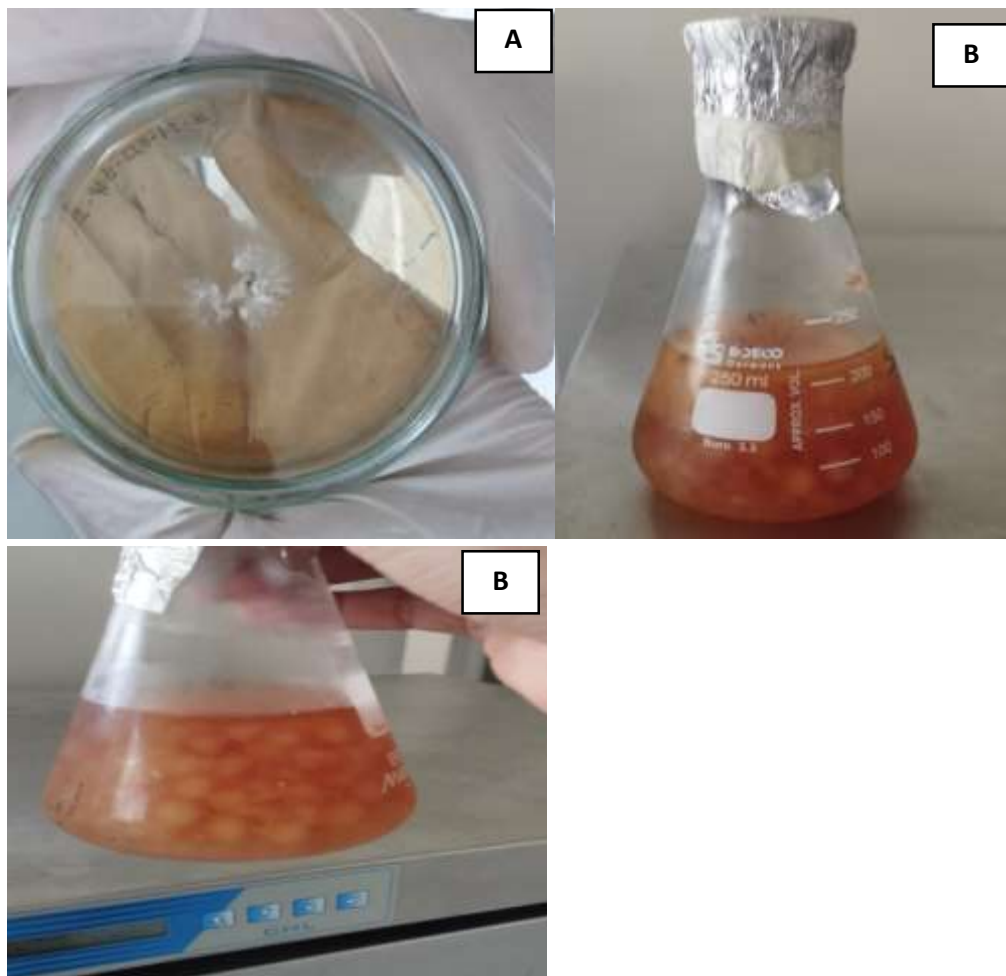
Young, C. S., Clarkson, J. P., Smith, J. A., Watling, M., Phelps, K. y Whipps J. M. 2004. Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathology* (4), 387-397.

## 10. Anexos

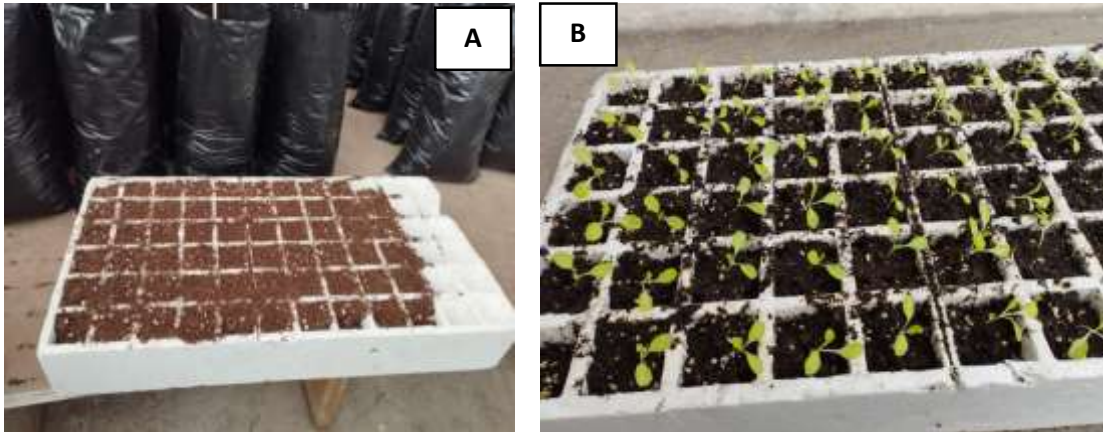
### Anexos 1: Evidencias fotográficas.



