

ESCUELA POLITECNICA DEL EJERCITO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS I.A.S.A.
“GRAD CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”

“CONTROL DE Rhizoctonia sp. EN PLANTAS DE LECHUGA
(Lactuca sativa) CON Bacillus subtilis PROVENIENTE DE BIOL DE
PAPA PREHIDROLIZADA”

SILVIA ELIZABETH MALDONADO PAGUAY
VICTOR HUGO VARGAS VALLE

INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO

SANGOLQUÍ – ECUADOR
2005

CONTROL DE Rhizoctonia sp. EN PLANTAS DE LECHUGA
(Lactuca sativa) CON Bacillus subtilis PROVENIENTE DE BIOL DE
PAPA PREHIDROLIZADA

SILVIA ELIZABETH MALDONADO PAGUAY
VICTOR HUGO VARGAS VALLE

REVISADO Y APROBADO

Cnrl. E.M.S. Giovanni Granda

Dr. Darwin Rueda
DIRECTOR INVESTIGACIÓN
INVESTIGACIÓN

Ing. Marco Barahona
CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís
BIOMETRISTA

CERTIFICO QUE ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN
ORIGINAL (ELECTROMAGNÉTICAMENTE) E IMPRESO EN DOS
EJEMPLARES.

Dr. Marco Peñaherrera
SECRETARIO ACADÉMICO

CONTROL DE Rhizoctonia sp. EN PLANTAS DE LECHUGA
(Lactuca sativa) CON Bacillus subtilis PROVENIENTE DE BIOL DE
PAPA PREHIDROLIZADA

SILVIA ELIZABETH MALDONADO PAGUAY
VICTOR HUGO VARGAS VALLE

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL
DE CALIFICACIONES DEL INFORME TÉCNICO.

CALIFICACIÓN FECHA

Dr. Darwin Rueda
DIRECTOR INVESTIGACIÓN _____

Ing. Marco Barahona
CODIRECTOR INVESTIGACIÓN _____

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON
PRESENTADAS EN ESTA SECRETARÍA.

Dr. Marco Peñaherrera
SECRETARIO ACADÉMICO

DEDICATORIA

A nuestros amados padres y hermanos.

A Verónica y Santiago.

A nuestros amigos.

AGRADECIMIENTO

Me cuidaron en mi tierna infancia, me acompañaron y me alentaron en los momentos difíciles, en mis alegrías ellos se alegraban. Todo aquello beneficio a mi corazón y no lo olvida, la memoria de mi corazón se llama agradecimiento.

A nuestros padres.

Por su apoyo incondicional, por su cariño, por su amistad.

A nuestros hermanos y primos.

Por su amistad, camaradería, cariño, por todos los gratos momentos que compartimos juntos.

A nuestros queridos amigos.

Por los valiosos conocimientos impartidos, por enseñarnos a ser más que ingenieros, personas.

A nuestros maestros.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION.	1
II. OBJETIVOS.	3
III. REVISION DE LITERATURA.	5
A. EL CULTIVO DE LA LECHUGA (<u>Lactuca sativa</u>).	5
1. <u>Origen.</u>	5
2. <u>Taxonomía y Morfología.</u>	5
3. <u>Importancia económica y distribución geográfica.</u>	6
4. <u>Material vegetal.</u>	7
a. Romanas.	7
b. Acogolladas.	7
c. De hojas sueltas.	8
d. Lechuga espárrago.	8
5. <u>Requerimientos edafoclimáticos.</u>	8
a. Temperatura.	9
b. Altitud.	9
c. Humedad relativa.	9
d. Suelo.	10
6. <u>Particularidades del cultivo.</u>	10
a. Propagación.	10
b. Semillero.	11
c. Preparación del terreno.	11
d. Siembra.	11
e. Riego.	12
f. Abonado.	12

g. Fertilización.	13
h. Malas hierbas.	13
i. Recolección.	14
7. <u>Almacenamiento.</u>	15
8. <u>Valor nutricional.</u>	15
9. <u>Plagas y enfermedades.</u>	16
a. Plagas.	16
1) Trips.	16
2) Minadores.	17
3) Mosca blanca.	18
4) Pulgones.	19
b. Enfermedades.	20
1) Antracnosis.	20
2) Botritis.	20
3) Mildiú Velloso.	22
4) Esclerotinia.	23
5) Septoriosis.	24
6) Virus del mosaico de la lechuga (LMV).	24
7) Virus del bronceado del tomate (TSWV).	25
c. Fisiopatías.	25
1) Latencia de semilla y mala germinación.	25
2) Tip burn.	26
3) Espigado o subida de la flor.	26
4) Antocianos en las hojas.	26
5) Granizo.	26

6) Punteado pardo.	27
7) Mancha parda (brown stain).	27
8) Costilla rosada (pink rib).	27
B. MANCHA CAFÉ DE LA HOJA (<u>Rhizoctonia</u> spp.).	28
1. <u>Agente causal.</u>	28
2. <u>Etiología.</u>	28
3. <u>Ciclo de la enfermedad.</u>	29
4. <u>Diagnóstico.</u>	30
5. <u>Signos y Síntomas.</u>	30
6. <u>Control.</u>	30
7. <u>Importancia económica.</u>	31
C. EL BIOL.	32
1. <u>Elaboración del Biol.</u>	32
2. <u>Uso del Biol.</u>	33
D. CONTROL BIOLÓGICO.	33
1. <u>Género Bacillus.</u>	35
2. <u>Bacillus subtilis.</u>	36
a. Esporulación.	36
b. Propiedades de las Esporas.	38
E. COMPARACIÓN CON VARIOS ESTUDIOS SIMILARES.	39
1) <u>Bacillus subtilis aplicado a cereales.</u>	39
2) <u>Bacillus subtilis aplicado a hortalizas.</u>	40
3) <u>Bacillus subtilis aplicado a frutales.</u>	40

4) <u>Bacillus subtilis aplicado a leguminosas.</u>	41
5) <u>Bacillus subtilis aplicado a semillas.</u>	41
IV. MATERIALES Y METODOS.	42
A. MATERIALES.	42
B. METODOS.	43
1. <u>Obtención de biol de papa prehidrolizada en melaza.</u>	43
2. <u>Aislamiento, purificación y tipificación del Bacillus subtilis a partir del biol.</u>	44
a. Aislamiento y purificación.	44
b. Tipificación del <u>Bacillus subtilis.</u>	44
3. <u>Determinación la acción antagónica de Bacillus subtilis para controlar Rhizoctonia sp in vitro e in vivo.</u>	48
a. <i>In vitro.</i>	48
1) Preparación del inóculo.	48
2) Prueba Dual de Antagonismo.	49
b. <i>In vivo.</i>	51
1) Características del Campo Experimental.	51
2) Método de Evaluación.	52
4. <u>Establecimiento de la concentración más adecuada de Bacillus subtilis para control de Rhizoctonia sp. y Evaluación de los tratamientos en campo.</u>	56

a.	Porcentaje de prendimiento.	56
b.	Altura de planta.	57
c.	Ciclo de cultivo.	57
d.	Diámetro de cabeza.	57
e.	Peso final.	58
f.	Compactación	58
5.	<u>Determinación de la concentración inicial y final de Rhizoctonia sp. en el suelo.</u>	59
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	62
A.	DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN ANTAGÓNICA DE <u>Bacillus subtilis</u> PARA CONTROLAR <u>Rhizoctonia</u> sp <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> .	62
1.	<u>In vitro.</u>	62
2.	<u>In vivo.</u>	67
a.	Porcentaje de Incidencia de <u>Rhizoctonia</u> sp. en el cultivo.	67
1)	Primer ciclo de cultivo.	67
2)	Segundo ciclo de cultivo.	71
B.	ESTABLECIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN MÁS ADECUADA DE <u>BACILLUS SUBTILIS</u> PARA CONTROL DE <u>RHIZOCTONIA</u> SP. Y EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN EL CAMPO.	75

1. <u>Primer ciclo de cultivo</u>	75
a. Porcentaje de prendimiento.	75
b. Altura de planta.	76
c. Ciclo de cultivo.	77
d. Diámetro de cabeza.	78
e. Peso de cabeza.	78
f. Compactación de cabeza.	79
2. <u>Segundo ciclo de cultivo.</u>	81
a. Porcentaje de prendimiento.	81
b. Altura de planta.	81
c. Ciclo de cultivo.	82
d. Diámetro de cabeza.	83
e. Peso de cabeza.	83
f. Compactación	84
C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL Y FINAL DE <u>RHIZOCTONIA</u> SP. EN EL SUELO	86
VI. CONCLUSIONES.	88
VII. RECOMENDACIONES.	90
VIII. RESUMEN.	92
IX. SUMMARY.	93
X. BIBLIOGRAFÍA.	94

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Producción de lechuga de los principales países en toneladas métricas.	6
CUADRO 2. Materias activas recomendadas para el control de malezas en lechuga.	14
CUADRO 3. Valor nutricional de la lechuga en 100 g de sustancia.	15
CUADRO 4. Materias activas para el control del minador de la hoja ((<u>Liriomyza trifolii</u> y <u>Liriomyza huidobrensis</u>) en el cultivo de lechuga.	18
CUADRO 5. Materias activas para el control químico de la mosca blanca (<u>Trialeurodes vaporariorum</u>) en el cultivo de lechuga.	18
CUADRO 6. Materias activas para el control químico del pulgón (<u>Myzus persicae</u> , <u>Mcrosiphum solani</u> y <u>Narsonovia ribisnigri</u>) en el cultivo de lechuga.	19
CUADRO 7. Materias activas para el control químico de la antracnosis (<u>Marssonina panattoniana</u>) en el cultivo de lechuga.	20
CUADRO 8. Materias activas para el control de botritis (<u>Botrytis cinerea</u>) en el cultivo de lechuga.	21
CUADRO 9. Materias activas para el control de mildiú vellosa (<u>Bremia lactucae</u>) en el cultivo de lechuga.	22

CUADRO 10. Materias activas para el control químico de esclerotinia (<u>Sclerotinia sclerotiorum</u>) en el cultivo de lechuga.	23
CUADRO 11. Materias activas para el control de septoriosis (<u>Septoria lactucae</u>) en el cultivo de lechuga.	24
CUADRO 12. Promedio (\pm EE) del crecimiento en cm de <u>Rhizoctonia</u> sp. en la prueba dual durante el primer día, laboratorio I.A.S.A, 2004.	63
CUADRO 13. Promedio (\pm EE) del crecimiento en cm de <u>Rhizoctonia</u> sp. en la prueba dual durante el segundo día, laboratorio I.A.S.A, 2004.	65
CUADRO 14. Promedio (\pm EE) del crecimiento en cm de <u>Rhizoctonia</u> sp. en la prueba dual durante el tercer día, laboratorio I.A.S.A, 2004.	67
CUADRO 15. Promedio (\pm EE) del porcentaje del nivel de incidencia de la mancha café de la hoja (<u>Rhizoctonia</u> sp.) en plantas de lechuga, IASA, 2004.	71
CUADRO 16. Promedio (\pm EE) del porcentaje del nivel de incidencia de la mancha café de la hoja (<u>Rhizoctonia</u> sp.) en plantas de lechuga, IASA, 2005.	74
CUADRO 17. Promedio (\pm EE) de la velocidad de crecimiento tomada cada 15 días en plantas de lechuga (<u>Lactuca sativa</u>), IASA, 2004.	77

- CUADRO 18.** Promedio (\pm EE) del peso, diámetro, compactación y ciclo de cultivo de plantas de lechuga medidos al tiempo de cosecha, IASA, 2005. 80
- CUADRO 19.** Promedio (\pm EE) de la velocidad de crecimiento tomada cada quince días en plantas de lechuga (Lactuca sativa), IASA, 2005. 82
- CUADRO 20.** Promedio (\pm EE) del peso, diámetro, compactación y ciclo de cultivo de plantas de lechuga (Lactuca sativa) medidos al tiempo de cosecha, IASA, 2005. 85
- CUADRO 21.** Promedio (\pm EE) del conteo de Rhizoctonia en Unidades Formadoras de colonia por gramo de suelo, laboratorio IASA, 2005. 87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Ciclo de Vida de <u>Rhizoctonia</u>	29
FIGURA 2.	Biol de papa prehidrolizada, Laboratorio IASA, 2004.	43
FIGURA 3.	Prueba ácida, laboratorio IASA, 2004.	46
FIGURA 4.	Prueba de gas, laboratorio IASA, 2004.	47
FIGURA 5.	Prueba dual de antagonismo laboratorio IASA, 2004.	50
FIGURA 6.	Crecimiento paralelo en A vs crecimiento perpendicular en B del hongo a las estrías de la bacteria aislada.	50
FIGURA 7.	Cultivo de lechuga IASA, 2004 - 2005.	52
FIGURA 8.	Escala Mc Farland, IASA, 2004.	53
FIGURA 9.	Aplicación de <u>Bacillus subtilis</u> en el cultivo de lechuga IASA, 2004.	54
FIGURA 10.	Transplante de plantas de lechuga IASA, 2004.	56
FIGURA 11.	Medición de la velocidad de crecimiento IASA, 2004.	57
FIGURA 12.	Cosecha IASA, 2004.	59
FIGURA 13.	Conteo de Rhizoctonia, laboratorio IASA, 2005.	60
FIGURA 14.	Crecimiento de colonias a los 6 días de siembra, laboratorio IASA, 2005.	60

I. INTRODUCCION

El control de enfermedades importantes como la “mancha café de la hoja” (Rhizoctonia sp.), ha sido una preocupación entre los productores de lechuga, ya sea por el costo de los pesticidas utilizados para su control y prevención; así como por la contaminación que estos provocan al medio ambiente y a la salud de los seres humanos (Valencia, 1995; Infoagro, 2002).

La agricultura actual tiende al manejo orgánico de los cultivos. Entre las nuevas técnicas de cultivo se tiene la utilización de bioles como fuente de micronutrientes, fitoreguladores, fitohormonas, y gran cantidad de microorganismos que actúan como controladores biológicos. Además el uso del biol permite el reciclaje de residuos orgánicos no solo de cultivos sino también de empresas procesadoras de alimentos, como es el caso de la papa (Suquilanda, 1996).

El uso del biol como fuente de controladores biológicos, no ha sido ampliamente estudiado, ya que las investigaciones se han enfocado al análisis de micronutrientes y fitohormonas que este contiene. Se considera que el biol, estimula el desarrollo de microorganismos como Bacillus subtilis. Además, se conoce que ciertos tipos de Bacillus provocan la hidrólisis en productos hidrocarbonados como en el caso del biol de papa prehidrolizada (Rougieux, 1964 y Hemming, 1990).

La importancia de obtener Bacillus subtilis como controlador biológico, se basa en la capacidad de liberar compuestos con propiedades antifúngicas como la

subtilina y otros antibióticos de la familia Utirinas, que son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos, también se han realizado pruebas *in vitro* con Bacillus subtilis obtenido a partir de arroz que demuestra inhibición de hongos fitopatógenos del suelo como: Rhizoctonia solani , Pythium ultimum, Fusarium oxysporium entre otros. De igual manera se reporta una esporulación reducida en Rhizoctonia sp. en ensayos *in vitro* realizados en Colombia (Bravo, 1993; citado por Benzing, 2001).

Por los antecedentes señalados se planteó la presente investigación, la misma que se llevó a cabo durante un año en la Hacienda El Prado (IASA), que tuvo como objetivo encontrar un mecanismo alternativo de control de Rhizoctonia sp. en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa), para obtener una hortaliza de calidad y libre de residuos de plaguicidas. Por otro lado el producir biol de papa permitirá a los productores y procesadores de este producto de consumo masivo, optimizar sus recursos, obtener un ingreso extra y proveer un producto ideal para el control de esta enfermedad.

II. OBJETIVOS

A. GENERAL

Determinar el efecto de Bacillus subtilis proveniente de biol de papa prehidrolizada sobre Rhizoctonia sp en plantas de lechuga (Lactuca sativa) durante dos ciclos de cultivo para obtener un producto biológico que controle esta enfermedad.

B. ESPECIFICOS

- Obtener biol de papa prehidrolizada en melaza.
- Aislar, purificar y tipificar Bacillus subtilis a partir del biol para usarlo como antagonista de Rhizoctonia.
- Determinar la acción antagónica de Bacillus subtilis para controlar Rhizoctonia sp *in vitro* e *in vivo*.
- Establecer la concentración más adecuada de Bacillus subtilis para control de Rhizoctonia sp.

- Evaluar los tratamientos que permitan obtener mayor prendimiento, mayor velocidad de crecimiento, menor ciclo de cultivo, mayor diámetro de cabeza, mayor peso final y mayor compactación.
- Determinar la concentración inicial y final de Rhizoctonia sp. en el suelo donde se va a llevar a cabo la investigación.

IV. REVISION DE LITERATURA

A. EL CULTIVO DE LA LECHUGA (Lactuca sativa)

2. Origen

El origen de la lechuga no parece estar muy claro, aunque algunos autores afirman que procede de algún lugar al este del mar mediterráneo (Yépez, 1988). Sin embargo, para Vavilov citado por Barahona¹ (2005), el principal centro donde evolucionó esta asterácea se localizó en el Asia menor.

3. Taxonomía y Morfología

La lechuga es una planta anual y autógena, perteneciente a la familia Compositae y cuyo nombre botánico es *Lactuca sativa* L (Yépez, 1988). El sistema radicular de las plantas adultas es moderadamente extenso, la raíz pivotante puede llegar hasta profundidades de 1,5 m. En suelos compactos el sistema radicular es mas denso y mas compacto que en suelos sueltos. Las hojas nacen alrededor del tallo formando una roseta, varían en tamaño (grandes y pequeñas), forma (espatuladas y circulares), grado de ondulación y un color que va del verde pálido al verde oscuro dependiendo de la variedad (Edmond, 1988). El tallo es cilíndrico y ramificado. Cuando la lechuga esta madura emite un tallo floral que se ramifica y tiene inflorescencia con capítulos florales amarillos dispuestos en racimos o

¹ Barahona, M. 2004. Cultivo de lechuga (entrevista) Sangolquí, EC. ESPE.

corimbos, mientras que la semilla se encuentra provista de un vilano plumoso (Infoagro, 2002).

4. Importancia económica y distribución geográfica

La importancia del cultivo se ha ido incrementando en los últimos años, debido tanto a la diversificación de tipos varietales como al aumento del consumo mundial de esta, Cuadro 1.

CUADRO 2. Producción de lechuga en los principales países en toneladas métricas.

