

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y  
DEL MEDIO NATURAL



**Evaluación del tratamiento con *Coniothyrium minitans*  
para el control de esclerocios de *Sclerotinia  
sclerotiorum* y *S. minor* en parcelas de cultivo de  
lechuga.**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Máster en Ingeniería Agronómica**

ALUMNA: Myriam Pérez Márquez

TUTOR: Josep Armengol Fortí

**Curso académico 2017/2018**

**VALENCIA, Diciembre de 2017**

# Título

---

Evaluación del tratamiento con *Coniothyrium minitans* para el control de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* en parcelas de cultivo de lechuga.

## Resumen

---

La podredumbre blanca o de cuello en lechuga, causada por *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*, es una de las enfermedades más importantes de la lechuga a nivel mundial, debido a las pérdidas que ocasiona y su difícil control. Estos dos hongos ascomicetos producen esclerocios, masas de hifas apelmazadas rodeadas por una capa de melanina resistente, que sirven tanto como estructuras de conservación y supervivencia como inóculo primario para cultivos de lechuga subsiguientes, consiguiendo así multiplicarse y diseminarse. Por ello, el control de los esclerocios, agentes causales de la podredumbre blanca, en suelo es esencial para la reducción del inóculo primario de estos hongos y, de este modo, reducir el nivel de infección inicial en parcelas de lechuga. Para este fin, existe un agente de control biológico, *Coniothyrium minitans*, que parasita los esclerocios de ambas especies. En este trabajo se ha usado una técnica de tamizado húmedo de suelo para la cuantificación de esclerocios de *S. sclerotiorum* y *S. minor* que permita determinar el número de esclerocios en suelos de campos comerciales de lechuga y se ha estudiado si la aplicación del agente de biocontrol *C. minitans* en un ciclo de cultivo de lechuga es efectivo para la disminución de las poblaciones de esclerocios viables de *S. sclerotiorum* y *S. minor* en suelo. Para ello, se realizaron experimentos con muestras procedentes de tres parcelas de cultivo de lechuga que habían sufrido infecciones de podredumbre blanca en años anteriores localizadas en Fuente Álamo (Murcia), Carnaxide (Lisboa) y en Algarrobina (Almería). Se marcaron dos subparcelas en cada parcela y en cada una de estas subparcelas se tomaron muestras de suelo para determinar la densidad de los esclerocios de *S. sclerotiorum* o *S. minor*, tras la primera recogida de muestras, una subparcela de cada parcela se trató con *C. minitans* y un año después se realizó la segunda toma de muestras. Tras dejar secar las muestras, se procedió a la recuperación de esclerocios del suelo mediante la técnica de tamizado húmedo y se estudió la viabilidad de los mismos desinfectándolos previamente con lejía. Los resultados obtenidos mostraron que en los suelos de las tres parcelas de lechuga estudiadas en los que se aplicó el agente de biocontrol *C. minitans*, no se encontraron diferencias significativas en el número de esclerocios por 100 gramos de suelo entre las subparcelas tratadas y no tratadas una vez transcurrido un año desde el momento de la aplicación.

**Palabras clave:** Podredumbre blanca, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, lechuga.

**Autor del TFM:** Myriam Pérez Márquez

**Tutor académico:** Josep Armengol Fortí

**Valencia, Diciembre 2017**

# Title

---

Evaluation of the treatment with *Coniothyrium minitans* for control of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* sclerotia in plots of lettuce cultivation.

# Abstract

---

Lettuce drop, caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* is one of the most important diseases of lettuce worldwide, due to the losses it causes and its difficult control. These two ascomycete fungi produce sclerotia, masses of compressed hyfas, surrounded by a resistant layer of melanin, which serve as conservation and survival structures and as primary inoculum for subsequent lettuce crops, thereby they multiply and spread. Thus, the control of sclerotia, in soil is essential to reduce the primary inoculum of these fungi and, in this way, to reduce the initial level of infection in lettuce plots. For this purpose, a biological control agent exists, *Coniothyrium minitans*, which parasitizes the sclerotia of both species. In this paper a technique of moist sieved soil has been used for the quantification of *S. sclerotiorum* and *S. minor* sclerotia, that makes possible to determine the number of sclerotia in soils of lettuce crop fields. Moreover, it has been studied whether the application of the biocontrol agent *C. minitans* in a lettuce growing cycle is effective for the decrease of viable populations of *S. sclerotiorum* and *S. minor* sclerotia in soil. For that purpose, different experiments with samples of three different lettuce field, which suffered roteness infections previous years, placed in Fuente Álamo (Murcia), Carnaxide (Lisboa) and in Algarrobina (Almería), were carried out. Two subplots were marked in each plot, and in each of these subplots different samples of soil were taken to determine the density of sclerotia of *S. sclerotiorum* or *S. minor*, after the first sample collection, a subplot of each plot was treated with *C. minitans*, and a year after a second sample collection took place. After letting the samples dry, a sclerotia recovery in soil was made through the moist sieved technique, and their viability was studied. The results obtained showed that in all the soils of the three studied plots where *C. minitans* was applied, no significant differences were found in the number of sclerotia per 100 grams of soil, between the treated subplots and the non-treated ones, once a year passed by from the time it was applied.

**Keywords:** Lettuce drop, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, lettuce.

**Author of the TFM:** Myriam Pérez Márquez

**Supervisor:** Josep Armengol Fortí

**Valencia, December 2017**

# Agradecimientos

---

*Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que me han ayudado y apoyado a lo largo de este trabajo. Sin ustedes esto no hubiera sido posible.*

*En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Josep Armengol Fortí, su infinita paciencia, su dedicación y todo el tiempo que me ha dedicado para que este trabajo saliera adelante.*

*Agradecer también a la empresa Bayer CropScience por facilitar y coordinar la toma y envío de muestras de suelo procedentes de parcelas de cultivo de lechuga.*

*A mis padres por estar en cada momento y por apoyo permanente en todo proyecto que he iniciado en la vida.*

# Índice

---

1. Introducción .....	1
1.1. El cultivo de la lechuga .....	1
1.1.2. Botánica, taxonomía y morfología .....	1
1.1.2. Tipos de lechuga.....	2
1.1.3. Importancia del cultivo de la lechuga.....	2
1.2. Enfermedades de la lechuga causadas por hongos .....	3
1.2.1. Importancia de los daños de la podredumbre blanca.....	3
1.2.2. Síntomas y agente causal.....	4
1.2.3. Ciclo de la enfermedad y epidemiología.....	5
1.2.4. Métodos de control.....	8
2. Objetivos .....	13
3. Materiales y métodos .....	14
3.1. Localización de las parcelas y toma de muestras .....	14
3.2. Extracción de los esclerocios del suelo .....	14
3.3. Determinación de la viabilidad de los esclerocios .....	15
4. Resultados y discusión .....	17
5. Conclusión.....	25
6. Bibliografía .....	26

