

**CONTROL DE LA PODREDUMBRE DEL CUELLO EN LECHUGA  
MEDIANTE EL USO DE CEPAS DE *Trichoderma* spp., ÁCIDO SALICÍLICO Y  
SU COMBINACIÓN COMO HERRAMIENTAS DE MANEJO INTEGRADO DE  
LA ENFERMEDAD**

**Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la Facultad de  
Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata**

**IVAN FELIPE GALVIS ROJAS**



**Facultad de  
Ciencias Agrarias  
y Forestales**



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA**

**Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales**

**La Plata, Argentina**

**2021**

**Directores:**

**Dra. Cecilia Mónaco**

**Ing. Agr. Daniel Giménez**

**Codirector:**

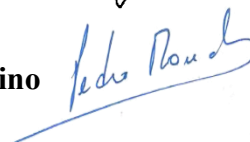
**MSc. Ing. Agr. Mariana Del Pino**

**JURADO EVALUADOR**

**Dra. Laura Gasoni**



**Dr. Pedro Mondino**



**Dra. Marta Rivera**



**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales**  
**La Plata, Argentina**  
**Octubre 5, 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Cecilia Mónaco, MSc. Ing. Agr. Mariana Del Pino a Ing. Agr. Daniel Giménez por su guía, apoyo, colaboración y amistad.

A la Dra. María Rosa Simón, Directora de la Maestría en Protección Vegetal, por el apoyo brindado durante mis años de estudios.

A la Dra. Laura Gasoni, Dr. Pedro Mondino, y Dra. Marta Rivera, por las observaciones y comentarios, así como por el tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.

Al Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI) de la Universidad Nacional de la Plata, y al grupo de investigadores por las facilidades prestadas en la realización de la presente tesis.

A mi familia, amigos, compañeras y compañeros de curso por la amistad y el apoyo durante el transcurso de la maestría.

## CONTENIDO

ABREVIACIONES .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	iv
CAPÍTULO 1 .....	1
Selección <i>in-vitro</i> de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con potencial para el biocontrol de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	4
3.1 Localización .....	4
3.2 Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. ....	4
3.2.1 Muestreo .....	4
3.2.2 Preparación de muestras .....	4
3.2.3 Técnica de aislamiento y cultivo de <i>Trichoderma</i> spp .....	5
3.2.4 Cultivo monospórico .....	5
3.3 Aislamiento del patógeno .....	6
3.3.1 Muestreo .....	6
3.3.2 Técnica de aislamiento y cultivo.....	6
3.4 Prueba de patogenicidad <i>in planta</i> .....	7
3.5 Evaluación de la capacidad antagonista de <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i> .....	7
3.5.1 Técnica de Cultivos duales en laboratorio: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR).....	7
3.5.2 Producción de esclerocios en cultivo dual.....	8
3.5.3 Índice de micoparasitismo (MICMO).....	8
3.6 Selección preliminar de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	9
3.7 Micoparasitismo sobre esclerocios .....	9
3.8 Selección final cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	9
3.9 Análisis de datos.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	10

4.1 Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	10
4.2 Aislamiento del patógeno .....	12
4.3 Prueba de patogenicidad en planta.....	13
4.4 Evaluación de la capacidad antagonista de <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i> .....	15
4.1 Técnica de Cultivos duales en laboratorio: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR).....	15
4.2 Producción de esclerocios en cultivo dual.....	17
4.3 Índice de micoparasitismo (MICMO) .....	19
4.5 Selección preliminar de cepas de <i>Trichoderma</i> spp .....	22
4.6 Micoparasitismo sobre esclerocios .....	23
4.7 Selección final de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	27
5. BIBLIOGRAFÍA .....	29
6. ANEXOS .....	35
6.1 Anexo 1-1. Composición del medio selectivo para <i>Trichoderma</i> (TSM) para un litro de preparación:.....	35
6.2 Anexo 1-2. Anova para la variable de porcentaje de inhibición de porcentaje radial (PICR) .....	35
6.3 Anexo 1-3. Test de Tukey para la variable de porcentaje de inhibición de porcentaje radial (PICR).....	36
6.4 Anexo 1-4. Anova para la variable producción de esclerocios en cultivo dual. ...	36
6.5 Anexo 1-5. Test de Tukey para la variable producción de esclerocios en cultivo dual. ....	37
6.6 Anexo 1-6. Anova y pruebas Tukey para la variable índice de micoparasitismo (MICMO) .....	37
6.7 Anexo 1-7. Anova para la variable micoparasitismo de esclerocios (Parasitados y con esporulación) .....	42
6.8 Anexo 1-8. Test de Tukey para la variable micoparasitismo de esclerocios (Parasitados y con esporulación). ....	43
CAPÍTULO 2 .....	44
Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L.) Var. Gallega de invierno.....	44
1. INTRODUCCIÓN .....	45
2. OBJETIVO GENERAL.....	46
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46

3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
3.1	<i>Localización</i> .....	47
3.2	<i>Material vegetal y manejo del ensayo</i> .....	47
3.3	<i>Tratamientos y criterios de selección para las FASE I y II</i> .....	48
3.3.1	FASE I: Selección de la forma de aplicación de ácido salicílico .....	48
3.3.2	FASE II: Selección de las dosis de ácido salicílico (AS) .....	49
3.4	<i>Variables evaluadas para las FASES I y II</i> .....	50
3.4.1	Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento) .....	50
3.4.2	Número de hojas .....	50
3.4.3	Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD) .....	50
3.4.4	Análisis estadístico .....	51
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
4.1	<i>FASE I: Selección de la forma de aplicación</i> .....	51
4.1.1	<i>Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento)</i> .....	51
4.1.2	<i>Número de hojas</i> .....	54
4.1.3	<i>Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD)</i> .....	58
4.1.4	<i>Selección de forma de aplicación</i> .....	61
4.2	<i>FASE II: Selección de las dosis de ácido salicílico</i> .....	61
4.2.1	<i>Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento)</i> .....	61
4.2.2	<i>Número de hojas</i> .....	63
4.2.3	<i>Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD)</i> .....	65
4.2.4	<i>Selección de dosis de aplicación</i> .....	69
5.	BIBLIOGRAFÍA .....	70
6.	ANEXOS .....	76
6.1	Anexo 2-1. Anova y pruebas Tukey para peso fresco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I .....	76
6.2	Anexo 2-2. Anova y prueba Tukey para peso seco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I .....	76
6.3	Anexo 2-3. Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre la variable peso fresco y seco de hojas en la FASE I .....	77
6.4	Anexo 2-4. Anova para número de hojas sin expandir (HTipoI) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I .....	78

6.5	Anexo 2-5. Anova y prueba Tukey para número de hojas expandidas (HTipoII) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I.....	78
6.6	Anexo 2-6. Anova y prueba Tukey número de hojas de número de hojas totales a cosecha (HTCosecha) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I.....	79
6.7	Anexo 2-7. Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre la variable número de hojas expandidas (HTipoII) en la FASE I.....	79
6.8	Anexo 2-8. Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre la variable número de hojas a cosecha (HTCosecha) en la FASE I.....	80
6.9	Anexo 2-9. Anova para los contenidos contenido de clorofilas (SPAD) en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I durante las 4 observaciones realizadas y prueba Tukey para as lecturas SAPD3 y SPAD4.....	80
6.10	Anexo 2-10. Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre contenido de clorofilas en la FASE I.....	81
6.11	Anexo 2-11. Anova y prueba Tukey para el peso fresco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II.....	81
6.12	Anexo 2-12. Anova y prueba Tukey de peso seco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II.....	82
6.13	Anexo 2-13. Anova para número de hojas total (HTotal) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II.....	82
6.14	Anexo 2-14. Anova para número total de hojas a cosecha (HTCosecha) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II.....	82
6.15	Anexo 2-15. Anova para número de hojas sin expandir (HTipoI) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II.....	83
6.16	Anexo 2-16. Anova para número de hojas expandidas (HTipoII) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II.....	83
6.17	Anexo 2-17. Anova y pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 4 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.....	83
6.18	Anexo 2-18. Anova y Pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 5 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.....	85
6.19	Anexo 2-19. Anova y pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 6 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.....	86
6.20	Anexo 2-20. Anova y pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 8 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.....	87

CAPÍTULO 3 .....	89
Efecto de dos cepas de <i>Trichoderma</i> sp., ácido salicílico y su combinación en el control de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y en el desarrollo y crecimiento de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	89
1. INTRODUCCIÓN .....	90
2. OBJETIVO GENERAL.....	94
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	94
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	95
3.2 Localización .....	95
3.2 Material vegetal y manejo del ensayo .....	95
3.3 Aislados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	95
3.4 Aislado del patógeno .....	96
3.5 Determinación de crecimiento endófito del hongo antagonista.....	96
3.6 Tratamientos.....	97
3.7 Aplicaciones e inoculación.....	98
3.7.1 Aplicación ácido salicílico.....	98
3.7.2 <i>Trichoderma</i> spp. ....	98
3.7.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	98
3.8 Variables evaluadas .....	99
3.8.1 Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento): Ensayos A y B .....	99
3.8.2 Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD).....	100
3.8.3 Incidencia de la enfermedad .....	100
3.8.4 Severidad (longitud y porcentaje de cobertura de la lesión).....	100
3.8.5 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE).....	101
3.9 Análisis estadístico .....	101
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	102
4.1 Determinación de crecimiento endófito del hongo antagonista .....	102
4.2 Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento): Ensayos A y B.....	104
4.3 Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD): Ensayo A.....	108
4.4 Incidencia de la enfermedad: Ensayos A y B.....	112
4.5 Severidad (longitud y porcentaje de cobertura de la lesión): Ensayos A y B .....	115



4.6 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE): Ensayos A y B....	121
5. BIBLIOGRAFIA .....	126
6. ANEXOS .....	142
6.1 Anexo 3-1. Anova y prueba Tukey para las variables Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento): Ensayos A y B .....	142
6.2 Anexo 3-2. Anova y prueba Tukey para la variable Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD) en la hoja 5.....	143
6.3 Anexo 3-3. Anova para la variable Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD) en la hoja 6.....	144
6.4 Anexo 3-4. Anova y prueba Tukey para la variable severidad del ensayo A para las seis evaluaciones.....	144
6.5 Anexo 3-5. Anova y prueba Tukey para la variable severidad del ensayo B para las seis evaluaciones .....	146
6.6 Anexo 3-6. Anova y prueba Tukey para la variable Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en el ensayo A.....	147
6.7 Anexo 3-7. Anova y prueba Tukey para la variable Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en el ensayo B.....	148
CAPITULO 4 .....	149
CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES .....	149

**ABREVIACIONES**

$\mu\text{M}$	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
ABA	Ácido abscísico
AJ	Ácido jasmónico
APG	Agar papa glucosa
AS	Ácido salicílico
ASG	Ácido salicílico O-b-glucósido
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
DCA	Diseño completamente al azar
ddi	Días después de inoculación
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ET	Etileno
g	Gramos
HTipoI	Hojas tipo I
HTipoII	Hojas tipo I
Log Kow	Coefficientes de reparto octanol-agua
M	Molar
MICMO	Índice de micoparasitismo
mM	Milimolar
mmol. L <sup>-1</sup>	Milimoles por litro
nm	Nanómetro
PCNB	Pentacloronitrobenceno

PICR	Porcentaje de inhibición de crecimiento radial
SAG	Genes asociados a la senescencia
TSM	<i>Trichoderma</i> selective medium

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-1.</b> Cepas aisladas a partir de suelo .....	11
<b>Figura 1-2.</b> Esclerocios producidos por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	13
Figura 1-3. Desarrollo de la podredumbre sobre las hojas de lechuga inoculadas con ..	14
<b>Figura 1-4.</b> Ejemplo de micoparasitismo en algunas cepas evaluadas .....	21
Figura 1-5. Prueba de micoparasitismo de esclerocios y esclerocios parasitados por las 5 cepas seleccionadas y evaluadas. ....	26
<b>Figura 2-6.</b> Proceso de establecimiento de los ensayos. A) Pre germinación en caja de Petri. B) Siembra en bandejas de germinación. C) Trasplante de plántulas en macetas. D) Distribución en el ensayo.....	48
Figura 3-7. A) Inoculación de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y B) establecimiento del ensayo. ....	99
Figura 3-8. A) Detalle del crecimiento radical de las plantas sometidas a los tratamientos con <i>Trichoderma</i> sp. cepa 15 y 22 B) Siembra en medio selectivo para <i>Trichoderma</i> (TSM) de fragmentos de raíz de lechuga y características macroscópicas de las colonias .....	104
Figura 3-9. Incidencia de la enfermedad en las plantas en los distintos tratamientos en los ensayos A y B.....	113
Figura 3-10. Severidad de la enfermedad en el ensayo A.....	116
Figura 3-11. Severidad de la enfermedad en el ensayo B.....	118
Figura 3-12. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad de las plantas sometidas a los tratamientos del 1 al 9 en los ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	123

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1-1. Escala de evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo a la invasión de la superficie. ....	8
<b>Tabla 1-2.</b> Registro de los diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. empleados en este estudio. ....	11
Tabla 1-3. Datos promedio para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en los diferentes aislados a las 48 horas después de siembra. Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey. ....	15
Tabla 1-4. Valores promedio de los esclerocios producidos por el aislado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> enfrentado con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp. Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey. ....	18
Tabla 1-5. Valores promedio de porcentaje de micoparasitismo y valores según escala evaluada. Valores con la misma letra no difieren entre sí según la prueba de Tukey. ....	20
Tabla 1-6. Valores de la correlación de las variables porcentaje de inhibición de porcentaje radial (PICR), Porcentaje de micoparasitismo (MICMO) y su significancia. ....	22
Tabla 1-7. Resumen de los valores promedio más altos en las variables Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), Número promedio de esclerocios en dual, Porcentaje de reducción en formación de esclerocios y Porcentaje de micoparasitismo en dual (MICMO) ....	23
Tabla 1-8. Valores promedio del micoparasitismo de esclerocios (esclerocios parasitados y colonizados). Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey. ....	24
Tabla 2-9. Tratamientos producto de la combinación de dosis y formas de aplicación para la FASE I. ....	49
Tabla 2-10. Tratamientos para la FASE II. ....	49
Tabla 2-11. Datos de peso fresco y seco obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey ....	52
Tabla 2-12. Valor y prueba Tukey para el componente forma de aplicación sobre el peso fresco y seco. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). ....	52
Tabla 2-13. Datos de número total de hojas y hojas tipo I y II obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	55

Tabla 2-14. Valor y prueba Tukey para el componente forma de aplicación sobre las variables de número de hojas tipo I y II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). .....	55
Tabla 2-15. Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 4 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	58
Tabla 2-16. Valor y prueba Tukey para el componente forma de aplicación sobre el contenido de clorofilas. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). .....	59
Tabla 2-17. Datos de peso fresco y seco obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	61
Tabla 2-18. Datos del número de las hojas tipo I y II de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	64
Tabla 2-19. Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 4 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	65
Tabla 2-20. Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 5 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	66
Tabla 2-21. Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 6 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	66
Tabla 2-22. Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 8 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	67
Tabla 3-23. Tratamientos planteados para el desarrollo de la tesis. ....	97
Tabla 3-24. Datos de peso fresco y seco obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	106
Tabla 3-25. Contenido de clorofilas en las hojas 5 y 6 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	109
Tabla 3-26. Datos de severidad de la enfermedad en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos A. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	117

Tabla 3-27. Datos de severidad de la enfermedad en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	118
Tabla 3-28. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra, para cada ensayo, representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey. ....	122

## **CAPÍTULO 1**

**Selección *in-vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. con potencial para el biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum*.**



## 1. INTRODUCCIÓN

Las especies de *Sclerotinia* figuran entre los patógenos de suelo más polífagos. Adams y Ayers (1979) mencionan como hospedantes a 64 familias, 225 géneros y 361 especies, siendo las Compuestas una de las familias más atacadas (64 géneros y 62 especies). Los síntomas varían de acuerdo al cultivo u órgano afectado, pero comúnmente produce pudrición algodonosa, moho blanco o pudrición blanda acuosa, pudriciones del tallo, marchitez, ahogamiento, pudrición de la corona, tizón de las inflorescencias, cáncer del tallo, pudriciones de la raíz y corona, entre otras (Agrios, 2005).

En caso particular de la lechuga (*Lactuca sativa* L.), la podredumbre del cuello es comúnmente causada por dos agentes patógenos pertenecientes a la división Ascomycota y género *Sclerotinia* (*S. Sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *S. minor* Jagger) (Arias *et al.*, 2007 y Cundom *et al.*, 2002). En zonas tropicales, esta enfermedad se presenta con mayor intensidad durante épocas tempranas del cultivo, o próximo a cosecha y durante el almacenamiento (Ávila *et al.*, 1996). En Argentina, la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en épocas frías (otoño e invierno) con una alta prevalencia en los sistemas productivos con baja tecnología según los datos del estudio de Szeszney *et al.* (2013) en el cinturón hortícola de Mar del Plata.

Dentro de las prácticas de control se han encontrados grandes limitantes debido a los inconvenientes para obtener cultivares resistentes, el amplio rango de hospedantes espontáneos y cultivados y por la habilidad de patógeno de sobrevivir en el suelo por largos periodos mediante la producción de estructuras de resistencia (esclerocios) (Cundom *et al.*, 2002), las cuales se consideran como fuente de inóculo primario para nuevas infecciones, además que pueden permanecer viables por al menos 4-5 años (Adams y Ayers, 1979). Generalmente el manejo de esta enfermedad se realiza mediante el uso de fungicidas como vinclozolin, benomil, iprodione, carbendazin y procimidone (Ávila y Velandia, 1992), estando los tres últimos registrados para su uso en Argentina (Viglianchino y Huarte, 2014). Sin embargo, la vida media de estos ingredientes activos es corta, producto de su biodegradación de los microorganismos y por la interacción con las características físico-químicas del suelo (Subbarao, 1998), sumado a la eliminación de organismos benéficos al ser pesticidas no selectivos (Hoyos *et al.*, 2008 y García *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, se han realizado estudios con diferentes microorganismos que han permitido identificar más de 30 especies entre bacterias y hongos como antagonistas y micoparásitos de *Sclerotinia* spp. (Smith, 2004 y Agrios, 2005). Dentro de los hongos biocontroladores se destacan *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum*, y *Trichoderma* sp. con potencial biocontrol de patógenos de suelo; Autores como Stewart y Harrison, (1988) y Alexander, (1992) citados por Jones *et al.* (1999) reportan que *C. minitans* parasita fuertemente a *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii* en ensayos de laboratorio e invernadero en Nueva Zelanda; Adams y Ayers, (1982) demostraron que la introducción de macroconidios al suelo de *Sporidesmium sclerotivorum*, lograron parasitar y disminuir la población de esclerocios pertenecientes a *S. minor*, mientras que Hoyos *et al.* (2008), indican que *Trichoderma* sp., es capaz de colonizar, esporular y alimentarse de estructuras de resistencia (esclerocios), comunes en especies como *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*.

En el caso de *Trichoderma* spp., diferentes autores mencionan que la eficiencia en el control de hongos patógenos se debe a que son i) altamente reproductivas (alta capacidad de producción de conidios), ii) eficaces en la utilización de nutrientes, iii) modificadores de la rizosfera al inducir cambios en el pH y/o poblaciones microbianas (Ibarra *et al.*, 2010), iv) fuertemente agresivas contra hongos patógenos, mediante su actividad micoparásita, antibiosis y competencia por sustrato (Hermosa *et al.*, 2012) y/o v) agentes promotores de crecimiento (Sriram *et al.*, 2009). Aunque vale la pena mencionar que la eficiencia del control del hongo antagonista depende de atributos de aislados particulares (Howell, 2006).

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Seleccionar *in-vitro* cepas de *Trichoderma* spp. con potencial para el biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum* dentro del manejo integrado de la enfermedad.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.1.1 Aislar cepas de *Trichoderma* spp. a partir de suelos dedicados al cultivo de lechuga en el Cinturón Hortícola de La Plata.

- 2.1.2 Aislar en medio de cultivo al agente causal de la enfermedad de la podredumbre de cuello de lechuga (*Sclerotinia sclerotiorum*).
- 2.1.3 Evaluar en el laboratorio la capacidad antagónica de los aislados de *Trichoderma* spp. mediante cultivos duales y pruebas de micoparasitismo de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*.
- 2.1.4 Seleccionar las cepas de *Trichoderma* spp. que presenten los mejores resultados en las pruebas *in-vitro*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***3.1 Localización***

Para las pruebas de laboratorio se usaron las instalaciones del curso de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

#### ***3.2 Aislamientos de *Trichoderma* spp.***

##### ***3.2.1 Muestreo***

Se trabajó con tres muestras de suelo provenientes de lotes dedicados al cultivo de lechuga a libre exposición en la huerta orgánica “La Asunción” ubicada en la zona de Abasto, Partido de La Plata, en la Provincia de Buenos Aires. La primera muestra con antecedentes de la enfermedad (M1) y las dos siguientes, sin registro alguno (M2 y M3). Cada muestra estuvo compuesta por diez submuestras de suelo, tomadas de los primeros 10 centímetros de profundidad, las cuales fueron colectadas en bolsas de polietileno y homogenizadas para su secado.

##### ***3.2.2 Preparación de muestras***

Cada muestra fue secada a temperatura ambiente durante tres días, posteriormente se destruyeron los terrones grandes mediante aplicación de fuerza mecánica usando mortero con el fin de lograr una muestra con estructura homogénea.

### **3.2.3 Técnica de aislamiento y cultivo de *Trichoderma* spp**

Los aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvieron utilizando la técnica del suelo diluido (Stocco, 2014) con medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* (TSM) (Elad *et al.*, 1981 citado por Stocco, 2014):

Se tomaron, de cada una de las muestras de suelo, 5 g que fueron suspendidos en 50 ml de agua destilada estéril (solución original). Luego se agitó durante 20 minutos y se realizaron diluciones seriadas, tomando una alícuota de 1 ml de la suspensión que fue vertida en 9 ml de agua destilada estéril. De las diluciones  $1 \times 10^{-3}$  y  $1 \times 10^{-4}$  se colocaron en cajas de Petri, 1 ml de la suspensión con 1 ml de solución de pentacloronitrobenceno (PCNB) (PCNB, 0,2g/100 ml de agua destilada estéril, Terrazan PHD®). Posteriormente, se preparó y agregó el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* (TSM) (Anexo 1-1) fundido y enfriado a 50 °C. Se realizaron tres repeticiones por muestra las cuales fueron incubaron en estufas a 26 °C, durante 5 días. Aquellas colonias de *Trichoderma* spp. que crecieron de manera aisladas fueron repicadas en medio agar papa glucosa (APG).

### **3.2.4 Cultivo monospórico**

De cada uno de los aislados obtenidos, se realizaron cultivos monospóricos para asegurar que la cepa obtenida correspondiera a un único genotipo. Para esto se siguió la metodología planteada por Valiente y Pavone (2013), consistente en agregar 20 ml agua destilada estéril sobre la caja de petri con cada una de las cepas sobre medio APG a fin de obtener una suspensión de conidios lo más diluida posible (50 a 100 conidios/ml). Dicha suspensión se vertió sobre una placa de agar agua (1,6%) descartando de inmediato el líquido excedente y se incubó durante 18 horas a 25 °C. Después de este tiempo, se tomaron las cajas y se observaron a través de microscopio con aumento 4x, donde se lograron identificar los conidios germinados, luego se extrajo la sección de agar donde se encontraban usando una aguja, que posteriormente se llevó a una placa con medio APG y se incubó por 5 días a 25°C.

Adicional a las cepas aisladas de las muestras, se utilizaron dos aislados provenientes de la zona hortícola de La Plata que fueron aislados a partir de suelo dedicado al cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y que presentaron potencial biocontrolador del cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) (Guerrero, 2017).

### **3.3 Aislamiento del patógeno**

#### **3.3.1 Muestreo**

Para el aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum* se colectaron 10 plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en condiciones de campo con los síntomas característicos de la enfermedad.

#### **3.3.2 Técnica de aislamiento y cultivo**

Se realizó el procedimiento teniendo en cuenta la metodología usada por Delhey *et al.*, (2009) y Aguilar *et al.* (2015) con el fin de fomentar el crecimiento micelial y la formación de esclerocios para posteriormente aislar al agente patógeno:

Se hizo una desinfección superficial del tejido afectado (parte del tallo con hojas bajas) con hipoclorito de sodio al 2,5% por 2 minutos, ejerciendo agitación constante. Posteriormente se realizaron lavados con agua destilada estéril. El tallo y las hojas fueron secadas con papel absorbente y luego fueron ubicadas en una cámara húmeda, la cual consistió de un recipiente plástico con tapa con dos toallas de papel absorbente humedecidas con 20 ml de agua destilada estéril. Las hojas se dejaron dentro de la cámara durante 5 días a una temperatura promedio de 18 °C. Después de este tiempo, se extrajeron y desinfectaron las estructuras de resistencia (esclerocios) formadas sobre el tejido afectado, con hipoclorito de sodio al 2,5% durante 30 segundos, 1 minuto en alcohol al 70% y 2 minutos en agua destilada estéril. Posteriormente fueron sembrados en medio de cultivo APG (un esclerocio por caja) (Aguilar *et al.*, 2015).

La determinación de la especie del agente causal de la podredumbre de cuello en las plantas de lechuga muestreadas, se realizó mediante el registro de características

microscópicas y macroscópicas teniendo las observaciones descritas por Willetts y Wong (1980) (aspecto y color del micelio, así como el tamaño y forma de esclerocios).

### ***3.4 Prueba de patogenicidad in planta***

Esta prueba tuvo como fin cumplir con los postulados de Koch y determinar la habilidad del patógeno para infectar tejido foliar, para esto se siguió la metodología de cámara húmeda:

Se tomaron 8 hojas sanas de lechuga, las cuales fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% durante 2 minutos, posteriormente fueron lavadas con agua destilada estéril. Cada hoja se colocó dentro de cámaras húmedas que consistió en un recipiente plástico con toallas de papel humedecidas. Las hojas fueron inoculadas con discos de 5 mm de APG con micelio del patógeno obtenido. Se registraron los síntomas y signos de la enfermedad en las hojas inoculadas durante 15 días.

### **3.5 Evaluación de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. in –vitro**

#### **3.5.1 Técnica de Cultivos duales en laboratorio: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)**

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología propuesta en el estudio de Fernández y Suarez (2009). Se colocaron, en un extremo de la caja de Petri de 9 cm con agar papa glucosa, un disco de medio de cultivo APG de 5 mm de diámetro con micelio del agente patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con micelio de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. a 5 cm aproximadamente entre ellos. Asimismo, se sembraron en cajas separadas discos de agar de *Sclerotinia sclerotiorum*, los cuales correspondían a los testigos; por cada enfrentamiento y testigo se sembraron tres cajas para tres repeticiones. Posteriormente, se incubaron a 26 °C, durante 4 días, haciendo mediciones del crecimiento radial del micelio de las colonias de los hongos 24 h después de la siembra.

Se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) provocado por la presencia del antagonista empleando la fórmula de Ezziyyani *et al.* (2004):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial del patógeno.

### 3.5.2 Producción de esclerocios en cultivo dual

Se hicieron recuentos de número de esclerocios producidos por el agente patógeno en los diferentes enfrentamientos y cajas testigo.

### 3.5.3 Índice de micoparasitismo (MICMO)

Se calculó el índice de micoparasitismo haciendo un registro fotográfico de cada una de las cajas de los cultivos duales (enfrentados y testigos) cada 2 días después del contacto de los microorganismos (durante 10 días para un total de 5 observaciones). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ® (Martínez *et al.*, 2013) con el que se determinó el área de las colonias del patógeno y antagonista y así establecer la capacidad antagónica según la escala de la Tabla 1-1 (Ezziyyani *et al.* 2004).

**Tabla 1-1.** Escala de evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo a la invasión de la superficie.

<b>Grado</b>	<b>Capacidad Antagónica</b>
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie del hongo y esporulación sobre ella.

### **3.6 Selección preliminar de cepas de *Trichoderma* spp.**

Se seleccionaron 5 aislados que presentaron i) los mejores valores en el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), ii) altos valores en la escala del índice de micoparasitismo (MICMO) para las dos últimas observaciones (si el antagonista cubre más del 75% el micelio del fitopatógeno) y iii) menor número de esclerocios en los cultivos duales.

### **3.7 Micoparasitismo sobre esclerocios**

El micoparasitismo se evaluó siguiendo la metodología de Rollan *et al.* (1999). Para esto se sembraron en el centro de cajas de Petri con APG, de forma independiente, discos de micelio de 5 mm de diámetro de 5 cepas de *Trichoderma* spp. seleccionadas de manera preliminar; Los discos fueron extraídos de cajas de Petri con medio de APG que contenían las diferentes cepas provenientes de los cultivo monospórico, los que posteriormente fueron incubadas a 26 °C durante 7 días.

Alrededor de la siembra y a 2 cm de distancia del disco de micelio con *Trichoderma* se colocaron 10 esclerocios del aislado del patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, los cuales provienen de cultivos con el mismo medio (APG) mantenidos a 26 °C. Adicionalmente se sembraron como testigo esclerocios del patógeno sin los antagonistas. Por cada cepa de *Trichoderma* y testigo se realizaron 5 repeticiones. Las cajas fueron incubadas a 26 °C por un periodo de 15 días para su respectiva evaluación.

La evaluación comparativa de la actividad micoparásita se determinó mediante la aplicación de fuerza mecánica con una aguja de laboratorio sobre los esclerocios de los diferentes tratamientos y testigo, realizando el conteo de aquellos que presentaron pérdida en su integridad. Se consideró esclerocio parasitado aquel que estaba blando y cubierto por abundante esporulación del antagonista (Rollan *et al.* 1999).

### **3.8 Selección final cepas de *Trichoderma* spp.**

De los 5 aislados seleccionados en *Selección preliminar de cepas de Trichoderma* spp., se eligieron 2 que presentaron los mayores porcentajes en la variable *Micoparasitismo*



sobre esclerocios, los cuales fueron utilizados en los ensayos in-vivo o Pruebas de invernáculo.

La identificación de las cepas se hizo de acuerdo a la morfología, tamaño y patrón de distribución de los conidióforos, formas y color de los conidios y presencia o ausencia de clamidosporas siguiendo la clave taxonómica de Bisset (1991).

### **3.9 Análisis de datos**

El experimento se desarrolló bajo un diseño experimental completamente al azar. Se establecieron 22 tratamientos con tres repeticiones, para el análisis de las variables *porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)*, *producción de esclerocios en cultivo dual* e *índice de micoraparasitismo*. Para la variable *micoparasitismo sobre esclerocios*, se desarrolló un diseño experimental completamente al azar con 6 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias Tukey con el programa estadístico STATISTICA versión 8 (StatSoft Inc.).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Aislados de *Trichoderma* spp.**

Se lograron aislar 20 cepas de las tres muestras analizadas, las cuales corresponden al género *Trichoderma* spp. según las características macroscópicas y microscópicas de las colonias (Tabla 1-2) (Fig. 1-1).

Se pudo evidenciar la presencia del hongo antagonista en la totalidad (100%) de las muestras analizadas (M1, M2 y M3), posiblemente a que el género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo (Pineda *et al.*, 2017) especialmente en aquellos que contienen alta materia orgánica (Martínez *et al.* 2013).



**Figura 1-1.** Cepas aisladas a partir de suelo

El alto número de cepas de *Trichoderma* encontrados en las muestras se debe principalmente al tipo de manejo agronómico que se realiza en la huerta “La Asunción” (manejo orgánico), donde se hacen incorporaciones de materia orgánica al suelo y no se usan agroquímicos, lo cual puede favorecer el establecimiento y reproducción del hongo antagonista. Liu *et al.* (2008) afirman que dentro de las prácticas de manejo convencional como desinfección de suelo (aplicación de fungicidas e insecticidas), se afecta a gran parte de los microorganismos que habitan allí debido a su sensibilidad, del mismo modo, Stirling, (2011) citado por Guerrero (2017) indica que la aplicación de agroquímicos afecta las poblaciones microbianas que de manera natural suprimen el efecto de los patógenos (Ej. *Trichoderma*).

**Tabla 1-2.** Registro de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. empleados en este estudio.

Aislado	Muestra	Repetición	Localidad	Sustrato
T1			Zona hortícola Platense	Suelo Cultivo de Tomate
T2			Zona hortícola Platense	Suelo Cultivo de Tomate
T3	M1	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
T4	M1	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
T5	M1	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
T6	M1	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga

<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Repetición</b>	<b>Localidad</b>	<b>Sustrato</b>
<b>T7</b>	M1	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T8</b>	M1	3	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T9</b>	M1	3	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T10</b>	M2	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T11</b>	M2	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T12</b>	M2	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T13</b>	M2	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T14</b>	M2	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T15</b>	M2	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T16</b>	M2	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T17</b>	M3	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T18</b>	M3	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T19</b>	M3	1	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T20</b>	M3	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T21</b>	M3	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga
<b>T22</b>	M3	2	Abasto, Partido de La Plata	Suelo Cultivo de lechuga

#### ***4.2 Aislamiento del patógeno***

En el medio de cultivo se observó crecimiento del micelio del patógeno a partir los 2 días después de la siembra, el cual presentaba color blanco y aspecto algodonoso (Fig. 1-2A); las hifas fueron hialinas y septadas, característica presente en los hongos pertenecientes al género *Sclerotinia* (Willetts y Wong, 1980). Al cabo de 7 días, después de la colonización total del medio, i) se formaron agrupaciones de hifas que produjeron una masa blanca, ii) hubo una mayor agregación que permitió aumentar su tamaño y iii) días después tomaron un color negro, posiblemente debido al depósito de melanina en las células de la corteza periférica que dan paso a esclerocios maduros (Fig. 1-2B). Estos eventos coinciden con las etapas de desarrollo de esclerocios descritas por Bolton *et al.* (2006) y Willetts y Wong (1980).



**Figura 1-2.** Esclerocios producidos por *Sclerotinia sclerotiorum*.

La principal característica que permite diferenciar las especies de *Sclerotinia* que causan la podredumbre del cuello en lechuga es el tamaño y forma de los esclerocios (Ekins *et al.*, 2005). En esta investigación se observó una producción promedio de 17 esclerocios por caja de Petri, los cuales presentaron un tamaño promedio de 3,4 mm de largo y 2,18 mm, con forma irregular a elíptico (Fig. 1-2); características que concuerdan con la descripción que hace Laemmlen (2001) de *S. sclerotiorum* quien indica que este patógeno presenta esclerocios más grandes (2 a 10 mm de diámetro) que los de *S. minor*, tienen superficie lisa y de forma irregular (usualmente semiesféricos y/o alargados). Mientras que los esclerocios de *S. minor* son pequeños (0,5 a 2,0 mm de diámetro), rugosos, angulares y más numerosos que los de *S. sclerotiorum* (> 100 dependiendo de las condiciones de crecimiento) (Willettts y Wong, 1980).

#### ***4.3 Prueba de patogenicidad en planta***

Se observaron síntomas de la enfermedad después de los 7 días de inoculación; las hojas presentaron manchas marrones alrededor de la zona donde se dispuso el disco de agar con micelio del patógeno. A los 13 días se pudo evidenciar una podredumbre acuosa generalizada en el tejido con abundante micelio blanco algodonoso. Después de los 17 días de la inoculación del patógeno se observó micelio blanco algodonoso que posteriormente dio paso a la formación de esclerocios, los cuales eran de gran tamaño (>3 mm) de forma irregular, compactos y de color negro (Fig. 1-3).



Inoculación con el patógeno aislado



7 días después de inoculación



13 días después de inoculación



17 días después de inoculación

**Figura 1-3.** Desarrollo de la podredumbre sobre las hojas de lechuga inoculadas con *Sclerotinia sclerotiorum*

Los síntomas descritos son típicos de especies del género *Sclerotinia* asociados a la podredumbre de la lechuga (*S. sclerotiorum* y *S. minor*) y concuerdan con las descripciones realizadas por distintos autores. Koike y Davis (2009) indican que a medida que estos hongos colonizan el tejido huésped producen lesiones de color café pálido. Posteriormente hay una pudrición blanda en las hojas y finalmente toma un aspecto de masa gelatinosa o viscosa (Subbarao, 1998) que bajo condiciones de alta humedad forma un micelio blanco y se producen esclerocios (Laemmlen, 2001), los cuales según Messiaen y Lafon (1968) citados por Pérez *et al.* (2009) son inicialmente blancos, del color del micelio que los origina, y después toman una coloración grisácea hasta quedar negros por completo (Fig. 1-3) con un tamaño promedio entre 2 a 10 mm de diámetro con superficie lisa y forma irregular.

Teniendo en cuenta los síntomas y las características de los esclerocios producidos se puede inferir que el agente causal aislado e inoculado es *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### 4.4 Evaluación de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. *in vitro*

##### 4.1 Técnica de Cultivos duales en laboratorio: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)

Se pueden evidenciar diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial ( $p < 0,01$ ) (Anexo 1-2 y 1-3) entre las diferentes cepas con una amplia variación que va desde 4,08% al 45,65%. Los valores promedio más altos e iguales estadísticamente, se encontraron en las cepas T17 (45,65%) seguido por las cepas T21, T22 y T15 (45,25%, 41,53% y 39,05 respectivamente) (Tabla 1-3), los cuales presentan potencial por su mayor capacidad inhibitoria.

**Tabla 1-3.** Datos promedio para la variable porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en los diferentes aislados a las 48 horas después de siembra. Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey.