PAÍSES	PRODUCCION	
	AÑO	
	2001	2002
China	7.605.000	8.005.000
Estados Unidos	4.472.120	4.352.740
España	972.600	914.900
Italia	965.593	845.593
India	790.000	790.000
Japón	553.800	560.000
Francia	490.936	433.400
México	212.719	234.452
Egipto	179.602	179.602
Bélgica- Luxemburgo	170.000	170.000
Alemania	166.493	195.067
Australia	145.000	145.000
Reino Unido	139.200	149.900
Portugal	95.000	95.000
Chile	85.000	86.000

Fuente: Infoagro, 2002.

5. Material vegetal

Las variedades de lechuga se pueden clasificar en los siguientes grupos botánicos:

a. **Romanas** (Lactuca sativa var. Longifolia).

No forman un verdadero cogollo, tienen cabeza cilíndrica o cónica; las hojas son oblongas, relativamente estrechas, rígidas, crocantes y plegadas en forma de cuchara con bordes enteros y nervio central ancho. También se le conoce como lechuga col (Valencia, 1995). Dentro de este grupo son cultivares representativos: White Paris, Lobjoit'sGeen, Little Gem, Bubbles, Winter Density (Hessayon, 1995).

b. **Acogolladas** (Lactuca sativa var. Capitata).

Se encuentra ampliamente distribuida y corresponde a la lechuga de repollo. Se subdivide en dos grupos:

Tipo Crocante (Crisphead): Tiene cabeza parecida a la col muy compacta, formada por hojas gruesas, su vena principal se ramifica en venas más pequeñas hasta llegar al ápice de las hojas: sus hojas son quebradizas produciendo el sonido característico del cual proviene su nombre. Los cultivares más utilizados son: Grandes Lagos y Mesa.

Tipo mantequilla (Butterhead): Tiene hojas suaves con apariencia grasosa, forma un repollo menos compacto que el del tipo crocante. Los cultivares mas utilizados son: White Boston, Dark Green Boston, Mignomet Green (Valencia, 1995).

c. De hojas sueltas (Lactuca sativa var. Crespa).

No producen cogollo sus hojas son rizadas y se recolecta como la espinaca. No forman una cabeza compacta si no un manojo de hojas. Son cultivares representativos de esta variedad: Salad Bowl, Cracarelle y Lollo Rosa (Hessayon, 1995).

d. Lechuga espárrago (Lactuca sativa var. Asparagina).

Son aquellas que se aprovechan por sus tallos, teniendo las hojas puntiagudas y lanceoladas. Se cultiva principalmente en China y la India. Sigue siendo el grupo mas popular con una maduración rápida y con tolerancia a condiciones adversas (Infoagro, 2002). Los cultivares más representativos son: Old The Year Round, Tom Thumb, Avondefiance, Continuity, Dolly, Hilde, Suzan, Winter Crop, Imperial Winter, Artic King, Kwiek, Premier, Kloek y Musette (Hessayon, 1995).

6. Requerimientos edafoclimáticos

La gran mayoría de hortalizas de hoja tienen una mayor adaptación a climas templados, sin embargo gracias a los trabajos de mejoramiento genético se cuenta

con variedades de lechugas que se adaptan bien a diferentes tipos de clima por lo que se puede cultivar en diferentes pisos altitudinales (Valencia, 1995).

a. Temperatura

La temperatura óptima de germinación oscila entre 18-20 °C, mientras que la óptima para su desarrollo se encuentra alrededor de los 20 °C. Durante la fase de crecimiento del cultivo se requieren temperaturas entre 14-18 °C por el día y 5-8 °C por la noche, pues la lechuga exige que haya diferencia de temperaturas entre el día y la noche. Durante el acogollado se requieren temperaturas en torno a los 12 °C por el día y 3-5 °C por la noche. Cuando la lechuga soporta temperaturas bajas durante algún tiempo, sus hojas toman una coloración rojiza, que se puede confundir con alguna carencia (Infoagro, 2002).

b. Altitud

En el Ecuador las condiciones óptimas de clima pueden encontrarse en altitudes que oscilan entre los 1500 a los 2800 msnm, sin embargo la gran mayoría de zonas cultivadas con lechuga se llevan a cabo en áreas cuya altitud sobrepasa la cota de los 2500 msnm (Yépez, 1988).

c. Humedad relativa

La humedad relativa conveniente para la lechuga es del 60 al 80%, los problemas que presenta este cultivo en invernadero es que se incrementa la humedad

ambiental, por lo que se recomienda su cultivo al aire libre, cuando las condiciones climatológicas lo permitan. En lugares con humedades relativas altas los cosecheros, con mucha frecuencia, tienen dificultades para obtener cabezas compactas (Edmond, 1988).

d. Suelo

Los suelos preferidos por la lechuga son los ligeros, arenoso-limosos, con buen drenaje, situando el pH óptimo entre 6,7 y 7,4. En los suelos humíferos, la lechuga vegeta bien, pero si son excesivamente ácidos será necesario encalar (Infoagro, 2002).

En cuanto a la conductividad eléctrica del suelo, se considera como susceptible. A valores mayores de $1,2 \text{ mmhos cm}^{-1}$, puede afectar su desarrollo si el riego no es manejado de una forma adecuada (Valencia, 1995).

7. Particularidades del cultivo

a. Propagación

Se realiza a través de semilla botánica, la misma que tiene una viabilidad de hasta cuatro años en condiciones ambientales favorables y un color que varía entre negro, marrón y blanco. La germinación ocurre a los 2 – 4 días de sembrado en buenas condiciones ambientales (Valencia, 1995).

b. Semillero

Se requiere alrededor de 600 g de semilla para un área de semillero de 70 m² para obtener el suficiente número de plantas para una Hectárea (Yépez, 1988). El transplante se realiza una vez transcurridos 30-40 días después de la siembra, cuando tenga 5-6 hojas verdaderas y una altura de 8 cm desde el cuello del tallo hasta las puntas de las hojas (Infoagro, 2002).

c. Preparación del terreno

El cultivo de la lechuga requiere que se mulla bien una capa superficial de terreno, pero es aconsejable que después de tres o cuatro años de cultivo se de una aradura más profunda debido a que el suelo se compacta más allá de los 20 cm (Infoagro, 2002).

d. Siembra

La siembra se realiza principalmente en forma directa, utilizándose 1.5 kg de semilla por hectárea. En caso de que la siembra se realice en almácigo para su posterior trasplante al campo definitivo se utilizara 0.5 a 0.8 kg de semilla. La siembra directa es manual colocando tres o cuatro semillas por golpe de acuerdo al distanciamiento establecido y a doble hilera, obligatoriamente se debe realizar un raleo (Valencia, 1995).

En siembras comerciales de lechuga se pueden obtener de 66000 a 72000 plantas por hectárea. La siembra se realiza a doble hilera de planta por surco y los distanciamientos más utilizados son: 0.8 m entre surcos y 0.25 a 0.25 entre plantas (Valencia, 1995).

e. Riego

En la actualidad los mejores sistemas de riego que se están utilizando para el cultivo de lechuga son, el riego por goteo (cultivo en invernadero), y las cintas de exudación (cultivo al aire libre). Existen otras maneras de regar la lechuga como el riego por gravedad y el riego por aspersión, pero cada vez están más en recesión, aunque el riego por surcos permite incrementar el nitrógeno en un 20% (Infoagro, 2002).

El riego debe realizarse frecuentemente procurando que el suelo quede aparentemente seco en la parte superficial para evitar podredumbres del cuello y de las hojas que están en contacto con el suelo. El primer riego después del trasplante es de vital importancia para un elevado porcentaje de prendimiento de las plantas, siendo más recomendado el riego por aspersión (Infoagro, 2002 y Yépez, 1988).

f. Abonado

El aporte de estiércol en el cultivo de lechuga se debe realizar a razón de 1 a 3 kg/m², no obstante, cuando se cultiva en invernadero puede no ser necesaria la estercoladura, si ya se aportó estiércol en los cultivos anteriores (Infoagro, 2002).

g. Fertilización

La lechuga es una planta exigente en potasio, debiendo cuidar los aportes de este elemento, especialmente en épocas de bajas temperaturas; y al consumir más potasio va a absorber más magnesio, por lo que habrá que tenerlo en cuenta a la hora de equilibrar esta posible carencia. Las necesidades de nitrógeno de la lechuga dentro de todo el ciclo del cultivo son de 90 – 100 kg ha⁻¹ el cual debe suministrarse en dosis no mayores a los 60 kg ha⁻¹. Se debe tener mucho cuidado con la fertilización, con objeto de prevenir posibles fitotoxicidades por exceso de sales y conseguir una buena calidad de hoja y una adecuada formación de los cogollos. También se trata de un cultivo bastante exigente en molibdeno durante las primeras fases de desarrollo, por lo que resulta conveniente la aplicación de este elemento vía foliar, tanto de forma preventiva como para la corrección de posibles carencias (Balcaza, 1997).

Aproximadamente el 60 a 65% de todos los nutrientes son absorbidos en el periodo de formación del cogollo (Infoagro, 2002).

h. Control de malezas

La presencia de malas hierbas requiere de su eliminación, pues este cultivo no admite competencia con ellas ni en épocas tempranas de desarrollo ni en el período próximo a la cosecha, en los primeros estadios debido a la competencia por luz, y en los últimos estadios debido a que pueden sofocar a la lechuga, creando un ambiente propicio al desarrollo de enfermedades y virosis. El control de malas hierbas se

debe realizar de manera integrada para evitar un fuerte impacto ambiental, además se debe tener en cuenta el periodo próximo a la recolección (Infoagro, 2002).

Las materias activas recomendadas en el cultivo de la lechuga contra malas hierbas anuales se presentan a continuación en el Cuadro 2.

CUADRO 22. Materias activas recomendadas para el control de malezas en lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Benfluralina 18%	6.50-9.50 l/ha	Concentrado emulsionable
Pendimetalina 33%	3-5 l/ha	Concentrado emulsionable
Propizamida 40%	1.75-3.75 l/ha	Suspensión concentrada

Fuente: Infoagro, 2002.

i. Recolección

La madurez de la cabeza está basada en la compactación del repollo para todas las variedades excepto las de hoja suelta, las cuales se cosechan en cualquier período después de que las plantas se encuentran lo suficientemente grandes para el consumo, una cabeza compacta es la que requiere de una fuerza manual moderada para ser comprimida (Edmond, 1988).

La cosecha se realiza frecuentemente con un cuchillo grande, cortando en el cuello del tallo. Tradicionalmente la cosecha se realiza en la mañana cuando las lechugas se encuentran cubiertas por el rocío (Hessayon, 1995). Los residuos pueden utilizarse para la elaboración de compost, el cual servirá como abonado para el mismo cultivo o para otros cultivos circundantes.

8. Almacenamiento

La temperatura ideal para el almacenamiento de lechuga es de 0 °C y una humedad relativa mayor del 95%, pudiendo conservarse por un período de tres a cuatro semanas (Yépez, 1988).

9. Valor nutricional

Es una hortaliza pobre en calorías, aunque las hojas exteriores son más ricas en vitamina C que las interiores. El valor nutricional de la lechuga se presenta en el Cuadro 3.

CUADRO 23. Valor nutricional de la lechuga en 100 g de sustancia.

NUTRIENTE	VALOR
Carbohidratos (g)	20.1
Proteínas (g)	8.4
Grasas (g)	1.3
Calcio (g)	0.4
Fósforo (mg)	138.9
Vitamina C (mg)	125.7
Hierro (mg)	7.5
Niacina (mg)	1.3
Riboflavina (mg)	0.6
Tiamina (mg)	0.3
Vitamina A (U.I.)	1155
Calorías (cal)	18

Fuente: Infoagro, 2002.

10. Plagas y enfermedades

a. Plagas

2) **Trips** (Frankliniella occidentalis)

Se le considera una de las peores plagas de la lechuga, pues es transmisor del virus del bronceado del tomate (TSWV), el cual provoca grandes necrosis foliares, y rápidamente éstas acaban matando a la planta como daño directo, mientras que el daño indirecto ocasionado por las picaduras y las hendiduras de puestas depende del nivel poblacional del insecto (Infoagro, 2002).

Lucha biológica: Existen algunos artrópodos depredadores de Frankliniella occidentalis, destacando un insecto del género Orius y los ácaros del grupo de los Fitoseidos. Resulta efectivo plantar en los márgenes de la parcela algunas plantas por la que estos insectos muestran una especial predilección, como es el caso de las habas o alcachofas.

Métodos culturales: Existen algunas sugerencias para el control cultural de esta plaga como es: evitar el uso de material vegetal contaminado, desplazar los cultivos de lechuga en el tiempo para no coincidir, fundamentalmente en las primeras fases vegetativas, con poblaciones altas de trips y eliminar las malas hierbas y restos vegetales antes de la plantación; en invernaderos colocar mallas para evitar la entrada de trips y colocar también trampas para detectar la presencia de los primeros individuos.

Lucha química: Si el nivel poblacional de trips ya no es tolerado por el cultivo se procederá a la lucha química, sin olvidar que la residualidad de los productos sobre el cultivo y la aparición de resistencias en la plaga. Las formas de aplicación de los productos (espolvoreo y pulverización) se deberán alternar para lograr mayor eficacia. En invernadero se recomienda la termonebulización (Infoagro, 2002).

Si las poblaciones de trips son muy elevadas, será necesario realizar dos tratamientos en el plazo de 5 días para romper el ciclo, teniendo en cuenta que las fases de huevo y ninfa no van a ser afectadas por el primer tratamiento y necesitan unos días para emerger. Entre las materias activas recomendadas destacan: Metiocarb, Formetanato, Fenitrotion y Lindano (Infoagro, 2002).

3) **Minadores** (Liriomyza trifolii y Liriomyza huidobrensis)

Esta plaga ocasiona serios problemas sobre todo en las plántulas, forma galerías en las hojas que llegan a debilitar a la planta (Kerns, 1996).

Lucha biológica: Se la realiza utilizando algunas avispas parásitas pero sobre todo se debe evitar cultivar en las épocas propicias para la plaga (Valencia, 1995).

Métodos culturales: Se han obtenido excelentes resultados al utilizar trampas pegantes de color amarillo, las cuales deben colocarse cuando las poblaciones aún se mantienen en un nivel bajo, estas además permiten evaluar las fluctuaciones poblacionales de la plaga.

Lucha química: Se debe comenzar el tratamiento cuando se observen los primeros síntomas, procurando mojar bien toda la superficie de la planta; siendo las siguientes materias activas las recomendadas en el Cuadro 4.

CUADRO 24. Materias activas para el control del minador de la hoja (*Liriomyza trifolii* y *Liriomyza huidobrensis*) en el cultivo de lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Abamectina 1.8%	0.05-0.10%	Concentrado emulsionable
Abamectina 3.37%	0.03-0.05%	Concentrado emulsionable

Fuente: Infoagro, 2002.

4) Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*)

El daño por grandes poblaciones de mosca blanca se observa en una clorosis foliar, reducción del tamaño del repollo, daño económico por contaminación y acumulación de fumagina (Kerns, 1996).

Lucha química: Cuando la población de mosca blanca vaya incrementándose se iniciará el control químico con las materias activas citadas en el Cuadro 5.

CUADRO 25. Materias activas para el control químico de la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) en el cultivo de lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Alfa cipermetrin 5%	0.06-0.08%	Concentrado emulsionable
Imidacloprid 20%	0.05-0.08%	Concentrado soluble

Fuente: Infoagro, 2002.

5) **Pulgon** (Myzus persicae, Macrosiphum solani y Narsonovia ribisnigri).

Se considera al pulgón como una plaga sistemática en el cultivo de la lechuga, su ataque suele ocurrir cuando el cultivo está próximo a la recolección, chupan la savia de las hojas y segregan una sustancia pegajosa que la vuelve susceptible a la fumagina, además puede propagar el virus del mosaico. Tienen la característica de colonizar las plantas desde las hojas exteriores y avanzando hasta el interior, excepto la especie Narsonovia ribisnigri, cuya difusión es centrífuga, es decir, su colonización comienza en las hojas interiores, multiplicándose progresivamente y trasladándose después a las partes exteriores (Infoagro, 2002).

Lucha química: A continuación se muestran las materias activas recomendadas para el control de pulgones (Cuadro 6).

CUADRO 26. Materias activas para el control químico del pulgón (Myzus persicae, Macrosiphum solani y Narsonovia ribisnigri) en lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Acefato 75%	0.05%	Polvo soluble en agua
Alfa cipermetrin 4%	0.08-0.10%	Concentrado emulsionable
Cipermetrin 2% + Metil pirifos 25%	0.20-0.25%	Concentrado emulsionable
Deltametrin 2.5% + Heptenofos 40%	0.05%	Concentrado emulsionable
Imidacloprid 20%	0.05-0.08%	Concentrado soluble
Lambda cihalotrin 2.5%	0.04-0.08%	Concentrado emulsionable

Fuente: Infoagro, 2002.

b. Enfermedades

1) Antracnosis (Marssonina panattoniana)

La antracnosis se inicia con lesiones de tamaño de la punta de un alfiler, esta aumentan de tamaño hasta formar manchas angulosas-circulares de color rojo oscuro, que pueden llegar a tener un diámetro de hasta 4 cm (Infoagro, 2002).

Control químico: Se puede controlar con la desinfección del suelo y de la semilla, En el Cuadro 7 se tiene algunas de las materias activas recomendadas para el control de antracnosis.

CUADRO 27. Materias activas para el control químico de la antracnosis (Marssonina panattoniana) en el cultivo de lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Captan 47.5%	0.25-0.30%	Suspensión concentrada
Folpet 10% + Oxiclورو de cobre 11.2% + Sulfato cuprocálcico 10.4%	0.25-0.35%	Polvo mojable
Folpet 50%	0.25-0.30%	Microgánulo
Mancozeb 40% + Sulfato de cobre 11%	0.30%	Polvo mojable

Fuente: Infoagro, 2002.

2) Botritis (Botrytis cinerea)

Esta enfermedad empieza en las hojas más viejas con unas manchas húmedas que se tornan amarillas, posteriormente se cubren de un moho gris que forma una gran cantidad de esporas. Cuando la humedad relativa aumenta las plantas quedan

cubiertas por un micelio blanco; pero si el ambiente está seco se produce una putrefacción de color pardo o negro (Valencia, 1995).

Control Biológico: Se han descrito diferentes hongos, nematodos y bacterias como antagonistas de botritis, considerándose a los primeros como los mas importantes, entre ellos tenemos: Trichoderma spp, Coniothyrium spp, Gliocladium sp, Mucor spp, Penicillium spp, Verticilium spp (Infoagro, 2002).

Control cultural: Para el control cultural de esta enfermedad se debe evitar una alta humedad dentro del cultivo, manejando densidades de plantación adecuadas y manejando eficientemente los riegos; además evitar un exceso de fertilización con nitrógeno ya que favorece el crecimiento del hongo (Valencia, 1995).

Control químico: El Cuadro 8 muestra las materias activas eficaces y autorizadas actualmente.