## Índice de tablas

---

TABLA 1: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 1 en el año 2015.....	19
TABLA 2: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 1 en el año 2016.....	19
TABLA 3: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 2 en el año 2015.....	20
TABLA 4: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 2 en el año 2016.....	20
TABLA 5: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 3 en el año 2015.....	21
TABLA 6: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 3 en el año 2016.....	21
TABLA 7: Comparación de los valores medios de numero de esclerocios por 100 gr de suelo entre las subparcelas sin o con C. minitans en las parcelas de estudios (1,2 y 3) en los años 2015 y 2016.....	22
TABLA 8: Relación entre el número de esclerocios viables frente al número de esclerocios totales encontrados. ....	23

# 1. Introducción

---

## 1.1. El cultivo de la lechuga

Los primeros vestigios del cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) aparecen en las pinturas de las tumbas del antiguo Egipto (2500 a. C.). Eran lechugas en forma de tallo, como las que actualmente siguen cultivándose en Egipto, muy parecidas a la especie *Lactuca serriola* L. En Egipto la lechuga era una planta sagrada que se asociaba al dios Min, deidad de la fecundidad y protector de las cosechas. Sin embargo, los primeros escritos sobre lechuga se atribuyen a Herodoto (Maroto Borrego, 2014).

La lechuga fue también muy popular en Roma, cultivándose distintos tipos y variedades. Todo parece indicar que los romanos introdujeron la lechuga en el resto de Europa. La lechuga romana, también conocida como «Cos», se extendió por todo el Mediterráneo y parece haber sido el origen de múltiples tipos de lechuga, como las de hoja mantecosa y Batavia. Además, fue una de las primeras verduras introducidas por Cristóbal Colon en el Nuevo Mundo.

A lo largo de los años se han seleccionado múltiples tipos de lechuga en todo el mundo, pero cabe resaltar la obtención en la década de los 40 de la primera lechuga iceberg, la variedad 'Grandes Lagos', que representó el inicio de la actual industria de ensaladas, dominando el mercado de EEUU hasta hoy en día. Las variedades de lechuga iceberg fueron introducidas en Europa al final de los 60 y representan el núcleo de la producción actual de lechugas, aunque ya se ha desarrollado una amplia gama de tipos de lechuga con una gran diversidad de formas, texturas y colores (Maroto Borrego y Baixauli Soria, 2016).

### 1.1.2. Botánica, taxonomía y morfología.

Según la taxonomía clásica, la lechuga se clasifica como:

- Familia: Compositae (Asteraceae).
- Tribu: Cichoreae.
- Género: *Lactuca*.
- Especie: *sativa* L.

La lechuga está estrechamente emparentada con la lechuga silvestre *L. serriola* L. y menos próxima a la *L. saligna* L. y *L. virosa* L.

La planta tiene una raíz pivotante y el tallo, en función de la variedad y su comportamiento, puede cambiar considerablemente, en la mayoría de las variedades comerciales es corto, apenas unos milímetros en el momento óptimo de cosecha, pero cuando inicia la etapa reproductiva se produce un alargamiento del mismo para dar lugar a la floración.

Las hojas pueden ser de múltiples formas, lanceoladas, oblongas, redondas; y el borde, liso, lobulado, ondulado o dentado. La superficie es plana, rugosa o abarquillada. El color amarillento, verde claro, verde oscuro, rojizo o púrpura. Por su consistencia pueden ser más rígidas y crujientes o mantecosas.

Las flores están agrupadas en capítulos compuestos por 10 a 20 floretes amarillentos en racimos o corimbos. Es una planta autógama cuyas semillas son en realidad aquenios de color blanco, amarillo, marrón o negro, miden unos 2 a 4 mm de longitud y en su base se encuentra el vilano plumoso que facilita la diseminación por el viento. En un gramo hay unas 800 semillas y su capacidad germinativa es de 4 a 6 años (Maroto Borrego y Baixauli Soria, 2016).

### 1.1.2. Tipos de lechuga

La especie *L. sativa* se divide en 4 variedades botánicas:

- *L. sativa* var. *capitata* L. incluye a todos los cultivares que forman un cogollo compacto con sus hojas. La forma de sus hojas suele ser ancha y redondeada y su textura crujiente o mantecosa.
- *L. sativa* var. *longifolia* Lam. Engloba a los cultivares de lechuga romana o cos, con hojas alargadas, oblonga, que tienen un porte erguido y, generalmente, las hojas interiores son amarillas y las exteriores verdes. Pueden acogollar o quedarse prácticamente abiertas.
- *L. sativa* var. *intybacea* Hort. Incluye a todos los cultivares con hojas abiertas, aunque en estado avanzado de madurez pueden formar un pequeño cogollo interior.
- *L. sativa* var. *augustana* Irish. Se cultivan por su tallo y las hojas son lanceoladas. Este tipo solo se produce en China.

Dentro de cada una de las variedades botánicas descritas se ubican los distintos tipos. Dentro de cada tipo hay disponible una amplia gama de variedades para poder cubrir el ciclo completo de cultivo en las distintas zonas geográficas en todo el mundo, con sistemas de cultivo y condiciones del medio cambiantes (Maroto Borrego y Baixauli Soria, 2016).

### 1.1.3. Importancia del cultivo de la lechuga

Los últimos datos oficiales de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) determinan que en el mundo se producen 24.976.318 t de lechuga y escarola (Figura 1). En los últimos 10 años se ha producido un constante incremento en la producción, con excepción del intervalo entre el año 2012 y 2013 en el que se produjo un notable descenso, a partir del cual se ha vuelto a incrementar la producción. La producción mundial actual se divide en 1.158.979 ha. El país con mayor producción actualmente es China con un 54,67% de la producción mundial, seguido de los Estados Unidos de América (EE.UU.) que produce un 15,18%. Por otro lado, España ocupa el cuarto lugar en la producción después de la India, representando 3,61% de la producción mundial (FAO, 2014). Actualmente, España tiene una producción anual de 904.802 t de lechugas en una superficie de 33.924 ha (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2016). Teniendo en cuenta los datos de la FAO, Estados Unidos y España son los países que mejor rendimiento por metro cuadrado obtienen en la producción de lechuga, teniendo en cuenta los cinco mayores productores mundiales. España tiene un rendimiento del 2,67 kg/m<sup>2</sup>.