<b>Aislado</b>	<b>Valor promedio de PICR</b>
T1	16,43 b
T2	21,51 b
T3	7,32 a
T4	5,40 a
T5	24,24 b
T6	4,08 a
T7	38,09 c
T8	19,01 b
T9	14,38 a
T10	16,33 b
T11	13,05 a
T12	29,08 c
T13	19,49 b
T14	21,79 b
T15	39,05 cd
T16	20,36 b

<b>Aislado</b>	<b>Valor promedio de PICR</b>
T17	45,65 d
T18	27,74 bc
T19	14,76 a
T20	7,55 a
T21	45,25 d
T22	41,53 d

En el estudio realizado por García *et al.* (2012) encontraron diferencias significativas en un amplio rango de valores de porcentaje de inhibición del crecimiento de *Sclerotinia* spp. en presencia de *Trichoderma* que van desde 0,08% (cepa TL6) hasta 88% (TX8). Matroudi *et al.* (2009) indican que, en cultivo dual, aislados de *S. sclerotiorum* (S1 y S2) presentaron alta inhibición del crecimiento con valores de 85-93% respectivamente cuando fueron enfrentados a *T. atroviride*. Mientras que Zivković *et al.*, (2016) muestran que *T. harzianum* manifestó un fuerte antagonismo contra los aislados LS-1, LS-2, LS-3 y LS-4 de *S. sclerotiorum* donde el porcentaje de inhibición de crecimiento radial fue de 71%, 68%, 65%, y 63% respectivamente.

Las diferencias obtenidas para la capacidad de inhibición entre las cepas de *Trichoderma* sp. pueden estar relacionadas con el hecho de que los aislados podrían pertenecer a distintas especies, evidenciado por las características macroscópicas como el patrón de color y crecimiento, así como a los mecanismos de inhibición (García *et al.*, 2012), aunque se ha demostrado que existe gran diversidad entre cepas de la misma especie, por lo que la eficiencia del control del hongo antagonista depende de atributos de aislados particulares (Howell, 2006).

Del mismo modo, Amin *et al.*, (2010) indican que la alta velocidad de crecimiento del antagonista es un factor importante que puede influir en la capacidad antagónica del aislado. Ibarra *et al.* (2010) reportan diferencias en las tasas de crecimiento de las cepas evaluadas de *Trichoderma* sp. las cuales fueron, a su vez, más altas que *Sclerotinia* spp. a pesar de ser catalogado como patógeno agresivo, lo cual le daría una ventaja importante en la competencia con los hongos patógenos por el espacio y los nutrientes (Cook y Baker 1989; Deacon y Berry 1992 citados por Matroudi *et al.* 2009), al

permitirle colonizar de manera más eficiente el sustrato (Infante et al, 2009). Es por esto, que cepas que presenten un rápido crecimiento respecto al patógeno *S. sclerotiorum* pueden llegar a presentar los valores más altos de PICR. Después de 48 horas de siembra (segunda evaluación) la totalidad de las cepas evaluadas entraron en contacto con la colonia del patógeno, resultado que coincide con las observaciones de Arzate *et al.* (2006) citados por Calvo *et al.*, (2012) quienes encontraron en su estudio que *Trichoderma* y diversos patógenos (*M. fijiensis*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc.) entran en contacto entre uno y tres días después de establecida la prueba de cultivos duales, característica deseable en un antagonista, ya que cuando menor sea este valor (días de contacto), implicará una mayor agresividad por parte del antagonista (Calvo *et al.*, 2012).

Sumado a la velocidad de crecimiento, los bajos valores también pueden deberse a los diferentes mecanismos de acción de cada una de las cepas *Trichoderma* sp. así como su especificidad frente al hongo patógeno, por lo que pueden existir aislados que sean más eficientes para el control de un patógeno que de otro (Martínez *et al.*, 2013); Dentro de los posibles mecanismos de acción se encuentran la competencia por espacio y/o nutrientes, la antibiosis o micoparasitismo (Saba Banday *et al.*, 2008).

#### 4.2 Producción de esclerocios en cultivo dual

El número de esclerocios producidos por *Sclerotinia sclerotiorum* durante la confrontación con las diferentes cepas mostró diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) (Anexo 1-4) y según la prueba de Tukey se evidencian tres agrupamientos (Anexo 1-5); el primero abarca el 90,90% de las cepas analizadas con valores entre 0,33 y 3 esclerocios, el segundo comprende dos cepas (T1 y T6) con valores de 5,33 y 5,67 esclerocios respectivamente y por último el tratamiento testigo quien presentó un valor promedio de 16,33 esclerocios (Tabla 1-4).



**Tabla 1-4.** Valores promedio de los esclerocios producidos por el aislado de *Sclerotinia sclerotiorum* enfrentado con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey.

<b>Aislado</b>	<b>Esclerocios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b>
<b>T1</b>	5,33 b
<b>T2</b>	2,67 a
<b>T3</b>	2,67 a
<b>T4</b>	3,00 a
<b>T5</b>	3,00 ab
<b>T6</b>	5,67 b
<b>T7</b>	0,67 a
<b>T8</b>	0,67 a
<b>T9</b>	2,00 a
<b>T10</b>	0,67 a
<b>T11</b>	0,67 a
<b>T12</b>	1,33 a
<b>T13</b>	0,33 a
<b>T14</b>	1,33 a
<b>T15</b>	0,67 a
<b>T16</b>	1,33 a
<b>T17</b>	0,67 a
<b>T18</b>	1,33 a
<b>T19</b>	1,33 a
<b>T20</b>	2,00 a
<b>T21</b>	1,67 a
<b>T22</b>	1,00 a
<b><i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b>	16,33 c

Durante algunos enfrentamientos se evidencio la formación de esclerocios en la periferia de la colonia, los cuales tenían forma irregular (deformaciones) y presentaban un menor tamaño en comparación al testigo, observaciones similares a las obtenidas por Ibarra (2010), quien mostró en su estudio un retraso en la producción y número de esclerocios en presencia del hongo antagonista. Menéndes (1996) indica en su estudio que ninguno de los aislados suprimió por completo la formación de esclerocios, siendo el mejor un aislado de *T. koningii* con una reducción del 83,4%. En este caso veinte de las veintidós cepas analizadas mostraron una reducción en la formación de estructuras de resistencia superior al 82%.

#### 4.3 Índice de micoparasitismo (MICMO)

Se evidenciaron diferencias significativas en las 5 observaciones realizadas en esta variable ( $p < 0,01$ ) (Anexo 1-6). Al final de la evaluación (Obs 5), según la prueba Tukey, los aislados T7, T8, T15, T17, T21 y T22 fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a los demás aislados, cuyos valores estuvieron por encima de 93,92%, posicionándolos como cepas promisorias con potencial de control. Los demás tratamientos presentaron valores que va desde 42,90% a 93,92%.

Para la escala propuesta se puede evidenciar que los valores fueron ascendiendo a medida que aumentaba el tiempo de las observaciones, lo que parece indicar que todas las cepas tuvieron la capacidad de crecer y sobreponerse sobre el micelio del agente patógeno, resultados que coinciden con los reportes de Durman (2003), quien determinó que dicho evento predominó en las cepas de *Trichoderma* sp. evaluadas y estableció como mecanismo de biocontrol, el micoparasitismo. En la observación 1, el 100% de los aislados son iguales estadísticamente, para las observaciones del 2 al 4 la prueba Tukey indica, que para la última (observación 5), los aislados T7, T8, T15, T17, T21 y T22, se diferenciaron estadísticamente del resto por que lograron una mayor inhibición “in vitro” de la cepa de *Sclerotinia sclerotiorum* cuyos valores superaron el 93,92%.

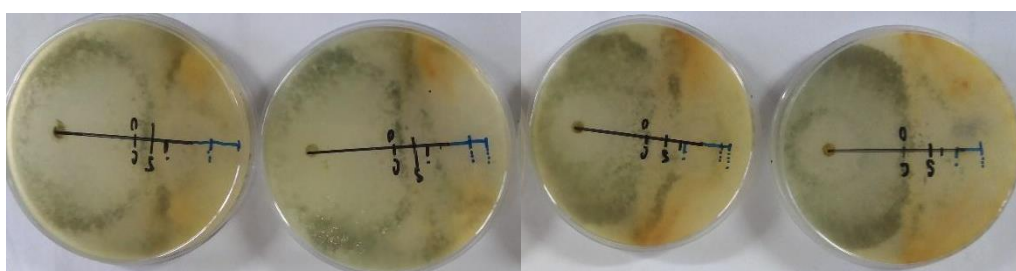
**Tabla 1-5.** Valores promedio de porcentaje de micoparasitismo y valores según escala evaluada. Valores con la misma letra no difieren entre sí según la prueba de Tukey.

Ais.	Valores promedio de porcentaje					Escala propuesta				
	Obs 1	Obs 2	Obs 3	Obs 4	Obs 5	Obs 1	Obs 2	Obs 3	Obs 4	Obs 5
<b>T1</b>	15,18 a	26,80 a	30,11 a	35,67 a	42,90 a	1,00 a	1,33 a	2,00 a	2,00 a	2,00 a
<b>T2</b>	14,97 a	28,75 a	39,37 a	45,26 a	50,16 b	1,00 a	2,00 ab	2,00 a	1,67 a	2,33 a
<b>T3</b>	25,84 a	55,12 b	77,00 c	85,17 c	90,73 d	2,00 a	2,67 b	3,00 b	3,00 b	3,00 b
<b>T4</b>	19,47 a	37,56 a	53,08 b	71,36 b	90,58 d	1,00 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	3,00 b
<b>T5</b>	21,57 a	42,91 a	60,90 b	72,93 b	82,55 c	1,00 a	2,33 b	3,00 b	3,00 b	3,00 b
<b>T6</b>	16,80 a	27,82 a	38,62 a	41,40 a	48,52 b	1,00 a	2,00 ab	2,00 a	2,00 a	2,00 a
<b>T7</b>	30,47 b	37,56 a	59,37 b	76,67 b	95,45 e	2,00 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	4,00 c
<b>T8</b>	23,76 a	39,56 a	56,60 b	76,71 b	93,92 de	1,33 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	3,67 c
<b>T9</b>	22,65 a	41,56 a	57,58 b	79,41 b	88,52 d	1,33 a	2,00 ab	2,67 ab	3,00 b	3,00 b
<b>T10</b>	16,48 a	32,36 a	52,80 b	76,58 b	89,07 d	1,00 a	2,00 ab	2,33 ab	3,00 b	3,00 b
<b>T11</b>	16,11 a	30,64 a	45,22 a	70,45 b	89,01 d	1,00 a	2,00 ab	2,33 ab	3,00 b	3,00 b
<b>T12</b>	21,42 a	39,58 a	55,69 b	78,37 b	90,05 d	1,33 a	1,67 a	2,67 ab	3,00 b	3,00 b
<b>T13</b>	17,20 a	32,04 a	49,26 a	71,35 b	90,00 d	1,00 a	2,00 ab	2,67 ab	3,00 b	3,00 b
<b>T14</b>	23,06 a	42,25 a	61,11 b	77,53 b	89,46 d	1,33 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	3,00 b
<b>T15</b>	22,94 a	42,25 a	59,01 b	82,02 bc	96,47 e	1,00 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	3,67 c
<b>T16</b>	16,15 a	34,70 a	57,04 b	75,91 b	88,43 d	1,00 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	3,00 b
<b>T17</b>	23,54 a	35,89 a	63,92 b	84,41 c	96,93 e	1,33 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	4,00 c
<b>T18</b>	19,79 a	39,91 a	61,01 b	76,09 b	82,22 c	1,00 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	3,00 b
<b>T19</b>	21,44 a	40,81 a	54,41 b	72,07 b	83,05 c	1,33 a	2,00 ab	2,67 ab	3,00 b	3,00 b
<b>T20</b>	22,56 a	43,08 a	59,68 b	79,65 b	85,71 c	1,33 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	3,00 b
<b>T21</b>	16,77 a	43,35 ab	70,37 bc	89,01 c	99,02 e	1,00 a	2,00 ab	3,00 b	3,00 b	4,00 c
<b>T22</b>	27,53 ab	49,77 b	72,29 c	87,66 c	98,65 e	2,00 a	2,33 b	3,00 b	3,00 b	4,00 c

En este estudio se encontró que sólo seis de las veintidós cepas analizadas presentaron crecimiento sobre casi la totalidad del agente patógeno y presencia de esporulación (grado 4 en la escala). Estos resultados son similares a los obtenidos por Suárez *et al.* (2008) quienes encontraron que tan solo el 25% de las cepas utilizadas lograron micoparasitismo grado 4 frente a *Fusarium solani*. Por otra parte, Astorga *et al.*, (2014)

encontró un aislamiento de *Trichoderma* sp. con valor de 4 en la escala cuando fueron enfrentados contra *Penicillium* sp. y *Sclerotium cepivorum*, que lo califica como potencial biocontrolador. Asimismo, Hoyos *et al.* (2008) al evaluar *Trichoderma* sp. de diferentes especies frente a *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, obtuvieron un 100 % de micoparasitismo (totalidad de la superficie del patógeno cubierto por el antagonista) en la gran mayoría de las cepas evaluadas. De modo que el principal hallazgo de esta investigación fue que no todas las cepas de *Trichoderma* spp. tienen la misma eficiencia en el control del patógeno. Por lo tanto, se demostró que el trabajo de selección es necesario.

Durante las mediciones se pudo observar que la mayoría de las cepas evaluadas crecieron a través de la colonia del hongo patógeno en diferentes proporciones, evidenciado por los distintos valores de la escala (Tabla 1-5) y en algunos casos se observaron coloraciones marrones en la zona de contacto que posteriormente fueron aumentando a medida que avanzaba la colonización del medio por parte del antagonista (Fig. 1-4). Esta situación puede deberse a la interacción de las hifas de *Trichoderma* y hongo patógeno, en la cual muy posiblemente está involucrado el micoparasitismo; Trutmann y Keane (1990) encontraron que *T. koningii* presentó crecimiento extenso dentro de hifas de *S. sclerotiorum* sin producción de estructuras de infección especializadas, pero en etapas posteriores del parasitismo se produjo cambio de coloración y posteriormente esporulación sobre restos de hifas de *S. sclerotiorum* y por consiguiente valores de 4 según la escala de Ezziyyani *et al.* (2004).



**Figura 1-4.** Ejemplo de micoparasitismo en algunas cepas evaluadas

Las coloraciones marrones evidenciadas en las diferentes cajas con los distintos aislados corresponden a pigmentos melánicos, los cuales están asociados a menudo con condiciones de estrés, en este caso por la presencia del antagonista, con su consecuente acción antibiótica y micoparasítica (Durman, 2003). Estos pigmentos parecen proteger a

las células fúngicas de la lisis y de la degradación química y microbiológica (Bloomfield y Alexander 1967 citado por Durman, 2003). Vale la pena resaltar que estos resultados deberán ser confirmados con estudios microscópicos de la zona de interacción.

Al realizar una correlación entre las variables PICR y MICMO, no se observó significancia para las primeras dos observaciones (MICMO1 y MICMO 2), pero para las siguientes 3 (MICMO 3, 4 y 5) se presentó un bajo valor positivo y significativo, lo que hace evidente que no es necesario alcanzar altos valores de PICR para parasitar de forma eficiente el micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Tabla 1-6). En caso particular, se pudo observar que cepas como T3, T4, y T6 quienes presentaron valores de PICR menores a 10, lograron un valor de 90,73, 90,58 y 85,71 en el porcentaje de micoparasitismo (Tabla 1-5).

**Tabla 1-6.** Valores de la correlación de las variables porcentaje de inhibición de porcentaje radial (PICR), Porcentaje de micoparasitismo (MICMO) y su significancia.

	MICMO 1	p valor	MICMO 2	p valor	MICMO 3	p valor	MICMO 4	p valor	MICMO 5	p valor
<b>PICR</b>	0,23	0,062	0,14	0,26	0,36**	0,003	0,40**	0,0008	0,37**	0,002

Hoyos *et al.* (2008) observaron que la tasa de crecimiento del fitopatógeno no afectaba la actividad micoparasítica de las especies de *Trichoderma* sp., afirmación que coincide con los estudios de Cundom *et al.* (2002), quienes señalan que, en el micoparasitismo, la tasa de crecimiento no es obstáculo para discriminar el buen potencial antagónico de los antagonistas, ya que cepas con bajo crecimiento pueden parasitar de igual manera el micelio del hongo patógeno (como en el caso de las cepas (T3, T4, y T6) .

#### **4.5 Selección preliminar de cepas de *Trichoderma* spp.**

Se seleccionaron las 5 mejores cepas usando como criterio, primero, los valores más altos para las variables porcentaje de inhibición del crecimiento radial, seguido por índice de micoparasitismo, y por último las que presentaron un menor número de esclerocios producidos en la prueba de enfrentamiento, ya que para esta última variable 20 aislados presentaron el mismo comportamiento estadísticamente (Tabla 1-7). Los

aislados seleccionados fueron T7, T15, T17, T21 y T22, siendo las últimas cuatro cepas procedentes de suelos sin antecedentes de la enfermedad.

**Tabla 1-7.** Resumen de los valores promedio más altos en las variables Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), Número promedio de esclerocios en dual, Porcentaje de reducción en formación de esclerocios y Porcentaje de micoparasitismo en dual (MICMO)

Aislados	Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)	Número promedio de esclerocios en dual	Porcentaje de reducción en formación de esclerocios	Porcentaje de micoparasitismo en dual (MICMO)				
				Obs. 1	Obs. 2	Obs. 3	Obs. 4	Obs. 5
T7	38,09	0,67	96	30,47	37,56	59,37	76,67	95,45
T15	39,05	0,67	96	22,94	42,25	59,01	82,02	96,47
T17	45,65	0,67	96	23,54	35,89	63,92	84,41	96,93
T22	41,53	1,00	94	27,53	49,77	72,29	87,66	98,65
T21	45,25	1,67	90	16,77	43,35	70,37	89,01	99,02

Algunos autores indican que las pruebas *in vitro* no necesariamente representan el grado de antagonismo y de control en condiciones de campo, por lo que se hace necesario tener en cuenta la interacción con las plantas para determinar la efectividad de un buen aislado (Hoyos *et al.*, 2012) pero estos resultados pueden ser guía para identificar cepas potenciales en el control del patógeno y reducir el número de aislados en condiciones de campo (proceso de “screening”).

#### 4.6 Micoparasitismo sobre esclerocios

En esta prueba se pudo evidenciar que la mayoría de las cepas evaluadas lograron colonizar y esporular sobre los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* ( $p < 0,01$ ) (Figura 1-5) (Anexo 1-7). Del mismo modo se pudo observar que muchos de los esclerocios usados fueron parasitados; los mejores valores fueron para las cepas T15, T17 y T22 (estadísticamente iguales) ( $p < 0,01$ ) (Anexo 1-8), donde los esclerocios que presentaron

pérdida en su integridad equivalen al 43,33%, 33,33% y 36,67% respectivamente, comparados con los testigos quienes eran compactos y duros al tacto (0%) (Tabla 1-8)(Fig. 1-5).

**Tabla 1-8.** Valores promedio del micoparasitismo de esclerocios (esclerocios parasitados y colonizados). Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey.

Aislamiento	Valor promedio del porcentaje de esclerocios parasitados	Valor promedio del porcentaje de esclerocios colonizados
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0,00 a	0,00 a
T7	13,33 b	100,00 b
T15	43,33 c	100,00 b
T17	33,33 c	96,67 b
T21	23,33 b	100,00 b
T22	36,67 c	100,00 b

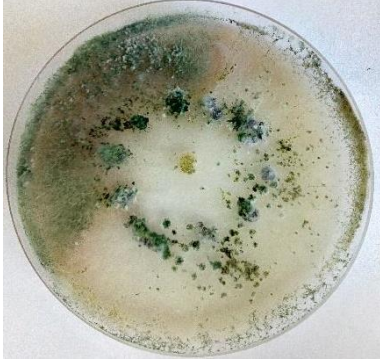
Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Mónaco *et al.*, (1998) donde las cepas de *Trichoderma* sp. evaluadas fueron capaces de esporular sobre los esclerocios *Sclerotinia sclerotiorum* y destruirlos en un 30%, 26% y 22% para *T. koningii*, *T. harzianum* y *Gliocladium roseum* respectivamente, a los 30 días después de iniciada la prueba. Vale la pena aclarar que dichos valores aumentaron y fueron superiores al 80% después de los 90 días, por lo que se puede esperar que las cepas analizadas en este ensayo puedan llegar a presentar valores similares si se alarga el periodo de evaluación.

A pesar de que todas las cepas de *Trichoderma* spp. fueron capaces de crecer y esporular sobre los esclerocios del patógeno, no todos los esclerocios evaluados estaban parasitados, lo cual se atribuye principalmente a que algunas especies de *Trichoderma* sp. son capaces de parasitar esclerocios, pero su efectividad depende de la cepa del antagonista, afirmación que coincide con los reporte de Hoyos *et al.* (2008) quienes asegura que diversas especies de *Trichoderma* han sido reportadas como antagonistas en hongos formadores de esclerocios y es claro que son atributos de aislados particulares, no de especies.

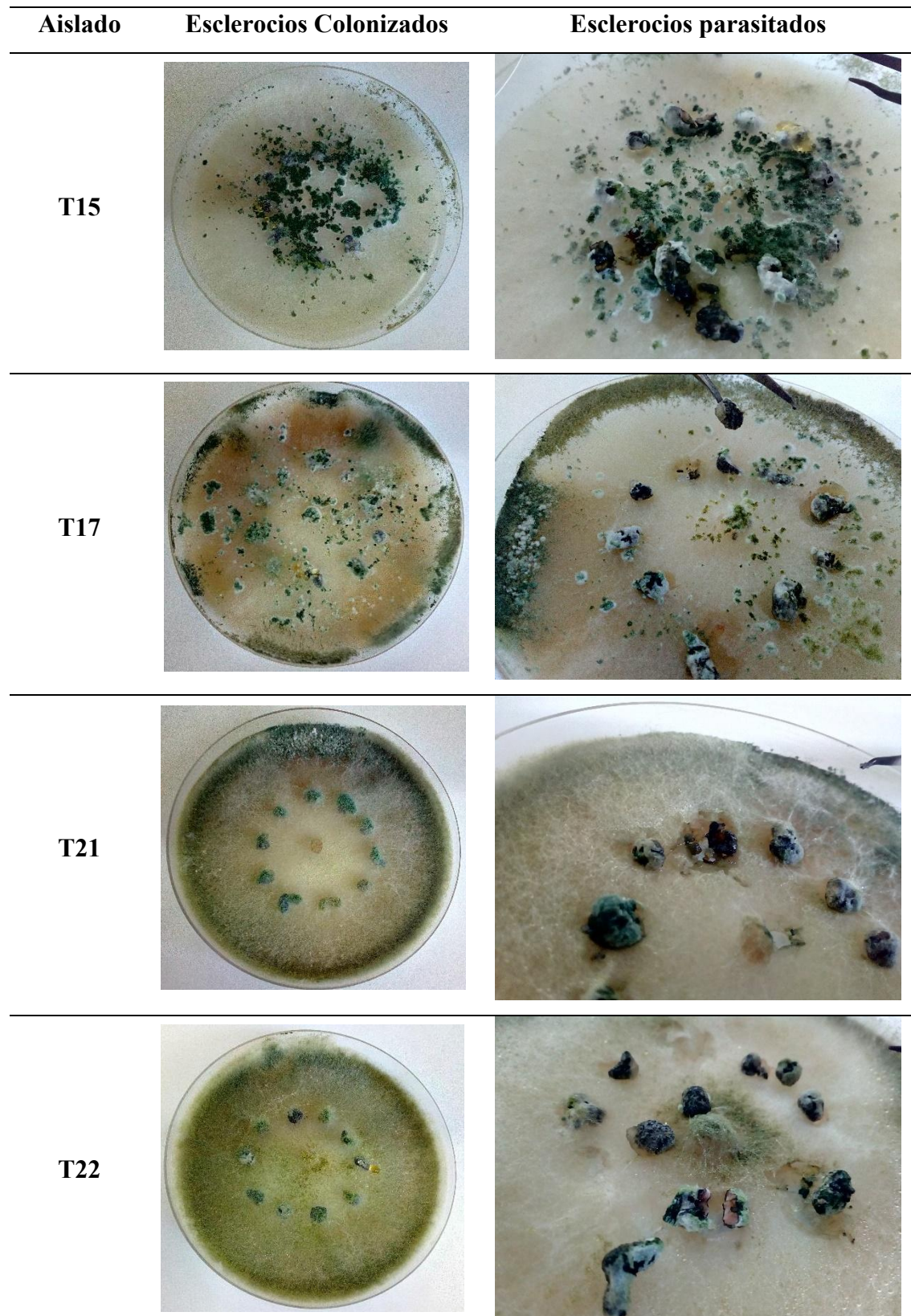
Los esclerocios que perdieron su consistencia se caracterizaron por ser blandos y acuosos con daños severo en su estructura (Fig. 1-5) observaciones similares a las reportadas por Ibarra *et al.* (2010) quienes evidenciaron que algunas estructuras de esclerocios fueron huecas, blandas o desintegradas por la actividad de las 10 cepas del hongo antagonista, asimismo, se observaron variaciones en el tamaño de los esclerocios.

La pérdida de integridad de los esclerocios se debe a la acción que tiene el hongo antagonista sobre las estructuras de resistencia del patógeno; Se ha demostrado que *Trichoderma* puede ser un micoparásito destructivo de *S. sclerotiorum*, posiblemente por la secreción de  $\beta$ -1,3 glucanasa, enzima que degrada las paredes celulares de la masa de micelio que conforma el esclerocio posibilitando la penetración de las hifas de *Trichoderma* y posterior destrucción (Arias *et al.*, 2007). De manera similar, Bolton *et al.* (2006) indican que la estructura interna de los esclerocios tiene una matriz de fibroides que consiste en carbohidratos, principalmente  $\beta$ -glucano y proteínas, por lo que la degradación de esclerocios por parte del antagonista puede deberse en parte a la liberación de glucanasas.

La importancia ecológica del micoparasitismo de esclerocios es que no solo se destruye la estructura, sino que también se puede prevenir significativamente la germinación de los esclerocios en condiciones de campo (Ibarra *et al.*, 2010). Del mismo modo, al tratarse de una enfermedad monocíclica la destrucción de las estructuras de resistencia reduce la fuente de inóculo primario para nuevas infecciones (Adams y Ayers, 1979).

Aislado	Esclerocios Colonizados	Esclerocios parasitados
T7		





**Figura 1-5.** Prueba de micoparasitismo de esclerocios y esclerocios parasitados por las 5 cepas seleccionadas y evaluadas.

#### ***4.7 Selección final de las cepas de Trichoderma spp.***

Los aislados seleccionados fueron las cepas T15 y T22 según los resultados de micoparasitismo de esclerocios, ya que sumado con los resultados en las variables evaluadas los convierten en cepas promisorias para el biocontrol de *S. sclerotiorum* en condiciones semicontroladas o de invernáculo.

Las cepas T15 y T22 se caracterizaron por un crecimiento rápido de micelio blanco algodonoso sobre medio de cultivo APG (4 días de siembra cubría el 90% de la caja de Petri) con hifas septadas e hialinas, que desarrollaron un color verde claro u oscuro (para T22 y T15 respectivamente) producto del proceso de esporulación o conidiación, el cual se produjo en pequeños manchones (para T15) y del centro de la colonia hacia la periferia o margen del medio de cultivo (para T22) con textura aterciopelada.

A nivel microscópico, las cepas se caracterizaron por presentar conidios globosos o subglobosos dispuestas sobre fíalides terminales, las cuales presentaron forma de botella (alargadas y ensanchadas hacia la base), formando el conidióforo piramidal. De acuerdo a las claves taxonómicas propuestas por Bisset (1991) se pudo determinar que los aislados seleccionados corresponden a la sección Pachibasium, además estas características coinciden con los rasgos propios de las especies agregadas de *Trichoderma harzianum*.

Estas especies agregadas se definen como agregaciones de especies morfológicamente muy similares y difícilmente separables (Bisset, 1991) por lo que la taxonomía basada en caracteres morfológicos no permite una identificación adecuada de las especies del género, ya que las dimensiones de los caracteres continuos se superponen en sus medias desviación estándar y, por lo tanto, no permiten la discriminación de especies (Chaverri *et al.*, 2015). Es por ello que la introducción de técnicas moleculares tiene una función decisiva en la identificación y clasificación de las especies de *Trichoderma* (Martínez *et al.*, 2013). Chaverri *et al.* (2015) sugiere que, en la mayoría de los casos, la única forma confiable de identificar una especie de este complejo es con secuencias TEF1, lo cual coincide con los reportes Martínez *et al.* (2013) de quienes indicaron en su estudio que la secuenciación del factor de elongación de diferentes aislados de *Trichoderma* facilitó la identificación de especies.

Por tal motivo esta investigación ofrece una identificación parcial de las cepas que presentaron potencial de biocontrol en este patosistema, pero en un futuro se tendrán que hacer más estudio a nivel de campo y laboratorio para evaluar su comportamiento frente a otros patógenos, y en caso de observar un buen comportamiento se procederá a aplicar dicha técnica molecular (TEF1) para su plena identificación.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

**Adams, P. y W. Ayers. 1979.** Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopathol. Vol. 69. No. 8: 896-898 pp.

**Adams, P. y Ayers, W. 1982.** Biological control of *Sclerotinia* lettuce drop in the field by *Sporidesmium sclerotivorum*. Phytopathology. Vol. 72: 485-488 pp.

**Aguilar, W., Arce, P. y Rivera, W. 2016.** Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica Tecnología en Marcha. Vol. Especial biocontrol. 51-55 pp.

**Agrios, G. 2005.** Fitopatología. Editorial Limusa-Noriega. México. 35 - 36, 53 - 54 y 384 - 386 pp.

**Amin, F., Razdan, V., Mohiddin, F., Bhat. K. y Banday. S. 2010.** Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. Journal of Phytology. Vol. 2. No. 10: 38–41 pp.

**Arias, L., Tautiva, L., Piedrahíta, W., y Chaves. B. 2007.** Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.)- Agron. Colomb. Vol. 25. No. 1: 3-11 pp.

**Astorga, K., Meneses, K., Zúñiga, C., Brenes, J., y Rivera, W. 2014.** Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha, Vol. 27. No. 2: 4p.

**Ávila, C.; J. Velandia y A. López. 1996.** Enfermedades de algunas especies hortícolas y su manejo. 93-116 pp. En: Memorias Primer Curso Nacional de Hortalizas de Clima Frío. ICA, Mosquera, Colombia.

**Ávila, C. y Velandia, J. 1992.** Enfermedades de Algunas Especies hortícolas y su Manejo. 101 – 103 pp en: Muñoz, H. y Silva, C. Eds. Primer Curso Nacional de Hortalizas de Clima Frío. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Tibaitatá. Mosquera (Cundinamarca).

**Bisset, J. 1991.** A revision of the genus *Trichoderma* II. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany Vol. 69: 2373–2417 pp.

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

**Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S., y Orozco, F. 2012.** Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. Agronomía Mesoamericana Vol. 23. No. 2: 225-231pp.

**Chaverri, P., Branco, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G. 2015.** Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia. Vol. 3. 558-590 pp.

**Cundom, M.A.; S.M. Mazza de Gaiad; M.A. Mazzati de Castañon; S.A. Gutiérrez de Arriola y M. Coutinho. 2002.** Actividad antagónica in vitro de Hongos saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Disponible [en línea]: <http://www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-037.pdf>; Consultado: Abril de 2015.

**Delhey, R, Kiehr, M, Allievi, MI, Lusto, J, Frayssinet, S, Sidoti Hartmann, B, Kröger, I, Paoloni, PJ, Zappacosta, D, y Servera, A. 2009.** *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas cultivadas e invasoras del sur pampeano y norte patagónico, Argentina. Phytion (Buenos Aires), Vol. 78. No. 2: 111-115 pp.

**Durman, S. 2003.** Grupos de compatibilidad miceliana (MCGs) en poblaciones Bonaerenses de *Sclerotinia Sclerotiorum*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Disponible [en línea]: [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3678\\_Durman](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3678_Durman). Comsultado: Diciembre 2018.

**Ekins, M., Aitken. E., Goulter. K. 2005.** Identification of sclerotinia species. Australian Plant Pathology. Vol. 34: 549-555 pp.

**Ezziyyani, M., S.C. Pérez, M.E. Requena, L. Rubio y M.E. Candela 2004.** Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología Vol 26: 69-78 pp.

**Fernández, R y Suarez, C. 2009.** Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín Vol. 62. No. 1: 4743-4748 pp.

**García, H., Núñez, S., Romero, C., González, E., Gabino, N. y Martínez, R. 2012.** Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp de suelos hortícolas del valle de toluca, como biocontrol potencial de *Sclerotinia*. Tropical and Subtropical Agroecosystems, Vol 15: 357 – 365pp.

**Guerrero, R., Mónaco, C., Stocco, M., Rolleri, J. y Guerrero, N. 2017.** Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Amazónica Ciencia y Tecnología Vol. 6 No. 1.

**Hermosa, R., Viterbo, A., Chet. I y Monte, E. 2012.** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology. Vol. 158: 17–25 pp.

**Howell, C.R. 2006.** Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathol. Vol. 96. No. 2: 178-180 pp.

**Hoyos, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I. y Orduz, S. 2008.** Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. Agronomía Colombiana Vol. 26. No. 3: 451-458pp.

**Hoyos, L, Galvis, F., Rodríguez, D. 2012.** Aislamientos nativos y foráneos de *Trichoderma* para el control de rizoctonias en papa criolla. Revista De Ciencias Agrícolas Vol. 29. No. 1: 5 – 15 pp.

**Ibarra, V. 2010.** Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Revista mexicana de micología, Vol. 31: 53-63pp.

**Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. 2009.** Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal, Vol. 24. No. 1: 14-21pp.

**Jones, E., Carpenter, M., Fong, D., Goldstein, A., Thrush, A., Crowhurst, R., y Stewart, A. 1999.** Co-transformation of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans* with hygromycin B resistance and  $\beta$ -glucuronidase markers. Mycol. Res. Vol. 103. No. 8: 929-937 pp.

**Koike, S.T. y R.M. Davis. 2009.** Lettuce. Lettuce drop. UC IPM Pest management guidelines: Lettuce. UC ANR Publication 3450. University of California, Agriculture and Natural Resources. Disponible [en línea]: [www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r441100711.html](http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r441100711.html); consultado: octubre de 2015.

**Laemmles, F. 2001.** Sclerotinia Diseases. Publication 8042. University of California, Cooperative Extension Farm Advisor. 1-5 pp.

**Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. 2013a.** *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 1: 1-11pp.

**Martínez, J., Hernández, G., Cruz, M., Rodríguez, K., Hernández, F., Sandoval, B., 2013b.** Inhibición in vitro de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa comercial T22. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. 15. No. 1: 126-136 pp.

**Matroudi, S., Zamani, M. y Motallebi, M. 2009.** Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. Egyptian Journal of Biology, 2009, Vol. 11: 37-44 pp.

**Menéndes, A. 1996.** Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno vegetal de suelo *Sclerotinia sclerotiorum*: Pruebas preliminares sobre el biocontrol de esta enfermedad. Tesis para optar por el título de doctor de la universidad de buenos aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 196 p.

**Mónaco, C.I., M.C. Rollán & A.I. Nico. 1998.** Efecto de micoparásitos sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*. Revista Iberoamericana de Micología Vol. 15: 81-84pp.

**Pérez, S., Piedrahita, W., y Arbeláez, G. 2009.** Patogénesis de la pudrición blanda de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Sabana de Bogotá causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Una revisión. Rev. Colomb. Cienc. Hortic. Vol. 3. No.2: 262-274 pp.

**Pineda, J., Benavides, E., Duarte, A., Burgos, C., Soto, C., Pineda, C., Fierro, F., Mora, E., y Álvarez- 2017.** Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Vol. 51. No. 1. 47-52 pp.

**Rollan, M., Mónaco, C., y Nico, A. 1999.** Efecto de la temperatura sobre la interacción in vitro entre especies de *Trichoderma* Y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfsi*. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 14: 1-2 pp.

**Saba Banday, Dar, G.H., Ghani, M.Y., Sagar, V. y Nasreen, F. 2008.** In vitro interaction of bioagents against *Dematophora necatrix* and *Pythium ultimum* causing apple root rot in Jammu and Kashmir SKUAST Journal Vol. 10: 341-350pp.

**Smith, D. 2004.** Biology and Epidemiology of *Sclerotinia minor* on Peanut (*Arachis hypogaea* L.). M.Sc. Plant Pathology Thesis. North Carolina State University. Graduate Faculty. Raleigh, USA. 71 p.

**Stocco, M. C. 2014.** Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular Tesis doctoral para obtener el título de Doctor en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Plata. 181p



**Suárez, C., Fernández, R., Osvaldo, R., Valero, R., Gámez, M., y Páez, A. 2008.** Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. 10. No. 2: 35-43 pp.

**Subbarao, K. 1998.** Progress Toward Integrated Management of Lettuce Drop. Plant Disease Vol. 82: 1068 – 1078 pp.

**Szszesny, A., Carmona, D., y Melegari, A. 2013.** Protocolo preliminar para la producción de lechuga en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. Instituto Nacional de tecnología agropecuaria (INTA) centro regional Buenos Aires sur. 88p.