CUADRO 28. Materias activas para el control de botritis (Botrytis cinerea) en el cultivo de lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN
Benomilo 50%	0.10%	Polvo mojable
Captan 47.5%	0.25-0.30%	Suspensión concentrada
Cimoxanilo 4% + Folpet 40%	0.30%	Polvo mojable
Iprodiona 50%	0.10-0.15%	Suspensión concentrada
Procimidona 3%	20-30 kg/ha	Polvo para espolvoreo
Vinclozolina 50%	0.10-0.15%	Polvo mojable

Fuente: Infoagro, 2002.

3) **Mildiú Velloso** (Bremia lactucae)

Esta enfermedad se desarrolla en condiciones de baja temperatura (10 a 15 ° C) y de alta humedad relativa. Las hojas presentan manchas color verde amarillentas en el haz y por el envés se observa un polvillo blanquesino (Yépez, 1988).

Control cultural: Se debe utilizar cultivares resistentes sin embargo aparecen nuevas razas de el hongo; además se debe realizar riegos ligeros y mantener una densidad optima de cultivo, evitando asi la excesiva humedad (Valencia, 1995).

Control químico: Para controlar esta enfermedad se recomiendan varias materias activas (Cuadro 9), teniendo en cuenta que dichas aplicaciones sobre infecciones cuyo desarrollo foliar cubre completamente el suelo tiene una eficacia limitada (Infoagro, 2002).

CUADRO 29. Materias activas para el control de mildiu velloso (Bremia lactucae) en el cultivo de lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Benalaxil 6% + Cimoxanilo 3.2% + Folpet 35%	0.23-0.33%	Polvo mojable
Benalaxil 8% + Mancozeb 65%	0.20-0.30%	Polvo mojable
Captan 40% + Tiabendazol 17%	0.15-0.25%	Polvo mojable
Captan 85%	0.15-0.25%	Polvo mojable
Cimoxamilo 4% + Folpet 40%	0.30%	Polvo mojable
Etirimol 6% + Maneb 40%	0.30-0.60%	Suspensión concentrada
Mancozeb 60% + Metil tiofanato 14%	2-4 l/ha	Polvo mojable
Zineb 50%	0.40%	Suspensión concentrada

Fuente: Infoagro, 2002.

4) Esclerotinia (Sclerotinia sclerotiorum)

Esta enfermedad se presenta en bajas temperaturas y alta humedad. Presenta marchites de las hojas basales, podredumbre de la corona y de las hojas adyacentes además forma un moho blanco algodonoso en la parte afectada y unos cuerpos negros y duros que son las estructuras de conservación de los hongos denominados esclerosios (Yépez, 1988).

Control cultural: Se recomienda realizar araduras profundas para enterrar los esclerosios del hongo y evitar que estos germinen e inicien la infección del cultivo. Controlar los riegos para evitar un exceso de humedad y aplicar rotación de cultivos (Valencia, 1995).

Control químico: Para el control de esta enfermedad se recomiendan varias materias activas presentes en el Cuadro 10.

CUADRO 30. Materias activas para el control químico de esclerotinia (Sclerotinia sclerotiorum) en el cultivo de lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Captan 40% + Tiabendazol 17%	0.15-0.25%	Polvo mojable
Folpet 40% + Tiabendazol 17%	0.15-0.25%	Suspensión concentrada
Procimidona 3%	20-30 kg/ha	Polvo para espolvoreo
Vinclozolina 50%	0.10-0.15%	Suspensión concentrada

Fuente: Infoagro, 2002.

5) Septoriosis (Septoria lactucae)

Esta enfermedad produce manchas en las hojas inferiores y se combate empleando las materias activas que se muestran a continuación en el Cuadro 11.

CUADRO 31. Materias activas para el control de septoriosis (Septoria lactucae) en el cultivo de lechuga.

MATERIA ACTIVA	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Cimoxanilo 3% + Folpet 32%+ Ofurace 6%	0.20-0.30%	Polvo mojable
Folpet 10% + Oxiclورو de cobre 11.2% + Sulfato cuprocálcico 10.4%	0.25-0.35%	Polvo mojable

Fuente: Infoagro, 2002.

6) Virus del mosaico de la lechuga (LMV)

Sobre las hojas se producen manchas amarillentas o de color verde claro, atrofiando el crecimiento de la planta; puede presentar una clorosis generalizada e inclusive las nervaduras pueden llegar a lucir como transparentes. Es una de las principales virosis que afectan al cultivo de la lechuga, debido a los importantes daños causados. Se transmite por semilla y pulgones. (Hessayon, 1995).

Control cultural: Como normas básicas a seguir se recomienda: plantar semilleros con garantía sanitarias, arrancar y destruir las plantas afectadas, vigilar y mantener las poblaciones de los vectores en el menor número posible durante todo el ciclo de cultivo (Quilis, 2003).

7) Virus del bronceado del tomate (TSWV)

Este virus se caracteriza por manchas foliares, inicialmente cloróticas, y posteriormente, necróticas e irregulares, en ciertas circunstancias tan extensas que afectan a toda la planta, la cual no se desarrolla plenamente y se marchita en poco tiempo. En el cultivo de la lechuga la incidencia de la virosis no supera el 20-50%. Se transmite por el trips. La concentración del virus en el cuerpo del vector aumenta con la edad del insecto y la fecundidad disminuye en los insectos virulíferos (Infoagro, 2002).

Control cultural: El control debe ir encaminado hacia los vectores que transmiten el virus, así por ejemplo: controlar los semilleros para evitar contaminaciones precoces, eliminar plantas infectadas, eliminar malas hierbas, controlar químicamente a los vectores (Lycos, 2004).

c. Fisiopatías

1) Latencia de la semilla y mala germinación

Para romper la latencia se recomienda la prerefrigeración en cámara fría (2 °C, 48 horas), pregerminación con agua (48 horas a remojo), pregerminación en cámara oscura y tratamientos con solución de giberelinas (24 horas a remojo) (Morales, 2002).

2) Tip burn

Esta fisiopatía se produce en el campo y se relaciona con condiciones climáticas, selección del cultivar y nutrición mineral. Las hojas se presentan con las puntas quemadas dando una apariencia desagradable, volviendo el margen de la hoja dañada más débil y susceptible a pudriciones (Cantwell, 2004).

3) Espigado o subida de la flor

La lechuga produce tallos florales cuando se deja a esta en la tierra después de la formación de los cogollos, a veces estos tallos aparecen antes que las plantas estén en el punto de recolección, a este problema se le denomina “espigado” las posibles causas incluyen: algún contratiempo en el crecimiento, trasplante atrasado o hecho a la ligera superpoblación y sequedad en la raíz (Hessayon, 1995).

4) Antocianos en las hojas

En época de bajas temperaturas durante el ciclo del cultivo algunas variedades son muy sensibles al enrojecimiento de sus hojas (Morales, 2002).

5) Granizo

Afecta negativamente tanto por el daño directo como por el indirecto, ya que sobre las heridas pueden desarrollarse patógenos secundarios, afectando a la comercialización del producto (Morales, 2002).

6) Punteado pardo

Es una fisiopatía común debido a la exposición a bajas concentraciones de etileno que produce depresiones oscuras especialmente en la nervadura media de las hojas. Secundariamente, el etileno estimula la producción de compuestos fenólicos que conduce a la síntesis de pigmentos pardos. Bajo condiciones severas, las manchas pueden ser encontradas en el tejido verde de las hojas y en todo el cogollo. Esta fisiopatía hace a la lechuga no comercial. La contaminación por etileno puede originarse por montacargas que trabajan o funcionan con propano, transporte de cargas mixtas, o almacenaje con frutas generadoras de etileno tales como manzanas y peras (Hessayon, 1995).

7) Mancha parda (brown stain)

Los síntomas de esta fisiopatía son grandes manchas deprimidas de color amarillo rojizo principalmente en la nervadura media de las hojas. Estas pueden oscurecerse o agrandarse con el tiempo. La mancha parda en algunos casos se observa como un veteado pardo rojizo. La mancha parda es causada por la exposición a atmósferas con CO₂ sobre 3%, especialmente a bajas temperaturas (Cantwell, 2004).

8) Costilla rosada (pink rib)

Es una fisiopatía en la cual la nervadura de la hoja adquiere una coloración rojiza. La sobremadurez de los cogollos y el almacenaje a altas temperaturas

incrementan este desorden. Las exposiciones a etileno no incrementan esta fisiopatía y atmósferas con bajo oxígeno no lo controlan (Cantwell, 2004).

B. MANCHA CAFÉ DE LA HOJA (Rhizoctonia spp.)

La rizoctoniasis es una enfermedad que está ampliamente distribuida alrededor del mundo y que ataca a gran cantidad de hospedantes incluida la lechuga.

1. Agente causal

La enfermedad es causada por el hongo Rhizoctonia spp. que pertenece al Orden Micelia Sterilia, el mismo que incluye a todas las formas de hongos que no producen esporas. (González, 1989).

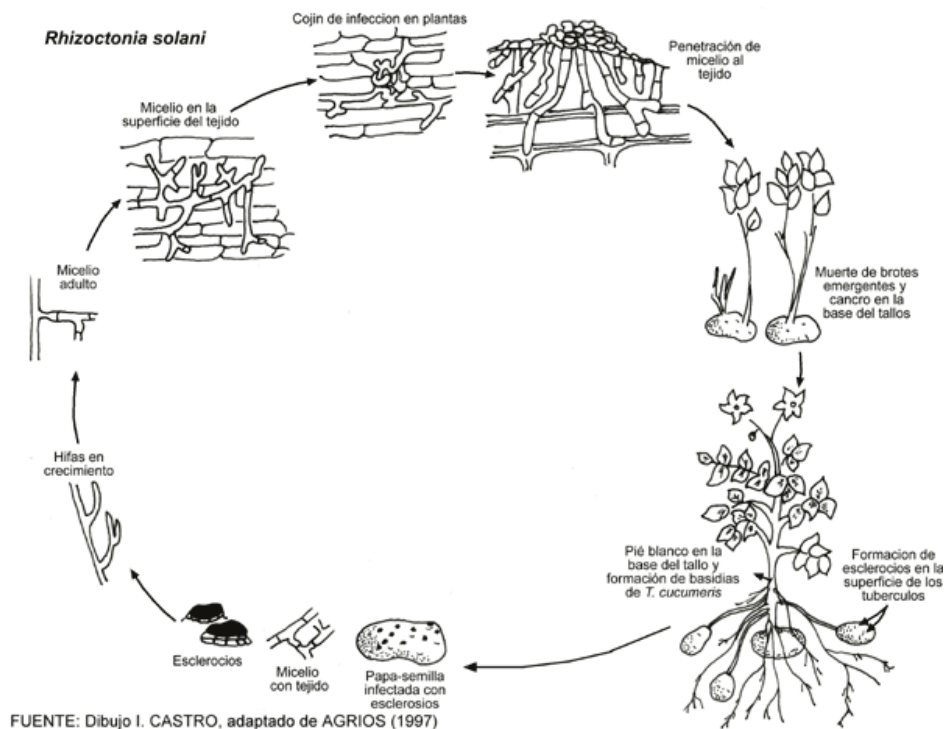
2. Etiología

El hongo se caracteriza por hifas ramificadas y septos formados muy próximos a esas ramificaciones, las hifas son de color marrón oscuro, las células son multinucleadas y la base de la célula que da origen a una ramificación tiene una constricción (Parmeter, 1969; Ogoshi, 1985).

Las hifas son claras cuando jóvenes y adquieren su color definitivo con la edad tornándose castañas.

3. Ciclo de la enfermedad

El hongo se mantiene de un año a otro, como esclerocio y como micelio en residuos de cosecha que se encuentran en el suelo. En la siguiente siembra y en presencia de condiciones favorables de humedad, los esclerocios germinan y el micelio desarrolla infectando los brotes y tallos que se encuentran en estado de pre y/o post emergencia (Figura 1). Las raíces y los estolones son también afectados durante el desarrollo de las plantas (Castro, 1989).



Fuente: Agrios, 1995

FIGURA 1. Ciclo de Vida de Rhizoctonia

4. Diagnóstico

Cuando se tiene sospecha de la presencia del hongo hay que arrancar algunas plantas y sacudir las raíces, luego se observa si quedan partículas de suelo suspendidas en pequeños hilos, como si estuvieran sobre una telaraña. Siempre es necesaria la confirmación por medio del diagnóstico de laboratorio. (Oirsa, 1999)

5. Signos y Síntomas

Las plantas afectadas se tornan de color amarillo, presentan escaso desarrollo, pierden anclaje y cuando el hongo se extiende hacia las hojas inferiores, los tejidos afectados se tornan de un color marrón oscuro y sobre la superficie crece un moho blanquecino que posteriormente se torna amarillento y por último de color marrón, formando costra sobre la superficie. (Oirsa, 1999).

6. Control

El control de la enfermedad debe hacerse combinando control cultural, biológico, químico, etc.

Control Cultural: Rotación de cultivos, eliminación o quema de los restos de cosecha. Esta práctica es válida para eliminar el micelio del hongo que se encuentra en restos de tallos y hojas infectadas en el campo después de la cosecha (Castro, 1989). Usar fertilizantes nitrogenados a base de nitratos (nitrato de calcio o nitrato de potasio) en vez de urea (Oirsa, 1999) así como cantidades moderadas de fósforo y altas a moderadas de potasio (Martínez, 2004). Incrementar la circulación

de aire y mejorar el drenaje del suelo son prácticas culturales aplicables al control de casi todas las enfermedades causadas por hongos. Aplicar cal si el pH del suelo es menor de 6.5 (Martínez, 2004).

Control químico: El uso de fungicidas no incrementa los rendimientos, pero, incrementa la calidad sanitaria de las lechugas. Por otro lado, los fungicidas deberían utilizarse de manera adecuada y siguiendo un esquema de control de la enfermedad (Castro, 1989). El uso de fungicidas del grupo de los benzimidazoles reduce el daño, pero no lo erradica. Aplicaciones de Thiofanato de Metilo, PCNB, Iprodione y Triflumizol son otros ingredientes que también manifiestan un adecuado control (Oirsa, 1999).

Control biológico: Entre los enemigos naturales de Rhizoctonia solani, los más eficientes son Trichoderma harzianum, Rhizoctonia binucleada y Verticillium biguttatum, aunque en la práctica el control biológico debe ser considerado sólo como un componente del control integrado. (Gutiérrez, 1990). Últimamente se ha determinado que Bacillus subtilis actúa como controlador biológico de la mayoría de enfermedades de suelo, por su capacidad de liberar compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina. (Bravo 1993; citado por Benzing 2001).

7. Importancia económica

Las pérdidas ocasionadas por Rhizoctonia en los invernaderos son incalculables, y dada su capacidad de diseminación. Además, no solo causa pudrición radicular sino que también causa enfermedades foliares como manchas y tizones. El control

es costoso y difícil dado que este hongo produce estructuras de resistencia que prevalecen por varios años en el suelo (Oirsa, 1999).

C. EL BIOL

Se denomina biol al afluente líquido que se descarga de un biodigestor, se obtiene como producto del proceso de descomposición anaeróbica de los desechos orgánicos. Está constituido de sólidos disueltos, conserva del 0,5 al 1,5 % de materia sólida. Entre las características más sobresalientes del biol, se tiene que es una gran fuente orgánica de fitorreguladores, por lo que promueve en la planta actividades fisiológicas y estimula su desarrollo. Aumenta y fortalece la base radicular de las plantas, mejora el enraizamiento, amplía la base foliar, mejora la floración y activa el vigor y poder germinativo de las semilla (Suquilanda, 1996).

1. Elaboración del Biol

Para la elaboración del biol se debe tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

Los microorganismos encargados de la descomposición requieren el carbono (C) como fuente de energía así como el nitrógeno (N) para su propia estructura celular. Por lo que se recomienda mantener una relación de estos componentes de 20:1 a 30:1. Las condiciones dentro del biodigestor deben ser de temperaturas de entre 25 a 35 °C, un pH de 7 y condiciones anaeróbicas al 100% (Suquilanda, 1996).

El volumen de agua debe ser del 90% del total colocado en el biodigestor, y un 10% de material orgánico. El material debe permanecer en el biodigestor por un período de entre 38 y 90 días, permitiendo la salida de gas (Suquilanda, 1996).

El biodigestor es de fácil construcción, se requiere de un recipiente plástico adecuado para el volumen que se requiere de biol (el volumen ocupará el 70% del espacio, dejando libre un 30% para la acumulación de gas), se necesita una manguera que permita la salida del gas y que conectará la parte interna del biodigestor con el ambiente externo, solo para liberar el gas. En el extremo exterior de la manguera, se colocará un recipiente con agua que servirá como válvula de escape (Gutiérrez, 2001). El producto está listo cuando en el agua no se observa burbujas de gas.

2. Uso del Biol

El biol puede ser utilizado como fuente de fitorreguladores. Su efecto como promotor de crecimiento ha sido ampliamente estudiado, sin embargo se conoce que puede ser utilizado como fuente de microorganismos que actúen como controladores biológicos de plagas y enfermedades (Suquilanda, 1996).

D. CONTROL BIOLÓGICO

La principal razón para el auge del uso de control biológico, es que en la actualidad se conoce mucho más de la ecología microbiana en relación con la fitopatología, por esto se puede entender los componentes y función de los nichos

ecológicos, en los que los microorganismos, pueden colonizar y hacer interrelaciones. Permittiéndonos algún tipo de predicción, y con esto controlar biológicamente las enfermedades. Tenemos además métodos de control biológico, disponibles, baratos, relativamente efectivos, que no han sido incentivados a tiempo.

Los primeros pesticidas desarrollados continúan siendo químicos tóxicos potentes, que persisten en el medio ambiente, acumulándose en predadores y en todos los niveles de las cadenas alimenticias (Falconí, 1997). En países desarrollados estos productos químicos han sido hoy en día limitados o prohibidos, a pesar de que siguen siendo usados en países en vías de desarrollo por su fácil adquisición y su eficiencia para el control frente a plagas y enfermedades, no obstante con un daño incalculable al medio ambiente.

Debemos darnos cuenta que el abandono inmediato de pesticidas no es posible, debido a que son considerados imprescindibles. Sin embargo existe un movimiento público por parte de los medio ambientalistas, de ecólogos, de fitopatòlogos, de agrónomos, que estamos a favor de la reducción del uso de pesticidas y en el establecimiento de reglamentos de práctica y legislación de pesticidas, lamentablemente estos se encuentran ausentes en el Ecuador.

El concepto de control biológico no debe relacionarse con un suceso de éxito inmediato, ya que abarca procesos biológicos más complejos, como el establecer paralelismos de coexistencias de antagonistas y patógenos con su respectivo huésped, en un sistema agrícola equilibrado.