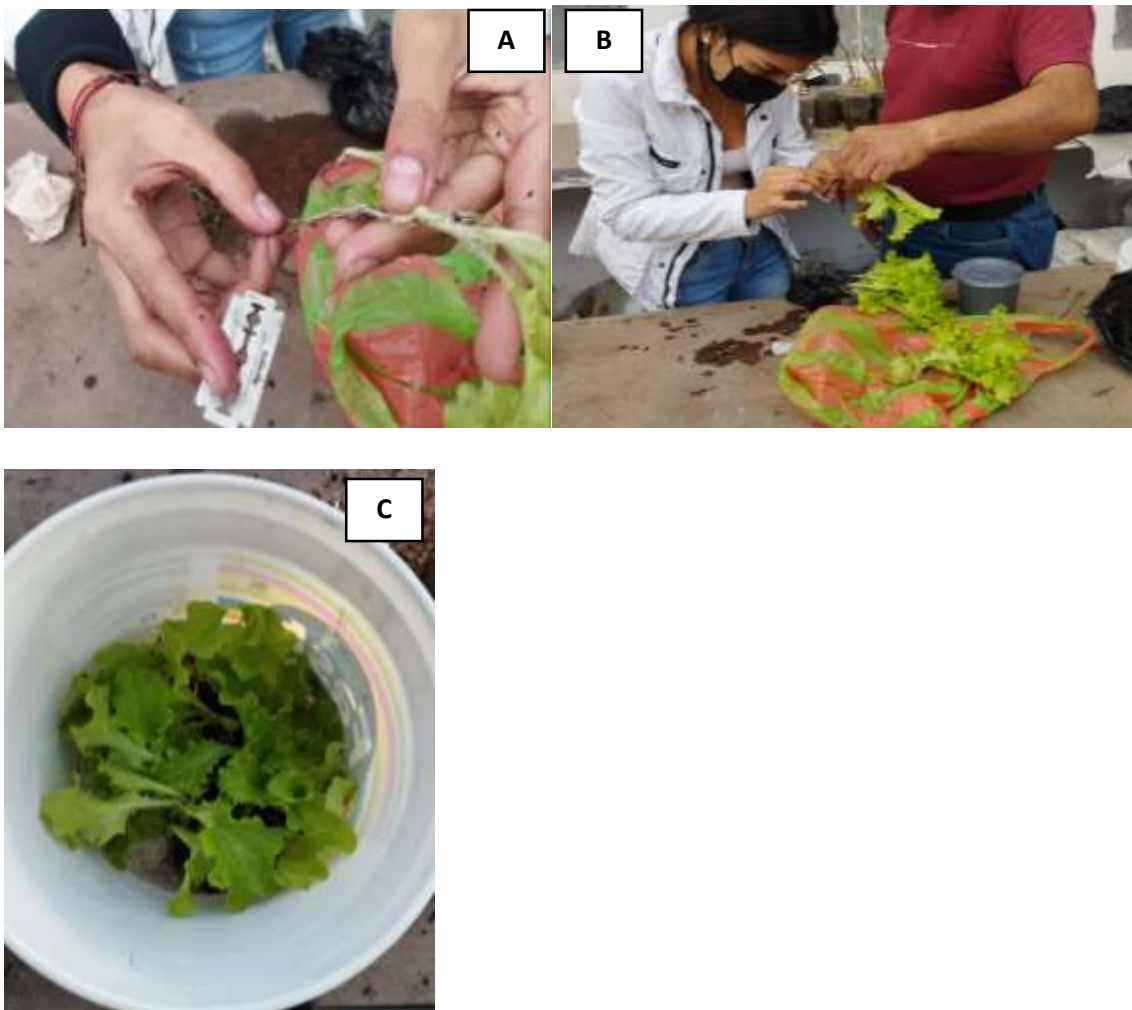
**Anexo 1.1.** Preparación del suelo. **A)** Secado de tierra negra de montaña. **B)** Mezcla de materiales arena y tierra de montaña



**Anexo 1.2.** A) Hongo *Sclerotinia sclerotium* en caja Petri. B) Hongo *Sclerotinia sclerotium* aislado en medio líquido.