**Trutmann, I y Keane, P. 1990.** *Trichoderma koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia. Soil Biology and Biochemistry Vol. 22. No. 1: 43-50 pp.

**Valiente, M. y Pavone, D. 2013.** Identificación de cepas del hongo *Trichoderma* spp. por métodos moleculares. FARAUTE. Vol. 8. No. 2. 1-9 pp.

**Viglianchino, L. y Huarte, D. 2014.** Ficha técnica para el cultivo de lechuga: Insecticidas/nematicidas/acaricidas, herbicidas, fungicidas, aprobados para su uso. Instituto Nacional de tecnología agropecuaria (INTA) centro regional Buenos Aires sur. Disponible [en línea]: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_lechuga\\_3.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_lechuga_3.pdf). Consultado: Diciembre del 2018.

**Willetts, H. y Wong, J. 1980.** The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliarum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. The Botanical Review. Vol. 46. 101-165 pp.

**Živković, S., Veljko, G., Gasic, K., Ristić, D., Dimkić, I., Stanković, S., y Fira, D. 2016.** Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus* sp. against the lettuce pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. AGRENG0. 7 p.

## 6. ANEXOS

**6.1 Anexo 1-1.** Composición del medio selectivo para *Trichoderma* (TSM) para un litro de preparación:

Reactivo	Cantidad
Nitrato de Amonio ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ )	1,00 g
Fosfato ácido de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,90 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,20 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,15 g
Cloranfenicol	0,25 g
Rosa de bengala	0,15 g
Glucosa	3,00 g
Agar	20,00 g
Agua destilada estéril	1,00 L

**6.2 Anexo 1-2.** Anova para la variable de porcentaje de inhibición de porcentaje radial (PICR)

Effect	Univariate Tests of Significance for PICR (Datos PICR.sta Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	33021,58	1	33021,58	2309,941	0,00
Cepa	10227,81	21	487,04	34,070	0,00
Error	629,00	44	14,30		

**6.3 Anexo 1-3.** Test de Tukey para la variable de porcentaje de inhibición de porcentaje radial (PICR)

Tukey HSD test; variable PICR (Datos PICR.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 14,295, df = 44,000									
Cell No.	PICR Mean	1	2	3	4	5	6	7	8
6	4,08249	****							
4	5,39734	****	****						
3	7,31817	****	****	****					
20	7,55207	****	****	****					
11	13,04585	****	****	****	****				
9	14,37749	****	****	****	****				
19	14,76094	****	****	****	****				
10	16,33190		****	****	****	****			
1	16,42930		****	****	****	****			
8	19,01207			****	****	****	****		
13	19,49070				****	****	****		
16	20,36004				****	****	****		
2	21,50677				****	****	****		
14	21,78583				****	****	****		
5	24,24168				****	****	****		
18	27,74481					****	****	****	
12	29,08417						****	****	
7	38,08962							****	****
15	39,05416							****	****
22	41,53451								****
21	45,24967								****
17	45,64618								****

**6.4 Anexo 1-4.** Anova para la variable producción de esclerocios en cultivo dual.

Univariate Results for Each DV (Datos Esclerocios.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	Esclerocio SS	Esclerocio MS	Esclerocio F	Esclerocio p
Intercept	660,056	660,0556	633,6533	0,00
Cepa	1291,944	56,1715	53,9246	0,00
Error	50,000	1,0417		
Total	1341,944			

**6.5 Anexo 1-5.** Test de Tukey para la variable producción de esclerocios en cultivo dual.

Tukey HSD test; variable Esclerocio (Datos Esclerocios.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 1,0417, df = 48,000					
Cell No.	Cepa	Esclerocio Mean	1	2	3
8	T13	0,33333	****		
2	T7	0,66667	****		
5	T10	0,66667	****		
6	T11	0,66667	****		
11	T17	0,66667	****		
4	T9	0,66667	****		
3	T8	0,66667	****		
12	T22	1,00000	****		
17	T16	1,33333	****		
9	T14	1,33333	****		
7	T12	1,33333	****		
13	T18	1,33333	****		
14	T19	1,33333	****		
16	T21	1,66667	****		
15	T20	2,00000	****		
10	T15	2,00000	****		
19	T2	2,66667	****	****	
20	T3	2,66667	****	****	
21	T4	3,00000	****	****	
22	T5	3,00000	****	****	
18	T1	5,33333		****	
1	T6	5,66667		****	
24	TESTIGO 2	15,66667			****
23	TESTIGO 1	17,00000			****

**6.6 Anexo 1-6.** Anova y pruebas Tukey para la variable índice de micoparasitismo (MICMO)

Univariate Results for Each DV (Datos MICMO.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	Obs1 SS	Obs1 MS	Obs1 F	Obs1 p
Intercept	1	28320,00	28320,00	1242,916	0,000000
Cepa	21	1121,11	53,39	2,343	0,008654
Error	44	1002,55	22,79		
Total	65	2123,65			

Tukey HSD test; variable Obs1 (Datos MICMO) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 22,785, df = 44,000				
Cell No.	Cepa	Obs1 Mean	1	2
2	T2	14,96698	****	
1	T1	15,18438	****	
11	T11	16,11390	****	
16	T16	16,14932	****	
10	T10	16,48359	****	
21	T21	16,77395	****	
6	T6	16,80489	****	
13	T13	17,19730	****	
4	T4	19,47089	****	
18	T18	19,78693	****	
12	T12	21,41928	****	
19	T19	21,43982	****	
5	T5	21,57182	****	
20	T20	22,55988	****	
9	T9	22,64670	****	
15	T15	22,94443	****	
14	T14	23,05922	****	
17	T17	23,53792	****	
8	T8	23,76292	****	
3	T3	25,84052	****	
22	T22	27,53497	****	****
7	T7	30,46961		****

Univariate Results for Each DV (Datos MICMO.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	Obs2 SS	Obs2 MS	Obs2 F	Obs2 p
Intercept	97205,24	97205,24	2807,184	0,000000
Cepa	3072,86	146,33	4,226	0,000028
Error	1523,60	34,63		
Total	4596,46			

Tukey HSD test; variable Obs2 (Datos MICMO) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 34,627, df = 44,000				
Cell No.	Cepa	Obs2 Mean	1	2
1	T1	26,80361	****	
6	T6	27,82101	****	
2	T2	28,74506	****	
11	T11	30,64096	****	
13	T13	32,04443	****	
10	T10	32,36103	****	
16	T16	34,70099	****	
17	T17	35,88787	****	
7	T7	37,56279	****	
4	T4	37,56419	****	
8	T8	39,55760	****	
12	T12	39,58455	****	
18	T18	39,91343	****	
19	T19	40,80770	****	
9	T9	41,56307	****	
15	T15	42,25219	****	
14	T14	42,25357	****	
5	T5	42,90801	****	
20	T20	43,08269	****	
21	T21	43,34977	****	****
22	T22	49,76838		****
3	T3	55,12470		****

Univariate Results for Each DV (Datos MICMO.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	Obs3 SS	Obs3 MS	Obs3 F	Obs3 p
Intercept	207798,3	207798,3	5447,143	0,000000
Cepa	7562,1	360,1	9,439	0,000000
Error	1678,5	38,1		
Total	9240,6			

Tukey HSD test; variable Obs3 (Datos MICMO) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 38,148, df = 44,000					
Cell No.	Cepa	Obs3 Mean	1	2	3
1	T1	30,10522	****		
6	T6	38,61954	****		
2	T2	39,36970	****		
11	T11	45,21585	****		
13	T13	49,25960	****		
10	T10	52,80395		****	
4	T4	53,07685		****	
19	T19	54,41338		****	
12	T12	55,69181		****	
8	T8	56,60198		****	
16	T16	57,04380		****	
9	T9	57,58447		****	
15	T15	59,01325		****	
7	T7	59,37277		****	
20	T20	59,67626		****	
5	T5	60,89794		****	
18	T18	61,00774		****	
14	T14	61,10937		****	
17	T17	63,92428		****	
21	T21	70,37013		****	****
22	T22	72,28607			****
3	T3	77,00090			****

Univariate Results for Each DV (Datos MICMO.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	Obs4 SS	Obs4 MS	Obs4 F	Obs4 p
Intercept	351577,9	351577,9	19671,15	0,00
Cepa	12592,7	599,7	33,55	0,00
Error	786,4	17,9		
Total	13379,1			

Tukey HSD test; variable Obs4 (Datos MICMO) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 17,873, df = 44,000					
Cell No.	Cepa	Obs4 Mean	1	2	3
1	T1	35,67229	****		
6	T6	41,40346	****		
2	T2	45,26018	****		
11	T11	70,45205		****	
13	T13	71,35173		****	
4	T4	71,35768		****	
19	T19	72,07401		****	
5	T5	72,92500		****	
16	T16	75,90691		****	
18	T18	76,09458		****	
10	T10	76,57935		****	
7	T7	76,67333		****	
8	T8	76,70919		****	
14	T14	77,53065		****	
12	T12	78,36904		****	
9	T9	79,40812		****	
20	T20	79,65408		****	
15	T15	82,02090		****	****
17	T17	84,41305			****
3	T3	85,16726			****
22	T22	87,65610			****
21	T21	89,01032			****

Univariate Results for Each DV (Datos MICMO.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	Obs5 SS	Obs5 MS	Obs5 F	Obs5 p
Intercept	472469,C	472469,C	146514,C	0,00
Cepa	16105,5	766,9	237,8	0,00
Error	141,9	3,2		
Total	16247,4			



Tukey HSD test; variable Obs5 (Datos MICMO) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 3,2247, df = 44,000							
Cell No.	Cepa	Obs5 Mean	1	2	3	4	5
1	T1	42,89898	****				
6	T6	48,51870		****			
2	T2	50,16275		****			
18	T18	82,21684			****		
5	T5	82,54781			****		
19	T19	83,04878			****		
20	T20	85,70721			****		
16	T16	88,43015				****	
9	T9	88,51884				****	
11	T11	89,00969				****	
10	T10	89,07466				****	
14	T14	89,45628				****	
13	T13	90,00121				****	
12	T12	90,04935				****	
4	T4	90,57709				****	
3	T3	90,72771				****	
8	T8	93,91750				****	****
7	T7	95,44636					****
15	T15	96,46934					****
17	T17	96,93452					****
22	T22	98,65213					****
21	T21	99,02411					****

**6.7 Anexo 1-7.** Anova para la variable micoparasitismo de esclerocios (Parasitados y con esporulación)

Effect	Univariate Results for Each DV (Spreadsheet30) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition							
	Parasitado SS	Parasitado MS	Parasitado F	Parasitado p	Esporulado SS	Esporulado MS	Esporulado F	Esporulado p
Intercept	11250,00	11250,00	405,0000	0,000000	123338,9	123338,9	22201,00	0,000000
Cepa	3916,67	783,33	28,2000	0,000003	24694,4	4938,9	889,00	0,000000
Error	333,33	27,78			66,7	5,6		
Total	4250,00				24761,1			

**6.8 Anexo 1-8.** Test de Tukey para la variable micoparasitismo de esclerocios (Parasitados y con esporulación).

Tukey HSD test; variable Esporulado (Spreadsheet30) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 5,5556, df = 12,000				
Cell No.	Cepa	Esporulado Mean	1	2
6	Sclerotinia	0,0000		****
3	T17	96,6667	****	
4	T21	100,0000	****	
5	T22	100,0000	****	
2	T15	100,0000	****	
1	T7	100,0000	****	

Tukey HSD test; variable Parasitado (Spreadsheet30) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 27,778, df = 12,000					
Cell No.	Cepa	Parasitado Mean	1	2	3
6	Sclerotinia	0,00000			****
1	T7	13,33333	****		
4	T21	23,33333	****		
3	T17	33,33333		****	
5	T22	36,66667		****	
2	T15	43,33333		****	

## **CAPÍTULO 2**

**Efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de lechuga  
(*Lactuca sativa* L.) Var. Gallega de invierno.**

## 1. INTRODUCCIÓN

Los reguladores de crecimiento se definen como compuestos orgánicos naturales que, en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican el crecimiento de los vegetales ejerciendo una profunda influencia en los procesos fisiológicos y metabólicos en las plantas que van desde el crecimiento y desarrollo, hasta su respuesta frente al estrés biótico y abiótico (Chávez *et al.*, 2012). Se ha comprobado que una compleja red de señales hormonales controla la respuesta de la planta al estrés (Bartsch y Bednarek, 2010), donde reguladores de crecimiento como el ácido abscísico (ABA), el etileno (ET), el ácido jasmónico (AJ) y el ácido salicílico (AS) desarrollan un papel fundamental (Raskin, 1992).

El ácido salicílico forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (Loake y Grant, 2007). Numerosos estudios han encontrado que AS participa en procesos como cierre de estomas, respiración, crecimiento celular, la germinación de semillas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico y biótico, regulador del gravitropismo, y en la inhibición de la maduración de los frutos, entre otros procesos (Vlot *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha descrito, que, en algunos casos, el efecto del AS dentro del metabolismo de las plantas puede ser indirecto ya que altera la síntesis y/o señalización de otras hormonas que incluyen la vía del ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), y auxinas (Balbi y Devoto 2008 citado por Rangel, 2010). Algunos estudios con aplicaciones exógenas de ácido salicílico han demostrado que bajas concentraciones de AS en plantas de importancia hortícola como tomate, pepino, zanahorias y frutales, tienen un efecto positivo en el incremento de su productividad (Larqué y Martín, 2007). Ramírez *et al.*, (2006) al aplicar ácido salicílico a una concentración de  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  en coliflor, brócoli, repollo y acelga, encontraron diferencias significativas para las variables altura y longitud de raíz a favor de las plantas tratadas. Hayat *et al.* (2005) mostraron que el número de hojas, masa fresca y seca por planta de plántulas de trigo cultivadas a partir de los granos empapados en concentraciones bajas ( $10^{-5} \text{M}$ ) de AS, aumentan significativamente respecto del tratamiento control, generando respuestas de promoción

de crecimiento similares en plántulas de cebada rociadas con AS (Pancheva *et al.*, 1996).

En lechuga (*Lactuca sativa* L.) se han realizado diferentes experimentos en distintas condiciones de crecimiento que han demostrado resultados a favor de la aplicación. Sayyari *et al.*, (2013) publicaron que plantas lechuga asperjadas con concentraciones de 0,75 y 1,5 mM de AS y sometidas a estrés hídrico, mostraron un aumento de la tasa de crecimiento y cambios en los parámetros fisiológicos para mitigar los efectos adversos causados por el estrés de sequía, asociado con el aumento de los pigmentos fotosintéticos y el contenido de prolina. Mientras que Gu *et al.*, (2016) encontraron que, el AS mejoró significativamente la tasa de germinación, el potencial de germinación y el índice de vigor de la semilla de lechuga incubadas bajo condiciones de estrés de alta temperatura (35 °C/ 30°C, día / noche) cuando se aplicó AS en concentración de 0,2 mmol. L<sup>-1</sup>.

Estos resultados demuestran los beneficios que tiene este compuesto en los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas, así como su participación en condiciones de estrés (biótico y abiótico), del mismo modo, muestra que dichas respuestas varían según el material vegetal y la dosis o concentración utilizada.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del ácido salicílico sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) Var. Gallega de invierno bajo condiciones de invernadero.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.1.1 Evaluar el efecto de diferentes dosis y formas de aplicación de ácido salicílico sobre el peso fresco y peso seco de las hojas de plantas de lechuga.
- 2.1.2 Evaluar el efecto de diferentes dosis y formas de aplicación de ácido salicílico sobre el número de hojas totales, hojas a cosecha, hojas expandidas y hojas sin expandir.
- 2.1.3 Evaluar el efecto de diferentes dosis y formas de aplicación de ácido salicílico sobre el contenido de clorofilas en las plantas sometidas a los tratamientos.

- 2.1.4 Seleccionar la forma de aplicación y las dos dosis de ácido salicílico que presenten los mayores valores en el peso fresco y seco de las hojas, contenido de clorofilas, así como en el número de hojas totales, hojas a cosecha, hojas expandidas y hojas sin expandir.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizaron dos ensayos independientes y consecutivos. El primero permitió determinar la mejor forma de aplicación de ácido salicílico (*FASE I*), mientras que en el segundo tuvo como objetivo encontrar las mejores dosis (*FASE II*). Ambos ensayos se realizaron en las mismas condiciones en términos de *Localización, Material vegetal y manejo agronómico* y se evaluaron las mismas variables peso fresco y seco de hojas, número de hojas totales (HTotal), hojas a cosecha (HTCosecha), hojas expandidas (HTipoI) y hojas sin expandir o potenciales (HTipoII) y contenido de clorofilas (SPAD).

#### ***3.1 Localización***

Los ensayos se llevaron a cabo en los invernaderos del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) de la facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

#### ***3.2 Material vegetal y manejo del ensayo***

Para ambas FASES (I y II) se usaron semillas de lechuga sin tratar (sin aplicaciones de insecticidas y/o fungicidas) de la variedad “Gallega de invierno”, las cuales fueron pregerminadas en cajas de Petri, con papel de filtro humedecido y mantenidas en condiciones de oscuridad y temperatura de 20°C durante 36 horas (Fig. 2-1A). Posterior a la emergencia de la radícula fueron trasplantadas en bandejas de germinación de 162 alveolos usando como sustrato turba Hi-Soil® (Fig. 2-1B). Cuando las plantas presentaron 4 hojas verdaderas, fueron trasplantadas en macetas de 864 cm<sup>3</sup> con el mismo sustrato (Fig. 2-1C), una planta por maceta. Se aplicó riego con agua corriente cada tres días (100 ml por maceta) y aplicación de fertirriego una vez por semana (100 ml por maceta de solución fertilizante la cual fue preparada disolviendo 2,5 gramos de

Basfoliar 25-10-17® SP en un litro de agua) (Fig. 2-1D). Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento que corresponde al mismo número de plantas y macetas.



**Figura 2-6.** Proceso de establecimiento de los ensayos. A) Pre germinación en caja de Petri. B) Siembra en bandejas de germinación. C) Trasplante de plántulas en macetas. D) Distribución en el ensayo.

### ***3.3 Tratamientos y criterios de selección para las FASE I y II***

#### **3.3.1 FASE I: Selección de la forma de aplicación de ácido salicílico**

El ensayo se planteó teniendo en cuenta el estudio de Hadi *et al.* (2014) en donde se evaluaron diferentes métodos de aplicación de ácido salicílico y diferentes dosis. Se prepararon soluciones de AS en concentraciones creciente de AS (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) a partir de una solución madre, posteriormente se añadió tween-20 como tensioactivo.

Dichas soluciones fueron aplicadas de forma i) foliar y ii) al sustrato una semana antes del trasplante, cuando las plantas presentaban 4 hojas verdaderas. La aplicación foliar se realizó asperjando las hojas con ayuda de un atomizador manual hasta punto de goteo

(Imami *et al.*, 2011). La aplicación por riego al sustrato se realizó vertiendo 2 ml de las soluciones en la base de las plantas sobre el sustrato de la bandeja de germinación (Sánchez *et al.*, 2010). Como testigo se realizaron las mismas aplicaciones (foliar y al sustrato) usando agua corriente.

La combinación de dosis y formas de aplicación dieron como resultado 8 tratamientos (Tabla 2-1):

**Tabla 2-9.** Tratamientos producto de la combinación de dosis y formas de aplicación para la FASE I

<b>Tratamientos</b>	<b>Dosis de AS (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Forma de aplicación</b>
<b>T1</b>	50	Foliar
<b>T2</b>	50	Al sustrato
<b>T3</b>	100	Foliar
<b>T4</b>	100	Al sustrato
<b>T5</b>	200	Foliar
<b>T6</b>	200	Al sustrato
<b>T7</b>	0	Foliar
<b>T8</b>	0	Al sustrato

### 3.3.2 FASE II: Selección de las dosis de ácido salicílico (AS)

Para determinar el efecto de la dosis de aplicación a plantas de lechuga se evaluó la aplicación foliar de soluciones de 0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  de AS. Se establecieron 6 tratamientos de acuerdo a las dosis evaluadas y testigo (Tabla 2-2).

**Tabla 2-10.** Tratamientos para la FASE II

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de AS (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>T1</b>	10
<b>T2</b>	50
<b>T3</b>	100
<b>T4</b>	200



<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de AS (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>T5</b>	500
<b>T6</b>	0

### ***3.4 Variables evaluadas para las FASES I y II***

#### **3.4.1 Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento)**

Se tomaron los pesos frescos y secos de hojas de 10 plantas de lechuga por tratamiento usando balanza digital de 0,01 g de precisión. Las plantas fueron muestreadas cuando más del 50% de ellas se encontraban en el punto de cosecha (80 días después de siembra; 45 días después de trasplante). Para el peso seco, las muestras fueron sometidas a estufa de aire forzado durante 48 horas con temperatura de 70 °C o hasta que el peso de las mismas fuera constante.

#### **3.4.2 Número de hojas**

Se cuantificó el número total de hojas emitidas por las plantas durante todo el ensayo (HTotal). En el momento de la cosecha se realizó el registro de ii) el número de hojas que presentaban largo y ancho superior a la hoja anterior (expandida más vieja) (HTipoII) (las hojas expandidas son las que ya tienen su máxima área foliar), iii) las hojas que mostraban un menor tamaño a la última evaluada en expansión (HTipoI), y que fueran visibles en dirección al meristemo apical, las cuales pueden, en óptimas condiciones, llegar a expandir y aumentar el rendimiento, ya que en los procesos de producción de hojas y su expansión influyen los factores ambientales (condiciones óptimas o estrés biótico y abiótico) y hormonales. Del mismo modo se llevó un registro de vi) las hojas presentes en el momento de la cosecha ( $\text{HTCosecha} = \text{HTipoI} + \text{HTipoII}$ ).

#### **3.4.3 Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD)**

Para esta variable se usó el medidor de clorofila Minolta® SPAD 502, el cual mide la concentración relativa de clorofila por medio de la luz transmitida a través de la hoja en 650 nm y 940 nm (longitud de onda fotosintéticamente activa) (Sainz y Echeverría, 1998). Las lecturas fueron tomadas en todas las plantas, específicamente en el tercio

medio y sobre la lámina foliar de la hoja número 4 para la FASE I y las hojas 4, 5, 6 y 8 para FASE II. Las observaciones se realizaron una vez por semana después de iniciados los tratamientos hasta la cosecha (4 y 8 evaluaciones para las FASES I y II respectivamente).

#### 3.4.4 Análisis estadístico

En la FASE I, las variables evaluadas fueron analizadas bajo un diseño experimental tipo factorial 4x2 (4 dosis; 2 formas de aplicación) para un total de 8 tratamientos con diez plantas (replicas) por cada tratamiento. Para la FASE II, el diseño experimental fue completamente al azar (DCA) con diez réplicas por tratamiento. Para ambas fases, se tomó como unidad experimental cada una de las plantas y a los datos obtenidos se les realizaron análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias Tukey con el programa estadístico STATISTICA versión 8 (StatSoft Inc.).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 FASE I: Selección de la forma de aplicación**

#### ***4.1.1 Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento)***

No se evidenciaron diferencias significativas en la Dosis, pero si en la Forma e interacción Dosis\*Forma para ambas variables (PF y PS) (Anexo 2-1 y 2-2). El tratamiento T4 consistente en aplicación foliar de 200  $\mu$ M logró un mayor peso fresco (55,28g) y mayor peso seco (7,57g) diferenciándose estadísticamente del resto de los tratamientos excepto del tratamiento T3 consistente en la aplicación foliar de 100  $\mu$ M de ácido salicílico con valores de 50,41g para peso fresco y 7,25 para peso seco (Tabla 2-3).

**Tabla 2-11.** Datos de peso fresco y seco obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey

Tratamiento	Forma	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)	
T1	Foliar	0	50,12	b	6,79	b
T2	Foliar	50	49,59	b	6,17	b
T3	Foliar	100	50,41	ab	7,25	ab
T4	Foliar	200	55,28	a	7,57	a
T5	Suelo	0	50,12	b	6,79	b
T6	Suelo	50	49,64	b	6,44	b
T7	Suelo	100	44,15	b	5,91	b
T8	Suelo	200	43,42	b	5,82	b

**Tabla 2-12.** Valor y prueba Tukey para el componente forma de aplicación sobre el peso fresco y seco. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Forma de aplicación	Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)	
Foliar	51,35	a	6,95	a
Suelo	46,83	b	6,24	b

El componente forma de aplicación mostró diferencias significativas para las variables de peso fresco y seco (Anexo 2-3), a favor de la aplicación al follaje con valores de 51,35 y 6,95 g para PF y PS respectivamente, la cual fue superior a la aplicación dirigida al suelo quien alcanzó valores de 46,83 y 6,24 g para PF y PS respectivamente (Tabla 2-4). Por lo tanto, las plantas tratadas con aplicaciones foliares de AS lograron mayores valores tanto de peso fresco como de peso seco que las tratadas con aplicaciones al suelo.

Imami *et al.*, (2011) trabajaron con dos variedades de *Cicer arietinum*, y encontraron que los métodos de aplicación de AS (aspersión de 25ml de AS a nivel foliar y suelo en dosis de 0, 500 y 1000 mMol) presentan diferencias significativas para la variable peso

seco a favor de la aplicación al suelo ( $0,58 \text{ g.planta}^{-1}$ ) respecto a la aplicación aérea ( $0,38 \text{ g.planta}^{-1}$ ) en una de las variedades (ILC482) mientras que en la variedad JAM los resultados fueron iguales estadísticamente al tratamiento testigo. En el estudio desarrollado por Lian *et al.* (2000) encontraron que plántulas de soja que fueron tratadas con AS a nivel foliar y al suelo, presentaron efectos negativos en el crecimiento en la dosis más alta (5mM) cuando fue aplicada al suelo, mientras que a dosis menores (1; 0,5; 0,1; y 0 mM) junto con las aplicaciones foliares en las mismas dosis no presentaron dicho efecto.

Los estudios citados muestran que el desarrollo de respuesta positivas en función a la forma de aplicación varía de una especie a otra (Arfan *et al.*, 2007) aunque en el estudio de Imami *et al.*, (2011) dichas diferencias se encontraron dentro de la misma especie. Este comportamiento se puede deber a la presencia/ausencia o cantidad de receptores específicos de AS dentro de la planta (hojas y/o raíces) que pueden magnificar los efectos en cascada que desembocan en cambios morfológicos (Larqué *et al.*, 2010). Del mismo modo, Klessig *et al.*, (2016) indican que los receptores de AS no solo difieren entre las distintas especies de plantas, sino que también pueden variar dentro de una planta individual según el tipo de tejido, el compartimento subcelular y la etapa de desarrollo.

Teniendo en cuenta esto, los resultados de esta investigación se deben posiblemente a que los receptores en la membrana del tejido foliar, presenten una mayor afinidad a AS a diferencia del tejido radical lo cual puede favorecer la respuesta fisiológica. En lo que respecta a la dosis se puede decir que la concentración de 100 y 200 de AS aplicadas al follaje es la cantidad umbral que logra penetrar el tejido y desencadena cambios positivos en las variables rendimiento. Vale la pena aclarar que hacen falta más estudios sobre los diferentes receptores de AS en los diferentes tejidos y cantidades de AS capaz de penetrar y favorecer las respuestas positivas en términos de rendimiento.

Diversos autores muestran las bondades de ácido salicílico sobre el crecimiento de las plantas debido a su participación en la regulación de numerosos procesos fisiológicos (El-Khalla *et al.*, 2009). Hadi *et al.* (2014) afirman que el AS aumenta el estado funcional de la maquinaria fotosintética en las plantas; Khodary (2004) indican que AS

tiene efectos estimulantes sobre la capacidad fotosintética en las plantas de maíz a través de la inducción de la actividad de Rubisco. Del mismo modo, Fariduddin *et al.*, (2003) indican que la aplicación exógena de AS mejora la tasa fotosintética neta, la concentración interna de CO<sub>2</sub>, la eficiencia del uso del agua, la conductancia estomática y la tasa de transpiración en *Brassica juncea*, resultados similares a los reportados por Kumar *et al.*, (2000) quienes trabajaron con plantas de soja. Del mismo modo, autores como Aghaeifard *et al.*, (2015) y Javaheri *et al.*, (2012) citados Javanmardi y Akbari (2016) por quienes trabajaron con fresa y tomate, respectivamente, reportan que el aumento en el rendimiento se relaciona con la división celular promovida por AS, a través de su influencia o interacción con otras hormonas vegetales como citoquininas, auxinas y regulación en la producción de ABA. Estos resultados demuestran el rol de AS en diversos procesos fisiológicos en las plantas, pero es necesario realizar mayores estudios para determinar con exactitud el proceso favorecido en las plantas de lechuga.

#### **4.1.2 Número de hojas**

No se evidenciaron diferencias significativas en la variable número de hojas sin expandir (HTipoI) ni en ninguno de sus componentes (Dosis, Forma e interacción (Dosis\*Forma)) (p-value=0,94, p-value=0,28 y p-value=0,70 respectivamente) (Anexos 2-4). Hubo diferencias significativas para la variable número de hojas tipo II (hojas expandidas) en la Forma (p-value=0,045), pero no en la Dosis e interacción (Dosis\*Forma) (p-value=0,56 y p-value=0,07 respectivamente) (Anexos 2-5). Para el número total de hojas (Htotal) no se presentaron diferencias significativas en la forma e interacción (Dosis\*Forma) (Anexo 2-5) donde todos los tratamientos fueron iguales estadísticamente con valores entre 29,37 y 30,25 (Tabla 2-5). Para el caso del número de hojas presentes a cosecha (tanto las hojas expandidas y sin expandir; HTCosecha) se evidenció diferencias significativas en el componente de Forma (p-value=0,02) e interacción (Dosis\*Forma) ((p-value=0,048) pero no términos de Dosis (p-value=0,52) (Anexo 2-6) (Tabla 2-5).

**Tabla 2-13.** Datos de número total de hojas y hojas tipo I y II obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamiento	Forma	Dosis de AS		HTotal	HTCosecha	HTipo I	HTipo II				
		( $\mu\text{M}$ )									
T1	Foliar	0		29,37	a	22,73	b	11,36	a	11,37	B
T2	Foliar	50		29,87	a	22,25	b	11,25	a	11,00	B
T3	Foliar	100		29,87	a	23,23	ab	11,36	a	11,87	ab
T4	Foliar	200		30,37	a	24,12	a	11,50	a	12,62	A
T5	Suelo	0		29,37	a	22,73	b	11,36	a	11,37	B
T6	Suelo	50		30,12	a	22,25	b	11,25	a	11,00	B
T7	Suelo	100		29,25	a	22,00	b	11,13	a	10,87	B
T8	Suelo	200		30,25	a	21,37	b	11,00	a	10,37	B

**Tabla 2-14.** Valor y prueba Tukey para el componente forma de aplicación sobre las variables de número de hojas tipo I y II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Forma de aplicación	HTotal	HTCosecha	HTipo I	HTipo II				
Foliar	29,87	a	23,08	a	11,37	a	11,72	a
Suelo	29,75	a	22,09	b	11,19	a	10,90	b

Los resultados muestran que aplicar al suelo o al follaje ácido salicílico no tiene ningún efecto sobre el número total de hojas (HTotal) y el número de hojas sin expandir (HTipoI) (todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales) donde las plantas que no recibieron ácido salicílico (T5) no presentaron diferencias significativas respecto a las que recibieron 50, 100 o 200  $\mu\text{M}$  de AS (Tabla 2-5). Al analizar el número de hojas expandidas (HTipoII) y el número de hojas a cosecha (HTCosecha) se observó que uno de los tratamientos (T4) fue superior al resto, con un valor de 12,62 y 24,12 para HTipoII y HTCosecha respectivamente. Dentro de las aplicaciones foliares los resultados muestran que al aplicar 50 o 100  $\mu\text{M}$  de AS tiene el mismo comportamiento que el testigo (sin diferencias significativas), sin embargo, al aplicar 200  $\mu\text{M}$  se

diferencia del control (T1) y de aplicaciones de 50  $\mu\text{M}$  (T2) para HTCosecha y HTipo II (Tabla 2-5).

Del mismo modo, el componente forma de aplicación mostró diferencias significativas a favor de la aplicación foliar en la variable HTipo II (hojas expandidas) y HTCosecha (número de hojas a cosecha) (Anexo 2-7 y Anexo 2-8), el cual obtuvo un valor de 11,72 y 23,09 respectivamente, siendo estadísticamente superior al valor alcanzado por la aplicación dirigida al suelo (10,90 para HTipoII y 22,09 para HTCosecha) (Tabla 2-6).

Los resultados de esta investigación difieren de lo evidenciado por Imami *et al.*, (2011) quienes encontraron diferencias significativas entre los métodos de aplicación y dosis de AS para la variable altura de planta en *Cicer arietinum* a favor de la aplicación dirigida al suelo, la cual registro un valor más alto y significativo en comparación a la aspersión foliar. Por otra parte, Martín *et al.* (2015) quienes trabajaron con aspersiones foliares de AS (1,0; 0,01 y 0,0001  $\mu\text{M}$ ) en diferentes dosis sobre *Sinningia speciosa* no evidenciaron efectos de los tratamientos en la variable número de hojas, pero si encontraron que todas las concentraciones usadas pudieron aumentar el área foliar total por planta. Metwally *et al.*, (2013) observaron en su ensayo que el ácido salicílico aumentó las características de crecimiento vegetativo (Ej. longitud de la planta, número de hojas/planta, área de la hoja y crecimiento fresco de las raíces) de planta de *Fragaria xananassa* Duch cuando se fueron tratadas con aspersiones foliares de AS en de dosis de 1,0 y 2,0 mM. Estos estudios muestran que las respuestas o el comportamiento de esta variable dependen de la especie vegetal en estudio, la forma de aplicación (tejido expuesto a la aplicación) y dosis.

Los resultados de esta investigación indican que tanto la forma de aplicación como la dosis de AS no tiene efecto sobre la formación de hojas y/o primordios foliares (HTipoI) y hojas totales (HTotal) debido a que son características inherentes del material vegetal usado, es decir, que existe una alta estabilidad genética de la característica que no es afectada por la aplicación de AS en sus diferentes dosis y/o formas.

Por otra parte, el número de hojas expandidas (HTipoII) y el número total de hojas a cosecha (HTCosecha) pueden ser afectados positivamente por la aplicación de AS al follaje, ya que su número aumentó cuando se aplicó 200  $\mu\text{M}$  de AS (Tabla 2-6), lo que indica que tejido foliar puede presentar una mayor sensibilidad a la aplicación de AS, la cual puede generar cambios morfológicos o fisiológicos a favor de la variable; según Klessig *et al.*, (2016) los receptores de AS pueden variar dentro de una planta individual según el tipo de tejido, el compartimento subcelular y la etapa de desarrollo. En términos de dosis, se puede observar que 200  $\mu\text{M}$  es la dosis que puede favorecer procesos fisiológicos aumentando el desarrollo de las hojas (HTipoII). Por lo que posiblemente existe un receptor que magnifica su efecto o que un pequeño umbral dispara la cascada de efectos (Larqué *et al.*, 2010).

Las diferencias significativas observadas a favor del tratamiento 4 (200  $\mu\text{M}$ ) en las variables de número de hojas expandidas (HTipoII) y el número total de hojas a cosecha (HTCosecha) se deban posiblemente a i) la influencia de AS en la rápida expansión de las hojas (crecimiento) o ii) al retraso del proceso de senescencia, el cual a su vez está controlado por la edad de desarrollo de la planta, factores exógenos (temperatura, sequía, etc) y factores endógenos como fitohormonas (Lim *et al.*, 2007).

Para el primer caso, se ha demostrado que AS interactúa con otras hormonas vegetales en diferentes etapas de desarrollo de las plantas y/o bajo condiciones de estrés abiótico y biótico (Canet, 2012), autores como Vlot *et al.* (2009) y Rivas y Plasencia (2011) indican que el efecto del AS sobre el crecimiento es indirecto mediante la alteración de las vías de señalización de otras hormonas vegetales, por lo que es posible que dicha interacción haya promovido el crecimiento de las hojas a nivel hormonal.

Para el segundo caso, se pone en evidencia que AS interfiere con la biosíntesis y/o la acción del etileno en las plantas (hormona involucrada en la senescencia y la abscisión de flores y hojas, etc) (Raskin *et al.* 1992 citado por Hayat *et al.*, 2013). Morris *et al.* (2000) observaron en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (NahG) y mutantes (pad4) donde la vía de señalización de AS esta interrumpida, se observaron patrones de senescencia alterados que incluyen amarillamiento retardado y necrosis reducida en comparación con el tipo salvaje (Morris *et al.* 2000). Por tal motivo la participación de



AS sobre la senescencia y/o interacciones con otras hormonas que afectan el proceso aún no está clara. Es necesario el desarrollo de más estudios para determinar con exactitud la participación de AS sobre esta variable, ya sea sobre el desarrollo de hojas y/o en la senescencia de las mismas, ya que se ha demostrado que este compuesto no solo afecta la defensa de la planta, sino que también regula los procesos de desarrollo.

#### 4.1.3 Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD)

No se evidenciaron diferencias significativas en dos primeras observaciones (SPAD1 y SPAD2) en la Dosis, Forma e interacción (Dosis\*Forma) en la hoja 4 (Anexo 2-9). Las diferencias significativas se evidenciaron en las evaluaciones 3 y 4 (SPAD3 y SPAD4) para la Dosis ( $p\text{-value}<0,05$  para ambas observaciones) (Anexos 2-9), Forma ( $p\text{-value}<0,05$  para SPAD4) e interacción ( $p\text{-value}<0,05$  para SPAD3 y 4 respectivamente) (Tabla 2-7).