Las propiedades que debe tener el controlador biológico para Falconí, 1997 son:

- Crecimiento rápido y poco exigente de elementos nutricionales y medio ambientales.
- Capacidad de utilizar las primeras fuentes nutricionales, como colonizador de la materia orgánica de plantas en los primeros estadios de desarrollo.
- Capacidad de adaptación a medio ambientes agrícolas alterados.
- Medio de distribución adecuado, usualmente esporas o esclerotes, para la sobrevivencia en el suelo o en la planta, cerca del inóculo patógeno o en la fuente de infección.

1. Género Bacillus

Los bacilos en general están clasificados dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos y productores de catalasa. Pueden ser gram positivos o gram variables. En general producen endosporas.

a. Características del género Bacillus

Las características generales del género Bacillus según (Bioland, 2005) son:

Producen endosporas, que son termoresistentes y también resisten a agentes como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos.

Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones; además estos bacilos

producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gamicidina y circulina.

Los bacilos crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno. Viven dentro los límites de temperatura de 55 a 70°C. El límite inferior de pH para Bacillus es de 2 a 3.

2. Bacillus subtilis

Bacillus subtilis es considerado uno de los más eficaces agentes controladores biológicos de enfermedades foliares y en especial de enfermedades radiculares. Es una bacteria gram positiva, que posee la capacidad de formar esporas, estructuras altamente resistentes y viables por períodos de tiempo inconmensurables. Es muy colonizador de raíces, poco versátil nutricionalmente (Rougieux, 1964).

Bacillus subtilis pertenece a las bacterias grampositivas, mesófilas, producen esporas ovas o cilíndricas; son fermentativas, usualmente hidrolizan caseína y almidón; los esporangios no son hinchados; la pared de la espora es delgada.

a. Esporulación

Varias especies de bacterias Gram positivas (incluido el genero Bacillus), disponen de una serie de estrategias adaptativas cuando se ven sometidas a privación de nutrientes en su medio ambiente (Rougieux, 1964). Entre estas tenemos:

Como un principio, intentan alcanzar un medio ambiente más propicio. Según (Iáñez, 1998), las respuestas consisten en lo siguiente:

Cuando los Bacillus están creciendo activamente en un medio rico en nutrientes, carecen de flagelos. Pero si los nutrientes comienzan a escasear, se induce la síntesis de flagelos y las bacterias se mueven, en virtud de quimiotaxis positiva, hacia zonas donde detecten mayores concentraciones de nutrientes.

Si de alguna manera, los nutrientes ricos vuelven a escasear, se inducen una serie de enzimas intracelulares y extracelulares, destinadas a aprovechar nutrientes menos ricos: enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, que permiten aprovechar el acetato que previamente las bacterias habían "desechado" como consecuencia de la utilización de la glucosa; enzimas hidrolíticas extracelulares destinadas a degradar polímeros presentes en el medio.

Sin embargo si la situación de carencia de nutrientes se mantiene, las bacterias se preparan para sobrellevar este período con la denominada **endospora**, que es una forma de reposo (metabolismo prácticamente detenido), y que es capaz de resistir una amplia gama de agentes agresivos ambientales, físicos y químicos (Rougieux, 1964).

Según Iáñez, 1998; si la bacteria sigue pasando hambre, concretamente, si los niveles de fuentes de C, N, o P caen por debajo de un umbral, esto constituye una señal a la bacteria de que se avecina un largo período de privación de nutrientes. Entonces, la bacteria se implica en una serie de complejos cambios genéticos,

metabólicos, estructurales, etc. (proceso de **esporulación**), que conducen a la diferenciación, en el interior de la célula vegetativa original, de una célula durmiente (**endospora**). La célula madre (o sea, la célula vegetativa original que generó la endospora) finalmente se autolisa, liberando la espora, que es capaz de permanecer en estado de metabolismo casi nulo, durmiente, varios decenios, incluso siglos. Las esporas son fácilmente diseminadas por el aire; cuando caen en medios ricos en nutrientes, se desencadena su **germinación**, se reinicia la actividad metabólica, de modo que cada espora genera una nueva célula vegetativa, capaz de división binaria.

b. Propiedades de las Esporas (Iáñez, 1998)

Hipometabolía: Poseen la más baja tasa respiratoria de todos los seres vivos. Por ello son capaces de sobrevivir en ausencia de nutrientes durante largos períodos de tiempo.

Dormancia: Esta propiedad se refiere al hecho de que la espora tiene una gran inercia a los sustratos exógenos, sólo perderá la dormancia cuando se haya activado para la germinación.

Resistencia al calor: Las esporas resisten 120°C durante 15 minutos, lo cual condiciona los parámetros para esterilizar materiales.

Deshidratación: Es capaz de mantenerse en un muy bajo contenido en agua de la espora.

Resistencia a agentes químicos: La resistencia de la endospora a agentes como octanol, cloroformo, etc. se debe a la impermeabilidad de las cubiertas, gracias a su gran grosor y su peculiar composición a base de proteínas ricas en aminoácidos hidrófobos y con abundantes puentes disulfuro (cistinas).

E. COMPARACIÓN CON VARIOS ESTUDIOS SIMILARES

El Bacillus subtilis como antagonista, no ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, existen algunos estudios que empiezan a aclarar muchas dudas acerca de este antagonista.

1. Bacillus subtilis aplicado a cereales

Se conoce que la aplicación de Bacillus subtilis duplica el rendimiento en cultivos de cereales como es el caso del trigo, comparados con plantas infectadas naturalmente con Gaeumannomyces graminis. De igual manera Bacillus subtilis y B. pumilis, han sido usados en trigo para el control de Rhizoctonia, por lo que se observa, que en presencia de la bacteria existe una poca incidencia de la enfermedad, lo que refleja un aumento del rendimiento a la cosecha (Falconí, 1997).

Debido a la diversidad genética en el género Bacillus, tanto en la rizósfera como en el suelo, se considera a estas bacterias como colonizadores eficaces. Las potencialidades del género Bacillus sobre Pseudomonas fluorescens han sido señaladas por (Kim, 1997), quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género.

2. Bacillus subtilis aplicado a hortalizas

Bacillus subtilis dio grandes resultados en el control de la pudrición radicular de la cebolla causada por Sclerotium cepivorum. La enfermedad fue disminuida a la mitad, pero los resultados repetitivos no dieron los efectos significativos que se esperaban, debido a la variabilidad del experimento (Falconí, 1997).

Para el control de Alternaria porri en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con las de los fungicidas zineb y oxiclورو de cobre, se determinó que los tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos.

3. Bacillus subtilis aplicado a frutales

Esta bacteria se ha evaluado para el control de enfermedades fungosas en pre y poscosecha de aguacate, teniendo un efecto similar al de los fungicidas comerciales (Korsten, 1997). Los mejores resultados fueron logrados con un tratamiento integrado que incluía aplicaciones de benomil y oxiclورو de cobre y control biológico, siendo este el primer informe de control biológico precosecha en aguacate. Cabe recalcar que Bacillus subtilis es un habitante natural del filoplano del árbol de aguacate.

También se realizaron pruebas *in vitro* con Pseudomonas sp. y Bacillus subtilis aislados de plátano y arroz, respectivamente (Torres, 2001). Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo,

como Fusarium oxysporium, Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Phytophthora nicotianae, Fusarium moniliforme y Fusarium solani (Castellanos, 1995).

4. Bacillus subtilis aplicado a leguminosas

Actualmente, se desarrolló una formulación de Bacillus subtilis para controlar la pudrición radicular del fréjol, la cual se evaluó comparando diferentes sustratos y se determinó que en condiciones de laboratorio el tratamiento con turba fue el más eficaz. No obstante, en condiciones de campo la formulación a base de pectina fue la que logró mejor control (Lazzarete, 1994).

El efecto de aplicaciones al suelo de Bacillus subtilis mejora el control de Fusarium oxysporum en arveja china, pero incrementa fuertemente los costos de producción. Se recomienda su uso aplicado al suelo, en suelos muy infestados por el patógeno.

5. Bacillus subtilis aplicado a semillas

Uno de los usos de Bacillus subtilis como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

IV. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES

Para la elaboración del biol se utilizó agua destilada, baldes plásticos, colador, melaza y papa.

Durante la fase de laboratorio se ocuparon los siguientes equipos: cámara de flujo laminar, cámara de inoculación, microscopio, incubadora y agitador. Los reactivos utilizados fueron: aceite mineral, ágar, alcohol, antisuero IASA C2S1 (Chiriboga, 2003), asparagina, bromo cresol purpura, carbonato de calcio, cloruro de sodio, cloranfenicol, dextrosa, difosfato de potasio, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, fosfato ácido de potasio, glucosa, jugo V8, hidróxido de potasio, maltosa, peptona, rosa de bengala, sulfato de magnesio, sulfato de estreptomicina. Finalmente se contó con el equipo normal de un laboratorio.

En la fase de campo se utilizaron los siguientes materiales: bomba de aplicación, balanza, calibrador, fertilizantes, flexómetro, formol, herramientas de campo, plástico negro de desinfección, producto químico (Captan 80), semilla de lechuga (Grandes lagos). Como ropa de trabajo se utilizó: botas de caucho, guantes, mandil, mascarillas, overol.

B. METODOS

1. Obtención de biol de papa prehidrolizada en melaza

Para obtener biol de papa en melaza se hidrolizó la misma mediante el siguiente proceso: se lavó los tubérculos minuciosamente para su posterior cocción durante 20 a 30 minutos, luego se dejó en reposo durante 3 días en un recipiente cerrado no herméticamente; finalmente se cernió el contenido del recipiente.

Una vez obtenido el extracto de papa hidrolizada, se colocó 1 lt de este, con 250 ml de melaza y se aforó hasta 4 litros con agua destilada en un balde plástico sellado; se mantuvo el biodigestor cerrado durante 20 días a temperatura constante de 50 °C, permitiendo la salida del gas cada tres días y se filtró el contenido obteniendo un biol de pH aproximado de 7 en condiciones anaeróbicas (Figura 2).

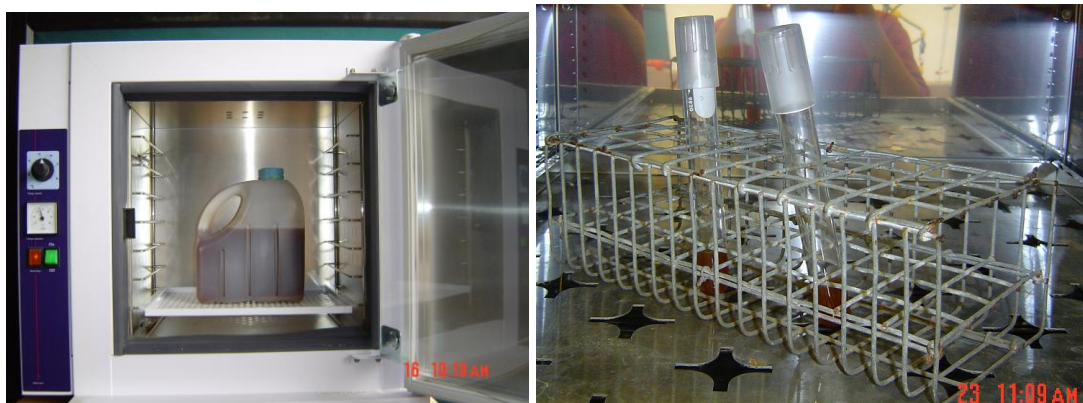


FIGURA 2. Biol de papa prehidrolizada, Laboratorio IASA, 2004.

2. **Aislamiento, purificación y tipificación del *Bacillus subtilis* a partir del biol.**

a. **Aislamiento y purificación**

Para el aislamiento y purificación del Bacillus a partir del biol se colocó una muestra de 10 ml de biol en 4 tubos estériles y estos fueron expuestos a una temperatura de 80 °C durante 15 minutos. Luego se propagó el Bacillus en agar nutriente, el mismo que se preparó con 1 g de extracto de carne, 2 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 5 g de cloruro de sodio, 15 g de agar. Todos los componentes fueron diluidos en 1 lt de agua destilada, esta mezcla se llevó al autoclave y finalmente se inoculó el Bacillus subtilis. Al momento de la siembra, se colocó en 3 cajas petri una alícuota del biol antes expuesto a la temperatura de 80 °C durante 15 minutos, se vertió el agar nutriente y se agitó suavemente con la mano para inducir un crecimiento de colonias aisladas.

En base a la observación de características como color blanco sin brillo, y tomando en cuenta la temperatura a la que fue sometido el biol, se determinó Bacillus a 6 colonias de entre todas las observadas.

b. **Tipificación del Bacillus subtilis**

Para la identificación del Bacillus subtilis, se realizaron 2 pruebas específicas, la Prueba Serológica y la Prueba de Productos de la Glucosa.

La prueba Serológica es una prueba específica para la determinación de Bacillus subtilis, se realizó con el antisuero I.A.S.A. C2S1 (Chiriboga, 2003) y una solución de cloruro de sodio al 0,85%. El procedimiento a seguirse fue el siguiente: las 6 muestras obtenidas de Bacillus, fueron llevadas a concentración Mc Farland 2, se realizó una mezcla con 1,5 ml de antisuero y 1,5 ml de la solución salina. Los 3 ml obtenidos se repartieron en 6 tubos de ensayo a razón de 0,5 ml y se agregó 0,5 ml de cada una de las 6 muestras anteriormente llevadas a una concentración de Mc Farland 2; se mantuvo en agitación los 6 tubos durante 24 horas. Esta prueba midió el aglutinamiento de la bacteria, las muestras 1 y 2 presentaron mayor aglutinamiento indicando la presencia de Bacillus subtilis.

La Prueba de Productos de la Glucosa se realizó para confirmar el resultado de la Prueba Serológica, para esto se sometió las 6 muestras anteriores a la Prueba de Productos de la Glucosa que constó de 3 partes, la Prueba Ácida, la de Gas y la de Acetoina. Para que una bacteria se considere Bacillus subtilis debe ser ácida positiva, gas negativa y acetoina positiva.

Para la realización de las dos primeras pruebas (Prueba Ácida y de Gas) fue necesario utilizar 10 ml de glucosa al 10% y preparar 100 ml de Medio Base, cuyos componentes son: 0,1 ml al 2,5% de bromo cresol púrpura, 0,3 g de fosfato ácido de potasio, 3 g de agar, 3 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio, 10 g de peptona, 100 ml de agua destilada (aforar).

Para esto se esterilizó en el autoclave por separado 2 frascos con 45 ml de Medio Base cada uno y un tercer frasco con 20 ml de aceite mineral, una vez

esterilizado cada uno de los frascos de 45 ml de medio base se agregó 5 ml de glucosa al 10%.

Para la Prueba Ácida, se vertió 5 ml del medio en 6 tubos de ensayo, se procedió a la siembra directa de cada muestra con una asa de inoculación. Se observó el crecimiento por un período de 3 días; esta prueba mide el cambio de pH a través de la variación de color en las muestras, pasando de púrpura a amarillo, siendo amarillo positivo. En esta prueba resultaron positivas las muestras 1, 2, 3, 4 y 6 (Figura 3).

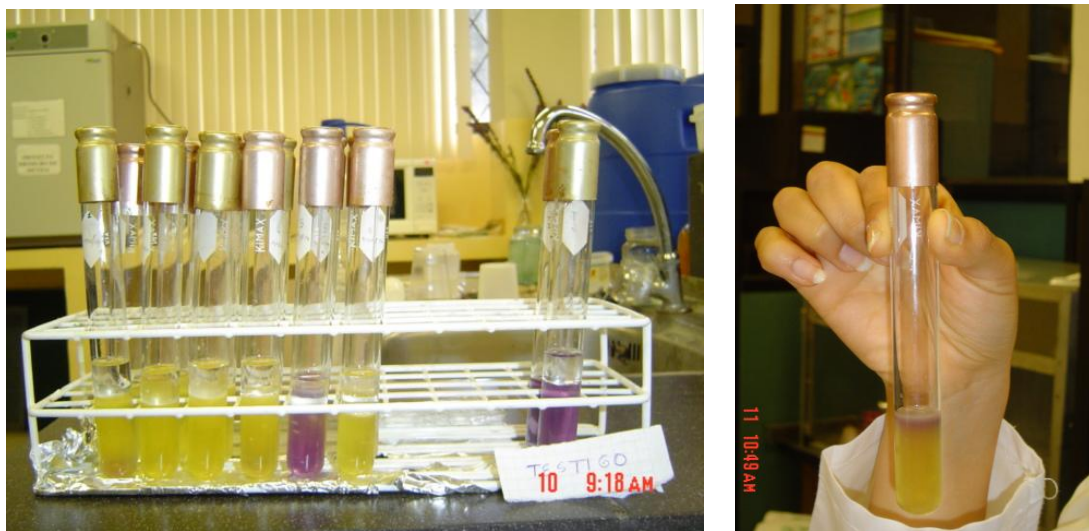


FIGURA 3. Prueba ácida, laboratorio IASA, 2004.

Para la Prueba de Gas se vertió 5 ml del medio en 6 tubos de ensayo, se procedió a la siembra directa de cada muestra con una asa de inoculación y sobre esta se colocó 2 ml de aceite mineral. Se observó la prueba por un período de 3 días; esta prueba mide la presencia (positiva) o ausencia (negativa) de burbujas en el aceite. Las muestras que resultaron negativas fueron 1, 2 y 6 (Figura 4).



FIGURA 4. Prueba de gas, laboratorio IASA, 2004.

Para la Prueba de Acetoina fue necesario preparar 50 ml de un medio que consta de 0,25 g de glucosa, 0,25 g de cloruro de sodio, 0,35 g de peptona, 50 ml de agua destilada. Una vez mezclados los componentes se procedió a su esterilización por medio del autoclave, luego se distribuyó el medio a razón de 4 ml en 12 tubos de ensayo correspondientes a las 6 muestras y a una repetición. Esta prueba mide la forma de crecimiento, siendo positiva cuando se forma un anillo de crecimiento en la superficie o un crecimiento vertical central y negativo si se desarrolla en el fondo, la única muestra positiva fue la número 2. La muestra número 2 resultó Bacillus subtilis en las 2 pruebas realizadas: Serológica y de Productos de la Glucosa.

3. **Determinación de la acción antagónica de Bacillus subtilis para controlar Rhizoctonia sp in vitro e in vivo.**

a. *In vitro*

3) **Preparación del inóculo**

Para obtener el patógeno Rhizoctonia se lavó por separado las hojas, raíces, y tallo de una lechuga enferma con Rhizoctonia, posteriormente se cortó por separado el material lavado. A continuación se colocó el material en agua destilada y se trituró hasta obtener una mezcla poco homogénea.