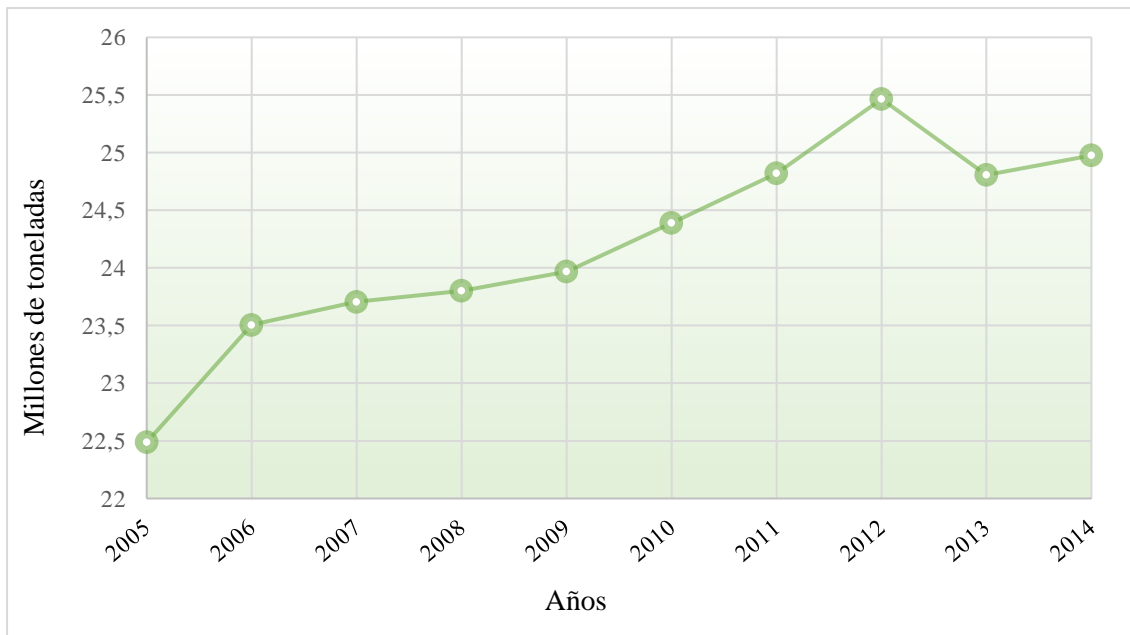


Figura 1: Producción de lechugas y coles en el mundo. (Elaboración propia. Fuente: FAO, 2014)

## 1.2. Enfermedades de la lechuga causadas por hongos

El cultivo de la lechuga se ve afectado por varias enfermedades fúngicas: el mildiu causado por el hongo *Bremia lactucae*, la podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea*, la podredumbre blanca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*, el oídio producido por el hongo *Erysiphe cichoracearum* y otras enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como: *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Fusarium*, que se presentan con mayor o menor importancia en función de determinadas condiciones ambientales (Maroto Borrego y Baixauli Soria, 2016).

El presente trabajo se centra en el estudio de una de las enfermedades más importantes que afecta a la lechuga: la podredumbre blanca. A continuación, se describe dicha enfermedad.

### 1.2.1. Importancia de los daños de la podredumbre blanca

La podredumbre blanca o de cuello es una de las enfermedades más importantes de la lechuga a nivel mundial, debido a las pérdidas que ocasiona y su difícil control. La enfermedad está ampliamente extendida y se citan sus daños en numerosas regiones de producción de lechuga del mundo como Australia, Nueva Zelanda, Japón, China, Estados Unidos, Canadá, Europa (Bélgica, Holanda, España Alemania, Italia, Inglaterra, Portugal, etc.), y la Cuenca mediterránea (Israel, Turquía, etc.) (Dominique *et al.*, 2005).

En la Comunidad Valenciana esta enfermedad se puede encontrar en todas las comarcas con niveles de daños variables tanto en extensión como en intensidad. Las zonas de huerta tradicional, la Ribera, L'Horta y zona norte del Bajo Segura son las más afectadas, en ellas resulta difícil llegar establecer el cultivo con resultados de rentabilidad económica, ya que la repetición de los cultivos ha aumentado el inóculo en el suelo hasta tal punto que la intensidad y extensión de la infección es muy alta, siendo un gran porcentaje de plantas víctimas de este parásito, sobre todo en cultivos realizados en época invernal (García Morató, 1995).

## 1.2.2. Síntomas y agente causal

La enfermedad de la podredumbre blanca en la lechuga está causada por dos especies criptogámicas: *Sclerotinia minor* (Jagger) y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Estos dos hongos ascomicetos polífagos son capaces de atacar a la especie *L. sativa* tanto en semillero como en el cultivo al aire libre. Pueden cohabitar en la misma parcela, pero generalmente predomina uno u otro.

Los síntomas en semillero de ambos hongos en *L. sativa*, después de la plantación y, sobre todo en el momento del acogollado y cerca de la recolección son muy similares (Dominique *et al.*, 2005). Ambos provocan alteraciones húmedas y de color marrón claro que afectan a las partes de la planta que están en contacto con el suelo y, especialmente, a las hojas senescentes. Estas alteraciones se desarrollan rápidamente, dando paso a una podredumbre que se generaliza a los estratos de las hojas cercanas al suelo. Los peciolo, las nerviaciones centrales y el cuello son invadidos y se llega a producir clorosis y el marchitamiento de las hojas externas y después de la planta entera en menos de 48 horas. A continuación, la podredumbre alcanza el conjunto de los tejidos foliares que se descomponen y se desfondan (Figura 2B) (Dominique *et al.*, 2005). Cabe destacar que el arrancado de la planta no ofrece ninguna resistencia, ya que presentan toda la zona del cuello y base de hojas externas húmeda, blanda y descompuesta (García Morató, 1995).

Desde un primer momento, las alteraciones anteriormente descritas pueden iniciarse a más altura a partir de las hojas expuestas a las ascosporas de *S. sclerotiorum*. Las manchas crecen con rapidez y conducen a la inevitable podredumbre de varias hojas y del cogollo (Figura 2C). Por otro lado, también se puede llegar a producir marchitamiento lento de la planta a causa de ataques de *S. minor* a más profundidad del suelo, estos ataques ocasionan un oscurecimiento de la raíz principal entre 5 – 10 cm de la superficie del suelo (Figura 2D) (Dominique, *et al.*, 2005). Independientemente de la localización del ataque es característica la aparición de abundante micelio blanco (Figura 2E), acompañado de unos órganos oscuros y duros llamados esclerocios (García Morató, 1995).

El nombre del género, *Sclerotinia*, hace referencia a estos órganos de multiplicación, los esclerocios. Los esclerocios son masas de hifas apelmazadas rodeadas por una capa de melanina resistente, que sirven tanto como estructuras de conservación y supervivencia como inóculo primario para cultivos de lechuga subsiguientes consiguiendo así multiplicarse y difundirse (Chitrapalama y Pryor, 2013).

Los esclerocios maduros presentan el aspecto de pequeños granos oscuros, negros, de forma y tamaños irregulares, muy típicos y evidentes sobre el blanco micelio característico (Dominique, *et al.*, 2005).

Los esclerocios permiten la distinción de las dos especies: *S. minor* forma un conglomerado de esclerocios negros y redondeados de 0,5 a 2 mm de diámetro (Figura 3A y 3B) (Subbarao, 1998). En condiciones apropiadas, germinan directamente y entran en contacto con las raíces o cuello de las plantas (puntos habituales de infección) alterándolos los tejidos profundamente, provocando muerte de células y acumulación de fluidos (García Morató, 1995).