**Anexo 1.3.** A) Elaboración del semillero. B) Plántulas luego de 10 días de realización del semillero.





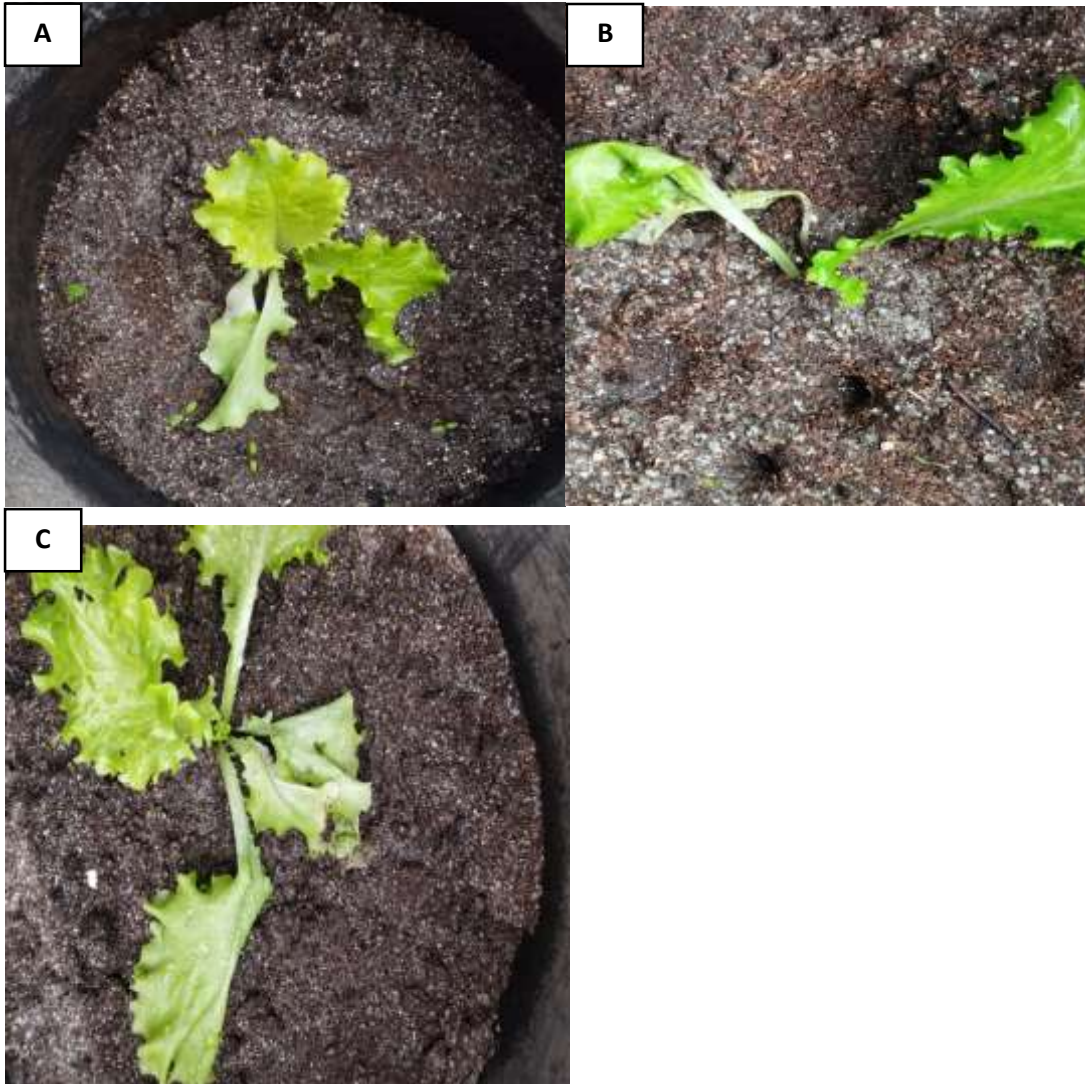
**Anexo 1.4.** Inoculación de *Sclerotinia sclerotiorum*. **A,B)** Corte de raíces con guillette. **C)** Inmersión de raíces en disolución de *Sclerotinia sclerotiorum*.