Para propagar la Rhizoctonia se preparó un medio de PDA con antibiótico (Cloranfenicol). Para preparar 1 lt de PDA se utilizaron 200 g de papas peladas, 500 ml de agua destilada, 20 g de dextrosa, 15 g de agar agar. Se cocinaron las papas hasta que se deshicieron en el agua destilada, se cernió el contenido y se vertió el líquido con la dextrosa y el agar, se aforó hasta 1 lt y se autoclavó el medio; luego se colocó el antibiótico (250 mg).

Para la siembra de Rhizoctonia en cajas petri, se colocó una alícuota de la mezcla formada con agua destilada y el material vegetal infectado, se agregó el PDA y se agitó suavemente para propender al crecimiento de colonias aisladas, una vez selladas las cajas estas se colocaron en la incubadora a 27 °C por un período de 24 horas.

Observado el crecimiento en las cajas, se realizó una inspección al microscopio, utilizando cinta adhesiva e hidróxido de potasio al 3%. Una vez determinada la colonia de Rhizoctonia, se realizó el mismo procedimiento por varias veces hasta obtener una Rhizoctonia pura.

4) Prueba Dual de Antagonismo

Para la Prueba Dual de Antagonismo fue necesario preparar un medio de cultivo donde se desarrollen el patógeno Rhizoctonia sp. y el antagonista Bacillus subtilis. Se escogió el medio V8, cuyos componentes son: 1,5 g de asparagina, 3 g de carbonato de calcio, 5 g de extracto de malta, 10 g de maltosa, 19 g de agar, 200 ml de jugo V8 (jugo Campbell), 1 lt de agua destilada (aforar). Una vez esterilizado el medio, se vertió en las cajas petri y se dejaron en reposo durante 24 horas en la cámara de inoculación para que solidifiquen adecuadamente y se evite un exceso de humedad al momento de la siembra.

La siembra de Rhizoctonia se realizó en 6 cajas petri con V8, correspondientes al tratamiento 1 y testigo absoluto. La siembra se realizó con sacabocados colocando una porción en el lado derecho de la caja y una porción al lado izquierdo. De igual manera, se sembró en 3 cajas petri el antagonista Bacillus subtilis (tratamiento 2), formando 2 franjas con el asa de inoculación como muestra el Figura 5. Se sellaron las 9 cajas y se colocaron en la incubadora durante 24 horas a 27 °C. Pasado este período de tiempo, se procedió a sembrar el Bacillus subtilis en las cajas que contenían Rhizoctonia y a sembrar la Rhizoctonia en las cajas que contenían el Bacillus subtilis. El testigo permaneció sellado.

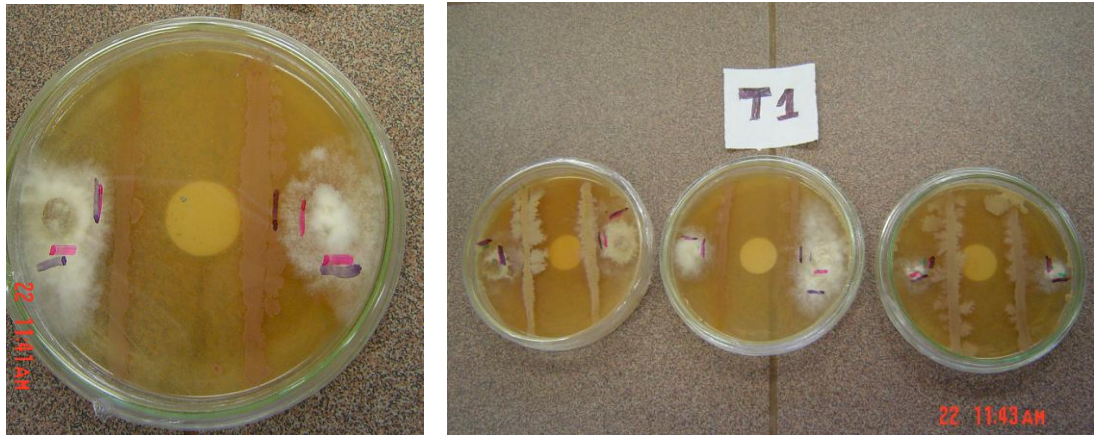


FIGURA 5. Prueba dual de antagonismo, laboratorio IASA, 2004.

Se midió el crecimiento transversal y perpendicular de la Rhizoctonia durante 3 días seguidos incluyendo el primer día en el cual tanto el tratamiento 1 como el tratamiento 2 tenían solo al patógeno y solo al antagonista respectivamente. Las variables analizadas fueron el crecimiento paralelo en A vs crecimiento perpendicular en B del hongo a las estrías de las bacterias aisladas (Figura 6).

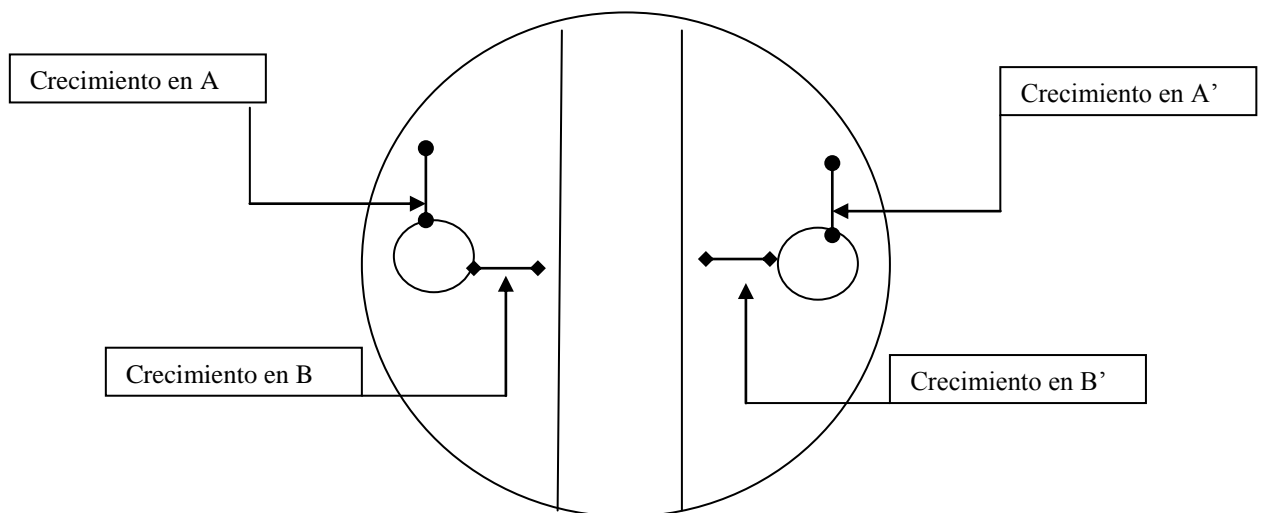


FIGURA 6. Crecimiento paralelo en A vs crecimiento perpendicular en B del hongo a las estrías de la bacteria aislada.

Los factores en estudio fueron el antagonista Bacillus subtilis y el patógeno Rhizoctonia sp. Para el análisis estadístico se utilizó el Diseño Completamente al Azar con 3 repeticiones. Se realizó pruebas de Duncan al 5% para tratamientos y pruebas de normalidad y homocedasticidad para determinar la distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos. El modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

μ : Media poblacional.

T_i : Efecto del i – esimo tratamiento

E_{ij} : Error experimental

b. ***In vivo***

1) Características del Campo Experimental

La investigación se realizó en la Hacienda el Prado – IASA, específicamente en el área de hortalizas, cuyas características son: suelo de pH entre 5,5 a 5,9; declive del 1%, drenaje irregular y textura franco arcillo arenoso.

Las características agroclimáticas de esta zona fueron: temperatura media de 14,47 °C, precipitación anual de 1089 mm y altitud de 2750 msnm (Arce², 2005). El número de camas utilizadas fue de 15. Cada cama con 90 plantas, de forma rectangular con 10 m de largo por 1 m de ancho. La distancia de siembra fue de 30 cm entre hileras y 20 cm entre plantas (Barahona, 2004; Figura 7).

² Arce, M. 2005. Características agroclimáticas de la Hacienda El Prado (entrevista). Sangolquí, EC. ESPE.



FIGURA 7. Cultivo de lechuga IASA, 2004 - 2005.

2) Método de Evaluación

El Bacillus subtilis se aplicó al campo semanalmente desde transplante hasta la cosecha, en concentraciones de Mc Farland 7, 8 y 9.

El medio de inoculación para Bacillus subtilis fue el denominado Caldo Nutriente que constó de 1 g de glucosa, 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de fosfato de potasio, 5 g de peptona, 1 lt de agua destilada (aforar). El medio se autoclavó junto con 3 tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada para realizar las diluciones Mc Farland, posteriormente se sembró el Bacillus subtilis con una asa de inoculación en 10 ml de Caldo Nutriente y se colocó el tubo sembrado durante 24 horas en la incubadora a 27 °C. Después de este tiempo, se realizaron las diluciones Mc Farland colocando 1 ml del primer tubo (Mc Farland 10) en 9 ml de agua destilada para obtener un segundo tubo con una dilución de Mc farland 9. De este segundo tubo (Mc Farland 9), se tomó 1 ml de agua y se colocó en un tercer tubo,

formando una solución Mc Farland 8. De este tercer tubo (Mc Farland 8), se tomó 1 ml y se realizó una solución Mc Farland 7 (Figura 8).



FIGURA 8. Escala Mc Farland, IASA, 2004.

A continuación se colocó 3 ml de cada una de las soluciones Mc Farland 7, 8 y 9 en 3 frascos de capacidad de 1 lt con 300 ml de Caldo Nutriente respectivamente para que exista una adecuada aireación. Se colocó los frascos en agitación a 120 revoluciones por minuto y a 27 °C por un período de 24 horas.

Para la aplicación al campo se colocó los 300 ml de bacteria Mc Farland 7 en una bomba de 12 lt, se procedió de igual manera con las concentraciones Mc Farland 8 y 9. El producto químico (Captan) se aplicó de acuerdo a las especificaciones del fabricante en el cultivo de lechuga (Figura 9).



FIGURA 9. Aplicación de Bacillus subtilis en el cultivo de lechuga IASA, 2004.

Para determinar la acción antagónica de Bacillus subtilis contra Rhizoctonia sp. en el campo se procedió a la medición del porcentaje de incidencia.

Para esto se tomaron los datos semanalmente, a partir del transplante durante 9 semanas, contando el número de plantas enfermas con Rhizoctonia sp. de cada unidad experimental y expresándolo en porcentaje mediante la ecuación :

$$\% \text{ incidencia} = \frac{\text{Número de plantas enfermas} \times 100}{\text{Número total de plantas}}$$

Los factores en estudio fueron las concentraciones de Bacillus subtilis Mc Farland 7, Mc Farland 8 y Mc Farland 9.

Durante la fase de campo se establecieron cinco tratamientos: T1 Bacillus subtilis Mc Farland 7, T2 Bacillus subtilis Mc Farland 8,

T3 Bacillus subtilis Mc Farland 9, T4 Químico (Captan) y T5 Testigo Absoluto (riego).

Para el análisis estadístico se utilizó el Diseño Completamente al Azar con 3 repeticiones. Se realizó pruebas de Duncan al 5% para tratamientos y pruebas de normalidad y homocedasticidad para determinar la distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos. El modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

μ : Media poblacional.

T_i : Efecto del i – esimo tratamiento

E_{ij} : Error experimental

Para el primer ciclo de cultivo se realizó una estandarización de datos que logra que se cumpla el supuesto análisis de varianza y permite el cumplimiento de la normalidad y la homocedasticidad, además determina la distribución normal y homogeneidad de dichos datos. Al no cumplirse lo esperado fue necesario realizar una prueba no Paramétrica.

Para el segundo ciclo de cultivo se aplicó logaritmo natural el cual logra que se cumpla el supuesto análisis de varianza, normalidad y homocedasticidad; determina la distribución normal y homogeneidad de los datos. Al no cumplirse lo esperado se realizó una prueba no Paramétrica.

4. **Establecimiento de la concentración más adecuada de Bacillus subtilis para control de Rhizoctonia sp. y evaluación de los tratamientos en campo.**

Para determinar los tratamientos que permitan obtener parámetros óptimos de producción se registró cada uno de los datos estudiados durante dos ciclos de cultivo. Las variables evaluadas fueron:

a. **Porcentaje de prendimiento**

Se tomaron datos a los 7 días de trasplante (Figura 10), contando el número de plantas prendidas de cada unidad experimental y expresándolo en porcentaje con la ecuación:

$$\% \text{ prendimiento} = \frac{\text{Número de plantas prendidas} \times 100}{\text{Número total de plantas trasplantadas}}$$



FIGURA 10. Transplante de plantas de lechuga IASA, 2004.

b. Altura de planta

Los datos se tomaron cada 15 días luego del trasplante hasta los 45 días. Se midió la altura desde la base hasta el ápice más alto de cada planta de las unidades experimentales con una regla de escala en centímetros (Figura 11).



FIGURA 11. Medición de la velocidad de crecimiento IASA, 2004.

c. Ciclo de cultivo

Los datos se tomaron a partir de que se apreció madurez comercial. Se tomó el tiempo que demoró cada muestra representativa de la unidad experimental (30 plantas) en llegar a la madurez comercial.

d. Diámetro de cabeza

Alcanzada la madurez comercial se midió el diámetro de cabeza con un calibrador de una muestra representativa de cada unidad experimental (30 plantas).

e. **Peso final**

Alcanzada la madurez comercial se tomó el peso individual de las lechugas (30 plantas por unidad experimental), esto se realizó con la ayuda de una balanza. Además se transformó a peso final por parcela y por hectárea, mediante las fórmulas:

$$\text{Peso final por parcela} = \text{Peso } \bar{x} \text{ de parcela} \times 90 \text{ plantas}$$

$$\text{Peso final por hectárea} = \text{Peso } \bar{x} \text{ de parcela} \times 67.500 \text{ plantas}$$

f. **Compactación**

La compactación se obtuvo tomando los datos de peso y diámetro a la madurez comercial de una muestra representativa de cada unidad experimental (30 plantas) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Compactación} = \frac{\text{Número de plantas prendidas} \times 100}{\text{Número total de plantas trasplantadas}}$$

Los factores en estudio para estos 6 parámetros de rendimiento, medidos a la cosecha (Figura 12), fueron las concentraciones de Bacillus subtilis Mc Farland 7, Mc Farland 8 y Mc Farland 9. Se mantuvieron los 5 tratamientos iniciales, el mismo diseño y modelo matemático que se utilizaron en el porcentaje de incidencia.



FIGURA 12. Cosecha IASA, 2004.

5. **Determinación de la concentración inicial y final de *Rhizoctonia sp.* en el suelo.**

Se realizaron 3 conteos de *Rhizoctonia* durante toda la investigación, uno al inicio del primer ciclo de cultivo, otro al inicio del segundo ciclo y uno al final del segundo ciclo de cultivo.

Para el conteo de *Rhizoctonia* se tomaron muestras de suelo de cada tratamiento, 5 en total, en el laboratorio se preparó el Medio de Martin, cuyos componentes fueron: 0,5 g de fosfato de potasio, 0,5 g de difosfato de potasio, 0,5 g de sulfato de magnesio, 0,5 g de extracto de levadura, 0,05 g de rosa de bengala, 0,03 g de sulfato de estreptomicina, 5 g de peptona, 10 g de dextrosa, 18 g de agar. Se esterilizó el medio en el autoclave junto a cinco botellas con 70 ml de agua destilada, una para cada tratamiento; en cada botella se colocó 30 g de cada muestra de suelo y se sometió cada frasco a 120 revoluciones por minuto durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se esterilizó 3 cajas petri por cada muestra de suelo (15). Se disolvió el antibiótico (cloranfenicol) en el Medio de Martin (Figura 13).



FIGURA 13. Conteo de Rhizoctonia, laboratorio IASA, 2005.

Se sembró una alícuota de cada muestra de suelo en las cajas petri, se sellaron y colocaron en la incubadora a 27 °C durante 6 días hasta observar crecimiento de colonias bien definidas (Figura 14).



FIGURA 14. Crecimiento de colonias a los 6 días de siembra, laboratorio IASA, 2005.

Para la observación al microscopio se realizaron placas con hidróxido de potasio al 3% y cinta adhesiva. Se determinó la presencia de Rhizoctonia y el número de colonias de la misma, se transformó el número de colonias de Rhizoctonia contabilizadas a unidades formadoras de colonias mediante la fórmula:

$$\text{Ufc g}^{-1} = \frac{\text{Número de colonias} \times 10.000 \times 70}{30}$$

V. RESULTADOS Y DISCUSION

A. ACCIÓN ANTAGÓNICA DE Bacillus subtilis PARA CONTROLAR Rhizoctonia sp *IN VITRO* E *IN VIVO*.

3. In vitro

Para la prueba *in vitro* se midió el crecimiento paralelo (A-A') y perpendicular (B-B') del hongo Rhizoctonia sp. a las estrías del antagonista Bacillus subtilis (Figura 1). Se considera tratamiento preventivo a aquel en el cual se sembró primero el antagonista y luego el patógeno; mientras que el tratamiento curativo es aquel en el cual se sembró primero el patógeno y luego el antagonista.

Para el crecimiento paralelo en A durante el primer día se observó que existieron diferencias significativas entre el tratamiento preventivo con respecto al resto de tratamientos, pues en este día no se sembró el patógeno en dicho tratamiento ($F_{2, 6} = 17,23$, $p = 0,0033$; Cuadro 12). El menor crecimiento registrado fue de 0,00 cm en el tratamiento preventivo y el mayor crecimiento registrado fue para el testigo con 1 cm.

Para el primer día en el crecimiento paralelo en A' se observaron diferencias significativas entre los 3 tratamientos, siendo el tratamiento preventivo el que no presenta ningún crecimiento, el tratamiento curativo mostró una media de 0,43 cm y finalmente el testigo con el mayor crecimiento obtuvo una media de 0,77 cm

($F_{2, 6} = 28,50$, $p = 0,0009$). El menor crecimiento registrado fue de 0,00 cm en el tratamiento preventivo y el máximo registrado fue de 1 cm para el testigo absoluto.

En el primer día del crecimiento perpendicular en B se observó que los 3 tratamientos presentaron diferencias significativas ($F_{2, 6} = 36,60$, $p = 0,0004$). El tratamiento preventivo no presentó crecimiento, en segundo lugar se ubicó el tratamiento curativo con una media de 0,50 cm y finalmente el mayor crecimiento lo obtuvo el testigo con una media de 0,90 cm. El mínimo registrado fue de 0,00 cm en el tratamiento preventivo y el máximo registrado fue para el testigo con 1 cm.

Durante el primer día de crecimiento perpendicular en B' se observaron diferencias significativas en los 3 tratamientos ($F_{2, 6} = 42$, $p = 0,0003$). El tratamiento preventivo no mostró crecimiento, el tratamiento curativo obtuvo un crecimiento medio con un valor de 0,47 cm y el testigo absoluto obtuvo el mayor crecimiento con un promedio de 0,93 cm. El menor crecimiento registrado fue de 0,00 cm en el tratamiento preventivo y el mayor crecimiento registrado fue de 1,10 cm para el testigo.