*Sclerotinia sclerotiorum* forma esclerocios más grandes, negros, gruesos, alargados e irregulares de 2 a 20 mm de largo y de 3 a 7 mm de ancho (Figura 3C y 3E). La forma teleomórfica (reproducción sexual) de esta especie a veces es visible en la superficie del suelo (Figura 3D) (Subbarao, 1998). Bajo condiciones climáticas relativamente frías y con humedades altas en el suelo lo normal es que estos esclerocios no germinen directamente, formando pequeños apotecios más a menudo en los esclerocios más grandes. Los apotecios producen ascosporas que originan las contaminaciones aéreas (Dominique, *et al.*, 2005). Sin embargo, en los cultivos de la Comunidad Valenciana no se observan habitualmente estos órganos, produciéndose más frecuentemente la germinación directa de los esclerocios (García Morató, 1995).

En una observación rápida estos daños pueden confundirse con los causados por un ataque de *Botrytis* (Figura 2A), pero la diferenciación es muy simple gracias a la presencia del micelio blanco y los citados esclerocios, mientras que en *Botrytis* el micelio es de color pardo grisáceo y no hay formación de esclerocios (García Morató, 1995).

### 1.2.3. Ciclo de la enfermedad y epidemiología

Las características de los ciclos de las dos especies de *Sclerotinia* afectan significativamente el modo en el que infectan plantas de lechuga (Figura 4). Ambas especies sobreviven en el suelo como esclerocios de 8 a 10 años si las condiciones son favorables, pero también pueden sobrevivir como micelio activo en plantas vivas o muertas (Subbarao, 1998). La repetición de cultivos sensibles va aumentando el número de estos esclerocios en las capas superficiales del suelo y, por tanto, las posibilidades de infección a los cultivos (García Morató, 1995).

Cabe destacar que estos hongos afectan a muchas especies de plantas, incluyendo muchas especies de cultivo económicamente importantes. *S. minor* infecta menos huéspedes que *S. sclerotiorum* que es más polífago (Subbarao, 1998). *Sclerotinia sclerotiorum* se cita sobre más de 400 plantas cultivadas o arvenses, como el tomate, pimiento o la judía y *S. minor* en más de 90 especies, sin embargo, en su caso el nivel de ataque está estrechamente relacionado con el número de esclerocios presentes en el suelo (Dominique *et al.*, 2005).

La supervivencia de los esclerocios de ambas especies se ve afectada por la localización de los mismos en el perfil del suelo, su edad, la humedad del suelo y la temperatura del suelo. La viabilidad de los esclerocios se reduce con el tiempo y con el aumento de la humedad del suelo. Los esclerocios de *S. minor* se desintegran o no germinan dentro de las 8 semanas que tardan normalmente cuando el suelo está saturado. Por otro lado, es posible su inactivación térmica, que en los esclerocios de *S. minor* se produce a 40 ° C dentro de 39 h, a 45 ° C en 6 h y a 50 ° C en 2 h. Los esclerocios de *S. sclerotiorum* sobreviven bien durante al menos 15 meses a profundidades de hasta 30 cm y pueden sobrevivir hasta 7 años en condiciones desfavorables. Casi el 90% de los esclerocios de *S. sclerotiorum* en el suelo son térmicamente inactivados a 35 ° C (Subbarao, 1998).

La germinación de esclerocios en ambas especies se ve afectada negativamente por la microflora del suelo. Los esclerocios de *S. sclerotiorum* debajo de la superficie del suelo germinan carpogénicamente después de un período de enfriamiento (4 ° C) y de humedad del suelo cerca de la saturación durante 2 o más semanas formando apotecios que producen y liberan millones de ascosporas en el aire en un periodo entre 2-3 semanas. Se producen mayores números de apotecios por esclerocios cuando se localizan en los 5 cm superiores del perfil del suelo que en los perfiles más profundos del suelo. La formación de apotecios es fuertemente fotodependiente, y la intensidad de la luz superior a 58,1  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\text{ m}^{-2}$  favorece su desarrollo. Las temperaturas óptimas para la formación de apotecios son de entre 8 a 16 ° C (Subbarao, 1998). La germinación de las ascosporas sobre las hojas solo es posible en presencia de agua libre, proveniente de lluvia, riego por aspersión o del rocío (Dominique *et al.*, 2005). No obstante, los esclerocios de *S. sclerotiorum* también pueden germinar eruptivamente.

Por otro lado, las condiciones para la germinación carpogénica de los esclerocios de *S. minor* son raras en la naturaleza y no han sido cuantificadas con precisión. La germinación eruptiva de los esclerocios menores de *S. minor* se ve afectada por el estado de humedad de los esclerocios, por ello, los esclerocios producidos en los tejidos del huésped no germinan bien debido a su alto contenido de humedad y deben secarse algo antes de que la mayoría de ellos puedan germinar. La humedad y temperatura del suelo afectan significativamente la germinación

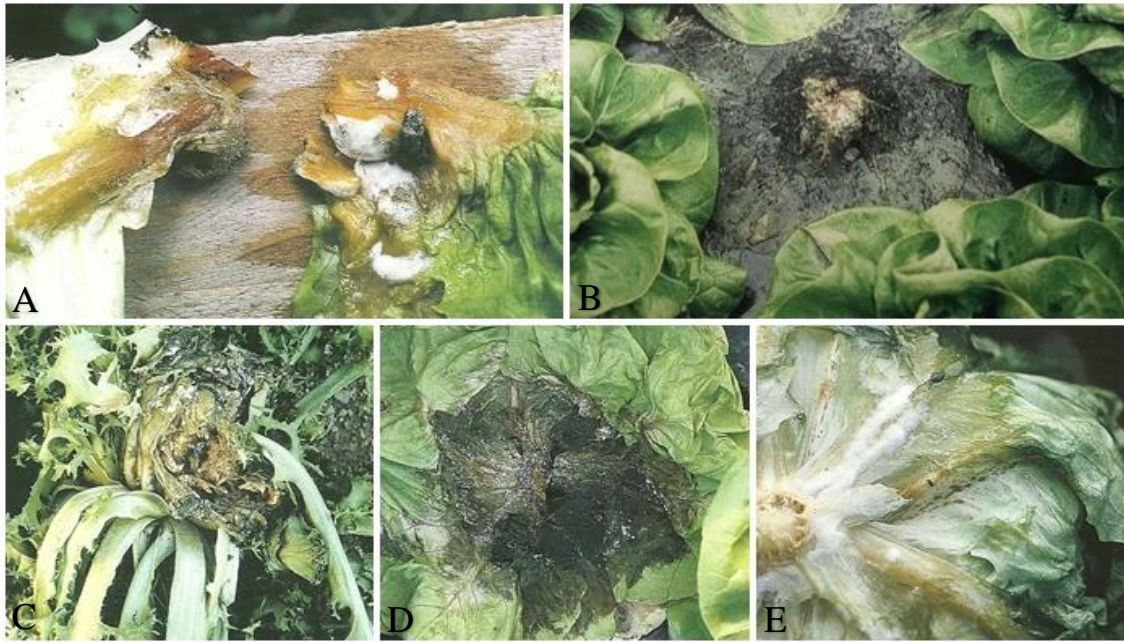


Figura 2: A) En la izquierda *Botrytis cinerea* genera un moho gris y a la derecha *Sclerotinia sclerotiorum* produce micelio blanco y esclerocios; B) *S. minor* descompone totalmente los tejidos vegetales, tal solo se distingue algunas nerviaciones principales de las hojas y los esclerocios del hongo diseminados; C) Infección aérea provocada por *S. sclerotiorum*; D) *S. minor* provoca alteraciones húmedas y después descompone la lechuga; E) *S. sclerotiorum* produce un denso micelio blanco sobre los tejidos parcialmente descompuestos. (Fuente: Dominique, B., Hervè, L. & Brigitte, M., 2005. Enfermedades de las lechugas. Identificar, conocer, controlar. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 375 pp.)