**Tabla 2-15.** Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 4 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamientos	Forma	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	SPAD1	SPAD2	SPAD3	SPAD4
T1	Foliar	0	17,24 a	27,88 a	26,21 ab	7,72 bc
T2	Foliar	50	17,65 a	26,79 a	26,29 a	8,74 ab
T3	Foliar	100	18,46 a	28,05 a	27,24 a	8,93 a
T4	Foliar	200	18,95 a	28,07 a	27,35 a	10,62 a
T5	Suelo	0	17,24 a	27,88 a	26,21 ab	7,72 bc
T6	Suelo	50	17,86 a	27,29 a	24,27 b	6,47 bc
T7	Suelo	100	17,33 a	26,09 a	23,71 b	6,33 c
T8	Suelo	200	18,18 a	25,61 a	23,35 b	5,93 c

**Tabla 2-16.** Valor y prueba Tukey para el componente forma de aplicación sobre el contenido de clorofilas. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Forma de aplicación	SPAD1	SPAD2	SPAD3	SPAD4
Foliar	18,08 a	27,70 a	26,77 a	9,00 a
Suelo	17,65 a	26,72 a	24,39 b	6,61 b

La aplicación al suelo de AS no tuvo ningún efecto sobre la cantidad de clorofila en las hojas; En las mediciones SPAD1, SPAD2, y SPAD3 en dosis de 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de AS al suelo presentaron estadísticamente el mismo comportamiento al testigo sin aplicación. Las aplicaciones de 200 y 100  $\mu\text{M}$  foliar incrementaron la cantidad de clorofila en las hojas diferenciándose del testigo sin aplicación, pero no se diferenciaron de la aplicación de 50  $\mu\text{M}$  que a su vez fue similar al testigo (Tabla 2-7).

En lo que respecta a los métodos de aplicación, las aplicaciones foliares de AS tuvieron efecto sobre la cantidad de clorofila presente en las hojas en SPAD3 y SPAD4, la prueba Tukey arrojó diferencias a favor de la aplicación al follaje con valores de 26,77 y 9,00 respectivamente, mientras que la aplicación al suelo mostró valores de 24,39 y 6,61 para las observaciones 3 y 4 respectivamente (Anexo 2-10) (Tabla 2-8).

Los resultados de esta investigación difieren a los reportes de Hadi *et al.* (2014) quienes encontraron en su estudio que los métodos de aplicación de AS en plantas de judía blanca (*Phaseolus vulgaris*) presentaron diferencias significativas para la variable contenido de clorofilas a favor de la aplicación en el suelo, el cual fue igual estadísticamente a la aplicación en semilla, mientras que la aplicación foliar tuvo el menor efecto. Estos mismos autores indican que la dosis más efectiva fue la concentración de 0,1 mM (100  $\mu\text{M}$ ), a diferencia de la concentración de 0,5 mM (500 $\mu\text{M}$ ), la cual no fue significativa.

Habibi y Vazir (2017) indican que a baja concentración de AS (0,5 mM= 500 $\mu\text{M}$ ) hay un aumento significativo en el contenido de clorofila b y de carotenoides en plantas de cebada respecto al tratamiento testigo, lo que ayudó a mantener una alta actividad de fotosíntesis en las plantas tratadas. Javaheri *et al.* (2012) reportan que una baja concentración de AS aumenta el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas de

tomate en condiciones normales o de estrés. Del mismo modo, diversos autores muestran en sus resultados efectos negativos del AS en el contenido de clorofilas; Moharekar *et al.* (2003), concluyen en su estudio que las aplicaciones de AS causan una disminución de los contenidos de clorofila y un aumento en el contenido de carotenoides en *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum* y *Vigna radiata*, cuando se realizaron aplicaciones a una concentración de 1mM (1000 $\mu$ M). Anandhi y Ramanujam (1997) concluye que el contenido de clorofilas totales de *Vigna mungo* var. CO-5 disminuye a medida que aumenta la dosis de AS (dosis evaluadas: 10, 100 y 500 $\mu$ M).

Los estudios anteriores demuestran que la respuesta a la aplicación de AS depende de la especie vegetal y de las dosis que se implementan; Arfan *et al.* (2007) sostiene que el efecto de la aplicación de AS en pigmentos fotosintéticos varía (aumenta o disminuye) dependiendo del tipo de especie o cultivar, mientras que Miura y Tada (2014), afirman que los efectos del AS en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas dependen de la concentración aplicada. En bajas concentraciones (0,1-0,5 mM para la mayoría de las plantas) (100 - 500 $\mu$ M), mejora la eficiencia del sistema antioxidante y la eficiencia de la fotoquímica del PSII, mientras que a concentraciones más altas (1-10 mM para la mayoría de las plantas) (1000-10000  $\mu$ M) aumenta el daño oxidativo (Habibi y Vazir, 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados de esta investigación sugieren que la mejor forma de aplicación de AS y dosis corresponde a la aplicación al follaje en concentraciones de 100 y 200  $\mu$ M elevando el contenido de clorofilas en las plantas de lechuga a medida que pasa el tiempo. Este comportamiento puede estar asociado al efecto de la aplicación de AS sobre las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en la planta (Yusuf *et al.*, 2016). Estudios realizados por Rane *et al.*, (1995) evidenciaron un aumento en la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) en las hojas de trigo después de la aplicación exógena de AS. Del mismo modo Fariduddin *et al.*, (2003) demostraron que al asperjar AS al follaje de plantas de mostaza se observó una mejora en la actividad de NR, la cual puede estar positivamente correlacionada con el contenido de clorofilas en plantas de lechuga romana (Raigón *et al.*, 2006)

#### 4.1.4 Selección de forma de aplicación

Teniendo en cuenta los datos de peso seco (PS) y fresco (PF), número de hojas a cosecha (HTipoII) y la cuantificación de clorofila, se puede evidenciar que los mejores resultados se presentaron cuando se realizaron las aplicaciones al follaje en comparación con aquellas que fueron dirigidas al suelo. Se determinó que la mejor forma es la aplicación foliar, la cual se utilizó en la FASE II.

#### 4.2 FASE II: Selección de las dosis de ácido salicílico

##### *4.2.1 Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento)*

Se evidenciaron diferencias significativas en las variables evaluadas ( $p\text{-value}<0,05$  para PF y  $p\text{-value}<0,05$  para PS) (Anexo 2-11); Los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T6 presentaron un comportamiento similar estadísticamente con valores que oscilan entre 55,55 y 59,18, mientras que el menor valor fue de 51,13 para el tratamiento T5 para la variable PF. Por otro lado, para PS el tratamiento T5 y testigo fueron iguales estadísticamente (6,15 y 6,80 respectivamente) e inferiores al resto de los tratamientos (T1, T2, T3 y T4) (Anexo 2-12) (Tabla 2-9).

A pesar de que no se presentaron diferencias significativas, se observa una tendencia en los resultados que indicarían una respuesta positiva al incremento de las dosis de AS, es decir, a medida que aumentan las concentraciones de AS, aumenta el valor del PF y PS. Sin embargo, cuando la dosis aplicada es de 500  $\mu\text{M}$ , el efecto es negativo (tratamiento T5) (Tabla 2-9).

**Tabla 2-17.** Datos de peso fresco y seco obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamiento	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
T1	10	55,55 b	7,25 b
T2	50	56,55 b	7,31 b
T3	100	58,17 b	7,36 b
T4	200	59,18 b	7,89 b

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de AS (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Peso Fresco (g)</b>	<b>Peso Seco (g)</b>
<b>T5</b>	500	51,13 a	6,15 a
<b>T6</b>	0	54,91 ab	6,80 a

Distintos estudios sugieren que el AS puede afectar positivamente la germinación o el crecimiento en varias especies de plantas (Janda *et al.*, 2014); existe evidencia que demuestra que AS es un importante regulador de la fotosíntesis porque afecta la estructura de las hojas y cloroplasto (Uzunova y Popova, 2000), cierre estomático (Mateo *et al.*, 2004; Melotto *et al.*, 2006 citados por Rivas y Plasencia, 2011), contenido de clorofila y (Fariduddin *et al.*, 2003), y la actividad de enzimas como Rubisco (ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa / oxigenasa) (Pancheva y Popova, 1998).

Gutiérrez *et al.* (1998) encontraron que aplicaciones foliares de AS a brotes de soja no tienen un efecto significativo sobre la tasa fotosintética, pero sí sobre su crecimiento, especialmente en el desarrollo de raíces. Kovacik *et al.*, (2009) encontraron en *Matricaria chamomilla* que AS a dosis de 50  $\mu\text{M}$  estimuló significativamente el crecimiento tanto de las hojas como de las raíces (en un 32 y un 65%, respectivamente), mientras que la concentración más alta (250  $\mu\text{M}$ ) tuvo el efecto opuesto (disminuyó de 40 y 43 %, respectivamente). Del mismo modo, Fariduddin *et al.* (2003) informaron que la acumulación de materia seca mejoró significativamente en *Brassica juncea*, cuando se rociaron concentraciones más bajas de AS, sin embargo, mayores concentraciones de AS tuvieron un efecto inhibitorio ( $10^{-3}$  M ó 1000  $\mu\text{M}$ ); Estos resultados son similares a los reportados en esta investigación en donde la dosis más alta (500  $\mu\text{M}$ ) presentó valores inferiores estadísticamente a los tratamientos T2 (50  $\mu\text{M}$ ), T3 (100  $\mu\text{M}$ ) y T4 (200  $\mu\text{M}$ ) para PF y PS.

Por otro lado, Khan *et al.* (2003) analizaron los efectos de ácido salicílico (AS), ácido acetil salicílico (ASA) y ácido gentsílico (GTA) en concentraciones de  $10^{-3}$  (1000  $\mu\text{M}$ ) y  $10^{-5}$  M (10  $\mu\text{M}$ ) en plantas de maíz y soja, y encontraron que posterior a la aplicación de AS se produce un aumento en las tasas de fotosíntesis, la cual no siempre estuvo acompañado de un aumento de los niveles de conductancia estomática o tasas de transpiración, si no que puede estar asociada a una mayor actividad de la enzima relacionada con la captación de  $\text{CO}_2$  a nivel de cloroplasto, ya que encontraron bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  intercelular en comparación al control. Algunos estudios que

analizan la actividad de la enzima Rubisco (enzima encargada de fijar el CO<sub>2</sub> en el cloroplasto) muestran diferentes comportamientos, Ananieva *et al.* (2002) citado por Janda *et al.* (2014) indican que posterior a la aplicación de AS, existió una disminución el contenido de clorofila, en la asimilación de CO<sub>2</sub> y en las tasas de transpiración, sin cambios en la actividad de Rubisco en plántulas de cebada, mientras que Pancheva y Popova (1998), usando el mismo material vegetal (cebada) y aplicaciones de AS en concentraciones de 100 μM, 500 μM y 1M, encontraron una disminución en la tasa fotosintética asociada con baja actividad y cantidad de la enzima Rubisco.

Así mismo, se ha demostrado que aplicaciones de AS también pueden llegar a afectar las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno (Yusuf *et al.*, 2016) que pueden influir o condicionar, en cierta medida, el rendimiento de los cultivos; Rane *et al.*, (1995) evidenciaron un aumento en la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) (enzima que cataliza la reducción de nitrato a nitrito y limita la adquisición del nitrógeno, en las hojas de trigo después de la aplicación exógena de AS), resultados similares a los descritos por Fariduddin *et al.*, (2003) quienes demostraron que al asperjar AS al follaje de plantas de mostaza mejora la actividad de NR, sin embargo, en concentraciones más altas (10<sup>-3</sup> M) (1000μM) demostró ser inhibidora.

Los resultados de esta investigación muestran que la aplicación de AS en dosis de 10, 50, 100 y 200 μM pueden favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas de lechuga, posiblemente, mediante al estímulo de los diferentes procesos mencionados anteriormente hasta una dosis de 500 μM. Es necesario realizar estudios más detallados en esta especie para definir con claridad donde interviene AS y de qué forma promueve la ganancia de materia seca. Además, es necesario experimentar con concentraciones intermedias entre 200 y 500 μM ya que esta primera concentración presentó los mejores valores a pesar de no mostrar diferencias significativas en el peso fresco, o si se prefiere, se puede trabajar con dosis superiores para determinar su umbral.

#### **4.2.2 Número de hojas**

No se observaron diferencias significativas en las variables el número de hojas totales (HTotal), número de hojas totales a cosecha (HTCosecha), hojas expandidas (HTipoII)

y/o sin expandir (HTipoI) (p-value= 0,35, p-value= 0,09; p-value= 0,14 y p-value=0,55, respectivamente) (Anexo 2-13, 2-14, 2-15 y 2-16) (Tabla 2-10).

**Tabla 2-18.** Datos del número de las hojas tipo I y II de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamiento	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	H Total	HTCosecha	HTipo I	HTipo II
T1	10	33,50 a	26,70 a	15,60 a	11,10 a
T2	50	33,50 a	26,80 a	15,60 a	11,20 a
T3	100	33,70 a	26,80 a	15,60 a	11,20 a
T4	200	33,70 a	27,30 a	15,70 a	11,60 a
T5	500	33,10 a	26,00 a	15,10 a	10,90 a
T6	0	33,60 a	26,80 a	15,60 a	11,00 a

A pesar de que en esta investigación no se evidenciaron diferencias significativas en los tipos de hojas evaluadas, se puede observar que la mayor dosis (500  $\mu\text{M}$ ) registró los valores más bajos; Hayat *et al.* (2005), encontraron un aumento significativo en el número de hojas, masa fresca y seca en plántulas de trigo cultivadas a partir de los granos empapados en una concentración baja ( $10^{-5}$  M) (10 $\mu\text{M}$ ) de ácido salicílico, mientras que en dosis más altas ( $10^{-3}$  M) (1000  $\mu\text{M}$ ) todos los parámetros medidos se redujeron.

Estos resultados difieren de los reportes de Pancheva *et al.* (1996) citado por Hayat *et al.* (2010) quienes encontraron que la aparición tardía de la hoja y la disminución en el crecimiento de las hojas y raíces de las plantas de cebada están asociados a la aplicación de ácido salicílico. Esto hace evidente que la respuesta a determinadas variables posterior a la aplicación de AS depende en gran medida de factores como la especie, la concentración de AS y las condiciones en las que se desarrolla (con o sin estrés).

Por otro lado, y teniendo en cuenta los resultados de la tabla 2-10, se puede decir que posiblemente la dosis de AS empleadas en esta investigación no tenga un efecto significativo estadísticamente sobre el desarrollo y formación de hojas (HTipo II), primordios foliares (HTipoI), aumento en el número hojas totales a cosecha (HTCosecha) y total de hojas emitidas (HTotal).

#### 4.2.3 Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD)

En la hoja 4 se pudieron evidenciar diferencias significativas en las primeras cuatro observaciones (p-value=0,012 para SPAD1, p-value=0,029 para SPAD2, p-value<0,05 para SPAD 3 y SPAD 4) (Anexo 2-17), en las cuales los menores valores fueron encontrados en el tratamiento T5 que corresponde a la concentración más alta de AS según la prueba de comparación de medias Tukey (Anexo 2-17) (Tabla 2-11). Al final de la experimentación todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales.

**Tabla 2-19.** Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 4 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas (p<0,05) según prueba Tukey.

Tratamientos	Dosis de AS ( $\mu$ M)	SPAD1	SPAD2	SPAD3	SPAD4	SPAD5
T1	10	21,19 a	22,61 a	23,02 a	17,82 a	5,8 a
T2	50	20,79 a	23,25 a	24,22 a	17,35 a	5,55 a
T3	100	21,52 a	23,83 a	24,38 a	18,44 a	8,93 a
T4	200	21,60 a	24,61 a	24,78 a	18,75 a	7,47 a
T5	500	19,81 b	22,20 b	20,94 b	11,89 b	4,90 a
T6	0	21,30 a	23,14 a	23,02 a	17,89 a	5,85 a

En la hoja 5 no se evidenciaron diferencias significativas en la primera y última observación (p-value=0,25: SPAD1 y p-value=0,42: SPAD5), mientras que el resto de mediciones sucedió lo contrario (SPAD2, SPAD3 y SPAD4) (Anexo 2-18). La prueba Tukey indica que el menor valor, que presentó diferencias significativas, fue el tratamiento T5 (concentración de 500 $\mu$ M) para SPAD2, SPAD3 y SPAD4 (23,98, 25,63 y 19,65 respetivamente), mientras que el resto de los tratamientos implementados



fueron iguales estadísticamente con valores que oscilaron entre 25,25 y 26,78 para SPAD2, 25,62 y 27,34 para SPAD3, mientras que SPAD4 los valores estuvieron entre 20,62 y 22,74 (Tabla 2-12).

**Tabla 2-20.** Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 5 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamientos	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	SPAD1	SPAD2	SPAD3	SPAD4	SPAD5
T1	10	23,17 a	25,92 a	25,74 a	20,79 a	12,71 a
T2	50	23,38 a	25,73 a	26,85 a	22,30 a	13,03 a
T3	100	23,45 a	26,31 a	26,89 a	22,48 a	14,13 a
T4	200	23,76 a	26,78 a	27,34 a	22,74 a	14,63 a
T5	500	22,59 a	23,98 b	25,49 b	19,65 b	11,61 a
T6	0	22,83 a	25,25 a	25,62 a	20,62 a	12,83 a

En la hoja 6 se observaron diferencias significativas en cuatro de las cinco observaciones realizadas ( $p\text{-value} < 0,05$ ) (Anexo 2-19) siendo el tratamiento T5 quien presentó, estadísticamente, el menor valor en todas ellas a excepción de la observación SPAD3, donde la prueba Tukey indico que tanto T5 como T1 fueron estadísticamente iguales e inferiores a los demás tratamientos. En la última observación (SPAD7) todos los tratamientos fueron iguales estadísticamente (Tabla 2-13).

**Tabla 2-21.** Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 6 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamientos	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	SPAD3	SPAD4	SPAD5	SPAD6	SPAD7
T1	10	30,43 b	26,88 a	21,97 a	6,76 a	0,52 a
T2	50	31,77 a	25,96 a	21,63 a	6,42 a	0,63 a
T3	100	32,38 a	28,05 a	22,02 a	9,33 a	0,74 a
T4	200	32,28 a	28,16 a	23,90 a	10,42 a	1,22 a
T5	500	30,35 b	24,97 b	20,35 b	5,90 b	0,39 a

Tratamientos	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	SPAD3	SPAD4	SPAD5	SPAD6	SPAD7
T6	0	30,93 a	27,81 a	21,75 a	6,87 a	0,39 A

En la hoja 8, las observaciones 5 y 7 ( $p\text{-value}<0,05$ ) mostraron diferencias significativas donde el tratamiento T5 ( $500\mu\text{M}$ ) fue inferior estadísticamente a todos los tratamientos, con valores de 27,89 y 18,99 para SPAD5 y SPAD7 respectivamente (Anexo 2-20) (Tabla 2-14). En las mediciones SPAD6 y SPAD8, según la prueba Tukey todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales. En esta hoja no se observó un patrón claro en el contenido de clorofilas en el tratamiento T5 en comparación con las hojas anteriores, por lo que sus diferencias estadísticas se deban al error experimental.

**Tabla 2-22.** Datos del contenido de clorofila obtenido en la hoja 8 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamientos	Dosis de AS ( $\mu\text{M}$ )	SPAD5	SPAD6	SPAD7	SPAD8
T1	10	30,29 a	25,06 a	21,07 a	9,65 a
T2	50	29,56 a	25,35 a	20,92 a	9,53 a
T3	100	30,53 a	25,48 a	23,20 a	9,69 a
T4	200	31,48 a	26,90 a	23,80 a	9,90 a
T5	500	27,89 b	24,43 a	18,99 b	9,04 a
T6	0	29,30 a	24,90 a	20,50 a	9,39 a

En términos generales los resultados muestran que las aplicaciones de AS en dosis de 10, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$  no se diferenciaron del testigo sin aplicación en las hojas 4, 5, 6 y 8 en las primeras 3 observaciones posteriores a la implementación de los tratamientos. En el caso de la aplicación de AS en la dosis de 500  $\mu\text{M}$  se observa efecto negativo al reducir el contenido de clorofilas. La última lectura, la totalidad de las hojas evaluadas presentaron el mismo comportamiento estadísticamente, debido posiblemente a la alta variabilidad en los datos.

Weaver (1976) reporta que, en las respuestas clásicas de la acción de las hormonas en el proceso fisiológico, existe una concentración mínima en la cual donde se evidencia un efecto favorable en el proceso fisiológico, pero al aumentar dicha concentración el efecto comienza a descender hasta igualar al testigo y puede llegar al punto de ser inhibitoria. En este caso las dosis 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  no favorecieron el contenido de clorofila en comparación al testigo, a pesar de que 200  $\mu\text{M}$  fue quien presentó los valores más altos sin diferencias significativas, pero 500  $\mu\text{M}$  fue la dosis que pudo provocar efectos adversos sobre el contenido de clorofilas. En este caso se podría evaluar dosis intermedias para determinar si efectivamente existe un efecto positivo sobre esta variable que sea superior al testigo.

Algunos estudios demuestran un aumento en el contenido de clorofila en dosis bajas y efectos adversos en dosis superiores; Fariduddin *et al.* (2003) trabajaron con plantas de *B. juncea* que fueron asperjadas con concentraciones bajas ( $1 \times 10^{-5}$  M) (10 $\mu\text{M}$ ) de AS, y encontraron que el contenido de clorofila incrementó significativamente, mientras que las concentraciones más altas demostraron ser inhibitorias. Por otro lado, Hayat *et al.* (2005), informaron que el contenido de pigmento aumentó significativamente en las plántulas de trigo, obtenidas de los granos pre tratados con la menor concentración ( $1 \times 10^{-5}$  M) (10 $\mu\text{M}$ ) de AS, mientras que las concentraciones más altas no demostraron ser beneficiosas ( $1 \times 10^{-3}$  M) (1000  $\mu\text{M}$ ), del mismo modo, Yanik *et al.* (2018) encontraron que el contenido total de clorofila en plantas de *Secale cereale* se incrementó cuando se realizaron aplicaciones de 10  $\mu\text{M}$  de AS, pero disminuyó cuando se aplicaron concentraciones más altas (100 y 500  $\mu\text{M}$ ). Esto hace evidente que las respuestas cambian de acuerdo con la especie vegetal en estudio, la concentración y forma de aplicación

Algunos autores indican que el descenso del contenido de clorofilas como consecuencia a las altas concentraciones de AS es atribuido a la inhibición de algunas enzimas (catalasas) encargadas de eliminar las especies reactivas de oxígeno (EROs) que causan daños por estrés oxidativo u oxidación inespecífica de proteínas y lípidos (cloroplastos; clorofilas) (Li *et al.*, 1992). Estudios realizados por Tasgín *et al.* (2006) y Szepesi *et al.* (2005) encontraron que los tratamientos de AS disminuyeron la actividad de la catalasa en el trigo y en el tomate respectivamente. Por tal motivo, es necesario realizar estudios

a nivel de síntesis de enzimas en las plantas de lechuga para demostrar su efecto sobre las mismas y corroborar esta información.

#### ***4.2.4 Selección de dosis de aplicación***

Para la variable de peso seco y fresco de hojas, los resultados muestran que no existe efecto de la aplicación de AS en las dosis de 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  aunque se evidenció una tendencia al aumento en los valores a medida que se incrementaron las dosis. Sin embargo, el efecto logrado a la dosis mayor (200  $\mu\text{M}$ ) tampoco se diferenció estadísticamente del testigo sin aplicación. La posibilidad de seguir incrementando las dosis de AS no es viable ya que se comprobó que la concentración más alta (500  $\mu\text{M}$ ) no solamente no se diferenció estadísticamente del tratamiento testigo sin aplicación, sino que el peso seco y fresco fue inferior a todos los demás tratamientos, incluso inferior al testigo sin tratar. En lo que respecta a el número de hojas totales (HTotal), total de hojas presentes a cosecha (HTCosecha), hojas expandías (HTipoII) y hojas potenciales (HTipoI) los resultados fueron similares, ya que no existe efecto de la aplicación de AS en las dosis de 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ , pero en este caso no se evidenció una tendencia al aumento en los valores en función a medida que se incrementaron las dosis. A esto se suma que el efecto logrado con la dosis mayor (200  $\mu\text{M}$ ) tampoco se diferenció estadísticamente del testigo sin aplicación. Finalmente, para el contenido de clorofilas, los resultados obtenidos muestran que no existe efecto de la aplicación de AS en todas las dosis evaluadas excepto con la dosis más alta que resultó en una disminución significativa en las primeras lecturas del contenido de clorofila.

Teniendo en cuenta que los estos resultados muestran que no hay efecto positivo de las aplicaciones de AS sobre las variables de rendimiento (peso fresco y seco), número de hojas (HTotal, HTCosecha, HTipoI y HTipoII), y contenido de clorofilas, se seleccionaron las dosis de 10 y 200  $\mu\text{M}$  y se determinó la concentración (una alta o baja dosis) que es capaz de promover las defensas propias de las plantas.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Anandhi, S. y Ramanujam, M.P. 1997.** Effect of salicylic acid on black gram (*Vigna mungo*) cultivars. Indian J. Plant Physiol. Vol.2 : 138-141 pp.
- Arfan, M., Athar, H. y Ashraf, M. 2007.** Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress?. Journal of Plant Physiology. Vol. 164: 685—694 pp.
- Bartsch, M. y Bednarek, P. 2010.** Accumulation of isochorismate-derived 2,3-dihydroxybenzoic 3-O-beta-D-xyloside in arabidopsis resistance to pathogens and ageing of leaves. J. Biol. Chem. Vol. 285. No. 33: 25654-25665 pp.
- Canet, J. 2012.** Análisis genético de la percepción del ácido salicílico en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Departamento de biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia. 322 p.
- Chávez, L., Álvarez, A. y Ramírez, R. 2012.** Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. Cultivos Tropicales, Vol. 33. No. 3: 47-56 pp.
- El-Khalla, S., Hathout, T., El Raheim, A., Ahsour, A., Abd-Almalik, A., y Brassinolide, F. 2009.** Salicylic acid induced antioxidant enzymes, hormonal balance and protein profile of maize plants grown under salt stress. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. Vol. 5. No. 4: 391-402 pp.
- Fariduddin, Q., Hayat, S., y Ahmad, A. 2003.** Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. Photosynthetica. Vol. 41: 281–284 pp.
- Gu, J. Kang, J., Lian, L., Zhang, X., Zhang, T. y Zhang, Z. 2016.** Effects of salicylic acid on seed germination and biochemical properties in seedlings of *Lactuca sativa* L. under high temperature stress. ISHS Acta Horticulturae 1123: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes

(IHC2014): International Symposium on High Value Vegetables, Root and Tuber Crops, and Edible Fungi Production, Supply and Demands.

**Gutiérrez, A., Trejo, C. y Larqué, Alfonso. 1998.** Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 36: 563-565 pp.

**Habibi, G y Vaziri, A. 2017.** High salicylic acid concentration alters the electron flow associated with photosystem II in barley. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol. 109. No.2: 393 – 402 pp.

**Hadi, H., Najafabadi, A., y Amirnia, R. 2014.** Effect of different treatment methods of salicylic acid on bean under salt stress. *Cercetari Agronomice in Moldova*. Vol. 47. No. 3: 159 p.

**Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B., Ahmad, A., 2005.** Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agron. Hung.* Vol. 53: 433–437 pp.

**Hayat, Q., Hayat, S., Mohd, I. y Ahmadb, A. 2010.** Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* Vol 68: 14–25pp

**Hayat, S., Yusuf, M., Alyemeni, M., y Fariduddin. 2013.** Chapter 2 Salicylic Acid: Physiological Roles in Plants. En. *SALICYLIC ACID*. 22 p.

**Imami, S., Jamshidi, S., y Shahrokhi. 2011.** Salicylic Acid Foliar and Soil Application Effect on Chickpea Resistance to Chilling Stress. 2011 International Conference on Biology, Environment and Chemistry IPCBEE. Vol. 24 p.

**Janda, T., Gondor, O., Szalai, G., y Pál, M. 2014.** Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 36. No. 10: 2537–2546 pp.

**Javaheri, M., Mashayekhi, K., Dadkhah, A., Tavallaee, F.Z. 2012.** Effects of salicylic acid on yield and quality characters of tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. Vol. 4: 1184-1187 pp.

**Javanmardi, J y Akbari, N. 2016.** Salicylic acid at different plant growth stages affects secondary metabolites and physico-chemical parameters of greenhouse tomato. *Adv. Hort. Sci.* Vol. 30. No. 3. 151-157 pp.

**Karar, H. y Saifullah, S. 2001.** Effect of Foliar and Drench Applications of Acetyl Salicylic Acid on Control of *Rhizoctonia solani* and on Dry Matter Production and Partitioning of Potatoes. *Journal of Biological Sciences.* Vol. 1. No. 11: 1074-1077 pp.

**Khan, W., B. Prithiviraj, y D. L. Smith. 2003.** Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J. Plant Physiol.* Vol. 160: 485–492 pp.

**Khodary, S. F. A. 2004.** Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture Biology.* Vol.6: 5–8 pp.

**Klessig, D., Miaoying, T., Hyong, W. 2016.** Multiple Targets of Salicylic Acid and Its Derivatives in Plants and Animals. *Frontiers in immunology.* Vol. 7. 206 p.

**Kovacik, J., Grúz, J., Backor, M., Strnad, M. y Repečak, M. 2009.** Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Reports.* Vol. 28. 135 pp.

**Kumar, P., Lakshmi, N. J., y Mani, V. P. 2000.** Interactive effects of salicylic acid and phytohormones on photosynthesis and grain yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Physiology Molecular Biology of Plants.* Vol. 6: 179–186 pp.

**Larqué, A., Martín, R., Nexticapan, A., Vergara, S., y Gutiérrez, G. 2010.** Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Rev. Chapingo Ser.Hortic* Vol.16. No.3. 183-187 pp.

**Larqué, A. y Martín, R. 2007.** Effect of salicylic acid on the bioproductivity of plants. In: *Salicylic acid: A Plant Hormone.* Eds. S. Hayat and A. Ahmad. Springer. The Netherlands. Vol. 3: 15-24. pp.

**Li N., Parsons B.L., Liu D.R., Mattoo A.K., 1992.** Accumulation of woundinducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Molecular Biology.* Vol. 18: 477-487 pp.

**Lian, B., Zhou, X., Miransari, M. y Smith, D. 2000.** Effects of Salicylic Acid on the Development and Root Nodulation of Soybean Seedlings. *J. Agronomy and Crop Science* Vol. 185: 187-192 pp.

**Lim, P. Kim, H. y Nam, H. 2007.** Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*. Vol. 58: 115–136 pp.

**Loake, G. y M. Grant. 2007.** Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 10: 466-472 pp.

**Martín, R., Nexticapan, A., Villanueva, E., Uicab, V., Vergara, S., Larqué, A. 2015.** Ácido salicílico estimula la floración en plantas micropropagadas de gloxinia *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 38. No. 2: 115–118 pp.

**Metwally, A., Youssef, S., El-Miniawy, S., y Ragab. M. 2013.** Effect of foliar spraying of salicylic acid on growth, yield and quality of cold stored strawberry plants. *J. Biol. Chem. Environ. Sci.* Vol. 8. No. 1-17 pp.

**Miura, K., y Tada, Y. 2014.** Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*. Vol. 5: 4p.

**Moharekar, S., Lokhande, S., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A. y Chavan, P. 2003.** Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica*. Vol. 41. No. 2: 315-317 pp.

**Morris, K., Mackerness, S. A. H., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., y Carr, J. P. 2000.** Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal*. Vol.23. 677–685 pp.

**Pancheva, T.V., Popova, L.P., Uzunova, A.M., 1996.** Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *J. Plant Physiol*. Vol. 149: 57–63 pp.

**Pancheva, T. y Popova, L. 1998.** Effect of Salicylic acid on the Synthesis of Ribulose-1,5- biphosphate Carboxylase/Oxygenase in Barley Leaves. *Journal of Plant Physiology*. Vol.152. No. 4 : 381-386 pp.

**Raigón, M., García, M., Guerrero, C. y Esteve, P. 2006.** Actividad de la nitrato reductasa y su relación con los factores productivos en lechuga. VII Congreso SEAE



Zaragoza 2006. Disponible [en línea]: <https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2006/CD%20Congreso%20Zaragoza/Ponencias/157%20Raig%C3%B3n%20Com-%20Actividad.pdf>, Consultado Febrero 2019.

**Ramírez, H., Racaño, A., Benavidez R., Mendoza, R., y Padrón E. 2006.** Influencia de promotores de oxidación controlada en hortalizas y su relación con antioxidante. Chapingo. Serie Horticultura. Vol. 12: 186-195 pp.

**Rane, J., Lakkineni, K. C., Kumar, P. A., y Abrol, Y. P. 1995.** Salicylic acid protects nitrate reductase activity of wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 22: 119–121 pp.

**Rangel, G., Castro E., Beltran, E., Reyes H. y García, E. 2010.** El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*. Vol. 12. No. 2: 90-95 pp.

**Raskin, I. 1992.** Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. Vol. 43: 439–463 pp.

**Rivas, M., y Plasencia, J. 2011.** Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62: 3321–3338 pp.

**Sainz, R. y Echeverría, H. 1998.** Relación entre las lecturas del medidor de clorofila (Minolta SPAD 502) en distintos estadios del ciclo del cultivo de maíz y el rendimiento en grano. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* Vol. 103. No. 1: 8p.

**Sánchez, E., Barrera, R., Tovar, Muñoz, E., Ojeda, L., y Anchondo, A. 2011.** Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Vol. 17: 63-68 pp.

**Sayyari, M. y Ghanbari, F. 2013.** Effect of acetyl salicylic acid on quality and chilling resistance of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) at different storage temperatures. *Acta Hort. (ISHS)* Vol. 10. No. 12. 559-568 pp.

**Shi Q., Bao Z., Zhu Z., Ying Q., y Qian Q., 2006.** Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme

activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation*, Vol. 48: 127-135 pp.

**Szepesi, A., J. Csiszar, S. Bajkan, K. Gemes, F. Horvath, L. Erdei, A. K. Deer, M. L. Simon, y I. Tari. 2005.** Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis* Vol. 49: 123–125 pp.

**Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B., y Popova, L. 2006.** Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*. Vol. 67: 710–715 pp.

**Tucuch, H., González, A., y Larqué, A. 2015.** Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latinoamericana*. Vol. 33, No. 1: 63-68 pp.

**Uzunova, A. N., y Popova, L. P. 2000.** Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica*. Vol. 38: 243–250pp.

**Vlot, A.C. Dempsey, D.A. y D.F. Klessig. 2009.** Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 47: 177-206 pp.

**Weaver, R. 1976.** Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. 622 pp. Editorial Trillas. Capitulo 2 pág 41 a 90.; Taiz,L. & Zeiger,E. 2015. *Plant physiology*. 6ta. Ed 761pág. Sinauer Associates, Inc Publishe)

**Yanık F., Aytürk Ö., Çetinbaş-Genç A., Vardar F. 2018.** Salicylic acid-induced germination biochemical and developmental alterations in rye (*Secale cereale* L.). *Acta Bot Croat*, Vol. 77. No. 1: 45-50 pp.

**Yusuf, M., Hasan, S. A., Ali, B., Hayat, S., Fariduddin, Q., Y Ahmad, A. 2016.** Chapter 2 Salicylic Acid: Physiological Roles in Plants. In . Hayat, S., Ahmad, A. y Nasser, M. 2016. *Salicylic Acid: Plant Growth and Development*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. 396 p.

## 6. ANEXOS

### 6.1 Anexo 2-1. Anova y pruebas Tukey para peso fresco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I

Univariate Results for Each DV (Datos Forma y dosis2.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	PFresco SS	PFresco MS	PFresco F	PFresco p
Intercept	1	154251,6	154251,6	7334,419	0,000000
Forma	1	325,8	325,8	15,494	0,000231
Dosis	3	74,7	24,9	1,184	0,324143
Forma*Dosis	3	393,2	131,1	6,232	0,000998
Error	56	1177,7	21,0		
Total	63	1971,5			

Tukey HSD test; variable PFresco (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 21,031, df = 56,000					
Cell No.	Forma	Dosis	PFresco Mean	1	2
8	Suelo	200	43,42500	****	
7	Suelo	100	44,15750	****	
2	Foliar	50	49,58625	****	
6	Suelo	50	49,64750	****	
5	Suelo	0	50,11875	****	
1	Foliar	0	50,11875	****	
3	Foliar	100	50,41000	****	****
4	Foliar	200	55,28500		****

### 6.2 Anexo 2-2. Anova y prueba Tukey para peso seco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I

Univariate Results for Each DV (Datos Forma y dosis2.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	PSeco SS	PSeco MS	PSeco F	PSeco p	
Intercept	2783,043	2783,043	2405,413	0,000000	
Forma	7,930	7,930	6,854	0,011354	
Dosis	2,093	0,698	0,603	0,615854	
Forma*Dosis	11,849	3,950	3,414	0,023467	
Error	64,792	1,157			
Total	86,663				

Tukey HSD test; variable PSeco (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1,1570, df = 56,000					
Cell No.	Forma	Dosis	PSeco Mean	1	2
8	Suelo	200	5,829142	****	
7	Suelo	100	5,906969	****	
2	Foliar	50	6,168220	****	
6	Suelo	50	6,446898	****	
5	Suelo	0	6,786250	****	
1	Foliar	0	6,786250	****	
3	Foliar	100	7,256330	****	****
4	Foliar	200	7,574500		****

**6.3 Anexo 2-3.** Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre la variable peso fresco y seco de hojas en la FASE I.