CUADRO 32. Promedio ($\pm EE$) del crecimiento en cm de *Rhizoctonia* sp. en la prueba dual durante el primer día, laboratorio I.A.S.A, 2004.

Tratamiento Crecimiento	<i>Rhizoctonia</i> sp. Vs <i>Bacillus subtilis</i> (Curativo)	<i>Bacillus subtilis</i> Vs <i>Rhizoctonia</i> sp. (Preventivo)	<i>Rhizoctonia</i> sp. (Testigo)	CV
A	0,50 \pm 0,06 b	0,00 a	0,73 \pm 0,15 b	38,03
B	0,50 \pm 0,12 b	0,00 a	0,90 \pm 0,06 c	27,66
A'	0,43 \pm 0,03 b	0,00 a	0,77 \pm 0,12 c	31,18
B'	0,47 \pm 0,09 b	0,00 a	0,93 \pm 0,09 c	26,73

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Para el crecimiento paralelo en A; durante el segundo día se observó que existieron diferencias significativas entre el todos los tratamientos ($F_{2, 6} = 35,29$, $p = 0,0005$; Cuadro 13). El tratamiento preventivo presento el menor crecimiento con un promedio de 0,60 cm, seguido del tratamiento curativo con un promedio de 1,07 cm y finalmente el testigo con un promedio de 1,80 cm. El menor crecimiento registrado fue de 0,50 cm para el tratamiento preventivo y el mayor crecimiento registrado fue para el testigo con 2 cm.

En el segundo día 2 de el crecimiento paralelo en A' se observaron diferencias significativas entre el testigo absoluto y el resto de tratamientos ($F_{2, 6} = 29,40$, $p = 0,0008$). El testigo el de mayor crecimiento con una media de 1,93 cm, los tratamientos preventivo y curativo no mostraron diferencias entre si con medias de 0,63 cm y 0,83 cm respectivamente. El menor crecimiento registrado fue de 0,40 cm en el tratamiento preventivo, mientras el máximo registrado fue 2,20 cm para el testigo absoluto.

En el segundo día de crecimiento perpendicular en B se observó que el testigo presento diferencias significativas con respecto al resto de tratamientos ($F_{2, 6} = 22,33$, $p = 0,0017$). El testigo mostró una media de 1,63 cm y los tratamientos preventivo y curativo no presentan diferencias entre si con valores promedios de 0,63 cm y 0,67 cm, respectivamente. El valor mínimo registrado fue de 0,50 cm en los tratamientos preventivo y curativo, el valor máximo registrado fue para el testigo con 1,90 cm.

Durante el segundo día para el crecimiento perpendicular en B' se observaron diferencias significativas entre el testigo y el resto de tratamientos ($F_{2,6} = 18,22$, $p = 0,0028$). El testigo obtuvo el mayor crecimiento con una media de 1,80 cm, seguido de los tratamientos preventivo y curativo con valores promedios de 0,57 cm y 1,00 cm respectivamente. El valor mínimo registrado fue de 0,40 cm en el tratamiento preventivo y el valor máximo registrado fue para el testigo absoluto con 1,90 cm.

CUADRO 33. Promedio ($\pm EE$) del crecimiento en cm de *Rhizoctonia* sp. en la prueba dual durante el segundo día, laboratorio I.A.S.A, 2004.

Tratamiento Crecimiento	<i>Rhizoctonia</i> sp. Vs <i>Bacillus subtilis</i> (Curativo)	<i>Bacillus subtilis</i> Vs <i>Rhizoctonia</i> sp. (Preventivo)	<i>Rhizoctonia</i> sp. (Testigo)	CV
A	1,07 \pm 0,07 b	0,60 \pm 0,06 a	1,8 \pm 0,15 c	15,26
B	0,67 \pm 0,09 a	0,63 \pm 0,13 a	1,63 \pm 0,13 b	21,29
A'	0,83 \pm 0,09 a	0,63 \pm 0,15 a	1,93 \pm 0,15 b	19,73
B'	1 \pm 0,23 a	0,57 \pm 0,09 a	1,8 \pm 0,06 b	22,62

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Para el crecimiento paralelo en A; durante el tercer día se observó que existieron diferencias significativas entre el todos los tratamientos ($F_{2,6} = 65,53$, $p = 0,0001$; Cuadro 14). El tratamiento preventivo presento el menor crecimiento con un promedio de 0,83 cm, seguido del tratamiento curativo con un promedio de 1,43 cm y finalmente el de mayor crecimiento fue el testigo con un promedio de 2,67 cm. El menor crecimiento registrado fue de 0,70 cm para el tratamiento preventivo y el mayor crecimiento registrado fue para el testigo con 3 cm.

Durante el tercer día en el crecimiento paralelo en A' se observaron diferencias significativas entre el testigo absoluto y el resto de tratamientos ($F_{2,6} = 26,80$, $p = 0,0010$). El primero fue el de mayor crecimiento con una media de 2,77 cm, mientras que los tratamientos preventivo y curativo no mostraron diferencias entre si con medias de 1,03 cm y 1,07 cm respectivamente. El menor crecimiento registrado fue de 0,70 cm en el tratamiento curativo, mientras el máximo registrado fue de 3,00 cm para el testigo absoluto.

En el tercer día para el crecimiento perpendicular en B se observó que existieron diferencias significativas entre todos los tratamientos ($F_{2,6} = 33,01$, $p = 0,0006$). El tratamiento preventivo presento el menor crecimiento con un promedio de 0,70 cm, seguido del tratamiento curativo con un promedio de 1,37 cm y finalmente el testigo con un promedio de 2,60 cm. El menor crecimiento registrado fue 0,50 cm para el tratamiento preventivo y el mayor valor registrado fue para el testigo con 3 cm.

Durante el tercer día para el crecimiento perpendicular en B' se observaron diferencias significativas entre el testigo y el resto de tratamientos ($F_{2,6} = 26,29$, $p = 0,0011$). El testigo presento el mayor crecimiento con una media de 3,07 cm mientras que los tratamientos preventivo y curativo presentan los menores crecimientos con valores promedios de 1,03 cm y 1,23 cm respectivamente. El valor mínimo registrado fue de 0,60 cm en el tratamiento preventivo y el valor máximo registrado fue para el testigo con 3,20 cm.

CUADRO 34. Promedio ($\pm EE$) del crecimiento en cm de Rhizoctonia sp. en la prueba dual durante el tercer día, I.A.S.A, 2004.

Tratamiento Crecimiento	<u>Rhizoctonia</u> sp. Vs <u>Bacillus subtilis</u> (Curativo)	<u>Bacillus subtilis</u> Vs <u>Rhizoctonia</u> sp. (Preventivo)	<u>Rhizoctonia</u> sp. (Testigo)	CV
A	1,43 \pm 0,07 b	0,83 \pm 0,09 a	2,67 \pm 0,17 c	12,16
B	1,37 \pm 0,13 b	0,70 \pm 0,15 a	2,60 \pm 0,21 c	18,69
A'	1,07 \pm 0,23 a	1,03 \pm 0,15 a	2,77 \pm 0,19 b	20,44
B'	1,23 \pm 0,15 a	1,03 \pm 0,34 a	3,07 \pm 0,09 b	21,30

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Como se pudo observar, Bacillus subtilis controló Rhizoctonia lo cual concuerda con otros estudios realizados *in vitro* como es el caso de un estudio realizado en Colombia donde esta bacteria reportó una esporulación reducida en Rhizoctonia sp. (Bravo, 1993; citado por Benzing, 2001).

4. In vivo

a. Porcentaje de incidencia de Rhizoctonia sp. en el cultivo

a. Primer ciclo

El porcentaje de incidencia en las 2 primeras semanas de cultivo fue nulo debido a que el cultivo se encontraba en un período de desarrollo temprano y sobre todo en una época de escasez de lluvia (Cuadro 15). Además las plantas llegaron completamente sanas al transplante pues el almácigo fue desinfectado con Formol al 37%, y este método es considerado uno de los más efectivos para el control de Rhizoctonia (Agrios, 1995).

En la tercera semana se observó que todos los tratamientos excepto el testigo absoluto presentaron un porcentaje de incidencia bajo ($F_{4, 10} = 18,14$, $p = 0,0001$). El valor promedio de los tratamientos 1, 2, 3 y 4 fue 7,92%, mientras el testigo absoluto presentó una media de 20,06%. El porcentaje mínimo de incidencia se encontró en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un valor de 4,49% y el valor máximo registrado fue de 21,84% en el testigo absoluto riego.

Durante la semana 4 se observó que el testigo absoluto presentó el porcentaje más alto de incidencia de la enfermedad con un valor promedio de 34,09%, no así el resto de tratamientos donde se observó un porcentaje de incidencia bajo ($F_{4, 10} = 20,51$, $p = 0,0001$). El tratamiento químico obtuvo el menor porcentaje de incidencia con un valor de 4,6%, mientras que el testigo absoluto obtuvo el valor máximo de 38,37%.

En la semana 5 se pudo observar que no existió diferencia significativa entre los tratamientos ($F_{4, 10} = 1,20$, $p = 0,3676$). El valor mínimo registrado se ubicó en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 y fue de 2,22%, mientras el valor máximo registrado fue de 12,36% en el testigo absoluto.

En la semana 6 de cultivo se observó una tendencia al menor porcentaje de incidencia en los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 9 y Bacillus subtilis Mc Farland 8, seguidos por los tratamientos químico y Bacillus subtilis Mc Farland 7 para ubicar finalmente al testigo absoluto ($p = 0,4491$). Se obtuvieron valores que fluctuaron entre 7,14% y 13,47% en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 y en el testigo absoluto respectivamente. El valor mínimo durante

esta semana fue de 0,00% presente en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7; el valor máximo fue de 15,12% en el testigo absoluto.

A partir de la semana 7 se notó que el tratamiento químico con Captan controló de manera eficaz la enfermedad mostrando un porcentaje de incidencia promedio de 5,71%, seguido de los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 9 y Bacillus subtilis Mc Farland 7 con promedios de 6,48% y 7,61% respectivamente. En tercer lugar se tuvo a Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un valor de 10,78% y finalmente se observó que el mayor porcentaje de incidencia de la enfermedad se encontró a las parcelas expuestas a riego, con un valor promedio de 39,73% ($F_{4, 10} = 102,71$, $p < 0,0001$). El valor mínimo registrado de incidencia de la enfermedad fue de 3,49% en las parcelas tratadas con el químico mientras el valor máximo registrado se presentó en las parcelas tratadas solo con riego y fue de 41,46%. Varios estudios han demostrado que Bacillus subtilis es un excelente controlador biológico de las enfermedades del suelo, incluidas Rhizoctonia y Sclerotium cepivorum, esta última de la cual se han realizado estudios en los que el uso de Bacillus subtilis redujo hasta un 50% la incidencia de la enfermedad en el cultivo de cebolla (Falconí, 1997).

Al finalizar la semana 8 se observó una diferencia significativa entre el testigo absoluto con un valor promedio de 40,84% y el resto de tratamientos con valores promedios entre 5,34% y 8,85% ($F_{4, 10} = 78,4$, $p < 0,0001$). El mayor valor obtenido fue de 43,59% en el testigo absoluto, mientras que el menor valor fue de 3,41% en el tratamiento químico. El comportamiento de las plantas con respecto al químico, demostró que fue el controlador mas eficaz de la enfermedad, lo que no siempre puede ser la opción mas acertada, como ocurrió en el caso de Benomil para control

de algunas enfermedades de suelo. En un estudio realizado en Australia por Kelemu y Bedel en 1994, que demostraron que el Bacillus subtilis fue mas eficaz que el producto químico (Kelemu Citado por Benzing, 2001).

En la última semana de aplicación se observó diferencias significativas entre el testigo absoluto con un valor promedio de 39,96% y el resto de tratamientos con valores comprendidos entre 3,83% y 6,29% ($F_{4, 10} = 208,77$, $p < 0,0001$). Similar comportamiento se observó en el cultivo de trigo, donde se utilizó Bacillus subtilis y B. pumilis para el control de Rhizoctonia, encontrándose poca incidencia de la enfermedad (Falconí, 1997). El menor valor registrado se obtuvo en las parcelas sometidas al testigo químico y fue de 2,35%; mientras que el mayor valor registrado fue de 42,25% en el testigo absoluto.

El control que ejerce Bacillus subtilis sobre Rhizoctonia se debe básicamente a que produce sustancias antimicrobianas como la Bacitracina, así lo menciona De Laat, 1983, donde afirma que tanto Bacillus subtilis como B. cereus producen Bacitracina como sustancia antimicrobiana.

CUADRO 35. Promedio ($\pm EE$) del porcentaje del nivel de incidencia de la mancha café de la hoja (*Rhizoctonia* sp.) en plantas de lechuga, IASA, 2004.

Tratamiento Semana	<i>Bacillus subtilis</i> Mc Farland 7	<i>Bacillus subtilis</i> Mc Farland 8	<i>Bacillus subtilis</i> Mc Farland 9	Tratamiento Químico	Testigo Absoluto (Riego)	CV
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
3	8,63 \pm 1,40 a	8,70 \pm 1,48 a	6,77 \pm 1,30 a	7,56 \pm 0,96 a	20,06 \pm 1,25 b	21,59
4	13,56 \pm 3,33 a	12,61 \pm 1,39 a	12,88 \pm 1,39 a	8,73 \pm 2,29 a	34,09 \pm 2,14 b	23,55
5*	7,04 \pm 2,59 a	5,98 \pm 1,33 a	5,95 \pm 1,61 a	9,63 \pm 0,74 a	9,77 \pm 1,34 a	21,25
6**	9,68 \pm 4,84	7,23 \pm 2,71	7,14 \pm 3,57	9,05 \pm 0,60	13,47 \pm 0,83	
7	7,61 \pm 0,39 ab	10,78 \pm 2,52 b	6,48 \pm 1,04 ab	5,71 \pm 1,11 a	39,73 \pm 1,17 c	17,60
8	8,85 \pm 1,55 a	6,25 \pm 1,66 a	8,56 \pm 1,18 a	5,34 \pm 1,35 a	40,84 \pm 2,48 b	21,14
9	5,78 \pm 0,69 a	6,29 \pm 1,42 a	5,04 \pm 1,01 a	3,83 \pm 0,98 a	39,96 \pm 1,15 b	15,31

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

* Estandarización de datos

** Prueba de Kruskal Wallis (No paramétrica).

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

b. Segundo ciclo de cultivo

El porcentaje de incidencia en la primera semana de cultivo fue nulo debido a que el cultivo se encontraba en un periodo de desarrollo temprano y las plantas llegaron sanas al transplante pues el almacigo fue desinfectado con formol al 37% (Cuadro 16).

En la segunda semana de cultivo se observó que el testigo absoluto pretendió a tener un mayor porcentaje de incidencia con respecto al resto de tratamientos ($p = 0,4901$). El testigo absoluto tuvo un promedio de 0,41%, seguido del tratamiento con *Bacillus subtilis* Mc Farland 8 con un promedio de 0,33%, en tercer lugar se ubicó el tratamiento *Bacillus subtilis* Mc Farland 9 con un promedio de 0,26% luego se ubicó el tratamiento químico con un promedio de 0,22% y finalmente la menor incidencia se presentó en el tratamiento *Bacillus subtilis*

Mc Farland 7 con un promedio de 0,19%. Estos datos van acorde a otros estudios realizados como es el caso de la investigación llevada a cabo por Castellanos en 1995, donde encontró que Bacillus subtilis mostraba gran capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo incluida Rhizoctonia solani. El valor mínimo observado fue 0,11% en los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 7, Bacillus subtilis Mc Farland 9, y en el tratamiento químico; mientras que el valor máximo registrado fue de 0,67% en el testigo absoluto.

En la semana 3 se observó que el tratamiento químico presentó el menor porcentaje de incidencia con un valor promedio de 2,41%, seguidas por los tratamientos Bacillus subtilis con valores promedios entre 4,34% y 5,51% finalmente el mayor porcentaje de incidencia fue observado en el testigo absoluto con un promedio de 7,68% ($F_{4, 10} = 2,94$, $p = 0,0761$). El valor mínimo registrado fue de 2,33% en testigo químico y el valor máximo fue de 9,41% en el testigo absoluto.

Durante la semana 4 se observó una diferencia significativa entre el testigo absoluto y el resto de tratamientos ($F_{4, 10} = 5,75$, $p = 0,0115$), siendo el primero el que presentó un mayor porcentaje de incidencia con un promedio de 9,76%. En esta semana se observó la incidencia mínima de 1,23% en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8, el valor máximo registrado fue 11,29% en el riego.

En la quinta semana se observó que la tendencia al mayor porcentaje de incidencia se presentó en el testigo absoluto con un promedio de 9,26%, seguida por el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 con una media de 7,16%, a

continuación se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un promedio de 4,28%, luego encontró el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 con una media de 4,16% y finalmente el testigo Químico con un promedio de 1,74% ($p = 0,1544$). La incidencia mínima registrada fue 1,18% en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 mientras que la incidencia máxima registrada fue 11,25% en el riego.

Durante la sexta semana se observó una diferencia significativa entre el tratamiento químico con un promedio de 1,56% y el resto de tratamientos, siendo el químico el de menor porcentaje de incidencia ($F_{4, 10} = 4,13$, $p = 0,0313$). El valor mínimo registrado fue 3,8% en el testigo químico mientras que el valor máximo registrado fue 22,22% en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9.

En la semana 7 de cultivo se observaron diferencias significativas entre el testigo absoluto con una media de 19,05% y el resto de tratamientos, siendo el riego el de mayor porcentaje de incidencia ($F_{4, 10} = 3,50$, $p = 0,0494$). El menor porcentaje de incidencia se presentó en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un valor de 2,70%, el mayor porcentaje de incidencia se registró en el riego con 23,33%.

En la semana 8 se pudo observar un comportamiento similar al de la semana 7 donde el testigo absoluto con un promedio de 27,27% presentaron diferencias significativas con respecto al resto de tratamientos ($F_{4, 10} = 7,40$, $p = 0,0049$). El porcentaje mínimo registrado fue 5,13% en el tratamiento químico y el máximo registrado fue 40,68% en el testigo absoluto (riego).

Al finalizar la novena semana de cultivo se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos ($F_{4, 10} = 12,30$, $p = 0,0007$), El tratamiento de menor incidencia fue el testigo químico con un promedio de 8,40%, después se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 con un promedio de 15,41%, en tercer lugar se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 con un promedio de 18,57%, luego se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un promedio de 24,30%, finalmente la mayor incidencia se encontró en el testigo absoluto con un promedio de 30,56%. El menor valor registrado fue del 8% en el tratamiento químico, el mayor valor registrado fue 37,50%. Esto podría deberse a que en invierno existe una mayor incidencia de la enfermedad debido a que las condiciones climáticas favorecen el desarrollo del hongo.