Figura 3: A) Esclerocios de *Sclerotinia minor*; B) Esclerocios de *S. minor*; C) Esclerocios de *S. sclerotiorum*; D) Forma teleomorfa de *S. sclerotiorum*, apotecios sobre los esclerocios; E) Esclerocios de *S. sclerotiorum*. (Fuente: Dominique, B., Hervè, L. & Brigitte, M., 2005. Enfermedades de las lechugas. Identificar, conocer, controlar. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 375 pp.)

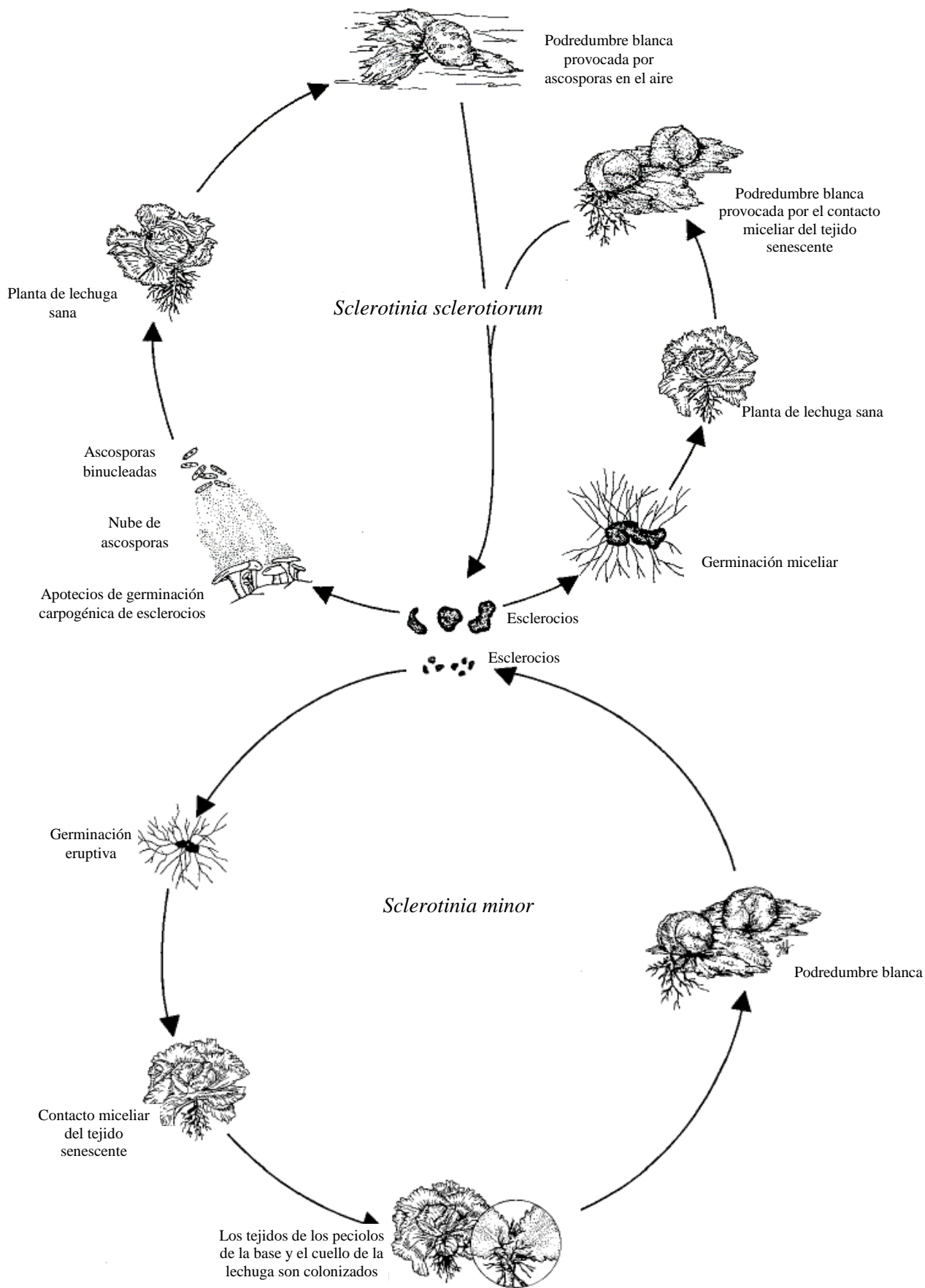


Figura 4: Ciclos de *S. sclerotiorum* y *S. minor*.



eruptiva en *S. minor*. La germinación de los esclerocios y el crecimiento micelial ocurre cuando el potencial matricial del suelo está entre -0,03 MPa y -1,5 MPa, con un óptimo a -0,03 MPa y con una temperatura de 6 y 30 ° C, con un óptimo a 18 ° C (Imolehin *et al.*, 1980).