Tukey HSD test; variable PFresco (Datos Forma y dosis2.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 21,031, df = 56,000				
Cell No.	Forma	PFresco Mean	1	2
2	Suelo	46,83719	****	
1	Foliar	51,35000		****

Tukey HSD test; variable PSeco (Datos Forma y dosis2.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1,1570, df = 56,000				
Cell No.	Forma	PSeco Mean	1	2
2	Suelo	6,242315	****	
1	Foliar	6,946325		****

**6.4 Anexo 2-4.** Anova para número de hojas sin expandir (HTipol) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I

Univariate Results for Each DV (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL.sta)				
Sigma-restricted parameterization				
Effective hypothesis decomposition				
Effect	HTipol SS	HTipol MS	HTipol F	HTipol p
Intercept	8145,063	8145,063	16586,31	0,000000
Forma	0,563	0,563	1,15	0,289094
Dosis	0,188	0,063	0,13	0,943549
Forma*Dosis	0,687	0,229	0,47	0,706703
Error	27,500	0,491		
Total	28,938			

**6.5 Anexo 2-5.** Anova y prueba Tukey para número de hojas expandidas (HTipoll) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I

Univariate Results for Each DV (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL.sta)				
Sigma-restricted parameterization				
Effective hypothesis decomposition				
Effect	HTipoll SS	HTipoll MS	HTipoll F	HTipoll p
Intercept	8441,016	8441,016	4253,740	0,000000
Forma	8,266	8,266	4,165	0,045983
Dosis	4,047	1,349	0,680	0,568098
Forma*Dosis	14,547	4,849	2,444	0,073526
Error	111,125	1,984		
Total	137,984			

Tukey HSD test; variable HTipoll (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 1,9844, df = 56,000					
Cell No.	Forma	Dosis	HTipoll Mean	1	2
8	Suelo	200	10,37500	****	
7	Suelo	100	10,87500	****	
2	Foliar	50	11,00000	****	
6	Suelo	50	11,37500	****	
5	Suelo	0	11,37500	****	
1	Foliar	0	11,37500	****	
3	Foliar	100	11,87500	****	****
4	Foliar	200	12,62000		****

**6.6 Anexo 2-6.** Anova y prueba Tukey número de hojas de número de hojas totales a cosecha (HTCosecha) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I.

Univariate Results for Each DV (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	HTCosecha SS	HTCosecha MS	HTCosecha F	HTCosecha p
Intercept	33169,52	33169,52	12978,12	0,000000
Forma	13,14	13,14	5,14	0,027239
Dosis	5,80	1,93	0,76	0,523522
Forma*Dosis	21,42	7,14	2,79	0,048577
Error	143,12	2,56		
Total	183,48			

Tukey HSD test; variable HTCosecha (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,5558, df = 56,000					
Cell No.	Forma	Dosis	HTCosecha Mean	1	2
8	Suelo	200	21,37500		****
7	Suelo	100	22,00000		****
2	Foliar	50	22,25000		****
6	Suelo	50	22,25000		****
5	Suelo	0	23,25000		****
1	Foliar	0	23,25000		****
3	Foliar	100	23,75000	****	****
4	Foliar	200	24,12000	****	

**6.7 Anexo 2-7.** Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre la variable número de hojas expandidas (HTipoII) en la FASE I.

Tukey HSD test; variable HTipoll (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1,9844, df = 56,000				
Cell No.	Forma	HTipoll Mean	1	2
2	Suelo	11,12500	****	
1	Foliar	11,84375		****

**6.8 Anexo 2-8.** Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre la variable número de hojas a cosecha (HTCosecha) en la FASE I.

Tukey HSD test; variable HTCosecha (Datos Forma y dosis2 rendimiento FINAL) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,5558, df = 56,000				
Cell No.	Forma	HTCosecha Mean	1	2
2	Suelo	22,09000	****	
1	Foliar	23,21875		****

**6.9 Anexo 2-9.** Anova para los contenidos contenido de clorofilas (SPAD) en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE I durante las 4 observaciones realizadas y prueba Tukey para as lecturas SAPD3 y SPAD4.

Univariate Results for Each DV (Datos Forma y dosis2.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition																	
Effect	Degr. of Freedom	SPAD1 SS	SPAD1 MS	SPAD1 F	SPAD1 p	SPAD2 SS	SPAD2 MS	SPAD2 F	SPAD2 p	SPAD3 SS	SPAD3 MS	SPAD3 F	SPAD3 p	SPAD4 SS	SPAD4 MS	SPAD4 F	SPAD4 p
Intercept	1	22992.46	22992.46	9277.508	0.000000	52316.81	52316.81	16496.22	0.000000	47011.99	47011.99	17734.93	0.000000	4559.782	4559.782	1239.621	0.000000
Forma	1	3.30	3.30	1.333	0.252675	0.01	0.01	0.00	0.957815	1.32	1.32	0.50	0.482210	26.980	26.980	7.335	0.008697
Dosis	3	14.17	4.72	1.906	0.137623	30.43	10.14	3.20	0.029278	116.61	38.87	14.66	0.000000	68.654	22.885	6.221	0.000907
Forma*Dosis	3	8.72	2.91	1.172	0.327368	28.52	9.51	3.00	0.037200	50.70	16.90	6.38	0.000765	49.845	16.615	4.517	0.006221
Error	63	156.13	2.48			199.80	3.17			167.00	2.65			231.737	3.678		
Total	70	182.69				259.96				335.05				373.306			

Tukey HSD test; variable SPAD3 (Datos SPAD4 FINAL.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,3367, df = 64,000					
Cell No.	Forma	Dosis	SPAD3 Mean	1	2
8	Suelo	200	23,35889	****	
7	Suelo	100	23,71111	****	
2	Suelo	50	24,27444	****	
5	Suelo	0	26,21444	****	****
1	Foliar	0	26,21444	****	****
6	Foliar	50	26,29000		****
3	Foliar	100	27,24667		****
4	Foliar	200	27,35111		****

Tukey HSD test; variable SPAD4 (Datos SPAD4 FINAL.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 3,0475, df = 64,000						
Cell No.	Forma	Dosis	SPAD4 Mean	1	2	4
8	Suelo	200	5,93111	****		
7	Suelo	100	6,33444	****		
6	Suelo	50	6,47222	****	****	
5	Suelo	0	7,72778	****	****	
1	Foliar	0	7,72778	****	****	
2	Foliar	50	8,74556		****	****
3	Foliar	100	8,93333			****
4	Foliar	200	10,62222			****

**6.10 Anexo 2-10.** Pruebas Tukey para el componente forma de aplicación sobre contenido de clorofilas en la FASE I.

Tukey HSD test; variable SPAD3 (Datos SPAD4 FINAL.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,8938, df = 64,000				
Cell No.	Forma	SPAD3 Mean	1	2
2	Suelo	24,38500	****	
1	Foliar	26,77250		****

Tukey HSD test; variable SPAD4 (Datos SPAD4 FINAL.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 3,0475, df = 64,000				
Cell No.	Forma	SPAD4 Mean	1	2
2	Suelo	6,612500	****	
1	Foliar	9,002500		****

**6.11 Anexo 2-11.** Anova y prueba Tukey para el peso fresco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet97) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	Degr. of Freedom	PFresco SS	PFresco MS	PFresco F	PFresco p
Intercept	1	187600,4	187600,4	14300,10	0,000000
Dosis	5	401,3	80,3	6,12	0,000147
Error	54	708,4	13,1		
Total	59	1109,8			

Tukey HSD test; variable PFresco (Spreadsheet97) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 13,119, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	PFresco Mean	1	2
6	500	51,13400		****
1	0	54,91000	****	****
2	10	55,55800	****	****
3	50	56,55000	****	
4	100	58,16800	****	
5	200	59,18000	****	



**6.12 Anexo 2-12.** Anova y prueba Tukey de peso seco de hojas de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet97) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	PSeco SS	PSeco MS	PSeco F	PSeco p
Intercept	3046,650	3046,650	5989,437	0,000000
Dosis	17,559	3,512	6,904	0,000048
Error	27,468	0,509		
Total	45,027			

Tukey HSD test; variable PSeco (Spreadsheet97) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,50867, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	PSeco Mean	1	2
6	500	6,149000	****	
1	0	6,797000	****	
2	10	7,248000		****
3	50	7,309000		****
4	100	7,357000		****
5	200	7,895000		****

**6.13 Anexo 2-13.** Anova para número de hojas total (HTotal) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II

Univariate Results for Each DV (Datos 10-500 rendimiento.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	HTotal SS	HTotal MS	HTotal F	HTotal p
Intercept	67469,07	67469,07	139058,4	0,000000
Dosis	2,73	0,55	1,1	0,357426
Error	26,20	0,49		
Total	28,93			

**6.14 Anexo 2-14.** Anova para número total de hojas a cosecha (HTCosecha) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II

Univariate Results for Each DV (Datos 10-500 rendimiento) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	HTCosecha SS	HTCosecha MS	HTCosecha F	HTCosecha p
Intercept	42880,27	42880,27	49266,69	0,000000
Dosis	8,73	1,75	2,01	0,092317
Error	47,00	0,87		
Total	55,73			

**6.15 Anexo 2-15.** Anova para número de hojas sin expandir (HTipol) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II

Univariate Results for Each DV (Datos 10-500 rendimiento.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	HTipol SS	HTipol MS	HTipol F	HTipol p
Intercept	14477,07	14477,07	53545,32	0,000000
Dosis	2,33	0,47	1,73	0,144341
Error	14,60	0,27		
Total	16,93			

**6.16 Anexo 2-16.** Anova para número de hojas expandidas (HTipoll) de las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II

Univariate Results for Each DV (Datos 10-500 rendimiento.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	HTipoll SS	HTipoll MS	HTipoll F	HTipoll p
Intercept	7526,400	7526,400	11612,16	0,000000
Dosis	2,600	0,520	0,80	0,553001
Error	35,000	0,648		
Total	37,600			

**6.17 Anexo 2-17.** Anova y pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 4 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet109) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition											
Effect	SPAD1 MS	SPAD1 F	SPAD1 p	SPAD2 SS	SPAD2 MS	SPAD2 F	SPAD2 p	SPAD3 SS	SPAD3 MS	SPAD3 F	SPAD3 p
Intercept	26552,48	19521,89	0,000000	32505,87	32505,87	11972,39	0,000000	33099,76	33099,76	15848,69	0,000000
Dosis	4,44	3,26	0,012060	36,89	7,38	2,72	0,029146	97,21	19,44	9,31	0,000002
Error	1,36			146,61	2,72			112,78	2,09		
Total				183,51				209,99			

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet109) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition								
Effect	SPAD4 SS	SPAD4 MS	SPAD4 F	SPAD4 p	SPAD5 SS	SPAD5 MS	SPAD5 F	SPAD5 p
Intercept	17389,34	17389,34	1767,255	0,000000	2472,342	2472,342	76,49000	0,000000
Dosis	328,41	65,68	6,675	0,000066	111,925	22,385	0,69255	0,631266
Error	531,35	9,84			1745,411	32,322		
Total	859,75				1857,335			

Tukey HSD test; variable SPAD1 (Spreadsheet109) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1,3601, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD1 Mean	1	2
6	500	19,81000		****
2	50	20,79000	****	****
5	10	21,19000	****	****
4	0	21,30500	****	****
1	100	21,52000	****	
3	200	21,60500	****	

Tukey HSD test; variable SPAD2 (Spreadsheet109) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,7151, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD2 Mean	1	2
1	500	22,20500	****	
6	10	22,61500	****	****
4	0	23,14000	****	****
3	50	23,25500	****	****
2	100	23,83000	****	****
5	200	24,61000		****

Tukey HSD test; variable SPAD3 (Spreadsheet109) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,0885, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD3 Mean	1	2
1	500	20,94000		****
3	10	23,02000	****	
6	0	23,58500	****	
2	50	24,22000	****	
4	100	24,38000	****	
5	200	24,78000	****	

Tukey HSD test; variable SPAD4 (Spreadsheet109) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 9,8397, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD4 Mean	1	2
1	500	11,89000		****
6	50	17,35000	****	
3	10	17,82000	****	
2	0	17,89500	****	
4	100	18,44000	****	
5	200	18,75000	****	

**6.18 Anexo 2-18.** Anova y Pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 5 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.

Univariate Results for Each DV (Datos SPAD H5 10-500.sta)													
Sigma-restricted parameterization													
Effective hypothesis decomposition													
Effect	Degr. of Freedom	SPAD1 SS	SPAD1 MS	SPAD1 F	SPAD1 p	SPAD2 SS	SPAD2 MS	SPAD2 F	SPAD2 p	SPAD3 SS	SPAD3 MS	SPAD3 F	SPAD3 p
Intercept	1	32296,72	32296,72	24061,65	0,000000	39519,10	39519,10	26555,02	0,000000	41575,07	41575,07	23297,76	0,000000
Dosis	5	9,18	1,84	1,37	0,251169	47,40	9,48	6,37	0,000102	31,61	6,32	3,54	0,007652
Error	54	72,48	1,34			80,36	1,49			96,36	1,78		
Total	59	81,66				127,76				127,98			

Univariate Results for Each DV (Datos SPAD H5 10-500.sta)									
Sigma-restricted parameterization									
Effective hypothesis decomposition									
Effect	SPAD4 SS	SPAD4 MS	SPAD4 F	SPAD4 p	SPAD5 SS	SPAD5 MS	SPAD5 F	SPAD5 p	
Intercept	27561,55	27561,55	6422,635	0,000000	10391,69	10391,69	895,2074	0,000000	
Dosis	78,22	15,64	3,646	0,006492	58,19	11,64	1,0025	0,425209	
Error	231,73	4,29			626,84	11,61			
Total	309,95				685,03				

Tukey HSD test; variable SPAD2 (Datos SPAD H5 10-500.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 1,4882, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD2 Mean	1	2
1	500	23,98600		****
3	0	25,25025	****	****
6	50	25,73000	****	
4	10	25,92000	****	
2	100	26,31000	****	
5	200	26,78900	****	

Tukey HSD test; variable SPAD3 (Datos SPAD H5 10-500.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 1,7845, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD3 Mean	1	2
3	500	25,49000	****	
1	0	25,62000	****	****
6	10	25,74500	****	****
2	50	26,85000	****	****
4	100	26,89500	****	****
5	200	27,34000		****

Tukey HSD test; variable SPAD4 (Datos SPAD H5 10-500.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 4,2913, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD4 Mean	1	2
1	500	19,65000		****
6	0	20,62500	****	****
3	10	20,79100	****	****
4	50	22,30500	****	****
5	100	22,48000	****	
2	200	22,74500	****	

**6.19 Anexo 2-19.** Anova y pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 6 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.

Univariate Results for Each DV (Datos SPAD H6 10-500.sta)													
Sigma-restricted parameterization													
Effective hypothesis decomposition													
Effect	Degr. of Freedom	SPAD3 SS	SPAD3 MS	SPAD3 F	SPAD3 p	SPAD4 SS	SPAD4 MS	SPAD4 F	SPAD4 p	SPAD5 SS	SPAD5 MS	SPAD5 F	SPAD5 p
Intercept	1	59012,62	59012,62	30356,61	0,000000	43653,37	43653,37	11388,56	0,000000	28964,17	28964,17	4118,214	0,000000
Dosis	5	41,31	8,26	4,25	0,002488	83,15	16,63	4,34	0,002165	65,81	13,16	1,871	0,114661
Error	54	104,97	1,94			206,99	3,83			379,79	7,03		
Total	59	146,28				290,13				445,60			

Univariate Results for Each DV (Datos SPAD H6 10-500.sta)									
Sigma-restricted parameterization									
Effective hypothesis decomposition									
Effect	SPAD6 SS	SPAD6 MS	SPAD6 F	SPAD6 p	SPAD7 SS	SPAD7 MS	SPAD7 F	SPAD7 p	
Intercept	3484,016	3484,016	350,6829	0,000000	29,2322	29,23224	10,37112	0,002169	
Dosis	164,629	32,926	3,3141	0,011067	4,1017	0,82034	0,29104	0,915899	
Error	536,487	9,935			152,2055	2,81862			
Total	701,116				156,3072				

Tukey HSD test; variable SPAD3 (Datos SPAD H6 10-500.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 1,9440, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD3 Mean	1	2
3	500	30,35500	****	
1	10	30,43000	****	
2	0	30,93900	****	****
5	50	31,77500	****	****
6	200	32,28500		****
4	100	32,38500		****

Tukey HSD test; variable SPAD4 (Datos SPAD H6 10-500.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 3,8331, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD4 Mean	1	2
1	500	24,97000		****
3	50	25,96000	****	****
2	10	26,88950	****	****
4	0	27,81000	****	
5	100	28,05000	****	
6	200	28,16000	****	

Tukey HSD test; variable SPAD5 (Datos SPAD H6 10-500.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 7,0332, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD5 Mean	1	2
3	500	20,35000	****	
2	50	21,63755	****	
4	0	21,75500	****	
6	10	21,97500	****	
1	100	22,20500	****	****
5	200	23,90500		****

Tukey HSD test; variable SPAD6 (Datos SPAD H6 10-500.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 9,9349, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD6 Mean	1	2
2	500	5,90000	****	
3	50	6,42500	****	
6	10	6,76600	****	
1	0	6,87500	****	
4	100	9,33000	****	****
5	200	10,42500		****

**6.20 Anexo 2-20.** Anova y pruebas Tukey para los contenidos de clorofilas (SPAD) de la hoja 8 en las plantas de lechuga sometidas a los diferentes tratamientos de la FASE II durante las 8 observaciones realizadas.

Univariate Results for Each DV (Datos SPAD H8 10-500.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition									
Effect	Degr. of Freedom	SPAD5 SS	SPAD5 MS	SPAD5 F	SPAD5 p	SPAD6 SS	SPAD6 MS	SPAD6 F	SPAD6 p
Intercept	1	53446,43	53446,43	7993,334	0,000000	38580,68	38580,68	4736,908	0,000000
Dosis	5	75,60	15,12	2,261	0,061214	35,60	7,12	0,874	0,504679
Error	54	361,06	6,69			439,81	8,14		
Total	59	436,67				475,41			

Univariate Results for Each DV (Datos SPAD H8 10-500.sta)								
Sigma-restricted parameterization								
Effective hypothesis decomposition								
Effect	SPAD7 SS	SPAD7 MS	SPAD7 F	SPAD7 p	SPAD8 SS	SPAD8 MS	SPAD8 F	SPAD8 p
Intercept	27523,84	27523,84	3216,811	0,000000	5455,164	5455,164	2129,077	0,000000
Dosis	159,53	31,91	3,729	0,005681	4,402	0,880	0,344	0,884124
Error	462,04	8,56			138,360	2,562		
Total	621,57				142,762			

Tukey HSD test; variable SPAD5 (Datos SPAD H8 10-500.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 6,6864, df = 54,000				
Cell No.	Dosis	SPAD5 Mean	1	2
6	500	27,89000	****	
1	0	29,30500	****	****
4	50	29,56500	****	****
3	10	30,29500	****	****
5	100	30,53500	****	****
2	200	31,48500		****

Tukey HSD test; variable SPAD7 (Datos SPAD H8 10-500.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 8,5563, df = 54,000			
Cell No.	SPAD7 Mean	1	2
6	18,99300		****
3	20,50700	****	****
2	20,92500	****	****
1	21,07500	****	****
4	23,20500	****	
5	23,80300	****	

### **CAPÍTULO 3**

**Efecto de dos cepas de *Trichoderma* sp., ácido salicílico y su combinación en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* y en el desarrollo y crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.)**



## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) se lleva a cabo en diferentes países del mundo, concentrando cerca del 80% de la producción mundial en los continentes asiático y europeo, y el 20% restante en el continente americano (Viteri *et al.*, 2013). En Argentina, es cultivada en casi todo el país con sus distintas variedades, en los cinturones verdes de grandes y medianas ciudades (Vigliola, 1989 citado por Alcalá *et al.*, 2006). Numerosos autores citan consumos de agua entre 52 mm y 125 mm dependiendo de la época del año en que se produzca asociado a los regímenes de lluvia (Defilipis *et al.*, 2008), condiciones que pueden influenciar de forma dramática la incidencia y severidad de enfermedades y las dinámicas poblacionales de insectos plaga.

Entre los patógenos más importantes se destacan, *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* (mildiu veloso), *Sclerotinia* spp. (*S. sclerotiorum* y *S. minor*) y algunos virus como los causantes del mosaico de la lechuga (LMV) y el bronceado del tomate (TSWV) (Ferreira y Boyle, 1992). Las especies de *Sclerotinia* figuran entre los patógenos de suelo más polífagos. Adams y Ayers (1979) mencionan como hospedantes a 64 familias, 225 géneros y 361 especies, siendo las Compuestas una de las familias más atacadas (64 géneros y 62 especies). Ávila *et al.* (1996) catalogan a *Sclerotinia* spp. como uno de los patógenos más destructivos y frecuentes en muchas plantas suculentas y en caso particular de lechuga, causa la podredumbre del cuello en plantas.

Esta enfermedad se controla mediante la aplicación de productos de síntesis química como vinclozolin, benomil, iprodione, carbendazin y procimidone (Ávila y Velandia, 1992) (tres últimos registrados para su uso en Argentina) (Viglianchino y Huarte, 2014). Sin embargo, la vida media de estos ingredientes activos es corta, ya que el producto está expuesto a la biodegradación por los microorganismos y a la interacción con las características físico-químicas del suelo (Subbarao, 1998). Mecatti *et al.* (2016) indican que aplicaciones repetidas de fungicidas pueden favorecer las poblaciones microbianas

que degradan rápidamente los fungicidas en el suelo y reducen la eficiencia de tratamiento, así como la eliminación de organismos benéficos al ser pesticidas no selectivos (Hoyos *et al.*, 2008 y García *et al.*, 2012). En muchos casos pueden generar un impacto negativo sobre el medio ambiente, la biodiversidad, así como en la salud sobre los operarios y riesgo de residuos en el producto.

Dentro del marco de alternativas que se presentan al control químico, se han logrado importantes avances en términos de control biológico que han permitido identificar más de 30 especies entre bacterias y hongos como antagonistas y micoparásitos de *Sclerotinia* spp. (Smith, 2004 y Agrios, 2002). Se han identificado a *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. y *Coniothyrium minitans* con mayor potencial para el manejo de la enfermedad (Subbarao, 1998 y McLean, *et al.*, 1996). Aunque dada la alta susceptibilidad del hospedante (lechuga) muchas de estas medidas no controlan de forma eficiente (Pérez *et al.*, 2009).

En el caso de *Trichoderma* spp., diferentes autores mencionan que la eficiencia en el control de hongos patógenos se debe a que son i) eficaces en la utilización de nutrientes, ii) modificadores de la rizosfera al inducir cambios en el pH y/o poblaciones microbianas (Ibarra *et al.*, 2010), iii) existen cepas fuertemente agresivas contra hongos patógenos mediante su actividad micoparásita, antibiosis y competencia por sustrato (Hermosa *et al.*, 2012) y iv) promotores de mecanismos de defensa en las plantas (Hoitink *et al.*, 2006).

Jaimes *et al.*, (2009), indican que varias especies del género *Trichoderma*, tienen capacidad formar relaciones estrechas como es el endofitismo, donde el antagonista es capaz de colonizar los tejidos de las plantas sin causar síntomas visibles donde permanece como un microorganismo simbiote provocando cambios sistémicos que ayudan a enfrentar patógenos y condiciones de estreses abióticos (Hermosa *et al.*, 2012 y León *et al.*, 2018). Nawrocka y Malolepsza, (2013) indican que durante la interacción planta-*Trichoderma*, numerosos inductores son liberados por las hifas de *Trichoderma* que pueden inducir diferentes tipos de señales dentro de la planta (ej. por ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) o especies reactivas de oxígeno (EROs)), que desencadena la expresión de proteínas de defensa. Algunos autores afirman que

*Trichoderma*, al igual que otros microorganismos benéficos (ej. promotores de crecimiento), pueden activar la resistencia sistémica (Shoresh *et al.*, 2005) través de la vía de señalización AJ/ET (Hermosa *et al.*, 2012).

El desarrollo de mecanismos de defensa en las plantas depende de una red de vías de señalización hormonal, donde el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), etileno (ET) entre otras, juegan un papel muy importante (Hermosa *et al.*, 2012). Por lo general el AS induce mecanismos de resistencia que son activos contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, conocida como resistencia sistémica adquirida (RSA). Mientras que patógenos con estilo de vida necrótrofo, suelen sucumbir a las defensas controladas por AJ y ET, que actúan como moléculas de transducción de señal de las respuestas sistémicas denominada resistencia sistémica inducida (RSI) (Pérez, 2014), característico en las interacciones de microorganismos no patogénicos y plantas (Sriram *et al.*, 2009).

Pérez (2014) confirma que plantas tratadas con *Trichoderma* sp. pueden desencadenar resistencia sistémica adquirida (RSA) mediada por AS, pero cuando son posteriormente infectadas por un patógeno, pueden inducir genes de la ruta del AJ y que desencadenan una respuesta RSI prolongada en el tiempo, afirmación que coincide con los resultados del estudio de Hermosa *et al.* (2012) con plantas de *Arabidopsis* y la cepa de *Trichoderma atroviride*, quienes indican que el pretratamiento con *Trichoderma* puede modular la expresión génica dependiente de ácido salicílico durante la colonización de las raíces por parte del antagonista, y que posteriormente y durante la infección por agentes patógenos, se produce la expresión de genes de defensa inducida a través de la vía de transducción de AJ, causando un aumento progresivo de RSI. Esto sugiere que durante el establecimiento de la relación simbiótica muy posiblemente *Trichoderma* sp. sea reconocido como patógeno; Ramírez *et al.*, (2014) observó que durante las primeras horas de la interacción se produce un aumento en las defensas mediadas por ácido salicílico (AS) con el fin de confinar al hongo antagonista en el espacio apoplástico impidiendo su entrada en el sistema vascular.

En la actualidad numerosos estudios están enfocados al desarrollo de nuevas moléculas químicas y/o a la búsqueda de nuevos microorganismos antagonistas, pero muy pocos se han ocupado en incluir moléculas como inductores de resistencia dentro de los planes

integrados de manejo, como lo es el ácido salicílico (AS). Los primeros estudios que determinaron el papel de AS en la resistencia a enfermedades fueron realizados por White (1979) en plantas de tabaco, donde evidenció que plantas tratadas con AS mostraron resistencia de la infección contra el virus del mosaico (TMV) evidenciado por la reducción en el número de lesiones debido al aumento de la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Gaffney *et al.* (1993) citados por Sánchez *et al.* (2010) trabajaron con mutantes de *Arabidopsis* en el gen *nahG* que codifica para una enzima salicilato hidroxilasa que metaboliza al AS y evita su acumulación, encontraron que después de la infección por patógenos, estas plantas fueron incapaces de acumular altos niveles de AS, y no lograron expresar genes PR en las hojas. Kamal *et al.*, (2009) encontraron que la aplicación de AS a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  en plantas de tomate puede (i) elevar significativamente los niveles foliares de AS, (ii) inducir la expresión génica relacionada con patogénesis (PR), y (iii) activar la resistencia sistémica adquirida (RSA), mecanismos que fueron efectivos en el control de *Alternaria solani*. An y Mou, (2011) afirman que la aplicación de AS y sus análogos funcionales, tales como ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y éster S-metilico de benzotiadiazol (BTH), activa la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y la resistencia contra virus, bacterias, oomicetos y hongos patógenos en una variedad de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Teniendo en cuenta lo anterior, integrar los diferentes métodos de control se convierte en una alternativa para solucionar los problemas ocasionados por esta enfermedad, aprovechando las bondades de cada uno de ellos.

Muchos autores mencionan que los mecanismos RSI y RSA son respuesta de defensa independientes y en algunos casos excluyentes o antagonista. Kunkel y Brooks (2002) indica que las interacciones entre la señalización AS y AJ parecen ser complejas, y existe evidencia de interacciones tanto positivas como negativas o interacciones neutras y sinérgicas, sin embargo, el modo primario de interacción entre estas vías parece ser el antagonismo mutuo. Afirmación que coincide con los reportes de Vidal *et al.*, (1997) quienes encontraron que el tratamiento de las plantas de tabaco con elicitores producidos por *Erwinia carotovora*, que se sabe que activa la señalización de AJ en *A.*

*thaliana*, dio como resultado la inhibición de expresión de los genes de resistencia dependientes de AS.

Existe evidencia limitada de interacciones positivas entre las vías AJ y AS. Mur *et al.* (2006) indican que el tratamiento de *Arabidopsis* con bajas concentraciones de ácido jasmónico y ácido salicílico dio como resultado un efecto sinérgico sobre los genes PDF1.2 y PR-1, mediados por AJ y AS respectivamente, mientras que, a concentraciones más altas, los efectos fueron antagonísticos, lo que demuestra que interacción AS-AJ depende de la concentración relativa de cada hormona. Al-Saleh *et al.* (2016) encontraron que al integrar tratamientos de *Pseudomonas fluorescens* (Pf) (microorganismo PGPR) y ácido salicílico se mejora el control de la enfermedad del cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp *citri*-A, al reducir el tamaño de sus lesiones. Jiménez *et al.* (2012) concluyen de su trabajo con ajo y *Sclerotium cepivorum* Berk. que la resistencia sistémica adquirida (RSA) desarrollada por las plantas después de la aplicación del inductor químico (acibenzolar-S-Metil) y la resistencia sistémica inducida (RSI) por *Trichoderma* sp. fueron compatibles y como resultado se obtuvo un efecto aditivo sobre el nivel de protección y la activación paralela de ambas respuestas de defensa.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de dos cepas de *Trichoderma* sp., aplicaciones de ácido salicílico y su combinación en el control de *Sclerotinia sclerotiorum* y en el desarrollo y crecimiento de lechuga en condiciones de invernadero.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.1.1 Evaluar el efecto de 2 cepas de *Trichoderma* sp., y 2 dosis de ácido salicílico, así como su combinación sobre el peso fresco y seco de las hojas de las plantas de lechuga.
- 2.1.2 Evaluar el efecto de las 2 cepas de *Trichoderma* sp., y las 2 dosis de ácido salicílico, y su combinación sobre el contenido de clorofilas.

- 2.1.3 Determinar el efecto de 2 cepas de *Trichoderma* sp., y 2 dosis de ácido salicílico, así como su combinación, en la incidencia de la podredumbre del cuello de la lechuga ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum*.
- 2.1.4 Evaluar el efecto de 2 cepas de *Trichoderma* sp. y 2 dosis de ácido salicílico, así como su combinación en la severidad de la podredumbre del cuello de la lechuga causada por *Sclerotinia sclerotiorum*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***3.2 Localización***

Los ensayos se llevaron a cabo en los invernaderos del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

#### ***3.2 Material vegetal y manejo del ensayo***

Se usaron semillas de lechuga sin tratar (sin aplicaciones de insecticidas y/o fungicidas) de la variedad “Gallega de invierno”, las cuales fueron pre germinadas en cajas de Petri, con papel de filtro humedecido y mantenidas en condiciones de oscuridad y temperatura de 20°C durante 36 horas. Posterior a la emergencia de la radícula fueron trasplantadas en bandejas de germinación de 162 alveolos usando como sustrato turba Hi-Soil®. Una vez que las plantas presentaron 4 hojas verdaderas fueron trasplantadas en macetas de 864 cm<sup>3</sup> con el mismo sustrato. Se aplicó riego con agua corriente cada tres días (100 ml por maceta) y fertirriego una vez por semana (100 ml por maceta de solución fertilizante la cual fue preparada disolviendo 2,5g de Basfoliar 25-10-17® SP en un litro de agua).

#### ***3.3 Aislados de Trichoderma spp.***

Se usaron los dos aislados de *Trichoderma* sp. (T15 y T22) que presentaron los mejores resultados en las variables evaluadas durante el Capítulo 1, las cuales fueron catalogadas como cepas promisorias para el control de *S. sclerotiorum*.

### **3.4 Aislado del patógeno**

Se usó un aislado patogénico obtenido de la manera que se describe en el Capítulo 1, el cual, según las características morfológicas de la colonia y esclerocios, se identificó como *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

### **3.5 Determinación de crecimiento endófito del hongo antagonista**

Se usaron semillas de lechuga sin tratar (sin aplicaciones de insecticidas y/o fungicidas) de la variedad “Gallega de invierno”, las cuales fueron pre germinadas en cajas de Petri, con papel de filtro humedecido y mantenidas en condiciones de oscuridad y temperatura de 20°C durante 36 horas. Posterior a la emergencia de la radícula fueron trasplantadas en bandejas de germinación independientes de acuerdo al tratamiento usando como sustrato turba Hi-Soil®.

Una vez las plantas presentaron 4 hojas verdaderas se aplicaron, a 10 plantas, 2 ml de la suspensión de conidios de las cepas de *Trichoderma* sp. seleccionadas en el Capítulo 1 (cepas 15 y 22) a una concentración de  $9 \times 10^7$  conidios.ml<sup>-1</sup>. Para el tratamiento testigo se usó agua corriente. Después de 8 días de la aplicación se utilizó la metodología planteada por González *et al.* (2019a), variando el medio de cultivo para la prueba (en este caso se usó *Trichoderma* selective medium (TSM), para determinar la actividad endófito de las cepas. Se tomaron porciones de las raíces de las plantas, se cortaron las secciones de 1 centímetro, se lavaron con agua corriente y se desinfectaron externamente utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 5%; luego se lavaron con agua destilada estéril y se sembraron en el medio de cultivo *Trichoderma* selective medium (TSM) que posteriormente fueron incubadas en estufa de 26°C durante 5 días.

Se realizaron observaciones macroscópicas de las colonias, así como observaciones microscópicas para determinar las estructuras somáticas y reproductivas (micelio, conidióforo, conidios, fíalides, etc.) que fueran representativos del género *Trichoderma*.

### 3.6 Tratamientos

Se plantearon 18 tratamientos con 10 plantas cada uno. Los 9 primeros se enmarcaron dentro de un escenario de AUSENCIA del patógeno para determinar el efecto de los diferentes tratamientos en el crecimiento y desarrollo de las plantas de lechuga teniendo en cuenta los posibles efectos positivos de *Trichoderma*, ácido salicílico y su combinación en el peso seco y fresco de las plantas (Tabla 3-1), mientras que los tratamientos del 9-19 se implementaron en PRESENCIA del agente patógeno para determinar la eficiencia de cada uno de los tratamientos en el control de la podredumbre del cuello.

**Tabla 3-23.** Tratamientos planteados para el desarrollo de la tesis.

<b>Tratamiento</b>	<b><i>En AUSENCIA del patógeno</i></b>
T1	Testigo Absoluto
T2	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T15
T3	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T22
T4	Aplicación de Ácido Salicílico (AS) 10 $\mu$ M
T5	Aplicación de Ácido Salicílico (AS) 200 $\mu$ M
T6	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T15 y AS 10 $\mu$ M
T7	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T15 y AS 200 $\mu$ M
T8	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T22 y AS 10 $\mu$ M
T9	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T22 y AS 200 $\mu$ M
<b>Tratamiento</b>	<b><i>En PRESENCIA del patógeno</i></b>
T10	Testigo Absoluto
T11	Testigo Relativo
T12	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T15
T13	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T22
T14	Aplicación de Ácido Salicílico (AS) 10 $\mu$ M
T15	Aplicación de Ácido Salicílico (AS) 200 $\mu$ M
T16	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T15 y AS 10 $\mu$ M
T17	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T15 y AS 200 $\mu$ M
T18	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T22 y AS 10 $\mu$ M
T19	Aplicación de <i>Trichoderma</i> sp. T22 y AS 200 $\mu$ M

Las aplicaciones de AS y las diferentes cepas del hongo antagónico se realizaron una semana antes del trasplante (7 días); para los taratmientos combinados, primero se hizo la aplicación del ácido salicílico y 6 horas después las aplicaciones de los aislados *de Trichoderma* seleccionados (T15 y T22).



### ***3.7 Aplicaciones e inoculación***

#### **3.7.1 Aplicación ácido salicílico**

La aplicación de ácido salicílico fue dirigida al follaje (aplicación foliar) en dosis de 10  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  con atomizador hasta punto de goteo.

#### **3.7.2 *Trichoderma* spp.**

La preparación de la suspensión de conidios de las dos cepas de *Trichoderma* sp., se llevó a cabo según Mónaco *et al.* (2015); Las cepas seleccionadas se cultivaron en medio de agar de papa glucosa (APG 2%) con 12 hs. de luz de fotoperíodo (3500 luz más cerca de la luz UV, 365 nm) a  $20\pm 2^\circ\text{C}$  por 7 a 15 días. Los conidios de cada aislamiento se obtuvieron inundando la superficie del cultivo con agua destilada estéril para separarlos con una barra de vidrio estéril. Después se filtraron a través de 2 telas de malla tramadas, las concentraciones de propágulos se ajustaron a  $9 \times 10^7$  conidios. $\text{ml}^{-1}$ , y se adicionaron  $50 \text{ul.L}^{-1}$  de 0.05% (v/v) Tween 20 en solución acuosa. Se tomaron 2 ml de la suspensión y se aplicaron de forma individual en cada alveolo de la bandeja de germinación donde se encontraban establecidas las plántulas de lechuga una semana antes del trasplante.