CUADRO 36. Promedio ($\pm EE$) del porcentaje del nivel de incidencia de la mancha café de la hoja (Rhizoctonia sp.) en plantas de lechuga, IASA, 2005.

Tratamiento Semana	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 7	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 8	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 9	Tratamiento Químico	Testigo Absoluto (Riego)	CV
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2**	0,19 \pm 0,07	0,33 \pm 0,11	0,26 \pm 0,1	0,22 \pm 0,11	0,41 \pm 0,13	
3*	4,89 \pm 1,06 ab	4,34 \pm 0,96 ab	5,61 \pm 1,87 ab	2,41 \pm 0,06 a	7,68 \pm 1,33 b	20,15
4*	4,84 \pm 1,51 a	2,61 \pm 1,36 a	3,35 \pm 0,67 a	3,03 \pm 0,39 a	9,76 \pm 0,89 b	22,05
5**	4,16 \pm 2,16	4,28 \pm 1,08	7,16 \pm 3,03	1,74 \pm 0,41	9,26 \pm 1,29	
6***	10,57 \pm 1,65 b	9,95 \pm 2,33 ab	13,33 \pm 4,46 b	4,83 \pm 0,60 a	16,62 \pm 2,68 b	16,91
7***	10,73 \pm 2,85 ab	6,25 \pm 2,97 a	7,17 \pm 1,24 a	6,16 \pm 0,76 a	19,05 \pm 2,69 b	22,60
8***	11,51 \pm 1,96 a	11,60 \pm 1,75 a	11,11 \pm 1,55 a	6,64 \pm 1,37 a	27,27 \pm 6,79 b	12,89
9***	15,41 \pm 2,87 b	24,30 \pm 4,46 cd	18,57 \pm 0,96 bc	8,40 \pm 0,35 a	30,56 \pm 3,60 d	8,44

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

* Estandarización de datos.

** Prueba de Kruskal Wallis (No paramétrica).

*** Logaritmo natural.

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

B. ESTABLECIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN MÁS ADECUADA DE BACILLUS SUBTILIS PARA CONTROL DE RHIZOCTONIA SP. Y EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN CAMPO.

3. Primer ciclo de cultivo

a. Porcentaje de prendimiento

El porcentaje de prendimiento en el cultivo no presentó ninguna diferencia significativa entre tratamientos, debido a que estos fueron determinados básicamente para controlar la enfermedad producida por Rhizoctonia sp. ($F_{4, 10} = 0,53$, $p = 0,7137$). Las medias de los tratamientos fueron 97,04% para el testigo absoluto, 95,93% para Bacillus subtilis Mc Farland 7, 94,81% para Bacillus subtilis Mc Farland 8, 94,44% para el tratamiento químico y 92,59% para Bacillus subtilis Mc Farland 9. El porcentaje de prendimiento más alto se presentó en los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 7, Bacillus subtilis Mc Farland 8, Bacillus subtilis Mc Farland 9 y en el testigo absoluto con un valor de 98,89%; el valor mínimo de porcentaje de prendimiento fue de 86,67% en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9.

Todos los tratamientos obtuvieron porcentajes altos de prendimiento debido a que después del transplante tuvieron un riego adecuado y los primeros riegos luego del transplante son de suma importancia para un mejor prendimiento de las plantas (Yépez, 1988).

b. Altura de planta

A los 15 días del trasplante se observó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 8, Bacillus subtilis Mc Farland 9 con el resto de tratamientos ($F_{4, 1345} = 6,54$, $p < 0,0001$; Cuadro 17). Estos tratamientos tuvieron un mayor crecimiento de 3,87 cm y 3,82 cm respectivamente mientras que el resto de tratamientos tuvieron valores promedios entre 3,46 cm y 3,72 cm. La mayor altura de planta medida a los 15 días de trasplante fue de 7 cm en los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 8 y el testigo absoluto, la menor altura de planta medida fue 1,5 cm en los testigos químico y absoluto. Es decir hubo un efecto significativo con el uso de Bacillus subtilis.

En la segunda evaluación realizada a los 30 días después del trasplante se obtuvo la mayor altura de planta velocidad de crecimiento en las plantas tratadas con Bacillus subtilis Mc Farland 7, Bacillus subtilis Mc Farland 8 y Bacillus subtilis Mc Farland 9 con promedios de 6,74 cm; 6,61 cm y 6,60 cm respectivamente, seguidas por el tratamiento químico con un promedio de 5,65 cm y finalmente las del testigo absoluto (riego) con 5,3 cm ($F_{4, 1345} = 23,04$, $p < 0,0001$). El máximo valor registrado a los 30 días fue 14,2 cm con el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7, la menor altitud de planta medida fue de 2,8 cm en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 y en el testigo químico.

Las medidas tomadas a los 45 días mostraron que se mantenía la mayor velocidad de crecimiento para las lechugas sometidas a los tratamientos con Bacillus subtilis Mc Farland 7, Bacillus subtilis Mc Farland 8 y Bacillus subtilis

Mc Farland 9 con promedios de 8,89 cm; 9,04 cm y 8,49 cm respectivamente y que la menor velocidad de crecimiento fue para el tratamiento químico y el testigo absoluto con 7,49 cm y 8,08 cm respectivamente ($F_{4, 1345} = 9,30, p < 0,0001$). El máximo crecimiento obtenido a los 45 días fue de 16 cm con el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 y en el testigo absoluto, la menor altitud de planta medida fue de 3,9 cm en el testigo absoluto riego.

Como puede observarse los mejores tratamientos fueron aquellos que utilizaban Bacillus subtilis, que se encuentran dentro de aquellas poblaciones microbianas capaces de producir sustancias promotoras de crecimiento (Falconí, 1997).

CUADRO 37. Promedio (\pm EE) de la velocidad de crecimiento tomada cada quince días en plantas de lechuga (Lactuca sativa), IASA, 2004.

Tratamientos Días	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 7	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 8	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 9	Tratamiento Químico	Testigo Absoluto (Riego)	CV
15*	3,60 \pm 0,06 bc	3,87 \pm 0,06 a	3,82 \pm 0,06 a	3,46 \pm 0,06 c	3,72 \pm 0,07 ab	14,20
30*	6,74 \pm 0,12 a	6,61 \pm 0,12 a	6,60 \pm 0,13 a	5,65 \pm 0,10 b	5,30 \pm 0,12 c	20,04
45*	8,89 \pm 0,15 a	9,04 \pm 0,17 a	8,49 \pm 0,14 a	7,49 \pm 0,14 b	8,08 \pm 0,19 b	22,16

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

* Estandarización de datos

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

c. Ciclo de cultivo

Se determinó que el ciclo de cultivo de las parcelas correspondientes al tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 fue el más corto con una media de 87,58 días, seguidas de las del tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 y Bacillus subtilis Mc Farland 9 con medias de 88,7 días y 88,67 días respectivamente. A continuación se ubicó el tratamiento químico Captan con una media de 88,98 días

y finalmente las mas tardías fueron las sometidas al testigo absoluto con una media de 90,61 días ($F_{4, 400} = 5,73$, $p = 0,0002$; Cuadro 18).

d. Diámetro de cabeza

El mayor diámetro se observó en las plantas tratadas con Captan y con Bacillus subtilis Mc Farland 8 con promedios de 10,33 cm y 10,05 cm respectivamente, mientras el menor diámetro correspondió a las plantas tratadas con Bacillus subtilis Mc Farland 7, Bacillus subtilis Mc Farland 9 y testigo absoluto con valores promedios comprendidos entre 9,24 cm y 9,62 cm ($F_{4, 400} = 10,41$, $p < 0,0001$; Cuadro 16). Se registró un valor máximo de 14 cm en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 y Bacillus subtilis Mc Farland 8 y el valor mínimo de 6,8 cm en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7.

e. Peso de cabeza

Se observó una diferencia significativa entre todos los tratamientos ($F_{4, 400}=31,28$, $p < 0,0001$; Cuadro 18). Las lechugas sometidas al tratamiento químico con Captan obtuvieron el mayor peso a la cosecha, con valores promedios de 532, 91 g, seguidas de las tratadas con Bacillus subtilis Mc Farland 8 con una media de 478,26 g, en tercer lugar se tienen los pesos obtenidos de las plantas tratadas con Bacillus subtilis Mc Farland 9 con una media de 448 g, luego por el tratamiento fue Bacillus subtilis Mc Farland 7 con una media de 424,25 g y los menores pesos obtenidos fueron del testigo absoluto con un promedio de 327 g. El peso máximo registrado fue de 800 g en los tratamientos Bacillus subtilis

Mc Farland 7, Bacillus subtilis Mc Farland 8 y en el químico; el peso mínimo registrado fue de 200 g en Bacillus subtilis Mc Farland 9 y en el testigo absoluto.

Con respecto al peso final por parcela se observaron tres grupos bien diferenciados, el de mayor peso fue el tratamiento químico captan con un promedio de 48,04 kg, en segundo lugar se ubicaron los tratamientos de Bacillus subtilis con valores que fluctuaron entre 38,13 kg a 43,17 kg y finalmente se ubicó el testigo absoluto con un peso promedio de 29,28 kg ($F_{4, 10} = 12,9$, $p = 0,0006$). El mayor peso obtenido fue de 51,56 kg para el tratamiento químico, el menor peso obtenido fue de 26,88 kg para el testigo absoluto.

En el peso final por hectárea se observó que el tratamiento químico fue superior al resto de tratamientos con un peso promedio de 36.031,61 kg, los tratamientos con Bacillus subtilis fueron superiores al testigo absoluto que obtuvo un valor promedio de 21.959,14 kg ($F_{4, 10} = 12,9$, $p = 0,0006$). El químico obtuvo el máximo registrado 38.667,86 kg y el testigo absoluto obtuvo el mínimo registrado 20.160 kg.

f. Compactación de cabeza

Estadísticamente se diferenciaron 3 grupos ($F_{4, 400} = 29,14$, $p < 0,0001$), el primero fue el tratamiento químico que produjo el mejor resultado mostrando una media de 51,49 g cm⁻¹ (Cuadro 18), el segundo que comprende a los tratamientos Bacillus subtilis con resultados medios y valores comprendidos entre 44,15 g cm⁻¹ y 47,17 g cm⁻¹, y el último grupo con los valores más bajos correspondieron al testigo absoluto (riego) con un promedio de 35,32 g cm⁻¹. La mayor compactación

registrada fue de 72 g cm⁻¹ en el tratamiento químico y la menor compactación registrada fue de 21,28 g cm⁻¹ en el testigo absoluto.

El testigo absoluto que fue gravemente afectado por la enfermedad no produjo lechugas de calidad. Esto se debe a que los componentes del rendimiento son afectados por la incidencia de la enfermedad en el cultivo (Falconí, 1997). Por esta razón, el tratamiento químico que controla mas eficazmente la enfermedad, hace que la planta se encuentre en mejor estado sanitario y de hecho obtenga mejores resultados de rendimiento, pero no se puede desmerecer el efecto de Bacillus subtilis Mc Farland 8, pues se acerca mucho a los resultados óptimos del tratamiento químico, con la ventaja de que es un producto que no deja residuos tóxicos ni para el ser humano ni el medio ambiente. Además lo anterior coincide con Singh (citado por Benzing, 2001) en 1990 que observó aumentos en el rendimiento de cultivos tratados con Bacillus sp., como en el caso de la soya.

CUADRO 38. Promedio (\pm EE) del peso, diámetro, compactación y ciclo de cultivo de plantas de lechuga medidos al tiempo de cosecha, IASA, 2005.

<i>Tratamientos</i> Variable	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 7	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 8	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 9	Tratamiento Químico	Testigo Absoluto (Riego)	CV
<i>Peso individual (g)</i>	424,25 $\pm 12,14$ c	478,26 $\pm 12,78$ b	448,00 $\pm 13,22$ bc	532,91 $\pm 11,76$ a	327,54 $\pm 13,47$ d	25,4 3
<i>Peso parcela (kg)</i>	38,13 $\pm 1,43$ b	43,17 $\pm 2,26$ ab	40,35 $\pm 2,24$ b	48,04 $\pm 2,01$ a	29,28 $\pm 1,57$ c	8,42
<i>Peso hectárea (kg)</i>	28.594,45 $\pm 1.070,33$ b	32.379,83 $\pm 1.698,52$ ab	30.264,83 $\pm 1.681,62$ b	36.031,61 $\pm 1.510,73$ a	21.959,14 $\pm 1.176,28$ c	8,42
<i>Diámetro (cm)</i>	9,57 $\pm 0,13$ b	10,05 $\pm 0,13$ a	9,62 $\pm 0,13$ b	10,33 $\pm 0,11$ a	9,24 $\pm 0,14$ b	11,8 6
<i>Compactación (g cm⁻¹)</i>	44,15 $\pm 0,98$ b	47,17 $\pm 0,85$ b	46,33 $\pm 1,14$ b	51,49 $\pm 0,95$ a	35,32 $\pm 1,22$ c	20,2 2
<i>Ciclo de cultivo (días)</i>	88,70 $\pm 0,49$ ab	87,58 $\pm 0,26$ a	88,67 $\pm 0,41$ ab	88,98 $\pm 0,43$ b	90,61 $\pm 0,50$ c	4,29

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación.
Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4. Segundo ciclo

a. Porcentaje de prendimiento

Se observó una diferencia significativa entre el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 y el resto de tratamientos, siendo el primero el de menor porcentaje de prendimiento con un promedio de 82,96% ($F_{4, 10} = 4,14$, $p = 0,0311$). El resto de tratamientos presentaron los siguientes promedios: Bacillus subtilis Mc Farland 7 93,70%, Bacillus subtilis Mc Farland 8 y químico 92,59% y testigo absoluto con 90,74%. El valor mínimo registrado fue 77,78% en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 y el máximo fue 97,78% Bacillus subtilis Mc Farland 7.

b. Altura de planta

En velocidad de crecimiento medidas a los 15 días luego del trasplante se observó que los tratamientos tendieron a ser iguales ($p = 0,0277$), sin embargo se observó una tendencia mayor en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 con una media de 3,54 cm y una tendencia menor en el testigo absoluto con una media de 3,18 cm (Cuadro 19). El valor máximo registrado fue de 8,5 cm para los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 8 y Bacillus subtilis Mc Farland 9.

A los 30 días después del trasplante se observó diferencias significativas entre el testigo absoluto, los tratamientos de Bacillus subtilis y el tratamiento químico ($F_{4, 1121} = 35,01$, $p < 0,0001$). El químico presentó una mayor altura de planta con un promedio de 5,68%, seguido con los tratamientos con Bacillus subtilis que

presentaron promedios entre 4,44% a 4,89%, finalmente la menor velocidad de crecimiento se presentó en el testigo absoluto con un valor de 3,78%. El mayor valor registrado fue de 12 cm para el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9.

En la tercera medición realizada a los 45 días se reportó diferencias significativas entre los tratamientos testigo químico, Bacillus subtilis y el testigo absoluto ($F_{4, 1101} = 26,69$, $p < 0,0001$). Siendo el químico el que muestra mayor altura de planta con 7,06 cm, en segundo lugar se ubicó Bacillus subtilis con medias entre 5,45 cm a 6,05 cm y la menor altura se encontró en el testigo absoluto con un promedio de 4,96 cm. La máxima altura registrada fue de 16,30 cm en el tratamiento químico.

CUADRO 39. Promedio (\pm EE) de la velocidad de crecimiento tomada cada quince días en plantas de lechuga (Lactuca sativa), IASA, 2005.

Tratamiento Días	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 7	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 8	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 9	Tratamiento Químico	Testigo Absoluto (Riego)	CV
15**	3,45 \pm 0,08	3,54 \pm 0,10	3,49 \pm 0,11	3,50 \pm 0,08	3,18 \pm 0,10	
30***	4,89 \pm 0,15 b	4,85 \pm 0,15 b	4,44 \pm 0,17 b	5,68 \pm 0,17 a	3,78 \pm 0,14 c	19,79
45***	6,05 \pm 0,20 b	5,90 \pm 0,18 b	5,45 \pm 0,21 b	7,06 \pm 0,22 a	4,96 \pm 0,19 c	15,64

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

** Prueba de Kruskal Wallis (No paramétrica).

*** Logaritmo natural.

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

c. Ciclo de cultivo

Se determinó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos para el segundo ciclo de cultivo ($F_{4, 325} = 0,96$, $p = 0,4320$; Cuadro 20). Cabe recalcar que por efecto del clima, la cosecha se retrasó por un período de 10 días, lo

que afectó a todas las plantas por igual, el exceso de humedad, no solo aumentó la incidencia de la enfermedad, sino también retraso el ciclo de cultivo.

d. Diámetro de cabeza

Existieron diferencias significativas para todos los tratamientos ($F_{4, 325} = 14,99$, $p < 0,0001$; Cuadro 20). El mayor diámetro se observó a las plantas tratadas con el tratamiento químico con 10,02 cm, en segundo lugar se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un promedio de 9,44 cm, en tercer lugar se encontró Bacillus subtilis Mc Farland 9 con un valor promedio de 9,25 cm, luego se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 con un valor de 8,79 cm y el menor diámetro fue de 8,15 cm para el testigo absoluto; El menor diámetro registrado fue de 5 cm en el testigo absoluto mientras que el mayor diámetro registrado fue de 12,80 cm para el testigo químico.

e. Peso de cabeza

Existen diferencias significativas en 3 categorías ($F_{4, 325} = 50,67$, $p < 0,0001$; Cuadro 20). Dentro de la primera (mayor peso) se ubicó el químico con un valor promedio de 453,15 g, en la segunda categoría (valores medios) se ubicaron los tratamientos de Bacillus subtilis con medias de 384,29 g a 403,43 g y la categoría de menor peso en la que se ubicó el testigo absoluto con una media de 279,12 g. El menor valor registrado fue de 150 g en el testigo absoluto y el mayor valor registrado fue de 950 g en el tratamiento químico.

Con respecto al peso final por parcela se observaron tres grupos bien diferenciados ($F_{4, 10} = 12,16$, $p = 0,0007$). El de mayor peso fue el tratamiento químico captan con un promedio de 42,65 kg, en segundo lugar se ubicaron los tratamientos de Bacillus subtilis con valores que fluctuaron entre 34,53 kg a 36,19 kg y finalmente se ubicó el testigo absoluto con un peso promedio de 25,08 kg. El mayor peso obtenido fue de 45,29 kg para el tratamiento químico, el menor peso obtenido fue de 22,40 kg para el testigo absoluto.