**Anexo1.5.** Plantas trasplantadas luego de la inoculación de *Sclerotinia sclerotiorum*.



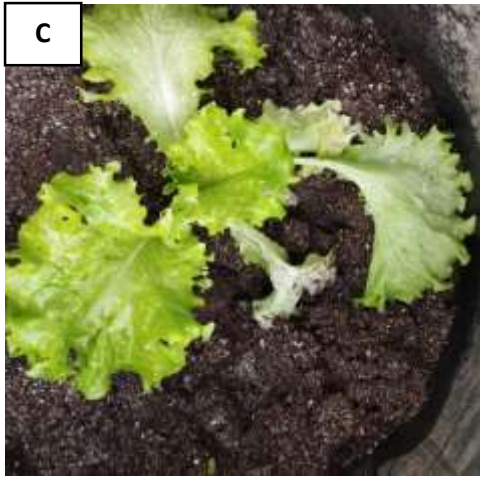
**Anexo 1.6.** Inoculación de *Chlorella* sp. **A,B)** Inmersión de raíces en disolución de *Chlorella* spp.



**Anexo 1.7.** Primeros síntomas de *Sclerotinia sclerotiorum* en los tratamientos donde fue inoculada la enfermedad. **A)** T2R1 (*Sclerotinia sclerotiorum*). **B)** T3R1 (*Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella* spp). **C)** T4R1 (*Sclerotinia sclerotiorum* + Control químico).

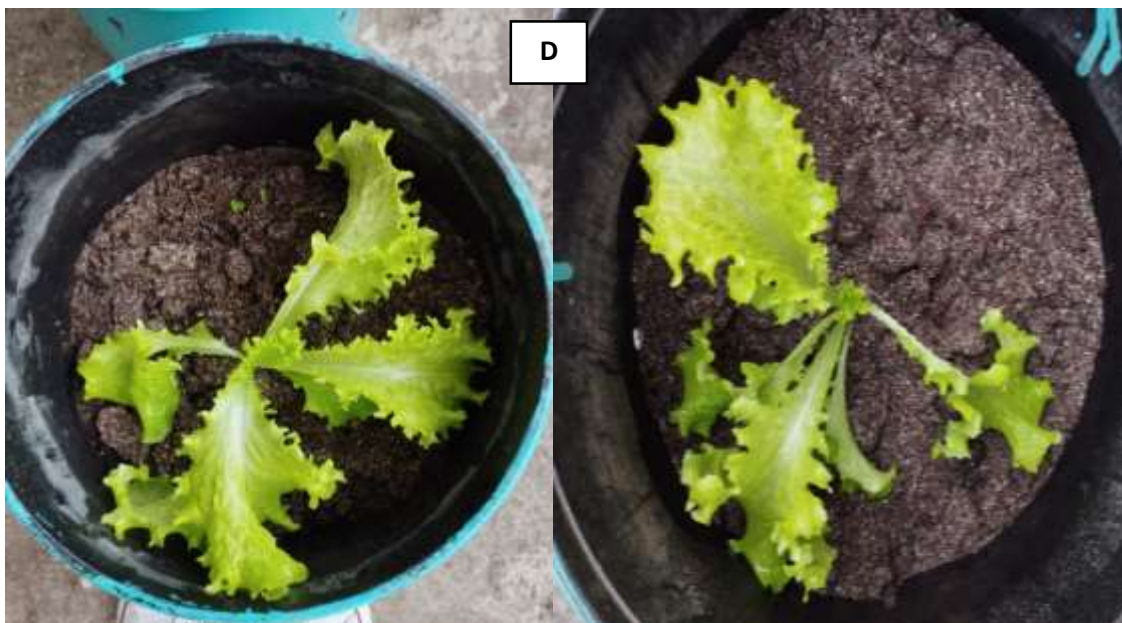
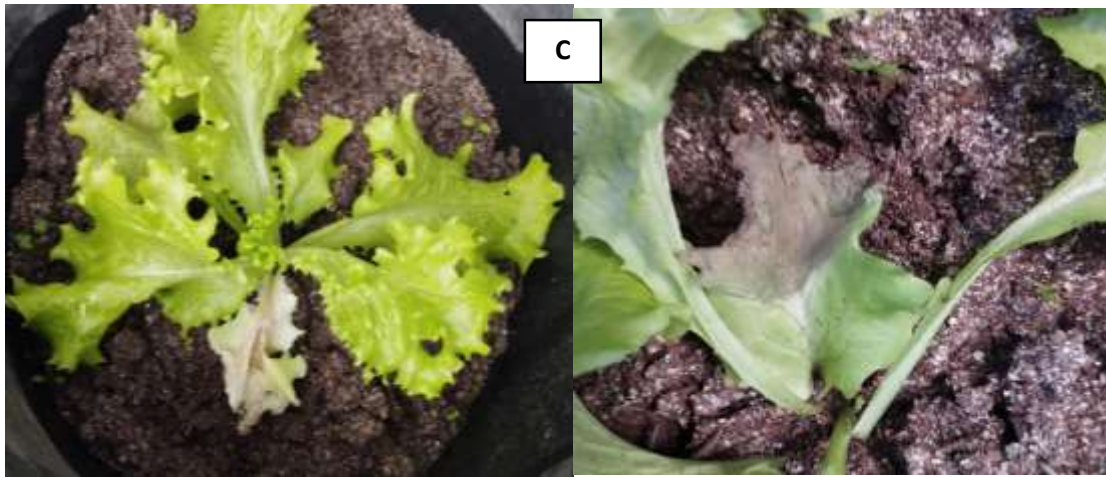