#### **3.7.3 *Sclerotinia sclerotiorum***

Para la inoculación del agente patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, se tomaron 10 plantas, a las cuales se les incorporó un disco de micelio de 5 mm, el cual fue colocado 0,5 cm de la planta y 0,5 cm de profundidad (Tassara *et al.*, 1998) (Fig. 3-1A y B) (Tratamientos del 10 al 19). Los discos fueron obtenidos de cultivo del patógeno sobre agar papa glucosa (APG) 1,5 %, pH 6,5 en cajas de Petri, que fueron mantenidas en estufa a  $20\text{-}22^\circ\text{C}$  durante 7 días. La inoculación se realizó 8 días después del trasplante (32 días después de siembra) y 15 días posterior a la aplicación de los tratamientos, siguiendo la técnica Stazzonelli *et al.* (2017) y Choudhary *et al.* (2012).



**Figura 3-7.** A) Inoculación de *Sclerotinia sclerotiorum* y B) establecimiento del ensayo.

### **3.8 Variables evaluadas**

Para los tratamientos 1 al 9 se evaluaron las variables de peso fresco y seco de las hojas de las plantas, y se cuantificó del contenido de clorofila (SPAD). Mientras que para los tratamientos del 10 al 19 se evaluaron incidencia de la enfermedad, severidad (longitud y cobertura de la lesión), así como el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. La cuantificación de clorofila y las mediciones de Incidencia y severidad de la enfermedad (longitud y porcentaje de cobertura de la lesión) se realizaron cada 8 días después de la inoculación. Se realizaron dos ensayos independientes y consecutivos con los mismos tratamientos, donde se evaluaron las mismas variables (exceptuando el contenido de clorofilas) con el fin de validar los resultados (ensayos A y B).

#### **3.8.1 Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento): Ensayos A y B**

Se tomaron los pesos frescos y secos de las hojas de la totalidad de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos (10 plantas individuales) usando balanza digital de 0,01 g de precisión. Las plantas fueron muestreadas cuando más del 50% de las plantas se encontraban en el punto de cosecha (48 días después de trasplante). Para el peso seco, las muestras fueron sometidas a estufa de aire forzado durante 48 horas con temperatura de 70°C o hasta que el peso de las mismas fuera constante usando balanza digital.

### 3.8.2 Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD)

Se usó el medidor de clorofila Minolta® SPAD 502 el cual mide la concentración relativa de clorofila por medio de la luz transmitida a través de la hoja en 650 nm (longitud de onda fotosintéticamente activa) y 940 nm (Sainz y Echeverría, 1998). Las lecturas fueron tomadas en todas las plantas, específicamente en el tercio medio y sobre la lámina foliar de la hoja número 5 y 6. Las observaciones se realizaron una vez por semana después de iniciados los tratamientos hasta la cosecha (6 evaluaciones).

### 3.8.3 Incidencia de la enfermedad

Para la evaluación de la *incidencia* de la enfermedad, se realizó el recuento del número de individuos que presentaron los síntomas asociados a la enfermedad y se tuvo en cuenta el número total de plantas muestreadas. Con estos datos se utilizó la siguiente relación en cada uno de los tratamientos (Arias *et al.*, 2007):

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Numero de plantas afectadas por la enfermedad}}{\text{Numero total de plantas muestreadas}} * 100$$

Los valores de incidencia fueron transformados para su análisis teniendo en cuenta las recomendaciones de McCune y Grace (2002), quienes indican que para los valores expresados en porcentaje la transformación más recurrente y apropiada es el arcoseno de la raíz cuadrada del valor.

### 3.8.4 Severidad (longitud y porcentaje de cobertura de la lesión)

Para evaluar la severidad en tallo se midió i) el tamaño de la lesión con ayuda de un medidor pie de Rey, ii) el porcentaje de cobertura de la lesión en tallo, tomando como 100% su circunferencia y iii) el diámetro del tallo. Con esta información se calculó el área de la lesión en cm<sup>2</sup>, para esto se usó la fórmula propuesta por Chabur (2012):

$$\text{Severidad} = \frac{\text{Longitud de la lesión (cm)} \times \text{Porcentaje de la lesión (\%)} \times \text{Diámetro del tallo (cm)}}{100}$$

El cálculo permite determinar el área de la lesión en el tallo teniendo en cuenta la longitud, cobertura y diámetro del tallo ante la ausencia de una escala de severidad para este patosistema.

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

Para comparar el comportamiento de los diferentes tratamientos, con los datos de severidad se calculó el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCPE) utilizando la fórmula propuesta por Shaner y Finney (1977) aplicando el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990) y usando la ecuación:

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

Dónde: n es el número de mediciones de la enfermedad en el tiempo; el término  $(Y_i + Y_{i+1}) / 2$  es el punto medio entre  $(Y_i + Y_{i+1})$  que representa la cantidad de enfermedad en un intervalo de tiempo, correspondiente a la altura de cada rectángulo; y el término  $(X_{i+1} - X_i)$  representa el tiempo (d) entre dos evaluaciones de la enfermedad e indica el ancho de cada rectángulo.

### **3.9 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar (DCA), con prueba de comparación de medias Tukey. Se usaron 10 repeticiones por cada tratamiento en los ensayos con ausencia (tratamientos del 1 al 9) y presencia (tratamientos del 10 al 19) del patógeno.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de crecimiento endófito del hongo antagonista

Luego de una desinfección superficial de las raíces de las plantas de lechuga se recuperaron las cepas del agente antagónico posterior a la inoculación, indicando que estos microorganismos pueden crecer dentro de las raíces de las plantas de lechuga; En los medios de cultivo, se evidenció la formación de micelio blanco algodonoso con pequeñas coloraciones verdes alrededor de los trozos de raíces. Observaciones microscópicas permitieron identificar estructuras como conidióforos erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, pero no verticilados. Las fiálides eran en forma de botella, hinchada en la región central pero delgadas hacia el ápice. Los conidios eran redondeados a oblongos de color verde y se localizaban en masa sobre los ápices de las fiálides; características que, según Barnett y Hunter, (1972) son propias del género *Trichoderma* sp. (Fig. 3-2).

Harman *et al.* (2004) afirman que algunas especies del género *Trichoderma* han sido descritas como simbiontes avirulentos oportunistas de plantas capaces de formar asociaciones con las raíces, afirmación que coincide con los reportes de Cummings *et al.* (2016) quienes indican que el hongo antagonista puede colonizar ampliamente las superficies de las raíces y establecerse dentro de ellas como endófito.

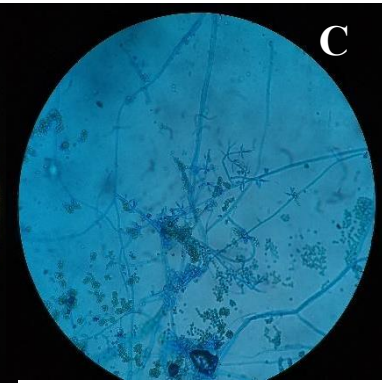
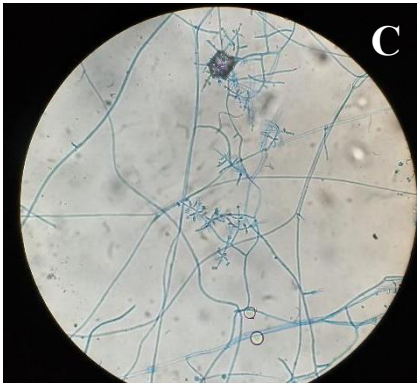
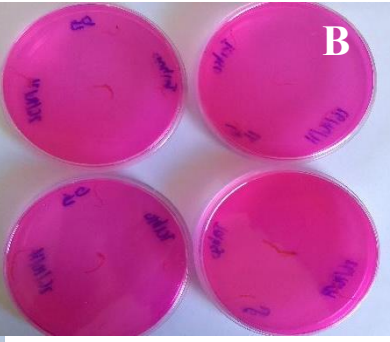
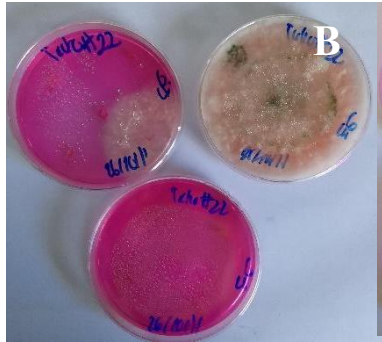
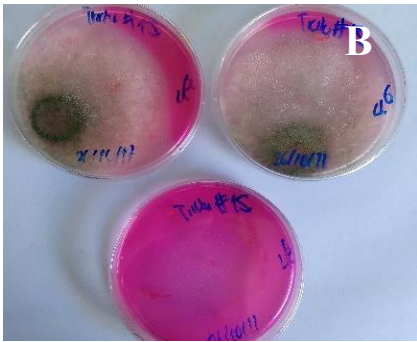
Hermosa *et al.* (2012) afirman que el hongo antagonista debe tener la capacidad de reconocer, adherirse y penetrar el tejido radical, para lograr su colonización. Del mismo modo, indica que el reconocimiento es facilitado por los polisacáridos altamente hidratados secretados por la raíz y por los monosacáridos y disacáridos excretados a la rizosfera, los cuales a su vez, fomentan el crecimiento de los hongos, mientras que la adherencia a la superficie de la raíz por parte del hongo antagonista puede estar mediada por hidrofobinas, que son pequeñas proteínas hidrofóbicas de la capa externa que recubren la superficie de las células del hongo, las cuales tiene como objetivo permitir la fijación de las hifas a la raíz (Viterbo y Chet, 2006) e identificar la celulosa y modificar la arquitectura de la pared celular de la planta para facilitar su colonización (Brotman *et al.*, 2008).

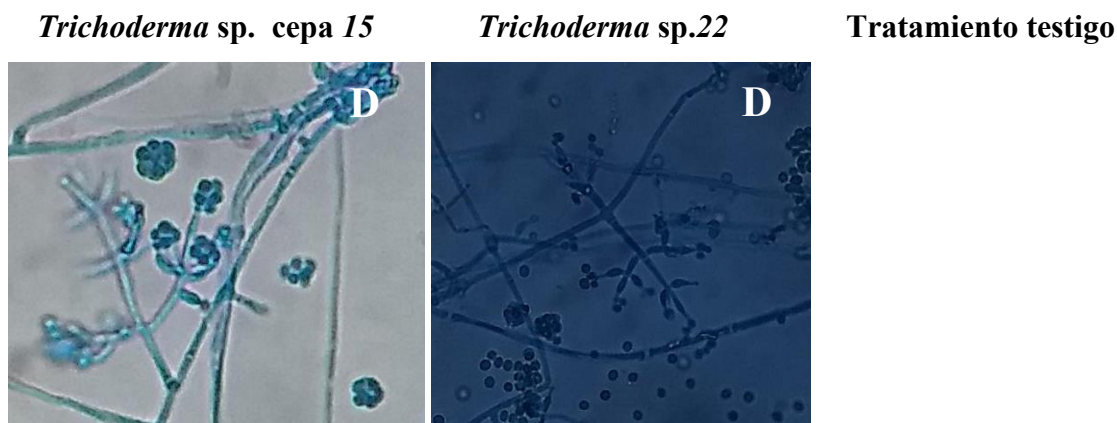


*Trichoderma* sp. cepa 15

*Trichoderma* sp.22

Tratamiento testigo





**Figura 3-8.** A) Detalle del crecimiento radical de las plantas sometidas a los tratamientos con *Trichoderma* sp. cepa 15 y 22 B) Siembra en medio selectivo para *Trichoderma* (TSM) de fragmentos de raíz de lechuga y características macroscópicas de las colonias

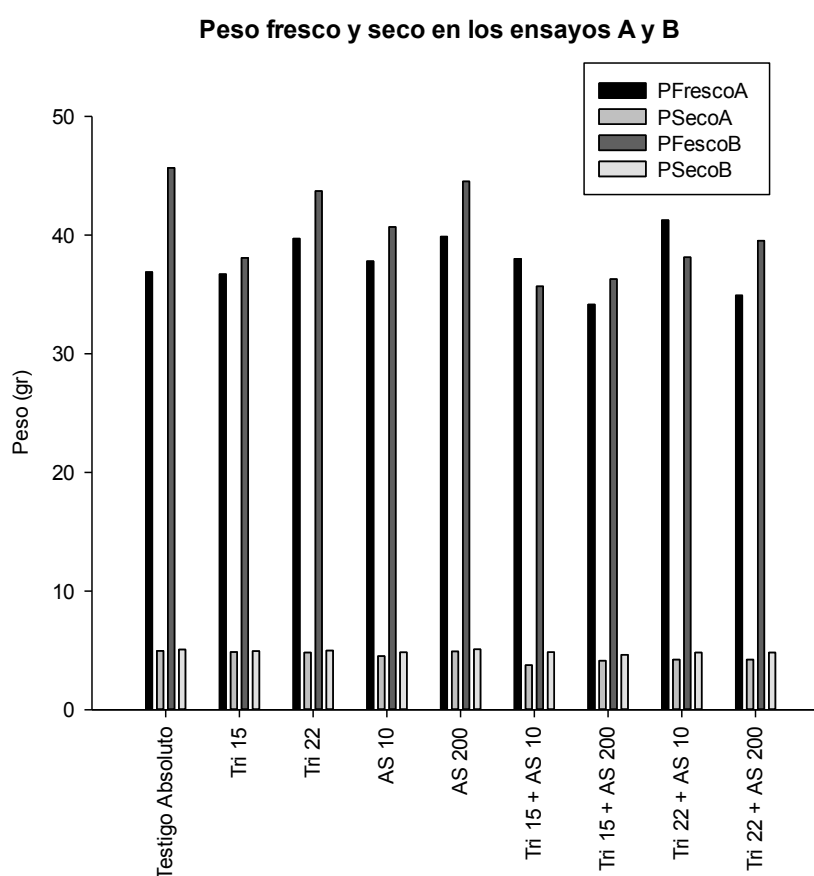
Shi *et al.*, (2009) indican que algunos hongos endofíticos mutualistas pueden actuar como promotores biológicos para la activación de los sistemas de defensa ante condiciones adversas bióticas y/o abióticas, mediante la producción de varios antibióticos y metabolitos secundarios. Entre los principales endófitos como agentes de control biológico, existe un grupo de hongos del género *Trichoderma* sp, considerados antagonistas naturales de fitopatógenos y son ampliamente utilizados en la agricultura, poseen un gran potencial de biocontrol a plagas y enfermedades (León *et al.*, 2018), puede sugerirse que los aislados de *Tichoderma* usados en esta investigación pueden presentar potencial de biocontrol mediante interacción directa con la planta (endofitismo) y desarrollar o inducir resistencia sistémica (RSI); González *et al.* (2019b) encontraron que cepas endófitas de *Trichoderma* presentan potencial de biocontrol de mediante la inducción de resistencia sistémica (RSI).

#### 4.2 Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento): Ensayos A y B

Se evidenciaron diferencias significativas solo en la variable del peso fresco en los ensayos A y B ( $p\text{-value} < 0,01$ ) (Anexo 3-1). Según la prueba Tukey, los tratamientos T3 (Tri 22) y T5 (AS 200  $\mu\text{M}$ ) fueron superiores estadísticamente con valores de 39,40 y 41,35 y 44,78 y 46,12 para ensayos A y B respectivamente (Tabla 3-2) (Fig. 3-3), mientras que los valores más bajos fueron registrados en los tratamientos T6 y T7 que

corresponden a la aplicación de *T. harzianum* cepa 15 con ambas dosis de AS (10 y 200  $\mu$ M). Por otro lado, el tratamiento testigo, fue igual estadísticamente a los tratamientos T2, T4, T8 y T9 en el ensayo A y B para esta variable (peso fresco)

En lo que respecta al peso seco no hubo efecto de la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp., ni hubo efecto de la aplicación de las dos dosis de AS, ni tampoco en las aplicaciones combinadas de las cepas de *Trichoderma* sp. y diferentes dosis de AS. Por lo que los tratamientos no se diferenciaron estadísticamente del testigo absoluto sin aplicaciones.



**Figura 3-3.** Peso fresco y seco de las plantas sometidas a los tratamientos del 1 al 9 en los ensayos A y B



**Tabla 3-24.** Datos de peso fresco y seco obtenidos en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

Tratamiento	Descripción	Ensayo A		Ensayo B	
		Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
T1	Testigo Absoluto	38,40 b	4,51 a	40,00 b	4,8 a
T2	Tri 15	37,60 b	4,79 a	38,07 b	4,94 a
T3	Tri 22	39,40 a	4,82 a	44,78 a	5,07 a
T4	AS 10 $\mu$ M	38,67 b	4,90 a	40,68 b	4,83 a
T5	AS 200 $\mu$ M	41,35 a	4,86 a	46,12 a	5,09 a
T6	Tri 15 + AS 10 $\mu$ M	36,60 c	4,22 a	35,67 c	4,63 a
T7	Tri 15 + AS 200 $\mu$ M	34,40 c	4,22 a	36,28 c	4,77 a
T8	Tri 22 + AS 10 $\mu$ M	36,90 b	4,37 a	38,12 b	4,84 a
T9	Tri 22 + AS 200 $\mu$ M	36,65 cb	4,24 a	39,52 b	4,83 a

Tri: *Trichoderma* sp.; AS: Ácido salicílico;  $\mu$ M: micromolar

Existen numerosas experiencias que reportan los beneficios del hongo antagónico en el aumento del rendimiento o en algunos de sus componentes; Gravel *et al.* (2007) evidenciaron que *T. atroviride* promueve el crecimiento de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., mientras que Jamal *et al.*, (2016) reportaron en *Solanum lycopersicum*, que tanto la floración, el número y tamaño de frutos, se ven afectados positivamente por la aplicación de *Trichoderma* sp. en el suelo. En el cultivo de lechuga, Lynch *et al.* (1991) encontraron que *T. harzianum* y otras especies del género son capaces de estimular el crecimiento de plantas, ya que encontraron diferencias significativas en el rendimiento comercial, peso fresco y seco, así como en el número de hojas. Resultados que coinciden con las observaciones de Akbudak y Basay (2013), quienes evidenciaron diferencias significativas en el rendimiento entre plantas de lechuga sometidas a aplicaciones de *T. harzianum* (23,74 g) y las plantas control (15,37 g).

Los resultados de esta investigación muestran que la cepa 22 de *Trichoderma* sp. puede tener un efecto positivo sobre la variable rendimiento (peso fresco) cuando es aplicado de forma individual, que podría estar asociado a mejoras en la nutrición vegetal,

producción de metabolitos secundarios y hormonas que benefician a las plantas mejorando su desarrollo y crecimiento (Windham *et al.*, 1986 citado por Jamal *et al.*, 2016).

Jamal *et al.*, (2016) aseguran que varias especies de *Trichoderma* son productores de diferentes tipos de metabolitos secundarios que son importantes para la regulación del crecimiento de las plantas en algunos cultivos comerciales. Sin embargo, no todas las especies y/o cepas de *Trichoderma* estimulan el desarrollo de las plantas (Hermosa *et al.*, 2012); este hecho está condicionado por el genotipo vegetal (Tucci *et al.*, 2011) y por la especie de *Trichoderma* en cuestión (Rubio *et al.*, 2012 citado por Poveda, 2018). Por tal motivo se puede inferir que la cepa 22 de *Trichoderma* sp. puede favorecer el contenido de agua en las plantas de lechuga al presentar un valor significativo y superior en el peso fresco respecto a la cepa 15 y testigo. Teniendo en cuenta que este producto se comercializa en fresco, aumento en el peso fresco puede representar beneficios económicos al productor.

En lo que respecta a la aplicación individual de AS (T4: 10  $\mu$ M y T5: 200  $\mu$ M), el aumento en el rendimiento del tratamiento T5 respecto al testigo se debe, posiblemente, a la influencia positiva sobre la eficiencia en el uso del agua y a la conductancia estomática (El-Khalla *et al.*, 2009), las cuales podrían explicar el mayor valor en el peso fresco. En lo que respecta al peso seco, las dosis utilizadas no aumentaron estadísticamente la acumulación de materia seca respecto al testigo a pesar de su efecto en los diferentes procesos fisiológicos y metabólicos de la planta, la regulación de la biogénesis de los cloroplastos (Uzunova y Popova, 2000), la actividad fotosintética, y la concentración interna de CO<sub>2</sub> (El-Khalla *et al.*, 2009). En este sentido, algunos ensayos realizados con agentes de control biológico e inductores de resistencia demostraron que combinaciones de *Trichoderma* sp. con ácido salicílico y metil jasmonato aumentaron significativamente el rendimiento de plantas de tomate en comparación con plantas no tratadas (Zehra *et al.*, 2017). Jiménez *et al.* (2012), hicieron aplicaciones solas y conjuntas de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Methyl sobre plantas de ajo, y a pesar de no evidenciar diferencias significativas en las variables de peso fresco del bulbo, peso seco del bulbo y rendimiento, encontraron que los mayores valores fueron para los tratamientos que contenían la mezcla de *T. koningiopsis* y Acibenzolar-S-Methyl, y *T. harzianum* y Acibenzolar-S-Methyl.

Estos estudios resaltan los beneficios de mezclar estos dos tratamientos sobre la variable rendimiento, pero en esta investigación, la combinación de *Trichoderma* spp. y AS fueron inferiores estadísticamente a los tratamientos T3 y T5 que corresponden a la aplicación individual de AS en concentración 200  $\mu$ M y a la aplicación de la cepa 22 de *Trichoderma* sp. respectivamente, e igual estadísticamente al tratamiento testigo, lo que indica que no hay efecto de dichos tratamientos sobre las variables de peso fresco y seco. Para las combinaciones de la cepa 15 con las diferentes dosis de AS se observa un efecto negativo sobre la variable peso fresco con valores inferiores estadísticamente al testigo en ambos ensayos (A y B).

La disminución del rendimiento en los tratamientos que involucran combinaciones (T6 y T7) respecto a las aplicaciones individuales (T2, T4 y T5) podría deberse al posible efecto antagónico de las hormonas de crecimiento que son sintetizadas por las plantas en presencia de ambos tratamientos (*Trichoderma* spp. y AS) que puede causar alteraciones a nivel hormonal en la planta, lo que puede explicar en parte los bajos valores en el peso fresco de las plantas en las mezclas con *Trichoderma* sp. T15 (A y B). Bajo el modelo propuesto por Hermosa *et al.*, (2012) se afirma que la auxina mediada por *Trichoderma* sp. (IAA) también contribuye a antagonizar la señalización del ácido salicílico (AS) en la planta, mientras que Wang *et al.* (2007), demostraron que plantas que sobreproducen la molécula de señal de defensa AS con frecuencia tienen fenotipos morfológicos que recuerdan a los mutantes deficientes en auxinas, por tal motivo, la aplicación de AS causa represión global de genes relacionados con auxinas, lo que resulta en la inhibición de sus respuestas (Wang *et al.*, 2007), por lo que es posible que AS y la señalización de auxinas sean mutuamente antagónicas (An y Mou, 2011). La respuesta diferencial entre las cepas de *Trichoderma* sp. y AS varía en dependencia de las combinaciones especie/cepa del microorganismo y al producto fitosanitario evaluado (inductor de resistencia) (Martínez *et al.*, 2013a).

#### 4.3 Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD): Ensayo A

Los resultados muestran que no existe efecto de la aplicación de los aislados de *Trichoderma* spp. ni de la aplicación de AS ni de la combinación de ambos sobre el contenido de clorofila en las hojas al inicio y final de la investigación. Las diferencias significativas se concentraron en las observaciones 2 y 3 de la hoja 5 ( $p$ -value<0,05 para

ambas lecturas) (Anexo 3-2). En SPAD2, los menores valores se obtuvieron en los tratamientos T7 (19,540) y T9 (19,730) quienes son iguales estadísticamente según la prueba Tukey. Mientras que para SPAD3, solo el tratamiento T9 (23,660) presentó el menor valor en comparación al resto de los tratamientos, quienes fueron estadísticamente iguales. Para la hoja número 6, se evidenciaron diferencias significativas en la observación 3 (SPAD3) ( $p$ -value<0,05) /Anexo 3-3) donde el mejor tratamiento fue T5 (29,690) quien fue superior estadísticamente a todos los tratamientos, cuyos valores oscilaron entre 27,050 y 28,150. Para las observaciones posteriores (SPAD 4, 5 y 6) de ambas hojas los tratamientos fueron iguales estadísticamente entre sí (Anexo 3-3).

**Tabla 3-25.** Contenido de clorofilas en las hojas 5 y 6 de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p$ <0,05) según prueba Tukey.

<b>Contenido de clorofilas (SPAD) hoja 5</b>							
<b>Trat.</b>	<b>Descripción</b>	<b>SPAD1</b>	<b>SPAD2</b>	<b>SPAD3</b>	<b>SPAD4</b>	<b>SPAD5</b>	<b>SPAD6</b>
<b>T1</b>	T. Absoluto	18,790 a	20,550 ab	26,770 b	25,120 a	23,110 a	13,360 a
<b>T2</b>	<i>Tri</i> 15	17,880 a	21,520 b	25,740 b	25,350 a	23,130 a	12,025 a
<b>T3</b>	<i>Tri</i> 22	17,260 a	21,230 b	25,580 b	22,980 a	23,510 a	13,780 a
<b>T4</b>	AS 10 $\mu$ M	16,150 a	20,850 b	24,950 ab	24,840 a	22,730 a	13,563 a
<b>T5</b>	AS 200 $\mu$ M	18,550 a	21,010 b	25,980 b	25,950 a	25,030 a	15,780 a
<b>T6</b>	<i>Tri</i> 15+AS 10 $\mu$ M	20,050 a	20,770 b	25,770 b	25,030 a	22,740 a	15,040 a
<b>T7</b>	<i>Tri</i> 15+AS 200 $\mu$ M	20,000 a	19,540 a	25,810 b	25,210 a	22,900 a	11,710 a
<b>T8</b>	<i>Tri</i> 22+AS 10 $\mu$ M	18,710 a	22,410 b	26,430 b	26,140 a	23,450 a	11,960 a
<b>T9</b>	<i>Tri</i> 22+AS 200 $\mu$ M	18,220 a	19,730 a	23,660 a	23,800 a	22,220 a	13,970 a

<b>Contenido de clorofilas (SPAD) hoja 6</b>						
<b>Trat.</b>	<b>Descripción</b>	<b>SPAD2</b>	<b>SPAD3</b>	<b>SPAD4</b>	<b>SPAD5</b>	<b>SPAD6</b>
<b>T1</b>	T. Absoluto	19,990 a	27,230 a	26,330 a	24,180 a	15,080 a
<b>T2</b>	<i>Tri</i> 15	20,330 a	27,510 a	26,170 a	24,770 a	13,790 a
<b>T3</b>	<i>Tri</i> 22	19,860 a	27,740 a	26,050 a	23,930 a	16,200 a
<b>T4</b>	AS 10 $\mu$ M	19,840 a	27,050 a	25,160 a	23,640 a	14,760 a

Contenido de clorofilas (SPAD) hoja 6						
Trat.	Descripción	SPAD2	SPAD3	SPAD4	SPAD5	SPAD6
T5	AS 200 $\mu$ M	20,940 a	29,690 b	27,110 a	25,690 a	17,800 a
T6	Tri 15 + AS 10 $\mu$ M	21,880 a	28,060 a	25,420 a	23,010 a	18,430 a
T7	Tri 15+AS 200 $\mu$ M	23,420 a	27,650 a	25,980 a	24,590 a	15,480 a
T8	Tri 22 + AS 10 $\mu$ M	21,730 a	28,150 ab	26,690 a	24,230 a	16,860 a
T9	Tri 22+ AS 200 $\mu$ M	19,300 a	27,250 a	25,930 a	23,130 a	17,150 a

Tri: *Trichoderma* sp.; AS: Ácido salicílico;  $\mu$ M: micromolar

Existen reportes en diferentes especies vegetales que exponen la relación positiva entre inoculaciones de diferentes cepas de *Trichoderma* y el contenido de clorofila; Moya (2016) encontró que plantas de cebada tratadas con *Trichoderma* presentan cierta tendencia hacia valores más altos de unidades SPAD respecto al testigo, afirmación que coincide con los resultados de Harman (2006) quien aplicó *T. harzianum* en plantas de maíz y encontró un efecto vigorizante evidenciado por el verdor de las plantas y mayores valores SPAD asociado a los altos niveles de nitrógeno, por lo que es posible pensar que el hongo antagonista puede mejorar la eficiencia en la captación de dicho elemento.

Akbudak y Basay (2013) realizaron aplicaciones individuales de *Trichoderma harzianum*, quitosano y metil jasmonato en plantas de lechuga, y encontraron que el tratamiento con el hongo antagonista fue significativamente mayor en la variable contenido total de clorofila (1,55 mg 100g<sup>-1</sup> peso seco) en comparación al testigo (1,10 mg 100g<sup>-1</sup> peso seco) al momento de la cosecha, mientras que los inductores quitosano y metil jasmonato presentaron valores de 0,55 mg 100g<sup>-1</sup> peso seco y 0,60 mg 100g<sup>-1</sup> peso seco, respectivamente. Resultados que difieren con lo evidenciado con esta investigación, ya que las aplicaciones individuales de *Trichoderma* spp. no lograron diferenciarse estadísticamente del resto de los tratamientos.

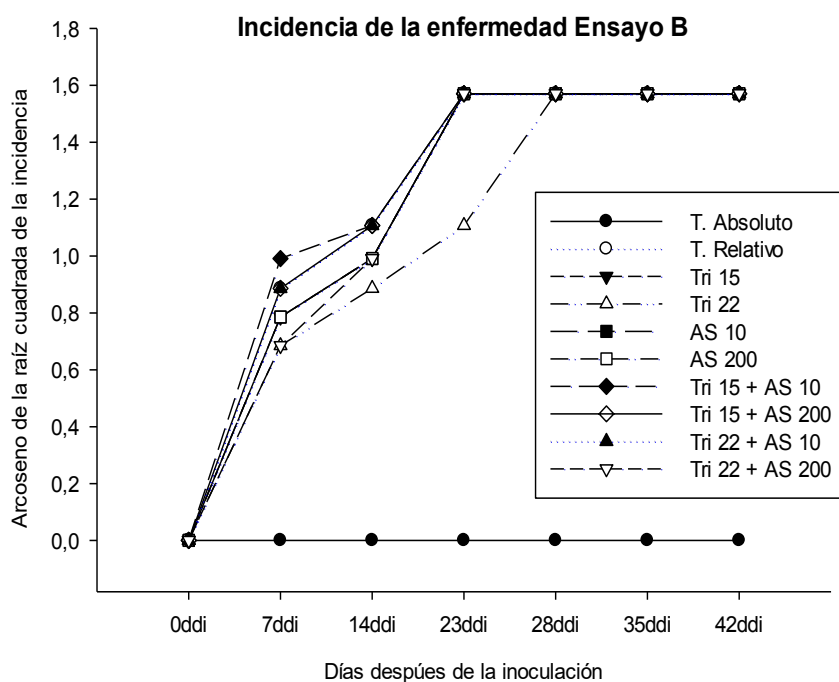
En lo que respecta al AS, algunos autores han reportado los beneficios de las aplicaciones de compuesto en el aumento de contenidos de clorofilas; Hayat *et al.*, (2005) informaron que el contenido de pigmento se mejoró significativamente en las

plántulas de trigo, obtenidas de los granos pretratados con menor concentración ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) ( $10 \mu\text{M}$ ) de AS, mientras que las concentraciones más altas no demostraron ser beneficiosas. Del mismo modo, Habibi y Vazir (2017), indican que a baja concentración de AS ( $0,5 \text{ mM} = 500 \mu\text{M}$ ) hay un aumento significativo en el contenido de clorofila b y de carotenoides en plantas de cebada respecto al tratamiento testigo, lo que ayudó a mantener una alta actividad de fotosíntesis en las plantas tratadas. En esta investigación solo se pudo evidenciar el efecto positivo de AS en la hoja 6 durante la tercera observación (SPAD3) donde la dosis de  $200 \mu\text{M}$  de AS obtuvo el mejor valor diferenciándose del resto de los tratamientos.

En cuanto a las aplicaciones combinadas, Jiménez *et al.* (2011) encontró que la mezcla o combinación de *T. koningiopsis* + Bion® (Acibenzolar-S-Metil), aumenta el contenido de clorofila, peso fresco y seco, así como la altura de las plantas de ajo en comparación a los tratamientos aplicados de forma independiente. Elwakil *et al.* (2015) encontraron en su estudio con plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) que la triple combinación de compost, ácido salicílico a  $4 \text{ mM}$  y *T. harzianum* presentó un aumento significativo respecto al testigo en el contenido de clorofila A, clorofila B, clorofila total y carotenoides. Mientras que Tanwar *et al.* (2013) citado por Geeta *et al.*, (2018) demostraron en su estudio que el contenido de clorofila aumentó significativamente en la inoculación combinada de *Trichoderma* sp. y AS. Estos resultados difieren a lo evidenciado en esta investigación ya que en la hoja 5 en las evaluaciones SPAD 2 y SPAD3 la mezcla de *Tri* 15 y AS  $200 \mu\text{M}$  presentaron los menores valores en ambas observaciones y la combinación de *Tri* 22 y AS  $200 \mu\text{M}$  fue quien registro el menor valor en SPAD 3.

Este comportamiento puede atribuirse a alta variabilidad en los datos y/o error experimental, por tal motivo no se puede demostrar de forma clara el efecto positivo de las aplicaciones de las cepas de *Trichoderma* sp. y AS sobre el contenido de clorofilas en plantas a pesar de que diversos autores afirman que ambos tratamientos pueden mejorar su valor. Por tal motivo es necesario mayor profundidad en el tema para esclarecer cómo se ven afectados los procesos metabólicos que participan en el aumento de esta variable cuando los tratamientos se aplican de manera conjunta.





**Figura 3-9.** Incidencia de la enfermedad en las plantas en los distintos tratamientos en los ensayos A y B.

El tiempo de aparición de los síntomas coincide con las observaciones de Moreno *et al.*, (2010) quienes encontraron que plantas de lechuga inoculadas con *Sclerotinia sclerotiorum* desarrollan síntomas asociados a la enfermedad a los 9 ddi.

La incidencia depende de la capacidad que tiene el patógeno para generar la enfermedad, la cual está determinada en gran medida por el tipo de inóculo, las particularidades del huésped, la virulencia del patógeno y de las condiciones ambientales en las que se desarrolla (Subbarao, 1998).

En lo que respecta a los tratamientos, es evidente que ninguno controló de manera efectiva la infección del tejido (evidencia de síntomas todas las plantas inoculadas) después de los 23 ddi y 28 ddi para en el ensayo A y B respectivamente, pero antes de este periodo se vio un comportamiento diferencial. Akbudak y Basay (2013), reportan que *Trichoderma* es uno de los agentes de control biológico utilizados con mayor éxito contra *Sclerotinia* sp. y otros hongos patógenos en el cultivo de lechuga. Infante *et al.*, (2009) reporta que los principales mecanismos de acción directa de *Trichoderma* son la



competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, mientras que dentro de los indirectos se encuentran la inducción mecanismos de defensa.

Los resultados de este ensayo muestran que las respuestas de resistencia impulsadas o mediadas por AS (RSA) no impiden la colonización del tejido vegetal por parte del patógeno, ya que las plantas tratadas con 10 y 200  $\mu\text{M}$  de AS alcanzaron valores de 100% después de los 23ddi en ambos ensayos (A y B). Se puede observar que el tratamiento de 10  $\mu\text{M}$  de AS (T5) y la cepa 22 de *T. harzianum* (T4) obtuvieron los menores valores de incidencia en el ensayo A a los 14ddi.

En lo que respecta a la combinación de los tratamientos y a la posible expresión de resistencia sistémica adquirida e inducida mediada por AS y AJ respectivamente, Kunkel y Brooks (2002) indican que las interacciones entre la señalización AS y AJ parecen ser complejas, y existe evidencia de interacciones tanto positivas como negativas o interacciones neutras y sinérgicas. En tabaco, un tratamiento combinado con jasmonato de metilo y ácido salicílico da como resultado una mayor inducción de la expresión del gen PR-1 (proteínas relacionadas a la patogénesis) que el tratamiento con ácido salicílico solo (Gomi *et al.*, 2005) demostrando así su sinergismo. En un estudio realizado por Shang *et al.*, (2011) citado por Zhu *et al.* (2014) muestran que la aplicación foliar de AJ seguida de AS activa la respuesta sistémica de defensa más fuerte y regula positivamente la expresión de genes relacionados con la defensa contra virus del mosaico del tabaco (TMV) en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

A pesar de los reportes de los autores anteriormente citados y teniendo en cuenta la naturaleza del patógeno como patógeno necrótrofo que es capaz de producir enzimas que degradan con facilidad el tejido vegetal del hospedero susceptible, no es posible encontrar variedades comerciales con genes de resistencia frente a *Sclerotinia sclerotiorum*. Por lo que es de esperar que los posibles mecanismos de resistencia impulsados por los diferentes tratamientos no sean eficientes ni suficientes para impedir la colonización del tejido vegetal en este patosistema. Por tal motivo, es posible considerar que las diferencias en los valores de incidencia pueden deberse a factores climáticos como humedad y temperatura que pudieron dificultar y/o retrasar su establecimiento en algunas de las repeticiones.