La infección por cualquiera de las dos especies puede ocurrir en cualquier etapa de crecimiento del cultivo, pero las pérdidas económicas ocurren con mayor frecuencia durante la madurez del cultivo. Las ascosporas, liberadas durante un período de 2 a 3 semanas, se dispersan en el campo de lechuga y campos adyacentes por el viento. Una vez se depositan en plantas senescentes u hojas de lechuga muertas, las ascosporas en presencia de agua libre en la hoja durante 48 h germinan para producir hifas que infectan y matan a la planta. Las plantas infectadas por ascosporas en el aire forman esclerocios en las partes aéreas de las plantas. También puede ocurrir infección micelial por germinación eruptiva, pero la infección de plantas de este modo por *S. sclerotiorum* en campos comerciales es poco frecuente (Patterson y Grogan, 1985). En contraste, los esclerocios de *S. minor* raramente producen apotecios, y las infecciones son causadas por germinación eruptiva de esclerocios. Los esclerocios situados a 2 cm de la raíz principal y a 8 cm de la superficie del suelo producen masas de hifas que infectan las raíces, tallos y hojas senescentes. La propagación de planta a planta se produce ocasionalmente por contacto micelial. Un gran número de esclerocios se forman en la corona y las partes subterráneas de la planta de lechuga infectada. Los esclerocios de ambas especies son devueltos al suelo cuando el residuo de la lechuga se envuelve debajo de la cosecha (Subbarao, 1998). Por lo tanto, en *S. sclerotiorum*, las plantas de lechuga son infectadas principalmente por ascosporas transportadas por el aire a partir de la germinación carpogénica de los esclerocios, y por ello la incidencia de la enfermedad suele ser esporádica y depende de las condiciones climáticas propicias para la producción de apotecios. Por el contrario, rara vez se han observado apotecios de *S. minor* en los campos de producción y su papel en las epidemias es limitado. La incidencia de la podredumbre blanca inducida por *S. minor* se correlaciona con la densidad de esclerocios en el suelo. Dado que la densidad de esclerocios viables en el suelo uno de los factores más importante que afecta las infecciones por las diferentes especies de *Sclerotinia* es esencial comprender mejor su supervivencia en el suelo para desarrollar nuevos métodos para el tratamiento de esta enfermedad (Wu, *et al.*, 2008).

#### **1.2.4. Métodos de control**

El manejo de podredumbre blanca incluye métodos de control culturales, biológicos, físicos y químicos. Actualmente, ninguna técnica de manejo proporciona niveles satisfactorios de control, por lo que los agricultores integran varios métodos. Las diferencias en la epidemiología de la enfermedad causada por las dos especies de *Sclerotinia* requieren diferentes métodos de control. Las ascosporas en el aire en *S. sclerotiorum* hacen que sea más difícil el manejo podredumbre blanca de la lechuga causada por esta especie (Subbarao, 1998). Por ello, conviene tener presente en la estrategia de control la preponderancia de una u otra especie (García Morató, 1995).

En la lucha integral contra esta enfermedad pueden considerarse dos fases bien diferenciadas dentro de los diferentes métodos de control: Manejo de los de esclerocios y la protección del cultivo durante su vegetación (García Morató, 1995).

##### **1.2.4.1. Manejo de los esclerocios**

La destrucción o reducción de los esclerocios en el suelo es la vía más directa y eficaz para reducir la incidencia de la enfermedad en el cultivo. Para ello se pueden utilizar las siguientes estrategias:

## **La eliminación de restos de cultivos afectados**

La eliminación de los restos de cultivo afectados por los dos hongos es la primera medida importante para reducir el inóculo en el suelo.

## **Eliminación de las plantas infectadas**

Teniendo en cuenta que las plantas infectadas sirven como reservorio del inóculo del suelo, la eliminación de las plantas infectadas, teóricamente, con el tiempo debería disminuir significativamente el depósito del inóculo del suelo. Se han realizado estudios en campos comerciales que confirman esta hipótesis, en ellos se observaron reducciones significativas en el inóculo del suelo en comparación con las áreas en las que las plantas infectadas no fueron eliminadas. Debido a la necesidad de mano de obra intensiva en esta técnica se aumentaba considerablemente el costo de la producción de lechuga y por ello, no es rentable (Patterson y Grogan, 1985).

## **El laboreo**

Es una práctica muy recomendable ya que al airear la capa superior reducimos humedad dificultando la viabilidad de muchos esclerocios (García Morató, 1995) y, además debido a que la supervivencia de los esclerocios disminuye con el tiempo y la profundidad su enterrado, el movimiento de los esclerocios a profundidades superiores a 10 cm puede evitar las infecciones en el cultivo. Factores como la temperatura del suelo, las concentraciones de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y etileno cambian con la profundidad del suelo y pueden influir en la supervivencia. Sin embargo, el aumento de la mortalidad de los esclerocios a mayores profundidades se produce principalmente por la colonización de esclerocios por hongos antagonistas (Chitrampalama y Pryor, 2013).

Estos hallazgos condujeron al desarrollo del arado profundo como una práctica de manejo de la enfermedad para enterrar a los esclerocios ubicados en el perfil superior del suelo. Debido a que *S. sclerotiorum* también tiene una fase en el aire, no se esperaba que el arado profundo fuera tan exitoso como con *S. minor* pero finalmente el coste de esta técnica no era rentable para el bajo control que ofrecía de la enfermedad. Es más, la incidencia de la enfermedad fue a menudo mayor en el segundo cultivo después del arado profundo, que antes del arado profundo ya que la distribución espacial de los esclerocios cambió de un patrón altamente agregado antes del arado profundo a un patrón más uniforme (Subbarao, 1998).

## **Rotación de cultivos**

La rotación de cultivos como método de control generalmente ha dado malos resultados debido a que *S. minor* y *S. sclerotiorum* tienen una amplia gama de huéspedes. Sin embargo, se han realizado experimentos favorables utilizando la alternancia del cultivo de brócoli con el de lechuga. En dichos experimentos se observó que el número de esclerocios en el suelo se reducía después de que el residuo de brócoli era incorporado cada nuevo cultivo de lechuga y además se demostró que la incidencia de la enfermedad en los subsiguientes cultivos de lechuga fue significativamente menor cuando el cultivo de lechuga siguió al brócoli que al de otras lechugas (Subbarao, 1998 ; Hao y Subbarao, 2006).

## **Cultivares resistentes**

Los cultivares de lechuga resistentes ofrecen la opción más predecible, conveniente y menos costosa para manejar esta enfermedad en lechuga. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a la podredumbre blanca de la lechuga ha sido difícil y lento. Actualmente no se dispone de cultivares comerciales resistentes. La resistencia a patógenos necrotróficos como *Sclerotinia* necesita ser definida de manera diferente debido a la participación de ácidos y enzimas en la patogénesis (Wu y Subbarao, 2006).

## **Manejo del agua**

El riego es uno de los factores de mayor impacto en el desarrollo de la enfermedad en la lechuga ya que condiciona la temperatura y la humedad del suelo, los cuales son factores críticos para la germinación de los esclerocios y subsecuente infección de la lechuga (Wu y Subbarao, 2006).

El cultivo de lechuga se hace con diferentes tipos de riego. Tradicionalmente, el riego de surcos se utilizó debido a la facilidad de operación, pero el gasto de agua es alto e ineficiente, y la acumulación de sal es un problema importante. Por otro lado, también es posible el riego por aspersión para la emergencia óptima de las plántulas y el establecimiento de las plantas, que tiene ventajas como la disminución de la acumulación de sal cerca de las filas de semillas, la aplicación rápida y uniforme del agua, el uso más eficiente del agua y mayores rendimientos. Sin embargo, el riego por goteo requiere aproximadamente la mitad del agua requerida por los sistemas de surcos y aspersores y, dado que los fertilizantes pueden aplicarse directamente a la zona de las raíces, la eficiencia del fertilizante aumenta mientras que la lixiviación de  $\text{NO}_3$  disminuye. La instalación inicial del riego por goteo es costosa, pero una vez que el sistema está en su lugar, los costos de operación son bajos (Subbarao, 1998).