**Anexo 1.8.** Síntomas de *Sclerotinia sclerotiorum* después de la aplicación del biocontrol y control químico. **A)** T2R1 (*Sclerotinia sclerotiorum*) no se aplicó biocontrol. Pero los síntomas persistieron. **B)** T3R1 (*Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella* spp). **C)** T4R1 (*Sclerotinia sclerotiorum* + Control químico).

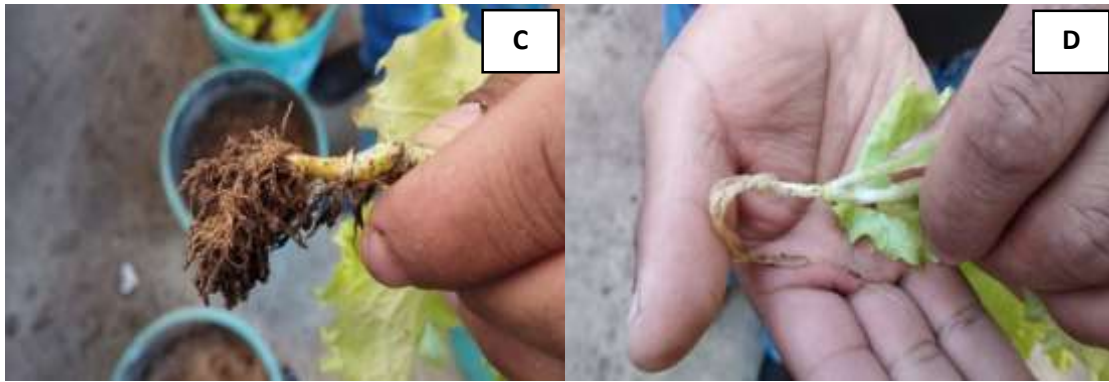




**Anexo 1.9.** Severidad antes de la aplicación del Biocontrol, luego de la aplicación del hongo patógeno. **A)** T2 (*Sclerotinia sclerotiorum*). **B)** T3 (*Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella*). **C)** T4 (*Sclerotinia sclerotiorum* + Control químico). **D)** T1 (Testigo)







**Anexo 1.10.** Severidad luego de la aplicación del biocontrol. **A)** T2 (*Sclerotinia sclerotiorum*). **B)** T4 (*Sclerotinia sclerotiorum* + Control químico). **C)** T3 (*Sclerotinia sclerotiorum* + *Chlorella*). **D)** T1 (Testigo).

**Anexo 2: Tablas de datos y análisis estadístico.**

**Tabla 1:** Promedios por tratamientos de Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), antes de la aplicación de biocontrol (*Chlorella* spp) y control químico.

Tratamientos	ABCPE antes del biocontrol	Tasa del progreso de la enfermedad	Promedio ABCPE	Promedio tasa del progreso de la enfermedad
T2	20	0.00019577	20.8	0.00023987
	25	0.000214901		
	16	0.000189392		
	16	0.000189392		
	25	0.000214901		
	16	0.000189392		
	27	0.000253164		
	16	0.000189392		
	31	0.000572994		
	16	0.000189392		
	16	0.000189392	20.9	0.00037359
	16	0.000189392		
	30	0.000611451		

T3	28	0.000534537	18.3	0.00026127
	25	0.000214901		
	16	0.000189392		
	23	0.000714004		
	16	0.000189392		
	23	0.000714004		
	16	0.000189392		
T4	16	0.000189392	18.3	0.00026127
	16	0.000189392		
	22	0.000534601		
	16	0.000189392		
	16	0.000189392		
	16	0.000189392		
	23	0.00028505		
	16	0.000189392		
	18	0.000227655		
	24	0.000429022		

**Tabla 2:** Promedios por tratamientos de Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), Tasa del progreso de la enfermedad (TPE), después de la aplicación de biocontrol (*Chlorella* spp) y control químico.