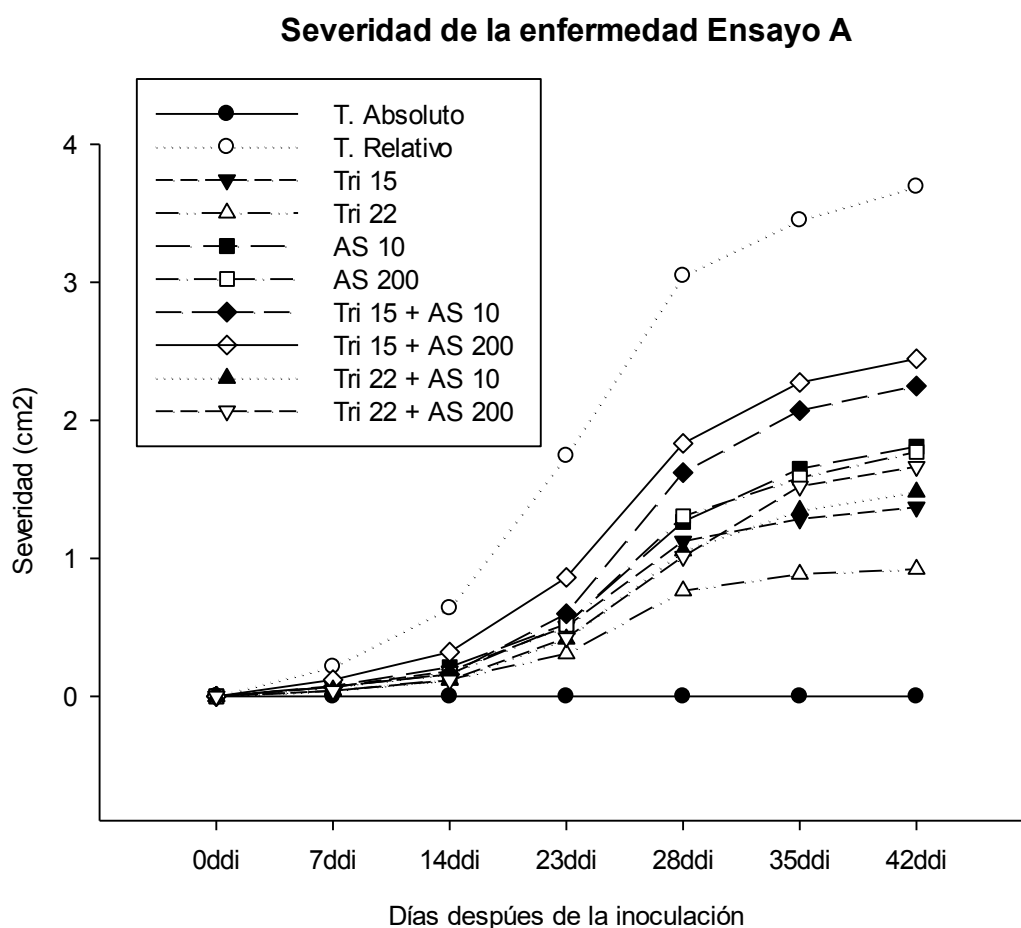
#### 4.5 Severidad (longitud y porcentaje de cobertura de la lesión): Ensayos A y B

En el ensayo A se pueden observar diferencias significativas desde los 7 ddi hasta los 42ddi (p-value<0,05) (Anexo 3-4), con valores que aumentan a medida que pasa el tiempo de evaluación (Fig. 3-5). Para la primera observación, los mejores tratamientos fueron T10 (Testigo Absoluto) y T13 (*Trichoderma* sp. cepa 22) con valores de 0 y 0,038 respectivamente, seguidos por los tratamientos T19 (0,039), T18 (0,046), T12 (0,068), T16 (0,068), T15 (0,068), T14 (0,074) y T17 (0,199), quienes fueron iguales estadísticamente, y por último se encuentra el tratamiento testigo relativo (T11) el cual solo fue inoculado por el agente patógeno (Tabla 3-4) (Fig. 3-5). Al final de la experimentación (cosecha), la mayoría de los tratamientos (7 de 10 tratamientos) presentaron valores entre 1,370 y 2,444, quienes según la prueba de Tukey fueron iguales estadísticamente, el mejor valor fue registrado para T13 (0,920) que es estadísticamente igual testigo absoluto (0,000) mientras que el tratamiento testigo relativo fue el que presentó la mayor severidad (3,692) (Tabla 3-4).

En términos generales, los mejores tratamientos fueron *Trichoderma* sp. cepa 22 (T13), *Trichoderma* sp. cepa 15 (T12), *Trichoderma* sp. cepa 22 + AS 10 $\mu$ M (T18), *Trichoderma* sp. cepa 22 + AS 200  $\mu$ M (T19), seguido por las aplicaciones individuales de AS (200  $\mu$ M y 15  $\mu$ M respectivamente) y por último las combinaciones con *Trichoderma* sp. cepa 15 (*Trichoderma* sp. cepa 15 + 10 $\mu$ M y *Trichoderma* sp. cepa 22 + 200 $\mu$ M).

En el ensayo B a diferencia del A, se pueden observar diferencias significativas desde los 14 días después de inoculación hasta los 42ddi (p-value<0,05) (Anexo 3-5), con valores que aumentan medida que pasa el tiempo de evaluación (Tabla 3-5) (Fig. 3-6). La prueba Tukey mostró tres agrupamientos a partir de los 23 ddi hasta los 35ddi; Para los 35 ddi, se presentó el valor más alto el T. Relativo (1,968), seguido por los Tri 15 + AS 200  $\mu$ M (1,625), Tri 15 + AS 10  $\mu$ M (1,389) con un comportamiento igual estadísticamente, le siguen las aplicaciones individuales de AS (10  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) y *Trichoderma* sp. (Tri 15 y 22), junto con las aplicaciones en mezcla que involucran la cepa 22 de hongo antagonista (Tri 22 + AS 200  $\mu$ M y Tri 22 + AS 10  $\mu$ M) con valores

que oscilan entre 1,320 y 0,820 los cuales son iguales estadísticamente, y por último el testigo absoluto (T. Absoluto; 0,000) el cual no presentó síntomas de la enfermedad y fue superior a los tratamientos anteriormente mencionados. En el momento de la cosecha (45ddi), las aplicaciones individuales, tanto del AS como de *Trichoderma* sp., junto con la mezcla Tri 22 + AS 10  $\mu$ M presentaron valores iguales estadísticamente (valores entre 0,900 y 1,395), las mezclas Tri 22 + AS 200  $\mu$ M, Tri 22 + AS 10  $\mu$ M, Tri 15 + AS 10  $\mu$ M y Tri 15 + AS 200  $\mu$ M presentaron valores entre 1,454 y 1,761, los cuales fueron estadísticamente iguales y superiores al testigo relativo (T. Relativo) (2,157).



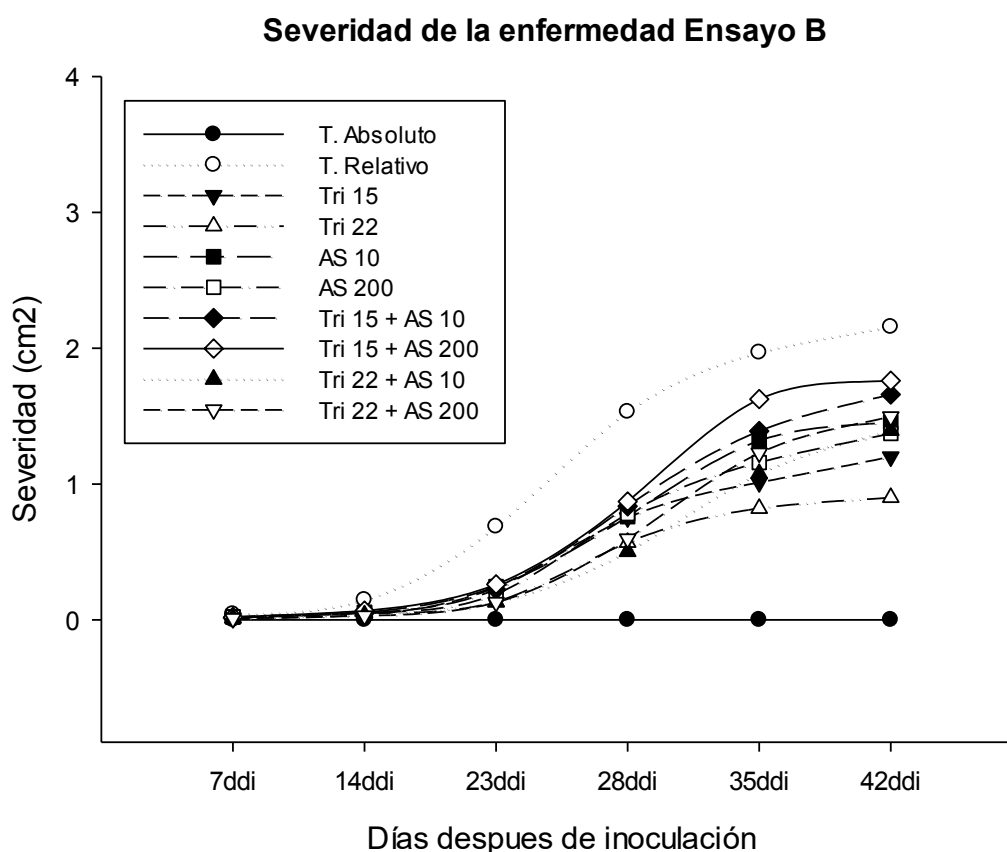
**Figura 3-10.** Severidad de la enfermedad en el ensayo A

**Tabla 3-26.** Datos de severidad de la enfermedad en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos A. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

		Severidad de la enfermedad Ensayo A (cm <sup>2</sup> )							
Trat.	Descripción	7ddi	14ddi	23ddi	28ddi	35ddi	42ddi		
T10	T. Absoluto	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
T11	T. Relativo	0,214 c	0,639 c	1,742 c	3,047 c	3,449 c	3,692 c		
T12	Tri 15	0,068 b	0,182 b	0,506 b	1,122 b	1,285 b	1,370 b		
T13	Tri 22	0,038 ab	0,123 b	0,309 ab	0,764 a	0,885 a	0,920 a		
T14	AS 10 $\mu$ M	0,074 b	0,212 b	0,523 b	1,264 b	1,648 b	1,809 b		
T15	AS 200 $\mu$ M	0,068 b	0,161 b	0,519 b	1,303 b	1,583 b	1,770 b		
T16	Tri 15+AS 10 $\mu$ M	0,068 b	0,159 b	0,598 b	1,620 b	2,069 b	2,248 b		
T17	Tri 15+AS 200 $\mu$ M	0,120 bc	0,321 b	0,861 b	1,833 b	2,273 b	2,444 b		
T18	Tri 22+AS 10 $\mu$ M	0,046 b	0,117 b	0,416 b	1,054 b	1,348 b	1,481 b		
T19	Tri 22+AS 200 $\mu$ M	0,039 b	0,115 ab	0,423 b	1,012 b	1,521 b	1,664 b		

Tri: *Trichoderma* sp.; AS: Ácido salicílico;  $\mu$ M: micromolar

Estos valores son inferiores a los registrados en el ensayo A posiblemente debido a las condiciones climáticas adversas para el patógeno ya que se presentaron temperaturas más altas (inicios del mes de septiembre). Saharan y Mehta (2008) indican que entre los factores que influyen en la severidad de la enfermedad ocasionada por *Sclerotinia* spp. se encuentran, la temperatura del aire y la humedad del suelo.



**Figura 3-11.** Severidad de la enfermedad en el ensayo B.

**Tabla 3-27.** Datos de severidad de la enfermedad en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos en los ensayos B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

		<b>Severidad de la lesión Ensayo B (cm<sup>2</sup>)</b>						
<b>Trat.</b>	<b>Descripción</b>	<b>7ddi</b>	<b>14ddi</b>	<b>23ddi</b>	<b>28ddi</b>	<b>35ddi</b>	<b>42ddi</b>	
<b>T10</b>	T. Absoluto	0,00 a	0,000 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	
<b>T11</b>	T. Relativo	0,04 a	0,147 b	0,68 c	1,53 c	1,96 c	2,15 d	
<b>T12</b>	<i>Tri</i> 15	0,01 a	0,038 a	0,24 b	0,75 b	1,01 b	1,20 b	
<b>T13</b>	<i>Tri</i> 22	0,01 a	0,050 a	0,13 b	0,56 b	0,82 b	0,90 b	
<b>T14</b>	AS 10 $\mu$ M	0,02 a	0,055 a	0,24 b	0,76 b	1,32 b	1,39 bc	
<b>T15</b>	AS 200 $\mu$ M	0,02 a	0,054 a	0,18 b	0,78 b	1,15 b	1,37 b	
<b>T16</b>	<i>Tri</i> 15 + AS 10 $\mu$ M	0,01 a	0,050 a	0,22 b	0,83 b	1,38 bc	1,65 c	
<b>T17</b>	<i>Tri</i> 15 + AS 200 $\mu$ M	0,02 a	0,067 a	0,26 b	0,87 b	1,62 c	1,76 c	
<b>T18</b>	<i>Tri</i> 22 + AS 10 $\mu$ M	0,01 a	0,036 a	0,13 b	0,50 b	1,07 b	1,45 c	
<b>T19</b>	<i>Tri</i> 22 + AS 200 $\mu$ M	0,00 a	0,029 a	0,12 b	0,59 b	1,22 b	1,49 c	

*Tri*: *Trichoderma* sp.; *AS*: Ácido salicílico;  $\mu$ M: micromolar

Los síntomas observados coinciden con reportes de Bolton *et al.* (2006), Subbarao (1998) y Moreno *et al.* (2010), donde las plantas presentaron pérdida de turgencia de hojas externas, amarillamiento y posterior necrosis junto con el desarrollo de micelio color blanco sobre el tejido infectado; al final de las observaciones se evidenció la formación de esclerocios, solo en las plantas con altos valores de severidad, que en su mayoría pertenecientes al testigo relativo. Los valores de la severidad (cobertura y longitud de la lesión) dependen en gran parte del efecto de los diferentes tratamientos en el desarrollo del patógeno sobre el tejido vegetal, que posiblemente están asociados a la generación de resistencia sistémicas adquirida (RSA) o inducida (RSI) teniendo en cuenta las propiedades de cada uno de los tratamientos.

Algunos estudios demuestran que aplicaciones de AS pueden retardar el desarrollo o limitar el avance de la enfermedad debido a la respuesta de resistencia mediada por esta molécula (RSA); Ojaghian *et al.*, (2013) encontraron que aplicaciones de AS sobre zanahorias cosechadas reduce la severidad de la podredumbre ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum*; En su estudio encontraron que AS en dosis de 200, 400 y 600 mg.L<sup>-1</sup> reduce la severidad de la enfermedad significativamente respecto al testigo. Estos autores afirman que los resultados se deben al aumento significativo de las enzimas relacionadas con RSA a lo largo del tiempo, lo que indica que pueden considerarse inductores de resistencia contra la podredumbre. Por otra parte, Yadav *et al.* (2017) encontraron que activadores de resistencia sistémica adquirida (RSA) como azoxistrobina y ácido salicílico que fueron aplicados por aspersión foliar sobre plantas de mostaza (*Brassica juncea* (L.)), lograron reducir la severidad de la enfermedad (podredumbre del tallo ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum*) en un 60,73% y un 49,45% respectivamente. Estos datos demostraron el potencial control de los tratamientos sobre el patógeno *S. sclerotiorum*.

Durante la expresión de RSA hay una inducción coordinada de un conjunto integrado de respuestas de defensa como rigidificación de la pared celular, síntesis de fitoalexinas, y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Pietersen y Van Loon, 2000); Heil, (2000) demostró que los refuerzos en la pared celular (principal respuesta para generar barreras estructurales y bloquear físicamente el avance del patógeno), es un fenómeno que se encuentra influenciada por la presencia y aumento en la concentración

de sustancias como especies oxígeno reactivas (EROs) y de señalizadores tipo peróxido de hidrógeno. Los refuerzos de las paredes celulares se deben a la lignificación de las mismas, por la formación de lignina que ocurre por la polimerización y deshidrogenación de precursores producidos en la vía metabólica de fenilpropanoides (Vance *et al.*, 1980).

La incorporación de lignina en la pared celular fortalece mecánicamente haciéndola más resistente a la degradación enzimática por el patógeno; en el caso de los hongos necrotrofos como *Botrytis cinerea* que hidroliza la pared celular durante su crecimiento, la lignificación de la pared retrasa la difusión de toxinas y enzimas en las células sensibles (Camarena y De la Torre, 2007); Ton y Mauch-Mani (2004) citados por Luna *et al.*, (2011) indica que la aplicación de productos químicos que inducen resistencia (ej; ácido salicílico (AS), el ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotioico S-metil éster y el aminoácido no proteico  $\beta$ -amino ácido butírico) pueden aumentar las deposiciones de calosa. Afirmaciones que pueden explicar parte de los resultados de esta investigación, ya que en las plantas tratadas con AS (10 y 200  $\mu$ M) presentaron una disminución significativa de la severidad en comparación del testigo relativo; es necesario cooreborar la esta información con estudios histológicos para demostrar dicho evento.

En el caso específico del hongo antagonista, Vos *et al.*, (2014) observaron que cuando este hongo (*Trichoderma*) se separó físicamente del patógeno, la reducción en la severidad del daño ocasionado por *Botrytis cinerea* corresponde a la respuesta de resistencia sistémica indirecta en la planta (resistencia sistémica inducida – RSI). Studholme *et al.* (2013) demostraron que una cepa de *Trichoderma hamatum* (GD12) promueve protección biológica contra las enfermedades pre y posemergencia de las plántulas de lechuga causados *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*, posiblemente a la acción de micoparasitismo y a la activación de defensa en las plantas, sin embargo, también se han descrito respuestas de tipo RSA causadas por *Trichoderma* sp. (Tucci *et al.*, 2011). Por otro lado, Pinto da Silva (2019) concluyen en su estudio que, todos los aislados de *Trichoderma* spp. usados en la experimentación, redujeron la severidad del daño ocasionado por *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga. Observaciones que coinciden con los resultados de esta investigación, donde los aislados Tri 15 y Tri 22 fueron los que presentaron menores valores de severidad, siendo el aislado Tri 22

superior estadísticamente al resto de los tratamientos al presentar el menos valor en severidad en el ensayo A.

Esto indica que los refuerzos de las paredes mediados por AS dentro de la respuesta sistémica adquirida son de vital importancia para confinar a *Trichoderma* a las capas más externas de la raíz, lo cual posiblemente retrasaría de igual manera el avance del patógeno, ya que se ha demostrado que la síntesis de calosa es necesaria para incrementar la resistencia de las células vegetales al ataque de patógenos (Ellinger y Voigt, 2014).

Para el caso de las aplicaciones combinadas de AS y *Trichoderma* spp., en este estudio se evidencia que dichas aplicaciones no fueron tan eficientes en la reducción de las lesiones en comparación a la aplicación individual de *Trichoderma* sp., además que fueron iguales estadísticamente a las aplicaciones de AS independientes en el ensayo A, mientras que para el ensayo B, sus valores presentaron un comportamiento intermedio, siendo superiores al testigo absoluto, pero con menor control en el avance de la enfermedad (valores altos de severidad respecto a los demás tratamientos AS y *Trichoderma* spp.): Martínez *et al.*, (2013b) indica que la respuesta de *Trichoderma* varía en dependencia de las combinaciones especie/cepa de microorganismos y productos fitosanitarios evaluados, lo que puede explicar la diferencia del efecto en la severidad de las dos cepas de *Trichoderma* sp. evaluadas.

Los resultados de esta investigación resultan promisorios, pero es necesario profundizar en los diferentes mecanismos de defensa impulsados por estos métodos (AS, *Trichoderma* spp. y su combinación) e identificar y establecer el tipo de relación (sinergia, antagonismo y neutra) se genera en este patosistema.

#### 4.6 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE): Ensayos A y B

Se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p\text{-value} < 0,05$ ) para los ensayos A y B (Anexo 3-6 y 3-7). Según la prueba Tukey, quien presentó el valor más alto en los ensayos A y B fue el testigo relativo con valores de 74,178 y 36,824 respectivamente (Tabla 3-6) (Fig. 3-7). En el ensayo A se puede observar, en términos generales, que el tratamiento *Trichoderma* sp. cepa 22 (T13) fue superior



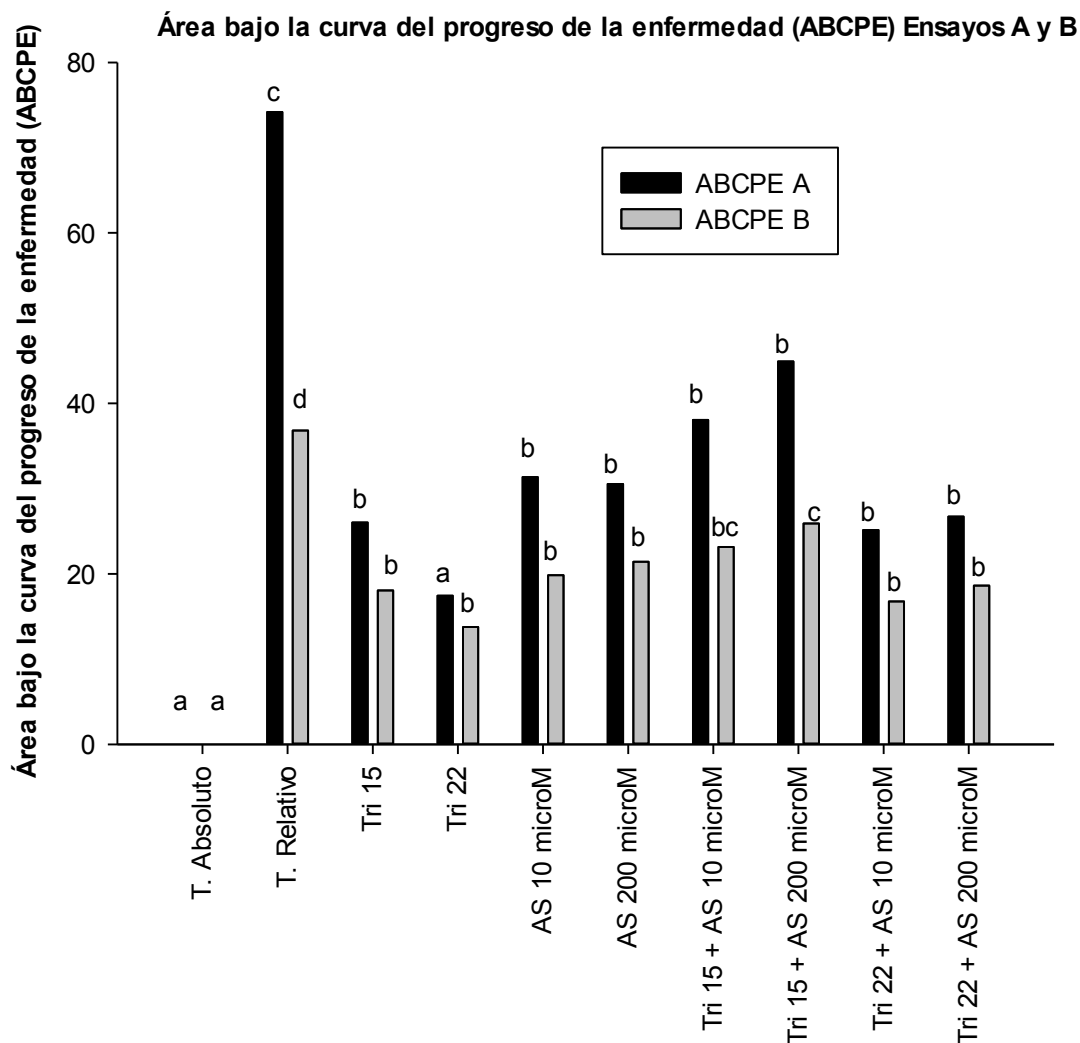
estadísticamente junto con el testigo absoluto, seguido por las mezclas de *Trichoderma* sp. cepa 22 con AS 10  $\mu$ M y 200  $\mu$ M (T18 y T19), *Trichoderma* sp. cepa 15 (T14), las aplicaciones de AS (10  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) (T14 y T15) y las combinaciones de *Trichoderma* sp. cepa 15 con 10  $\mu$ M y 200  $\mu$ M (T16 y T17), todos estos iguales estadísticamente. Por último, se encuentra el tratamiento testigo absoluto. En el ensayo B, los tratamientos se comportaron de manera similar distribuyéndose casi de la misma manera; la diferencia radicó en que ningún tratamiento superó el valor de 40 (Tabla 3-5) (Fig. 3-7) y que la prueba Tukey arrojó 4 agrupamientos (Anexo 3-7); i) testigo absoluto (T10)(0), ii) T13(13,760), T18(16,772), T12(17,904), T19(18,614), T15(19,519), T14(21,222), T16(22,660), iii) T17 (25,302) y finalmente iv) T11(36,824).

**Tabla 3-28.** Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra, para cada ensayo, representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)				
Tratamiento	Descripción	ABCPE Ensayo A	ABCPE Ensayo B	
<b>T10</b>	T. Absoluto	0,000	a	0,000 a
<b>T11</b>	T. Relativo	74,178	c	36,824 d
<b>T12</b>	<i>Tri</i> 15	26,028	b	17,904 b
<b>T13</b>	<i>Tri</i> 22	17,439	a	13,760 b
<b>T14</b>	AS 10 $\mu$ M	31,362	b	21,222 b
<b>T15</b>	AS 200 $\mu$ M	30,533	b	19,519 b
<b>T16</b>	<i>Tri</i> 15 + AS 10 $\mu$ M	38,048	b	22,660 bc
<b>T17</b>	<i>Tri</i> 15 + AS 200 $\mu$ M	44,930	b	25,302 c
<b>T18</b>	<i>Tri</i> 22 + AS 10 $\mu$ M	25,150	b	16,772 b
<b>T19</b>	<i>Tri</i> 22 + AS 200 $\mu$ M	26,730	b	18,614 b

*Tri*: *Trichoderma* sp.; *AS*: Ácido salicílico;  $\mu$ M: micromolar

De acuerdo con Van Loon *et al.* (1998) la activación rápida de algunos de los mecanismos de defensa puede retrasar la colonización del tejido vegetal por parte del patógeno y/o disminuir el avance de la enfermedad, lo cual se puede asociar al efecto cebado o “priming” de los diferentes tratamientos que se ve reflejado en las diferencias entre los valores del área bajo a curva del progreso de la enfermedad (ABCPE).



**Figura 3-12.** Área bajo la curva del progreso de la enfermedad de las plantas sometidas a los tratamientos del 1 al 9 en los ensayos A y B. Agrupamientos con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según prueba Tukey.

Este proceso de condicionamiento, priming o cebado de defensa es un estado fisiológico que puede ser inducido por patrones moleculares de microorganismos (MAMP's), efectores derivados de patógenos, microorganismos beneficiosos (ej. bacterias promotoras de crecimiento, micorriza, *Trichoderma* sp., entre otros) y tratamiento con algunos compuestos naturales o sintéticos (ácido salicílico, jasmónico, etc.) (Conrath, 2009). Del mismo modo Ward (1991), afirma que AS actúa como cebador de las plantas para una mejor inducción de la defensa dentro de la resistencia sistémica adquirida (RSA), ya que activa directamente la expresión de genes que codifican proteínas PR con actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que las plantas cebadas muestran una rápida

y/o fuerte activación de las respuestas de defensa cuando son desafiadas posteriormente por microorganismo patógenos, insectos o estrés abiótico, las cuales están comúnmente relacionadas con la inmunidad local y sistémica y la tolerancia al estrés (Conrath, 2011).

Katz *et al.* (1998) trabajaron con plantas de *Petroselinum crispum* L. y tratamientos con benzothiadiazole y ácido salicílico y encontraron que con bajas concentraciones de los inductores hay una potenciación de genes de defensa dependiente de AS. Estos mismos autores, indican que las respuestas varían de acuerdo a la especie vegetal; por ejemplo, se necesitó más de 500  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico para activar la PAL en *Petroselinum crispum* L, mientras que tan solo 10  $\mu\text{M}$  de este mismo inductor (AS) potenciaron en gran medida la activación de este mismo gen en plantas de *Vigna unguiculata* L. Estos resultados demuestran que aplicaciones exógenas de AS pueden cebar o condicionar las plantas para la inducción potenciada de ciertos genes de defensa, dependiendo de la dosis y material vegetal usado. En este ensayo, las dosis de AS empleadas no mostraron diferencias significativas entre sí para la variable ABCPE en ambos ensayos (A y B), registrando valores iguales estadísticamente, pero fueron menores al tratamiento testigo relativo.

En cuanto a la participación de organismo benéficos en el proceso de primming o cebado, Van Peer *et al.* (1991) encontraron que las plantas de clavel desarrollan una capacidad defensiva mejorada contra *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi después de la colonización de las raíces por la cepa no patogénica *Pseudomonas fluorescens* WCS417, donde antes de la inoculación del patógeno, no se pudo detectar un aumento en los niveles de fitoalexina en las plantas cebadas (colonizadas por la bacteria) y no cebadas (sin la bacteria), pero después de la inoculación con *F. oxysporum* f.sp. dianthi, los niveles de fitoalexina aumentaron significativamente más rápido en las plantas cebadas, junto con un rápido reforzamiento con calosa en los sitios de penetración de hongos.

Para el caso de *Trichoderma* sp., Martínez *et al.* (2013b) encontraron que la colonización de las raíces de tomate por *T. harzianum* dio como resultado el cebado de los tejidos vegetales, el cual permitió un aumento en la expresión génica sensible a AJ, donde las plantas tratadas con el antagonista mostraron una inducción de genes de

resistencia relativamente débil antes de la infección por *Botrytis cinerea*, lo que apunta a la sensibilización de las respuestas de defensa dependientes de AJ como el mecanismo subyacente a la inducción de resistencia contra este patógeno. Esto podría explicar la eficiencia en el control de *S. sclerotiorum* por parte de la cepa 22 de *Trichoderma* sp., que fue el que presentó los menores valores para la variable ABCPE en el ensayo A cuando fue aplicado de forma individual.

Vale la pena resaltar que la base molecular del cebado celular no está clara para RSI, Conrath (2002) plantea la hipótesis de que, durante el cebado, podría haber un aumento en la cantidad de componentes celulares con funciones importantes en la señalización de respuesta de defensa, posiblemente incluyendo ciertos factores de transcripción. La mayor presencia de componentes de señalización celular podría conducir a una respuesta acelerada y mejorada cuando las células son desafiadas por un segundo estímulo de estrés.

## 5. BIBLIOGRAFIA

**Adams, P. y W. Ayers. 1979.** Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopathol. Vol. 69. No. 8: 896-898 pp.

**Agrios, G. 2002.** Fitopatología. Editorial Limusa-Noriega. México. 35 - 36, 53 - 54 y 384 – 386 pp.

**Akbudak, N y Basay, S. 2013.** The Elicitor Response in Lettuce. International Conference on Agriculture and Biotechnology IPCBEE. Vol. 60. IACSIT Press, Singapore. 5 p.

**Alcalá A., Fenandez, N y Aguirre, C. 2006.** Respuesta del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) a la fertilización nitrogenada. 4p. Disponible [en línea]: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/05-Agrarias/A-083.pdf>. Consultado Febrero 2016.

**Al-Saleh, M., Saleh, A., y Ibrahim. Y. 2016.** Integration of *Pseudomonas fluorescens* and salicylic acid improves citrus canker disease management caused by *Xanthomonas citri* subsp *citri*-A. Archives of Phytopathology and Plant Protection, Vol. 4: 863-872 pp.

**An, C. y Mou, Z. 2011.** Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. Journal of Integrative Plant Biology 2011, Vol. 53. No. 6: 412–428 pp.

**Arias, L., Tautiva, L., Piedrahíta, W., y Chaves, B. 2007.** Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia spp.* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). Agronomía Colombiana, 25(1), 131-141. Disponible [en line]: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99652007000100015&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652007000100015&lng=en&tlng=es). Consultado Febrero 2016.

**Ávila, C. y Velandia, J. 1992.** Enfermedades de Algunas Especies hortícolas y su Manejo. Pp. 101 - 103 en: MUÑOZ, H. & SILVA, C. Eds. Primer Curso Nacional de

Hortalizas de Clima Frío. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Tibaitatá. Mosquera (Cundinamarca).

**Ávila, C.; J. Velandia y A. López. 1996.** Enfermedades de algunas especies hortícolas y su manejo. 93-116 pp. En: Memorias Primer Curso Nacional de Hortalizas de Clima Frío. ICA, Mosquera, Colombia.

**Ávila-Miranda, M. E., A. Herrera-Estrella, and J. J. Peña-Cabriales. 2006.** Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 38: 1823-1830.

**Barnett, H y Hunter, B. 1972.** Illustrated genera of imperfect fungi, Third Edition. Burgess Publishing Company. 241 pp.

**Bolton, M., Thomma, B. and Nelson, B. 2006.** Pathogen Profile *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology.* Vol. 7. No. 1: 1–16 pp.

**Brotman, Y., Landau, I., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A., Chet, A., Viterbo, A., y Willmitzer, J. 2013.** *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. *PLOS Pathogens.* Vol. 9. No. 3: 15 p.

**Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. y Chet, I. 2008.** Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* Vol. 147: 779–789. pp

**Camarena. G y De la Torre, A. 2007.** Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* Vol. 13. No. 2: 157-162 pp.

**Campbell, C. y Madden LV. 1990.** Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 532 p

**Chabur, M. 2012.** Evaluación del efecto de liofilizado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) en las poblaciones microbianas de suelo como estrategia de manejo de rizoctonias en cultivo de papa. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias – Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Departamento de Química Bogotá, Colombia. 121 p.

**Chen, L. L., Yang, X., Raza, W., Li, J., Liu, Y., Qiu, M., Zhang, F. & Shen, Q. 2011.** *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 89: 1653–1663 pp.

**Choudhary, V., Prasad, L. y Mishra, P. 2012.** Standardization of Inoculation Techniques of *Sclerotinia Sclerotiorum* on its Host. Progressive Agriculture. Vol. 12. No. 1: 191-193 pp.

**Conrath, U. 2002.** Priming in plant–pathogen interactions. TRENDS in Plant Science Vol.7 No.5.

**Conrath, U. 2009.** Priming of induced plant defence responses. In Advances in Botanical Research (Van Loon, L.C., ed.). 361–395 pp.

**Conrath, U. 2011.** Molecular aspects of defence priming. 4 Trends in Plant Science .Vol. 16. No. 10: 524-531 pp.

**Contreras, H.A., L. Macías-Rodríguez, C. Cortés-Penagos and J. López-Bucio. 2009.** *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. Plant Physiology. Vol 149: 1579–1592 pp.

**Cummings, N., Ambrose, A., Braithwaite, M., Bissett, J., Roslan, H., Abdullah, J., Stewart, S., Agbayani, F., Steyaert, J. y Hill, R. 2016.** Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. *Mycol Progress*. Vol. 15. No. 50: 14 p.

**Defilipis, C., Pariani, S,m Jimenez, A y Bouzo, C. 2008.** Respuesta al riego de lechuga (*Lactuca sativa* L) cultivada en invernadero. 8 p. Disponible [en línea]: [http://www.riegoyfertirriego.com.ar/III\\_Jornadas/Trabajospresentados/Defilipis.pdf](http://www.riegoyfertirriego.com.ar/III_Jornadas/Trabajospresentados/Defilipis.pdf). Consulta Febrero 2016.

**El-Khalla, S., Hathout, T., El Raheim, A., Ahsour, A., Abd-Almalik, A., y Brassinolide, F. 2009.** Salicylic acid induced antioxidant enzymes, hormonal balance and protein profile of maize plants grown under salt stress. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. Vol. 5. No. 4: 391-402 pp

**Ellinger D, y Voigt C. 2014.** Callose biosynthesis in Arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Ann Bot*. Vol. 114. No. 6. 1349-1358 pp.

**Elwakil, M., El-Metwally, M., Elsherbiny, A. y Eisa, K. 2015.** Enhancing Systemic Acquired Resistance in Cucumber to Control Root Rot and Wilt Diseases with Reference to Yield and Quality. *Plant Pathology Journal* Vol. 14. No. 4. 223-233 pp.

**Ferreira, S. y R. Boyle. 1992.** *Sclerotinia*. University of Hawaii at Manoa. Disponible [en línea]: [http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s\\_scler.htm](http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s_scler.htm); Consulta Febrero 2016.

**García, H., Núñez, S., Romero, C., González, E., Gabino, N. y Martínez, R. 2012.** Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp de suelos hortícolas del valle de toluca, como biocontrol potencial de *Sclerotinia*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Vol. 15: 357–365 pp.

**Geeta, D., Aswathanarayana, M., Naik, M., Kengana, M., Kuchanur, P., y Beladadi, R. 2018.** Positive Role of Salicylic Acid and *Trichoderma* on the



Enhancement of Systemic Acquired Resistance (SAR) and Induced Systemic Resistance (ISR) in Maize – *Exserohilum turcicum* Pathosystem under Greenhouse Condition. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* Vol. 7. No. 10: 1509-1522 pp.