Un estudio comparativo de los diferentes tipos de riego, confirmó que el control logrado mediante riego por goteo fue superior al riego por surcos más la aplicación de fungicidas. El número de esclerocios de *S. minor* fue mayor en el suelo después de cada cultivo de lechuga con riego por surcos en comparación con el riego por goteo subsuperficial. Por otra parte, las poblaciones de esclerocios aumentaron aproximadamente cinco veces después de 3 años de labranza convencional bajo riego por surcos y tuvieron una distribución menos agregada que con el riego por goteo subsuperficial. Bajo riego por goteo subsuperficial, la distribución y el número de esclerocios en las parcelas se modificaron poco por prácticas de laboreo mínimo (Wu y Subbarao, 2003).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, los riegos se deben realizar por las mañanas y nunca por las tardes con el fin de permitir a las plantas secarse.

## **La desinfestación del suelo**

Es la mejor manera de reducir en gran parte los órganos de resistencia y multiplicación del hongo. Dicha desinfestación puede llevarse a cabo por diversos procedimientos: vapor de agua, productos químicos, solar o mixta (García Morató, 1995).

La primera, a base de vapor de agua, es de difícil empleo por su elevado coste energético. En la aplicación de productos químicos destaca el Metam-Sodio y es preciso respetar el plazo de espera entre aplicación y plantación, pues la lechuga es muy sensible a la toxicidad residual de este desinfectante.

La solarización del suelo, que en esencia consiste en la elevación prolongada de la temperatura de las capas superficiales del mismo hasta lograr cotas que resultan letales a los esclerocios, se ha manifestado como un método excelente para combatir la enfermedad, pues después de su práctica la mayoría de aquéllos resultan inviables. Además, su coste no es excesivo. Una temperatura constante del suelo de  $35^\circ\text{C}$  durante 3 semanas o más redujo la supervivencia de los esclerocios. La solarización consigue que aproximadamente el 96% de los esclerocios de *S. minor* a una profundidad de 0 a 2 cm pierden viabilidad en 2 a 3 semanas (Vannacci, *et al.*, 1988), por otro lado, una solarización de 8 semanas también reduce la viabilidad de esclerocios de *S. sclerotiorum* enterrados en el suelo a una profundidad de 10 cm (Swaminathan, *et al.*, 1999).



La desinfección mixta, que consiste en la aplicación de una pequeña dosis de producto desinfectante cubriendo después el suelo con el film a modo de solarización, participa, lógicamente, de las propiedades de ambos métodos, físico y químico.

Finalmente expresar dos consideraciones generales relativas a la desinfección del suelo:

- Conviene advertir que la sensibilidad de los esclerocios a cualquier tratamiento es siempre mayor si poseen cierto grado de humedad, pues secos su resistencia es mayor.
- Recordar que siempre que se decida efectuar la desinfección del suelo con productos químicos deben respetarse estrictamente los correspondientes plazos de seguridad entre aplicación e implantación del cultivo.

### **Tratamientos fungicidas**

A pesar de que no llega al grado de efectividad de una desinfección también logra reducir buen número de esclerocios. Se han obtenido buenos resultados con pulverizaciones a todo el suelo, una vez preparado para la siembra o plantación del cultivo, con productos del grupo de las Dicarboximidias autorizados como la Iprodiona (García Morató, 1995).

### **Lucha biológica**

El control y/o supresión de la enfermedad ejercida por agentes biocontroladores se basa en la competición por las fuentes de nutrientes y espacio, antibiosis, inducción de resistencia en las plantas huésped, reducción de la habilidad saprofítica, reducción de la diseminación de esporas, restricción de los factores de patogenicidad del patógeno y micoparasitismo.

Se ha demostrado que una serie de hongos degradan los esclerocios de *S. sclerotiorum*, reduciendo su viabilidad y producción de apotecios, entre ellos se encuentran: *Coniothyrium minitans*, varias especies de *Trichoderma* como *T. asperellum*, *T. gamsii* y *T. harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Clonostachys rosea* y *Gliocladium catenulatum* (Jones *et al.*, 2014 ; Zeng *et al.*, 2011 ; Chitrampalam, *et al.*, 2010b). Cabe destacar, que de todos los microorganismos antagonistas utilizados para el control de *Sclerotinia* spp., *C. minitans* ha sido el más ampliamente estudiado. Se ha demostrado que la incorporación de *C. minitans* (Producto comercial Contans® WG) al suelo reduce la prodedumbre blanca provocada por *S. sclerotiorum* en la lechuga produciendo una amplia gama de enzimas de degradación de la pared celular tales como quitinasas y glucanasas, así como metabolitos antifúngicos que aumentan la colonización y degradación de los esclerocios de *S. sclerotiorum* y atacan a las hifas del hongo (Zeng *et al.*, 2011).

#### **1.2.4.2. Protección del cultivo durante su vegetación**

Los métodos usados durante el período vegetativo del cultivo para prevenir esta enfermedad no han evidenciado tan alto grado de eficacia como el tratamiento previo contra los esclerocios.

#### **La cubrición del suelo mediante film de polietileno negro**

Es una práctica que puede resultar positiva siempre que los daños estén causados por *S. sclerotiorum* ya que así no se dispersan las ascosporas, pero que será de poca eficacia en el caso de *S. minor*, ya que, como se indicó, esta especie solo ataca a órganos enterrados mediante la germinación directa de sus pequeños esclerocios.

#### **Los tratamientos fungicidas**

Es el método más eficaz que puede practicarse durante la vegetación.

Si se trata de ataques de *S. minor* las aplicaciones fungicidas deben realizarse en períodos tempranos del desarrollo de la planta y hasta llegar el inicio del acogollado. Los tratamientos iniciados posteriormente han demostrado su poca eficacia, pues la infección ya había tenido lugar. En cambio, si predominan los ataques de *S. sclerotiorum* los tratamientos en edad temprana de las plantas tienen muy poco efecto, ya que la infección de las plantas se da principalmente cuando estén bien desarrolladas y por tanto el tratamiento, suprimiéndolos cuando exista riesgo de residuos en la recolección.

Se ha utilizado ácido carbámico que tuvo un buen resultado contra *Sclerotinia* spp., pero posteriormente, de manera progresiva fue perdiendo buena parte de su eficacia. La investigación posterior aportó un nuevo grupo químico, las Dicarboximidias, que constituyeron, en una primera fase, un gran avance en la lucha contra este hongo, pues se lograban un excelente control con algunas materias del grupo. Desde hace unos años, se está constatando que también la eficacia de las Dicarboximidias disminuye progresivamente. Este fenómeno es debido a tres motivos: Aparición de cepas resistentes del hongo, alteración del equilibrio microbiológico en detrimento de la flora antagonista y biodegradación acelerada de los fungicidas aplicados reiteradamente (Jones *et al.*, 2014).