En el peso final por hectárea se observó que el tratamiento químico fue superior al resto de tratamientos con un peso promedio de 31.987,70 kg, los tratamientos con Bacillus subtilis fueron superiores al testigo absoluto que obtuvo un valor promedio de 18.810,19 kg ($F_{4, 10} = 12,16$, $p = 0,0007$). El tratamiento químico obtuvo el máximo peso registrado de 33.694,77 kg mientras que el testigo absoluto obtuvo el menor peso registrado de 16.800 kg.

f. Compactación de cabeza

Se observaron diferencias significativas formando tres grupos ($F_{4, 325} = 17,99$, $p < 0,0001$; Cuadro 20). El mayor índice de compactación lo obtuvo el tratamiento químico con un promedio de 47,76 g cm⁻¹, en segundo lugar se ubicaron los tratamientos de Bacillus subtilis con promedios de 43,37 g cm⁻¹ a 44,28 g cm⁻¹, la menor compactación la obtuvo el testigo absoluto con una media de 34,70 g cm⁻¹. La menor compactación registrada fue de 21,57 g cm⁻¹ en el testigo absoluto, mientras que el mayor índice registrado fue de 95 g cm⁻¹.

Como ya ocurrió en el ciclo anterior, las plantas tratadas con el químico obtuvieron una menor incidencia de la enfermedad y por lo tanto un mayor rendimiento. Sin embargo se debe tomar en cuenta el efecto del tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8, que se acerca mucho al químico y es un producto orgánico con mayor aceptación en el mercado internacional. Es importante recalcar que algunos estudios muestran resultados similares como fue el caso de la investigación realizada por Falconí, 1997, donde menciona que Bacillus subtilis y B. pumilis, reducen la incidencia de la enfermedad causada por Rhizoctonia, lo que refleja un aumento del rendimiento a la cosecha.

CUADRO 40. Promedio (\pm EE) del peso, diámetro, compactación y ciclo de cultivo de plantas de lechuga (Lactuca sativa) medidos al tiempo de cosecha, IASA, 2005.

Tratamiento Variable	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 7	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 8	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 9	Tratamiento Químico	Testigo Absoluto (Riego)	CV
Peso individual (g)	384,29 \pm 8,64 b	403,43 \pm 6,69 b	396,83 \pm 8,69 b	473,15 \pm 12,82 a	279,12 \pm 8,68 c	19,80
Peso parcela (kg)	34,53 \pm 2,27 b	36,19 \pm 1,30 b	35,37 \pm 2,37 b	42,65 \pm 1,41 a	25,08 \pm 1,35 c	8,99
Peso hectárea (kg)	25.895,25 \pm 1.703,87 b	27.144,70 \pm 975,92 b	26.527,60 \pm 1.779,99 b	31.987,70 \pm 1058,09 a	18.810,19 \pm 1.010,55 c	8,99
Diámetro (cm)	8,79 \pm 0,18 c	9,44 \pm 0,18 b	9,25 \pm 0,19 bc	10,02 \pm 0,15 a	8,15 \pm 0,20 d	15,92
Compactación (g cm ⁻¹)	70 \pm 8,17 b	67 \pm 6,49 b	63 \pm 8,79 b	73 \pm 12,05 a	57 \pm 7,59 c	20,70
Ciclo cultivo (días)	98,76 \pm 0,30 a	98,97 \pm 0,30 a	98,43 \pm 0,29 a	98,23 \pm 0,33 a	98,47 \pm 0,28 a	2,50

CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL Y FINAL DE RHIZOCTONIA SP. EN EL SUELO.

Durante el conteo inicial de Rhizoctonia se observó una tendencia al mayor número de unidades formadoras de colonias en el tratamiento con Bacillus subtilis Mc Farland 9 ($p = 0,6985$; Cuadro 21) con una media de $108.888,67 \text{ Ufc g}^{-1}$, seguido por el tratamiento químico con $46.666,33 \text{ Ufc g}^{-1}$, en tercer lugar se ubican los tratamientos Bacillus subtilis Mc Farland 8 y el testigo absoluto con un promedio de $31.111 \text{ Ufc g}^{-1}$ y finalmente se observa la tendencia a un menor número de unidades formadoras de colonia en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 con un promedio de $31.110,67 \text{ Ufc g}^{-1}$. El valor máximo registrado fue de $210.000 \text{ Ufc g}^{-1}$ en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9.

En el conteo medio de Rhizoctonia la tendencia ($p = 0,1425$) fue que se observó al menor número de unidades formadoras de colonias en Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un promedio de $54.443,67 \text{ Ufc g}^{-1}$, seguido del tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 con una media de $62.221,67 \text{ Ufc g}^{-1}$, a continuación se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 con un promedio de $77.777,67 \text{ Ufc g}^{-1}$, en cuarto lugar se encontró el tratamiento químico con un promedio de $101.110,67 \text{ Ufc g}^{-1}$ y finalmente la tendencia a una mayor cantidad de unidades formadoras de colonia se observó en el testigo absoluto con un promedio de $365.555 \text{ Ufc g}^{-1}$. El valor mínimo registrado fue de 0 Ufc g^{-1} en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 mientras que el máximo registrado fue $629.999 \text{ Ufc g}^{-1}$ en el testigo absoluto.

Durante el conteo final de Rhizoctonia se observó una tendencia ($p = 0,0498$) al mayor número de unidades formadoras de colonias en el testigo absoluto con una media de 357.777,33 Ufc g^{-1} , seguido por el tratamiento químico con 124.444 Ufc g^{-1} , en tercer lugar se ubicó el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 7 con un promedio de 108.888,33 Ufc g^{-1} , a continuación se encontró el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 9 con una media de 101.110,67 Ufc g^{-1} y finalmente se observa la tendencia a un menor número de unidades formadoras de colonia en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 con un promedio de 77.777 Ufc g^{-1} . El valor mínimo registrado fue de 69.999 Ufc g^{-1} en el tratamiento Bacillus subtilis Mc Farland 8 mientras el máximo registrado fue 536.666 Ufc g^{-1} en el testigo absoluto.

CUADRO 41. Promedio (\pm EE) del conteo de Rhizoctonia en Unidades Formadoras de colonia por gramo de suelo, laboratorio IASA, 2005.

Tratamientos Conteo	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 7	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 8	<u>Bacillus subtilis</u> Mc Farland 9	Tratamiento Químico	Testigo Absoluto (Riego)
Inicial**	31.110,67 \pm 20.577,77	31.111,00 \pm 31.111,00	108.888,67 \pm 60.746,37	46.666,33 \pm 26.942,92	31.111,00 \pm 31.111,00
Medio**	77.777,67 \pm 77.777,67	54.443,67 \pm 15.555,33	62.221,57 \pm 20.578,02	101.110,67 \pm 41.156,11	365.555,00 \pm 132.906,48
Final**	108.888,33 \pm 7.777,67	77.777,00 \pm 7.778,00	101.110,67 \pm 7.777,67	124.444,00 \pm 28.043,42	357.777,33 \pm 91.698,54

** Prueba de Kruskal Wallis (No paramétrica).

V. CONCLUSIONES

- Bacillus subtilis proliferó e incrementó infinitamente su población en forma óptima en biol de papa prehidrolizada en melaza.
- 80 °C por 15 minutos de incubación fueron suficientes para aislar Bacillus subtilis.
- La prueba Serológica garantizó la tipificación de Bacillus subtilis por ser altamente específica y requerir de menor tiempo.
- En las pruebas *in vitro* el tratamiento preventivo fue el más efectivo en el control de Rhizoctonia sp.
- Bacillus subtilis en concentración Mc Farland 7 y Captan fueron los tratamientos que controlaron en forma eficaz la enfermedad mancha café de la hoja de lechuga en campo en los dos ciclos de cultivo.
- El porcentaje de prendimiento no se vió afectado por la aplicación de ninguno de los tratamientos.
- Bacillus subtilis en concentración Mc Farland 8 y 9 determinó un mayor crecimiento vegetativo debido a que este antagonista tuvo efecto como biocontrolador del hongo y proporcionó sustancias fitoestimulantes.

- Bacillus subtilis en concentración Mc Farland 8 acortó el ciclo de cultivo de lechuga en época de invierno y verano.
- El mayor diámetro de cabeza se logró con aplicaciones de Bacillus subtilis en concentración Mc Farland 8 y Captan en época de verano; en invierno el mejor resultado correspondió a Captan.
- En invierno y verano Bacillus subtilis en concentración Mc farland 8 y Captan permitieron lechugas con mayor peso individual.
- Los mejores pesos rendimientos por parcela y por hectárea se lograron con Bacillus subtilis en concentración Mc farland 8 y con Captan en la época de verano. No así en época de invierno donde los mejores resultados se obtuvieron con Captan.
- La mejor compactación de cabeza se logró con aplicaciones de Captan en los 2 ciclos de cultivo.
- Bacillus subtilis en concentración Mc farland 8, fue el más eficaz para el control de Rhizoctonia en el suelo durante los 2 ciclos.

VI. RECOMENDACIONES

- Elaborar biol a partir de residuos de papa prehidrolizada mezclados con melaza, ya que así se garantiza la producción masiva de Bacillus subtilis.
- Aplicar el Bacillus subtilis cada 15 días para garantizar su efectividad en campo.
- Mantener niveles adecuados de materia orgánica en el suelo de cultivo para propiciar un nicho ecológico adecuado para desarrollo de Bacillus subtilis.
- Hacer aplicaciones de Bacillus subtilis en concentración Mc Farland 8, pues esta concentración resultó ser la más óptima para el control de Rhizoctonia.
- Desarrollar técnicas para obtención de metabolitos purificados a partir de Bacillus subtilis destinados a mejorar la nutrición vegetal puesto que la bacteria contiene promotores de crecimiento.
- Realizar investigaciones con Bacillus subtilis como antagonista en la etapa de semillero para determinar si es un controlador efectivo de otras patógenos además de Rhizoctonia sp.
- Desarrollar nuevas investigaciones en el campo del control biológico para determinar posibles efectos de biocontrol.

- Tomando en cuenta las actuales tendencias de producción ecológica, es recomendable desarrollar sistemas de manejo integrado de plagas y enfermedades que incluyan además de la bacteria investigada varios biocontroladores naturales con la finalidad de reducir el uso de plaguicidas que perjudican a la salud humana y al medio ambiente.

VII. RESUMEN

El presente trabajo, tuvo por objetivo encontrar una alternativa al uso de pesticidas para el control de la mancha café de la hoja (Rhizoctonia sp.) en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa) mediante el uso de la bacteria antagonista Bacillus subtilis. Para este efecto se realizaron pruebas de laboratorio y campo. En el laboratorio se realizó una prueba dual de antagonismo entre el hongo y la bacteria, se observó mayor grado de control con el tratamiento preventivo que no permitió un alto grado de desarrollo del hongo.

En campo se realizaron aplicaciones quincenales de la bacteria en tres diferentes concentraciones para determinar su efecto en variables como: porcentaje de incidencia de la enfermedad, altura de planta, porcentaje de prendimiento, ciclo de cultivo, peso, diámetro, compactación y presencia del hongo en el suelo de la investigación. Se mantuvo un porcentaje de incidencia bajo en los tratamientos con Bacillus subtilis en concentración Mc Farland 7 y Captan mientras que el tratamiento Bacillus subtilis en concentración Mc Farland 8 obtuvo de manera general los mejores parámetros de producción.

Se concluye que Bacillus subtilis es una alternativa al uso de productos químicos pues manejado adecuadamente permite obtener productos de calidad y libres de contaminación, lo que no se logra con los pesticidas.

VIII. SUMMARY

This research has the objective to find an alternative to the use of pesticides for the control of the brown spot of the leaf (Rhizoctonia sp.) in the crop of lettuce (Lactuca sativa) through the use of the antagonist Bacillus subtilis. For that it had made tests on laboratory and field. In laboratory it made a dual test of antagonist between the fungi and the bacterium. It got a better grade of control in the preventive treatment which not allowed a high rate of fungi growth.

In the field it made applications of the bacterium each 15 days, in three different concentrations to determinate its effect in variables as: percentage of disease incidence, growth speed, take root percentage, crop cycle, weight, diameter, compact and fungi presence in the soil of the research. It kept a low incidence percentage in the treatments Bacillus subtilis in Mc Farland 7 concentration and Captan, while the treatment Bacillus subtilis in Mc Farland 8 concentration got the best production parameters.

In conclusion Bacillus subtilis is an alternative at the use of chemical products. When it is adequately handed it allows getting high quality products and contamination free. It can't get with the use of pesticides.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G. 1995. Fitopatología. 2 ed. México. Limusa. P 506-513.
2. Balcaza, L. 1997. La fertilización de cultivos y pasturas: Hortalizas de hoja. Argentina. Hemisferio sur. P 207-210.
3. Benzing, A. 2001. Agricultura orgánica: Fundamentos para la región andina. Alemania. Neckar-Verlag. p 182-183, 488-489, 494-497, 550-574.
4. Bioland, CH. 2005. Genero Bacillus. (en línea). Chile. Consultado 10 abr. 2005. Disponible en <http://www.bioland.cl/frame.htm>.
5. Cantwell, M. 2004. Lechuga de cabeza o arepollada: recomendaciones para mantener la calidad poscosecha. Trad. R Campos. (en línea). California EU. Postharvest technology. Consultado 30 mar. 2005. Disponible en <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Lechuga.shtml>
6. Castellanos, JJ; Oliva, P; Izquierdo, E; Morales, N. 1995. Evaluación de Bacillus subtilis como biocontrol del patógeno Alternaria porri. La Habana, CU. INIFAT. p 21.
7. Castro, C. 1989. Fungal Diseases of the Potato: Ecology of Rhizoctonia solani and diseases development in relation to anastomosis groups. Lima, PE. CIP. p 181-190.

8. Chiriboga, F. 2003. Determinación del tiempo de sobre vivencia de tres bacterias antagónicas de Moniliophthora roreri sobre mazorcas de cacao mediante técnicas serológicas. Tesis Ing. Agr. Sangolquí, EC. ESPE. p 62.
9. De Laat. 1983. Microbiología interamericana. 2 ed. México. Editorial México. p 105-106, 131-133, 136.
10. Edmond, J; Senn, L; Andrews, S. 1988. Principios de horticultura. México. Continental. p 456-459.
11. Falconi, C. 1997. Control biológico de plagas y enfermedades de las plantas. Alemania. FIFAC. p 5-9, 18-20, 39-44, 55-60.
12. Gonzáles, C. 1989. Introducción a la fitopatología. 3 ed. San José, CR. IICA, CR. p 130-131.
13. Gutiérrez, M. 2001. Agricultura ecológica. 2 ed. Bogota, CO. Terranova. p 230-233. (Serie enciclopedia agropecuaria).
14. Gutiérrez, P; Torres, H. 1990. Fitopatología: Control biológico de Rhizoctonia solani con Rhizoctonia binucleada. Lima, PE. s.e. p 45-50.
15. Hemming, B. 1990. Bacteria as antagonists in biological control of plants pathogens in new directions in biological control: Alternatives for supressing agriculture. p 223-242.

16. Hessayon, D. 1995. Manual de horticultura. 2 ed. Barcelona, ES. Naturart. p 63-67.
17. Iáñez, E. 1998. Microbiología: características de las esporas. (en línea). 2 ed. España. Universidad de Granada. Consultado 10 abr. 2005. Disponible en <http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/12micro.htm> #exosporasç
18. Infoagro, ES. 2002. El cultivo de la Lechuga. (en línea). España. Consultado 14 mar. 2005. Disponible en <http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm>.
19. Kerns, D; Palumbo, J. 1996. Manejo integrado de plagas en lechuga: Sur oeste de los Estados Unidos. Trad. RE Cancelado. (en línea). Minnesota, EU. Universidad de Minnesota. Consultado 14 mar. 2005. Disponible en <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/KernsSp.htm>.
20. KIM, D. 1997. Phytopathology: Bacillus sp. for biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. Estados Unidos. s.e. p 551-558.
21. Korsten, L; De Villiers, EE; Wehner, RC; Kotzet, JM. 1997. Field spray of Bacillus subtilis and fungicides for control of preharvet fruit disease of avocado in South Africa. s.n.t. p 455-459.
22. Lazzarete, E; Menten, JOM; Bettiol, W. 1994. Bacillus subtilis antagónicos aos principaes patógenos asociados a sementes de feijao e trigo. s.n.t. p 42-46.

23. Lycos, ES. 2004. Plagas, enfermedades y fisiopatías: Virosis. (en línea). España. Consultado 30 mar. 2005. Disponible en <http://usuarios.lycos.es/Theo/id87.htm>.
24. Martínez, A. 2004. Enfermedades de los céspedes en Georgia: Identificación y control. (en línea). Georgia, EU. Universidad de georgia. Consultado 30 mar. 2005. Disponible en [http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubcd/B1233-SP.htm#Brown Patch](http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubcd/B1233-SP.htm#BrownPatch).
25. Morales, J. 2002. Plagas y enfermedades de las plantas: Trastornos. (en línea). Cadis, ES. Infojardin, ES. Consultado 30 mar. 2005. Disponible en http://www.infojardin.com/rosales/Trastornos_1.htm.
26. Ogoshi, A. 1985. Ecology and management of soil-borne plant pathogens: Anastomosis group of Rhizoctonia solani and binucleate Rhizoctonia. s.l. The American Phytopathological Society. St. Paul MN. p 57-58.
27. Parmeter, J. 1969. Phytopathology: Anastomosis Grups among Isolates of Thanatethorus cucumeris. Trad. RT Sherwood y WD Plat. s.n.t. p 1270-1278.
28. Oirsa. 1999. Manejo de enfermedades en ornamentales: Rhizoctonia. (en línea). San Salvador, ES. Consultado 25 mar. 2005. Disponible en <http://www.oirsa.org/Publicaciones/VIFINEX/Manuales/Manuales/Manual-03/II-Manejo.htm>.

29. Quilis, J. 2003. Problemas fitosanitarios en el cultivo de la lechuga: Principales plagas, enfermedades y fisiopatías de este cultivo en el levante. Vida rural No.166: 21-25.
30. Rougieux, G. 1964. Técnicas de Microbiología Agrícola. Zaragoza, ES. Acribia. p 129-143.
31. Suquilanda, M. 1996. Agricultura orgánica: alternativa tecnológica del futuro. Quito, EC. Fundagro. p 241-251.
32. Torres, LA; Wong, W; Miguel, A; Fernández, A; Amat, Z. 2001. Actividad antagónica de especies de *Bacillus* spp contra Rhizoctonia solani y Sclerotium rolfsii. S.n.t. p 58-63.
33. Valencia, A. 1995. Cultivo de hortalizas de hoja: Col y lechuga. Lima, PE. MAG-INIA. p 51-65.
34. Yèpez, A. 1988. Manual del cultivo de hortalizas. Quito, EC. INIAP. p 30-33.