**Gil, R., Smith, A., Chaves, B., Wyckhuys, K., Forero, C. y Jiménez, J. 2009.** **Combined** efficacy assessment of soil solarization and bio-fungicides for management of *Sclerotinia* spp. in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agronomía Colombiana.* Vol. 27. No. 2. 193-201 pp.

**Gomi K, Ogawa D, Katou S, Kamada H, Nakajima N, Saji H. 2005.** A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant Cell Physiol.* Vol. 46. No. 12: 1902-1914 pp.

**Gonzalez, I., Infante, D., Arias, Y., Gorrita, S., Hernández, T., De la noval, B., Martinez, B. y Peteira, B. 2019b.** Efecto de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre indicadores de crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar BAT-304. *Rev. Protección Veg.* Vol.34 No.2.

**González, C., Domínguez, B., y García, R. 2019b.** *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal.* Vol. 19. No. 4. 237-248 pp.

**Gravel V., Antoun H. y Tweddell R.J. 2007.** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil. Biol. Biochem.* Vol. 39: 1968-1977pp.

**Gutiérrez, M.A., Trejo C., y A. Larqué. 1998.** Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 36: 563-565 pp.

**Habibi, G.y Vazir, A. 2017.** High salicylic acid concentration alters the electron flow associated with photosystem II in barley. *Acta agriculturae Slovenica* . No. 109. 393 – 402 pp.

**Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., y Chet, I. 2004.** *Trichoderma* spp.— Opportunistic avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* Vol. 2: 43-56 pp.

**Harman, G.E. 2006.** Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. Vol. 96: 190–194 pp.

**Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B., Ahmad, A., 2005.** Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agron. Hung.* Vol. 53: 433–437 pp.

**Heil M. 2000.** The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 107: 137- 146 pp.

**Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I y Monte, E. 2012.** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* Vol. 158: 17–25 pp.

**Herrera, F. 1995.** La solarización en costa rica. En. Taller "Solarización Del Suelo" . Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano", Honduras. División de Producción y Protección Vegetal Organización de la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas FAO, Roma. 53 p.

**Hoitink, H., Madden, L., Dorrance. A. 2006.** Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology*. Vol. 96. 186-189 pp.

**Hoyos, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I. y Orduz, S. 2008.** Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*. Vol. 26. No. 3: 451-458 pp.

**Ibarra, V., Ferrera, R., Alarcon, A., y Lara, M. 2010.** Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Rev. Mex. Mic.* Vol. 31: 53-63 pp.

**Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC). 2002.** Censo Nacional Agropecuario. [http://www.indec.gov.ar/default\\_cna2002.htm](http://www.indec.gov.ar/default_cna2002.htm). Consultado Marzo 2015.

**Infante, D, Martínez, B, González, N, y Reyes, Yusimy. 2009.** Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. Vol. 24. No. 1: 14-21 pp.

**Jackson, L.; Mayberry, K.; Laemmlen, F.; Koike, S.; Schulbach, K.; Chaney, W. 1999.** La producción de lechuga de hoja en California, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 7216 Spanish, Oakland, California, USA.

**Jaimes, Y., Moreno, C., Cotes, A. 2009.** Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* th003. *Acta biol. Colomb.* Vol. 14. No.3. 111-120 pp.

**Jamal, F., Uddin, H., Ahmad, M.R., Hasan, S. Mahbuba, y Roni, A. 2016.** Effects of *Trichoderma* spp. on growth and yield characters of BARI Tomato-14. *Int. J. Bus. Soc. Sci. Res.* Vol. 4. No. 2: 117-122 pp.

**Jiménez, M., Asdrubal, A., Ulacio, D., y Hernández, A. 2012.** Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) bajo Condiciones de campo. *Journal of the Selva Andina Research Society*. Vol. 3. No. 1: 14-25 pp.

**Jiménez, M., Arcia, A, Dilcia, U., Hernández, A. 2012.** Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición

blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) bajo Condiciones de campo Journal of the Selva Andina Research Society. Vol. 3. No. 1. 14-25 pp.

**Kamal, M. Abo-Elyousr, A., Hashem, E. 2009.** Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. Crop Protection. Vol. 28: 295–301 pp.

**Katz, V., Thulke, OU., y Conrath U. 1998.** A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. Plant Physiol. Vol. 117: 1333–1339 pp.

**Kunkel, B y Brooks, D. 2002.** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology. Vol. 5. No. 4: 325-331 pp.

**León, B., Ortiz, N., Condori, N., Chura, E. 2018.** Cepas de *Trichoderma* con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua. Revista de Investigaciones Altoandinas. Vol. 20. No. 1. 19-30 pp.

**López, R; V, Camacho; M, Gutiérrez. 1998.** Aplicación de ácido salicílico para incrementar el rendimiento agronómico en tres variedades de trigo. Terra Latinoamericana. Vol. 16. No. 1: 43-48 pp.

**Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch, B., Ton, J. 2011.** Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. MPMI. Vol. 24. No. 2: 183–193 pp.

**Lynch J.M., Wilson K.L., Ousley M.A. y Whipps J.M. 1991.** Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. Lett. Appl. Microbiol. Vol. 12: 59-61 pp.

**Martín M.; Herrera T. y Larque S. 2004.** Incremento del rendimiento de papaya maradol por el efecto de salicilatos. Rev. Chapingo serie Horticultura Vol. 5 No. 8: 45-49 pp.

**Martínez, B., Infante, D., y Reyes, Y. 2013a.** *Trichoderma* spp. and their role in the control of crop pests. Rev. Protección Veg. vol.28 no.1

**Martínez, A., Fernández, I., Sanchez, M., Jung, S., Pascual, J., y Pozo, M. 2013b.** Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. Front Plant Sci. Vol. 24. No. 4: 206 p.

**Masunaka, A., Hyakumachi, M. y Takenaka, S. 2011.** Plant growthpromoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. Microbes Environ. Vol. 26. 128–134 pp.

**Moharekar, S., Lokhande, S., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A. y Chavan, P. 2003.** Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. Photosynthetica. Vol. 41. No. 2: 315-317 pp.

**Moya, P. 2016.** Antagonismo y efecto biocontrolador de *Trichoderma* spp. sobre *Drechslera teres*, agente causal de la "mancha en red" de la cebada (*Hordeum vulgare* L. var. *vulgare*). Tesis de grado para optar al grado de Doctor. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. 158 p.

**Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006.** The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiol. Vol. 140: 249–262 pp.

**McCune, B. y Grace, J. 2002.** Analysis of Ecological Communities. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, USA (www.pcord.com) 304 p.

**MClean, K.; Swaminathan, J.; Frampton, C.; Hunt, J.; Ridgway, H. y Stewart, A. 2005.** Effect of Formulation on the Rhizosphere Competence and Biocontrol Ability of *Trichoderma atroviride* C52. Plant Pathology Vol. 54: 212 – 218 pp.

**Mecatti, L., Domingues, E., De Moura, K., Harakava, R., y Rodrigues, F. 2016.** Selection of *Trichoderma* isolates for biological control of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* in lettuce. *Summa Phytopathol., Botucatu*. Vol. 42. No. 3: 216-221 pp.

**Mónaco, C., Stocco, M., Lampugnani, G., Abramoff, C., Kripelz, N., Cordo, C. 2015.** Capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. sobre la manifestación de la septoriosis del trigo. Disponible [en línea]: file:///D:/Downloads/10635-28024-1-SM%20(1).pdf. Consultado Febrero 2016.

**Moreno, C.A. y Cotes. A.M. (Eds.) 2010.** Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*). CORPOICA. Bogotá, Colombia. 94 p.

**Morris, S.W. Vernooij, B. Titatarn, S. Starrett, M. Thomas, S. Curtis, C.W. Frederiksen, R.A. Bhandhufalck, A. Hulbert, S. y S. Uknes. 2000.** Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 11: 643–652 pp.

**Mur, L., Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006.** The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol*. Vol. 140: 249–262 pp.

**Nawrocka, J. y Malolepsza, U. 2013.** Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*. Vol. 67: 149–156 pp.

**Ojaghian, M., Abdlwareth A. Almoneafy, Z., Guan, X., Zhang, J., Changlin, C. y Li, B. 2013.** Application of acetyl salicylic acid and chemically different chitosans against storage carrot rot. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 84: 51–60 pp.

**Pérez, E. 2014.** Estudio de la ruta de shikimato en *Trichoderma parareesei*, su papel en el antagonismo del hongo y en las relaciones que establece con la planta. Tesis de grado para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Centro hispano luso de

investigaciones agrarias departamento de microbiología y genética. Universidad de Salamanca. 197 p.

**Pérez, S., Piedrahíta, W., Arbeláez, G. 2009.** Patogénesis de la pudrición blanda de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Sabana de Bogotá causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Una revisión. Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas. Vol. 3. No.2: 262-274 pp.

**Pietersen, C. y Van Loon, L. 2000.** Salicylic acid-independent plant defence pathways. Cell press. Vol. 4. No. 2: 52-58 pp

**Pinto da Silva G., Heckler, L., Durigon. M., Dos Santos, R., Lovato, M., Finger, G., Blume, E. 2019.** Biological control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in lettuce using Brazilian *Trichoderma* spp. strains. Australian Journal of Crop Science. Vol. 13. No. 06. 803-809 pp

**Poveda, J. 2018.** Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma-Brassicaceae*. Tesis doctoral. Departamento de botánica y fisiología vegetal área: fisiología vegetal. Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias. Unisidad de Salamanca. 212 p.

**Rabeendran, N., Jones, E., Moot, D. y Stewart, A. 2006.** Biocontrol of Sclerotinia lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. Biological Control. Vol. 39. No. 3: 352-362 pp.

**Rajoy, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D. 2006.** Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. Plant Physiology Vol. 141. 910-923 pp.

**Ramírez A, Poveda J, Martín I, Hermosa R, Monte E, Nicolás C. 2014.** Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. Mol Plant Pathol. Vol. 15: 823-831 pp.

**Raskin, I. 1992.** Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Vol. 43: 439–463 pp.

**Ren, L., Li, G., Han, Y., Jiang, D., y Huang, H. 2007.** Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minitans* and its effects on production and activity of b-1,3-glucanase of this mycoparasite. *Biol. Control* Vol. 43. No. 1: 1-11 pp.

**Rivera, W., Brenes, J., y Zúñiga, C. 2017.** Efectos de la aplicación de *Trichoderma asperellum* y su filtrado en el crecimiento de almácigos de cebolla (*Allium cepa*). *Tecnología en Marcha.* Vol. 31. No. 02. 98-105 pp.

**Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra` , D., Woo, S. L. y Lorito, M. 2009.** Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol Plant Microbe Interact.* Vol. 22: 291–301 pp.

**Sainz, R. y Echeverría, H. 1998.** Relación entre las lecturas del medidor de clorofila (Minolta SPAD 502) en distintos estadios del ciclo del cultivo de maíz y el rendimiento en grano. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata.* Vol. 103. No. 1: 8pp.

**Saharan, G. y Mehta, N. 2008.** *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. Softcover reprint of hardcover 1st ed. 531 p.

**Samolski I, Rincón AM, Pinzón LM, Viterbo A, Monte E. 2012.** The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* Vol. 158: 129-138 pp.

**Sánchez E.; Barrera R.; Muños E.; Ojeda D. L. y Anchondo A. 2011.** Efecto del ácido salicílico sobre la biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. *Rev. Chapingo serie. Horticultura.* Vol. 17. No. 1: 63-68 pp.



**Sánchez, G., Castro, El., Beltran, E., Reyes de la Cruz, H. y Garcia, E. 2010.** El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Biológicas Vol. 12. No. 2: 90 – 95 pp.

**Stazonelli, A., Yasem M. y Ploper L.D. 2017.** Capacidad antagónica in vivo de cepas nativas de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* en plantines de lechuga. Libro de Resúmenes. 4° Congreso Argentino de Fitopatología. Asociación argentina de fitopatólogos. Mendoza, Argentina. 480 p.

**Shaner, G., Finney, R. 1977.** The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology. Vol. 67. 1051–1056 pp.

**Shi, Y., Lou, K. y Li, C. 2009.** Promotion of plant growth by phytohormone producing endophytic microbes of sugar beet. Biol Fertil Soils. Vol. 45. 645-653 pp.

**Shoresh M., Yedidia, I., y Chet, I. 2005.** Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. Phytopathology Vol. 95. No. 1: 76-84 pp.

**Smith, D. 2004.** Biology and Epidemiology of *Sclerotinia minor* on Peanut (*Arachis hypogaea* L.). M.Sc. Plant Pathology Thesis. North Carolina State University. Graduate Faculty. Raleigh, USA. 1 - 3 y 7 – 71 pp.

**Sriram, S., Manasa, S., y Savitha, M. 2009.** Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. J. Biol. Control, Vol. 23. No. 4. 449–456 pp.

**Studholme, D. J., Harris, B., Le Cocq, K., Winsbury, R., Perera, V., Ryder, L., y Grant, M. 2013.** Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture—insights from genomics. Frontiers in Plant Science. Vol. 4: 258 p.

**Subbarao, K. 1998.** Progress Toward Integrated Management of Lettuce Drop. Plant Disease Vol. 82: 1068 – 1078 pp.

**Tortarolo, G. A. 1998.** Cultivo de la lechuga. Ensayo Experimental - Informe técnico. E.E.A. del I.N.T.A. - Colonia Benítez - Chaco. 4 p.

**Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M. & Lorito, M. 2011.** The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. Mol Plant Pathol. Vol 12: 341–354 pp.

**Uzunova, A. N., y Popova, L. P. 2000.** Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. Photosynthetica. Vol. 38: 243–250pp.

**Van Loon LC, Bakker PA, y Pieterse CM. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. Vol. 36: 453–483 pp.

**Van Peer, R Niemman, G., y Schippers, B. 1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. Phytopathology. Vol. 81: 728–734 pp.

**Vance, c. P.; kirk, T. K.; y Sherwood, R. T. 1980.** Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology. Vol. 18: 259-288 pp.

**Vidal S, Ponce de Leon I, Denecke y J,Palva. 1997.** ET: Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. Plant J. Vol. 11: 115-123 pp.

**Viglianichino, L. y Huarte, D. 2014.** Ficha técnica para el cultivo de LECHUGA. Insecticidas/nematicidas/acaricidas, herbicidas, fungicidas, aprobados para su uso. Disponible [en línea]: [https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_lechuga\\_3.pdf](https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_lechuga_3.pdf). Consultado Diciembre 2018.

**Viterbo, A. y Chet, I. 2006.** TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* Vol. 7: 249–258 pp.

**Viteri, M., Ghezán, G., Iglesias D. 2013.** Tomate y lechuga: producción, comercialización y consumo. Proyecto Específico AEES 302421: Economía de las Cadenas Agroalimentarias y Agroindustriales. Estudio Socioeconomico De Los Sistemas Agroalimentarios Y Agroindustriales. Área Estratégica de Economía y Sociología Proyecto Propio de la Red Competitividad de las Cadenas Agroalimentarias y Agroindustriales Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria (INTA). ISSN1852-4605.

**Vlot, C., Amick, D., Dempsey, D., y Klessig, D. 2009.** Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol. 47: 177-206 pp.

**Vos, C., De Cremer, M., Cammue, K., y De Coninck, B. 2014.** The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology.* Vol. 16. No. 4. 400–412 pp.

**Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X. 2007.** Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* Vol. 17: 1784–1790 pp.

**Ward, E., Uknes, S., Williams, S., Dincher, S., Wiederhold, D., Alexander, D., Ahl-Goy, P., Metraux, J., y Ryals, J. 1991.** Coordinated gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell.* Vol. 3. No. 10: 1085–1094 pp.

**White R. 1979.** Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus. *Virology.* Vol. 99: 410-412 pp.

**Yadav, A., Ghasolia, R., Yadav. S. y Yadav, V. 2017.** To elicit systemic acquired resistance by chemical inducers against *Sclerotinia sclerotiorum*. (Lib.) de Bary. *International Journal of Chemical Studies.* Vol. 5. No. 4: 1551-1553 pp.

**Zehra, A., Meena, M., Dubey, M. K., Aamir, M., y Upadhyay, R. S. 2017.** Synergistic effects of plant defense elicitors and *Trichoderma harzianum* on enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against Fusarium wilt disease. Bot Stud. Vol. 58. No. 2: 44 p.

**Zhu, F., Xi, De., X,u, Fe., Zhang, D., y Lin, H. 2014.** Salicylic Acid and Jasmonic Acid Are Essential for Systemic Resistance Against *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. MPMI Vol. 27. No. 6: 567–577pp.

## 6. ANEXOS

### 6.1 Anexo 3-1. Anova y prueba Tukey para las variables Peso fresco (PF) y seco (PS) de hojas (Rendimiento): Ensayos A y B

Univariate Results for Each DV (Ensayo A)									
Sigma-restricted parameterization									
Effective hypothesis decomposition									
Effect	Degr. of Freedom	PFresco SS	PFresco MS	PFresco F	PFresco p	PSeco SS	PSeco MS	PSeco F	PSeco p
Intercept	1	128429,3	128429,3	45354,58	0,000000	1864,955	1864,955	5898,042	0,000000
Tratamiento	8	314,7	39,3	13,89	0,000000	6,950	0,869	2,748	0,979858
Error	81	229,4	2,8			25,612	0,316		
Total	89	544,1				32,562			

Univariate Results for Each DV (Ensayo B)									
Sigma-restricted parameterization									
Effective hypothesis decomposition									
Effect	Degr. of Freedom	PFresco SS	PFresco MS	PFresco F	PFresco p	PSeco SS	PSeco MS	PSeco F	PSeco p
Intercept	1	71707,50	71707,50	44028,65	0,000000	1065,800	1065,800	17755,11	0,000000
Tratamiento	8	503,65	62,96	38,66	0,000000	0,849	0,106	1,77	0,116234
Error	36	58,63	1,63			2,161	0,060		
Total	44	562,29				3,010			

Tukey HSD test; variable PFresco (Ensayo A)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 2,8317, df = 81,000				
Cell No.	Tratamiento	PFresco Mean	1	2 3
7	Th15 + AS 200µM	34,40000		****
6	Th15 + AS 10µM	36,60000	****	****
9	Th22 + AS 200µM	36,65500	****	****
8	Th22 + AS 10µM	36,90000	****	
2	Th15	37,60000	****	
1	T. Absoluto	38,40000	****	
4	AS 10µM	38,67000	****	
3	Th22	39,40000		****
5	AS 200µM	41,35500		****

Tukey HSD test; variable PSeco (Ensayo A)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = ,31620, df = 81,000			
Cell No.	Tratamiento	PSeco Mean	1
7	Th15 + AS 200µM	4,223245	****
6	Th15 + AS 10µM	4,227970	****
9	Th22 + AS 200µM	4,242360	****
8	Th22 + AS 10µM	4,376077	****
1	T. Absoluto	4,514803	****
2	Th15	4,790029	****
3	Th22	4,825840	****
5	AS 200µM	4,860121	****
4	AS 10µM	4,908565	****

Tukey HSD test; variable PFresco (Ensayo B)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 1,6287, df = 36,000				
Cell No.	Tratamiento	PFresco Mean	1	2 3
6	Th15 + AS 10µM	35,67000		****
7	Th15 + AS 200µM	36,28600		****
2	Th15	38,07200	****	****
8	Th22 + AS 10µM	38,12000	****	****
9	Th22 + AS 200µM	39,52000	****	
1	T. Absoluto	40,02000	****	
4	AS 10µM	40,68000	****	
3	Th22	44,78000		****
5	AS 200µM	46,12000		****

Tukey HSD test; variable PSeco (Ensayo B)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = ,06003, df = 36,000			
Cell No.	Tratamiento	PSeco Mean	1
6	Th15 + AS 10µM	4,630000	****
7	Th15 + AS 200µM	4,770000	****
1	T. Absoluto	4,800000	****
4	AS 10µM	4,830000	****
9	Th22 + AS 200µM	4,830000	****
8	Th22 + AS 10µM	4,840000	****
2	Th15	4,940000	****
3	Th22	5,070000	****
5	AS 200µM	5,090000	****

## 6.2 Anexo 3-2. Anova y prueba Tukey para la variable Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD) en la hoja 5

Effect	Univariate Results for Each DV (SPAD Hoja 5.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition											
	SPAD2 SS	SPAD2 MS	SPAD2 F	SPAD2 p	SPAD3 SS	SPAD3 MS	SPAD3 F	SPAD3 p	SPAD4 SS	SPAD4 MS	SPAD4 F	SPAD4 p
Intercept	19554,17	19554,17	18506,50	0,000000	29565,49	29565,49	24603,17	0,000000	27980,19	27980,19	5440,823	0,000000
Tratamiento	30,60	3,82	3,62	0,003504	32,36	4,04	3,37	0,005571	39,46	4,93	0,959	0,482308
Error	38,04	1,06			43,26	1,20			185,13	5,14		
Total	68,63				75,62				224,60			

Effect	Univariate Results for Each DV (SPAD Hoja 5.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition							
	SPAD5 SS	SPAD5 MS	SPAD5 F	SPAD5 p	SPAD6 SS	SPAD6 MS	SPAD6 F	SPAD6 p
Intercept	24225,44	24225,44	5294,278	0,000000	8159,238	8159,238	743,5481	0,000000
Tratamiento	25,02	3,13	0,683	0,703050	78,167	9,771	0,8904	0,534310
Error	164,73	4,58			395,042	10,973		
Total	189,74				473,209			

Tukey HSD test; variable SPAD2 (SPAD Hoja 5.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1,0566, df = 36,000				
Cell No.	Tratamiento	SPAD2 Mean	1	2
7	T7	19,54000	****	
9	T9	19,73000	****	
1	T1	20,55000	****	****
6	T6	20,77000		****
4	T4	20,85000		****
5	T5	21,01000		****
3	T3	21,23000		****
2	T2	21,52000		****
8	T8	22,41000		****

Tukey HSD test; variable SPAD3 (SPAD Hoja 5.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 1,2017, df = 36,000				
Cell No.	Tratamiento	SPAD3 Mean	1	2
9	T9	23,66000		****
4	T4	24,95000	****	****
3	T3	25,58000	****	
2	T2	25,74000	****	
6	T6	25,77000	****	
7	T7	25,81000	****	
5	T5	25,98000	****	
8	T8	26,43000	****	
1	T1	26,77000	****	

### 6.3 Anexo 3-3. Anova para la variable Cuantificación del contenido de clorofila (SPAD) en la hoja 6.

Univariate Results for Each DV (SPAD Hoja 6.sta)													
Sigma-restricted parameterization													
Effective hypothesis decomposition													
Effect	Degr. of Freedom	SPAD2 SS	SPAD2 MS	SPAD2 F	SPAD2 p	SPAD3 SS	SPAD3 MS	SPAD3 F	SPAD3 p	SPAD4 SS	SPAD4 MS	SPAD4 F	SPAD4 p
Intercept	1	19487,52	19487,52	3133,882	0,000000	34813,95	34813,95	50110,04	0,000000	30638,75	30638,75	15194,67	0,000000
Tratamiento	8	69,23	8,65	1,392	0,233325	25,30	3,16	4,55	0,000681	14,09	1,76	0,87	0,547703
Error	36	223,86	6,22			25,01	0,69			72,59	2,02		
Total	44	293,09				50,31				86,68			

Univariate Results for Each DV (SPAD Hoja 6.sta)							
Sigma-restricted parameterization							
Effective hypothesis decomposition							
Effect	SPAD5 MS	SPAD5 F	SPAD5 p	SPAD6 SS	SPAD6 MS	SPAD6 F	SPAD6 p
Intercept	26201,56	11723,58	0,000000	11769,33	11769,33	1253,205	0,000000
Tratamiento	3,50	1,57	0,169557	92,59	11,57	1,232	0,308886
Error	2,23			338,09	9,39		
Total				430,68			

Tukey HSD test; variable SPAD3 (SPAD Hoja 6.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,69475, df = 36,000				
Cell No.	Tratamiento	SPAD3 Mean	1	2
4	T4	27,05000	****	
1	T1	27,23000	****	
9	T9	27,25000	****	
2	T2	27,51000	****	
7	T7	27,65000	****	
3	T3	27,74000	****	
6	T6	28,06000	****	****
8	T8	28,15000	****	****
5	T5	29,69000		****

### 6.4 Anexo 3-4. Anova y prueba Tukey para la variable severidad del ensayo A para las seis evaluaciones.

Univariate Results for Each DV (Sev cm2 1.sta)													
Sigma-restricted parameterization													
Effective hypothesis decomposition													
Effect	Degr. of Freedom	Sev1 SS	Sev1 MS	Sev1 F	Sev1 p	Sev2 SS	Sev2 MS	Sev2 F	Sev2 p	Sev3 SS	Sev3 MS	Sev3 F	Sev3 p
Intercept	1	0,541225	0,541225	80,47335	0,000000	4,119089	4,119089	90,31791	0,000000	34,75244	34,75244	180,6503	0,000000
Tratamiento	9	0,304842	0,033871	5,03624	0,000017	2,706868	0,300763	6,59473	0,000000	19,02009	2,11334	10,9856	0,000000
Error	90	0,605297	0,006726			4,104591	0,045607			17,31367	0,19237		
Total	99	0,910139				6,811459				36,33377			

Univariate Results for Each DV (Sev cm2 1.sta)												
Sigma-restricted parameterization												
Effective hypothesis decomposition												
Effect	Sev4 SS	Sev4 MS	Sev4 F	Sev4 p	Sev5 SS	Sev5 MS	Sev5 F	Sev5 p	Sev6 SS	Sev6 MS	Sev6 F	Sev6 p
Intercept	169,4865	169,4865	390,1182	0,000000	257,9323	257,9323	428,6052	0,000000	302,7264	302,7264	445,9464	0,000000
Tratamiento	55,9116	6,2124	14,2995	0,000000	73,3443	8,1494	13,5418	0,000000	84,8157	9,4240	13,8824	0,000000
Error	39,1004	0,4344			54,1615	0,6018			61,0956	0,6788		
Total	95,0120				127,5058				145,9113			

Tukey HSD test; variable Sev1 (Sev cm2 1.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,00673, df = 90,000				
Cell No.	Tratamiento	Sev1 Mean	1	2 3
1	T10	0,000000	****	
4	T13	0,037800	****	****
10	T19	0,039400		****
9	T18	0,046480		****
3	T12	0,067800		****
7	T16	0,068200		****
6	T15	0,068400		****
5	T14	0,074000		****
8	T17	0,119800	****	****
2	T11	0,213800		****

Tukey HSD test; variable Sev2 (Sev cm2 1.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,04561, df = 90,000				
Cell No.	Tratamiento	Sev2 Mean	1	2 3
1	T10	0,000000	****	
10	T19	0,115197	****	****
9	T18	0,117218		****
4	T13	0,122905		****
7	T16	0,159189		****
6	T15	0,161022		****
3	T12	0,182360		****
5	T14	0,211829		****
8	T17	0,321104	****	****
2	T11	0,638730		****

Tukey HSD test; variable Sev3 (Sev cm2 1.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,19237, df = 90,000				
Cell No.	Tratamiento	Sev3 Mean	1	2 3
1	T10	0,000000	****	
4	T13	0,308560	****	****
9	T18	0,415520		****
10	T19	0,422800		****
3	T12	0,505680		****
6	T15	0,518840		****
5	T14	0,523320		****
7	T16	0,597800		****
8	T17	0,861000	****	****
2	T11	1,741600		****

Tukey HSD test; variable Sev4 (Sev cm2 1.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,43445, df = 90,000				
Cell No.	Tratamiento	Sev4 Mean	1	2 3
1	T10	0,000000	****	
4	T13	0,763763	****	****
10	T19	1,011933		****
9	T18	1,054202		****
3	T12	1,121999		****
5	T14	1,263870		****
6	T15	1,303209		****
7	T16	1,620432		****
8	T17	1,832611	****	****
2	T11	3,046680		****

Tukey HSD test; variable Sev5 (Sev cm2 1.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,60179, df = 90,000				
Cell No.	Tratamiento	Sev5 Mean	1	2 3
1	T10	0,000000	****	
4	T13	0,884656	****	
3	T12	1,284920		****
9	T18	1,347710		****
10	T19	1,520610		****
6	T15	1,583400		****
5	T14	1,648010		****
7	T16	2,069340		****
8	T17	2,272725	****	****
2	T11	3,448900		****

Tukey HSD test; variable Sev6 (Sev mm 1.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,67884, df = 90,000				
Cell No.	Tratamiento	Sev6 Mean	1	2 3
1	T10	0,000000	****	
4	T13	0,920190	****	
3	T12	1,369640		****
9	T18	1,481190		****
10	T19	1,663550		****
6	T15	1,770250		****
5	T14	1,809050		****
7	T16	2,248460		****
8	T17	2,444400	****	****
2	T11	3,692305		****



### 6.5 Anexo 3-5. Anova y prueba Tukey para la variable severidad del ensayo B para las seis evaluaciones

Univariate Results for Each DV (Sev cm2 2.sta)													
Sigma-restricted parameterization													
Effective hypothesis decomposition													
Effect	Degr. of Freedom	Sev1 SS	Sev1 MS	Sev1 F	Sev1 p	Sev2 SS	Sev2 MS	Sev2 F	Sev2 p	Sev3 SS	Sev3 MS	Sev3 F	Sev3 p
Intercept	1	0,028285	0,028285	41,33619	0,000000	0,276973	0,276973	108,3964	0,000000	4,995046	4,995046	209,4009	0,000000
Tratamiento	9	0,010479	0,001164	1,70166	0,100094	0,128690	0,014299	5,5960	0,000004	2,935459	0,326162	13,6733	0,000000
Error	90	0,061583	0,000684			0,229967	0,002555			2,146859	0,023854		
Total	99	0,072062				0,358657				5,082317			

Univariate Results for Each DV (Sev cm2 2.sta)													
Sigma-restricted parameterization													
Effective hypothesis decomposition													
Effect	Sev4 SS	Sev4 MS	Sev4 F	Sev4 p	Sev5 SS	Sev5 MS	Sev5 F	Sev5 p	Sev6 SS	Sev6 MS	Sev6 F	Sev6 p	
Intercept	51,83819	51,83819	450,5421	0,000000	134,4175	134,4175	826,8276	0,000000	189,3732	189,3732	913,9189	0,000000	
Tratamiento	13,06048	1,45116	12,6125	0,000000	24,4214	2,7135	16,6912	0,000000	32,8176	3,6464	17,5976	0,000000	
Error	10,35516	0,11506			14,6313	0,1626			18,6489	0,2072			
Total	23,41564				39,0527				51,4665				

Tukey HSD test; variable Sev1 (Sev cm2 2.sta)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = ,00068, df = 90,000			
Cell No.	Tratamiento	Sev1 Mean	1
1	T10	0,000000	****
10	T19	0,009000	****
4	T13	0,012000	****
9	T18	0,012880	****
3	T12	0,014200	****
7	T16	0,015400	****
8	T17	0,020600	****
5	T14	0,020800	****
6	T15	0,022000	****
2	T11	0,041300	****

Tukey HSD test; variable Sev2 (Sev cm2 2.sta)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,00256, df = 90,000				
Cell No.	Tratamiento	Sev2 Mean	1	2
1	T10	0,000000	****	
10	T19	0,028905	****	
9	T18	0,036190	****	
3	T12	0,038070	****	
7	T16	0,050055	****	
4	T13	0,050290	****	
5	T14	0,054050	****	
6	T15	0,054755	****	
8	T17	0,067445	****	
2	T11	0,146523		****

Tukey HSD test; variable Sev3 (Sev cm2 2.sta)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = ,02385, df = 90,000					
Cell No.	Tratamiento	Sev3 Mean	1	2	3
1	T10	0,000000	****		
10	T19	0,127680		****	
9	T18	0,131320		****	
4	T13	0,133000		****	
5	T14	0,188440		****	
7	T16	0,223440		****	
3	T12	0,239680		****	
6	T15	0,244160		****	
8	T17	0,260680		****	
2	T11	0,686560			****

Tukey HSD test; variable Sev4 (Sev cm2 2.sta)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = ,11506, df = 90,000					
Cell No.	Tratamiento	Sev4 Mean	1	2	3
1	T10	0,000000	****		
9	T18	0,503037		****	
4	T13	0,569160		****	
10	T19	0,595107		****	
3	T12	0,752045		****	
6	T15	0,759996		****	
5	T14	0,780921		****	
7	T16	0,837000		****	
8	T17	0,870480		****	
2	T11	1,532128			****

Tukey HSD test; variable Sev5 (Sev cm2 2.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,16257, df = 90,000					Tukey HSD test; variable Sev6 (Sev cm2 2.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,20721, df = 90,000							
Cell No.	tratamiento	Sev5 Mean	1	2	3	Cell No.	tratamiento	Sev6 Mean	1	2	3	4
1	T10	0,000000	****			1	T10	0,000000	****			
4	T13	0,820365		****		4	T13	0,900063		****		
3	T12	1,010555		****		3	T12	1,200375		****		
9	T18	1,076530		****		6	T15	1,371095		****		
5	T14	1,157520		****		9	T14	1,395345		****	****	
10	T19	1,227135		****		5	T18	1,454275			****	
6	T15	1,319500		****		10	T19	1,494285			****	
7	T16	1,389115		****	****	7	T16	1,659865			****	
8	T17	1,624805			****	8	T17	1,761755			****	
2	T11	1,968330			****	2	T11	2,157280				****

**6.6 Anexo 3-6.** Anova y prueba Tukey para la variable Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en el ensayo A.

Univariate Tests of Significance for AUPC (AUPC 1.sta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	98845,94	1	98845,94	339,5203	0,000000
Tratamiento	33285,52	9	3698,39	12,7034	0,000000
Error	26202,07	90	291,13		

Tukey HSD test; variable AUPC (AUPC 1.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 291,13, df = 90,000					
Cell No.	Tratamiento	AUPC Mean	1	2	3
1	T10	0,00000	****		
4	T13	17,43860	****		
9	T18	25,15009		****	
3	T12	26,02841		****	
10	T19	26,73027		****	
6	T15	30,53278		****	
5	T14	31,36184		****	
7	T16	38,04809		****	
8	T17	44,92958		****	
2	T11	74,17809			****

**6.7 Anexo 3-7.** Anova y prueba Tukey para la variable Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en el ensayo B.

Univariate Tests of Significance for AUPC (AUPC 2.sta Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	37761,94	1	37761,94	745,5455	0,000000
Tratamiento	7817,30	9	868,59	17,1488	0,000000
Error	4558,51	90	50,65		

Tukey HSD test; variable AUPC (AUPC 2.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 50,650, df = 90,000						
Cell No.	Tratamiento	AUPC Mean	1	2	3	4
1	T10	0,00000	****			
4	T13	13,76006		****		
9	T18	16,77156			****	
3	T12	18,04282				****
10	T19	18,61358				****
5	T14	19,83676				****
6	T15	21,42544				****
7	T16	23,14915				****
8	T17	25,90118				****
2	T11	36,82376				****

## **CAPITULO 4**

### **CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES**

- Los aislamientos seleccionados (*Trichoderma* cepa 15 y 22) son potenciales biocontroladores de *Sclerotinia sclerotiorum* presentando los mejores resultados en las variables evaluadas (Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno y micoraparasitismo de esclerocios).
- La forma más eficiente para la aplicación de ácido salicílico es foliar según los datos observados, en dosis de 100 y 200  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones provocaron el aumento del contenido de clorofila, número de hojas, peso fresco y seco diferenciándose significativamente del testigo sin aplicación.
- Las diferentes dosis aplicadas al follaje de las plantas (aplicación foliar), no evidenciaron efectos positivos respecto al testigo sin aplicación, en las dosis 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  en las distintas variables evaluadas (no hubo diferencias significativas respecto al testigo en el peso seco y fresco, contenido de clorofilas y número de hojas). Con la dosis más alta (500  $\mu\text{M}$ ) se obtuvieron los menores valores en peso seco y fresco.
- La implementación de *Trichoderma* sp, ácido salicílico y su combinación, no presentaron diferencias significativas para la variable peso seco. En cuanto a la variable peso fresco se observaron diferencias respecto al tratamiento testigo asociado a la influencia que tienen los tratamientos sobre el uso eficiente del agua.
- Las características morfológicas del hongo antagonista para su identificación a nivel de especie son insuficientes, por lo cual se recomienda su identificación por métodos moleculares después de evaluar su capacidad antagónica en otros patosistemas.
- Se recomienda hacer estudios detallados para determinar en que proceso metabólico interviene el ácido salicílico para favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas de lechuga. Del mismo modo, es necesaria la evaluación de dosis intermedias (entre 200 y 500  $\mu\text{M}$ ) con el fin de establecer una dosis umbral. Habida cuenta de que con la dosis de 200  $\mu\text{M}$ , a pesar de no

presentar diferencias significativas, se observó una tendencia a aumentar el valor de las variables evaluadas, mientras que con la mayor dosis mayor (500  $\mu$ M) estos valores comienzan a decaer.

- Los tratamientos de *Trichoderma* sp., ácido salicílico y su combinación, no impiden la colonización del tejido de las plantas por parte del hongo patógeno, alcanzando incidencias del 100%. El efecto de estos tratamientos sobre la variable severidad, pueden estar asociados a la generación de respuesta de defensa en la planta (resistencia sistémica adquirida e inducida), aunque hacen falta estudios a nivel de expresión de genes y cuantificación de proteínas que están involucradas en cada proceso en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos.
- Es necesario realizar estudios histológicos para complementar los resultados de esta investigación, para corroborar el confinamiento del patógeno cuando se implementan los tratamientos (*Trichoderma* sp. y ácido salicílico).