Tratamientos	ABCPE después del biocontrol	Tasa del progreso de la enfermedad	Promedio ABCPE	Promedio tasa del progreso de la enfermedad
	16	0.02010308	17.8	0.023586002
	17	0.025179265		
	16	0.02010308		
	16	0.02010308		
	19	0.025655158		
	16	0.02010308		
	16	0.02010308		

<b>T1</b>	19	0.025655158		
	16	0.02010308		
	21	0.029224351		
	22	0.02963069		
	18	0.020578972	19.5	0.026576193
	18	0.020578972		
	23	0.036838629		
	23	0.036838629		
	17	0.025179265		
	16	0.02010308		
<b>T2</b>	22	0.031762444		
	16	0.02010308		
	26	0.033675775		
	16	0.02010308		
	16	0.02010308	18.6	0.025210991
	16	0.02010308		
	24	0.032238336		
	16	0.02010308		
	16	0.02010308		
	19	0.032793544		
<b>T3</b>	18	0.020578972		
	16	0.02010308		
	18	0.027717358		
	27	0.038266307		

**Tabla 3:** Resultados de la Prueba de ANAVA para área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) antes de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05)

<b>Cuadro de análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
<b>F.V</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	43.4	2	21.7	0.87	0.43
<i>Sclerotinia</i>					
<i>sclerotiorum</i>	43.4	2	21.7	0.87	0.43
Error	672.6	27	24.91		
Total	716	29			

**Tabla 4:** Resultados de la Prueba de ANAVA para tasa del progreso de la enfermedad (TPE) antes de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05)

<b>Cuadro de análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
<b>F.V</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0	2	0	1.8	0.18
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>					
Error	0	27	0		
Total	0	29			

**Tabla 5:** Resultados de la Prueba de ANAVA para área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) después de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05).

<b>Cuadro de análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
<b>F.V</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	14.47	2	7.23	0.65	0.53
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	14.47	2	7.23	0.65	0.53
Error	302.5	27	11.2		
Total	316.97	29			

**Tabla 6:** Resultados de la Prueba de ANAVA para tasa del progreso de la enfermedad (TPE) después de la aplicación del biocontrol y control químico, (p valor significativo < 0,05).

<b>Cuadro de análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
<b>F.V</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0	2	0	0.57	0.57
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0	2	0	0.57	0.57
Error	0	27	0		
Total	0	29			

**Tabla 7:** Resultados de la Prueba de ANAVA para índice de sanidad del cultivo (ISC), (p valor significativo < 0,05).

<b>Cuadro de análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
<b>F.V</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0	1	0	0.01	0.94
<i>Chlorella</i> spp	0	1	0	0.01	0.94
Error	4.68	18	0.26		
Total	4.68	19			

### Anexo 3: Certificación de traducción del abstract



Mg. Yanina Quizhpe Espinoza  
Licenciada en Ciencias de Educación mención Inglés  
Magister en Traducción y mediación cultural

Celular: 0989805087  
Email: [yaniges@icloud.com](mailto:yaniges@icloud.com)  
Loja, Ecuador 110104

Loja, 31 de enero de 2023

Yo, Lic. Yanina Quizhpe Espinoza, con cédula de identidad 1104337553, docente del Instituto de Idiomas de la Universidad Nacional de Loja, y certificada como traductora e interprete en la Senescyt y en el Ministerio de trabajo del Ecuador con registro MDT-3104-CCL-252640, certifico:

Que tengo el conocimiento y dominio de los idiomas español e inglés y que la traducción del resumen de trabajo de integración curricular **Control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga con el uso de microalgas del género *Chlorella* spp.**, cuya autoría de la estudiante María Isabel Iñiguez Piedra, con cédula 1900859990 , es verdadero y correcto a mi mejor saber y entender.

Atentamente

YANINA  
BELEN  
QUIZHPE  
ESPINOZA  
Firmado digitalmente por  
YANINA BELEN  
QUIZHPE  
ESPINOZA  
Fecha: 2023.01.31  
12:19:10 -0500

Yanina Quizhpe Espinoza.

**Traductora**