De cualquier manera, las materias fungicidas autorizadas para el control de la podredumbre blanca de la lechuga en el registro de productos fitosanitarios actualmente son azoxistrobin, difenoconazol, ciprodinil, fludioxonil, fenhexamida, tebuconazol, fenhexamida, fluopyram, trifloxistrobin, iprodiona, piraclostrobin y boscalida.

## 2. Objetivos

---

Como se ha comentado en la introducción, el control de los esclerocios de las especies *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*, agentes causales de la podredumbre blanca, en suelo es clave para la reducción del inóculo primario de estos hongos y, de este modo, reducir el nivel de infección inicial en parcelas de lechuga. Para ello, existe un agente de control biológico, *Coniothyrium minitans*, que parasita los esclerocios de ambas especies. En este sentido, los objetivos de este trabajo son:

- Poner a punto y utilizar una técnica de tamizado húmedo de suelo para la cuantificación de esclerocios de *S. sclerotiorum* y *S. minor* que permita determinar el número de esclerocios en suelos de campos comerciales de lechuga.
- Determinar si la aplicación del agente de biocontrol *Coniothyrium minitans* en un ciclo de cultivo de lechuga es efectivo para la disminución de las poblaciones de esclerocios viables de *S. sclerotiorum* y *S. minor* en suelo.

## 3. Materiales y métodos

---

### 3.1. Localización de las parcelas y toma de muestras

Los experimentos se realizaron con muestras procedentes de tres parcelas de cultivo de lechuga que habían sufrido infecciones de podredumbre blanca en años anteriores. Dichas parcelas se localizaban en: Fuente Álamo, Murcia (Parcela 1), Carnaxide, Lisboa (Parcela 2) y Algarrobina, Almería (Parcela 3).

En octubre de 2015, se marcaron dos subparcelas de 10 m<sup>2</sup> en cada parcela y en cada una de estas subparcelas se tomaron muestras de suelo para determinar la densidad de los esclerocios de *S. sclerotiorum* o *S. minor* presentes. Para ello, en cada subparcela se recogieron 10 muestras a 10–20 cm de profundidad creando dos diagonales que forman una cruz imaginaria en el terreno para obtener muestras lo más representativas posible dentro de la parcela (Figura 5). Las muestras recogidas fueron de aproximadamente 1 kg, se guardaron en bolsas de papel individuales, se identificaron con números indicativos de la zona en la que se había recogido dicha muestra y se dejaron secar en un invernadero durante 1-3 meses.

Inmediatamente tras la primera recogida de muestras una subparcela de cada parcela se trató con *C. minitans* a razón de 2 kg/ha en el riego. Aproximadamente tres semanas después se plantaron lechugas. La segunda toma de muestras se realizó un año después, en octubre de 2016, tiempo después de la finalización del ciclo de cultivo de lechuga.

Así, teniendo en cuenta que se contó con 6 subparcelas, en las que se recogieron 10 muestras en cada una durante dos años consecutivos, en este trabajo se recogieron y estudiaron un total de 120 muestras suelo.

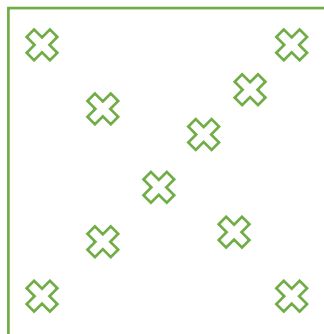


Figura 5: Esquema de la técnica utilizada para la recogida de muestras de suelo en cada una de las seis subparcelas (2 subparcelas por parcela).

### 3.2. Extracción de los esclerocios del suelo

La extracción de esclerocios del suelo se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural.

El procedimiento elegido para la recuperación de esclerocios del suelo y determinación de los niveles poblacionales de los mismos en las diferentes parcelas estudiadas, fue la técnica de tamizado húmedo. El método consistía en que a partir de cada muestra de suelo, se extrajeron tres submuestras por separado de 100 g, tomadas aleatoriamente de cada una de las muestras de 1 kg

de suelo completamente mezclado y desmenuzado previamente con la ayuda de un martillo. Las submuestras se lavaron a fondo con agua del grifo en un tamiz de 0,5 mm de poro (Figura 6A), el residuo se desechó y el material que queda en el tamiz se analizó visualmente para encontrar esclerocios de *Sclerotinia* spp. (Figura 6B Y 6C). Al final del proceso se cuantificó el número de esclerocios por 100 gramos de suelo.

### 3.3. Determinación de la viabilidad de los esclerocios

Para determinar el potencial de cada esclerocio recolectado en las muestras de suelos para causar enfermedad, éstos se esterilizaron superficialmente en lejía doméstica al 25% durante 1 minuto y medio y se lavaron dos veces con agua estéril (Figura 7A) para sembrarlos en placas medio de cultivo patata dextrosa agar con la adición de 0,5 g por litro de sulfato de estreptomicina (PDAS) (Figura 7B) e incubándolos a 20°C en la oscuridad, para comprobar si se producía germinación. Se evaluó el crecimiento micelar diariamente y se eliminaron los esclerocios ya germinados para evitar que la colonia en desarrollo creciera por encima de los esclerocios no germinados en la misma placa. En las placas en las que se produjo crecimiento micelar de morfología similar a la de *S. minor* y *S. sclerotiorum*, las colonias fueron repicadas a nuevas placas de medio de cultivo PDAS para obtener cultivos puros de los hongos (Figura 7C).



Figura 6: A) Tamizado húmedo de una submuestra de suelo. B) Extracción de esclerocios en el material retenido en el tamiz tras el tamizado húmedo. C) Esclerocio de *Sclerotinia* spp. encontrado tras el tamizado húmedo.



Figura 7: A) Esterilización superficial en lejía y agua esterilizada de los esclerocios. B) Cultivo de esclerocios en placas de PDAS. C) Cultivo puro de *S. minor*.

## 4. Resultados y discusión

---

Las tablas que se muestran a continuación (Tablas 1, 2, 3, 4, 5 y 6) muestran los niveles poblacionales de los esclerocios de *S. sclerotiorum* y *S. minor* obtenidos a través del tamizado húmedo en las parcelas estudiadas en los años 2015 y 2016.

En cada tabla se puede observar el número medio de esclerocios encontrados en cada muestra de suelo (promedio de las tres submuestras) y el número de esclerocios obtenidos en total en cada subparcela (promedio del número de esclerocios de cada muestra). Además, los números sombreados representan esclerocios viables, es decir, los esclerocios que, tras ser esterilizados, colocados en placas de PDAS e incubados a 20°C, germinaron y dieron lugar a una colonia de *Sclerotinia* ssp. Podemos distinguir la especie a la que pertenece cada uno de los esclerocios germinados según el color del número en el área sombreada. Los números azules representan esclerocios pertenecientes a la especie *S. sclerotiorum* y los números rojos son los pertenecientes a la especie *S. minor*.

En la parcela 1, en el primer año de estudio (2015, Tabla 1) el número medio de esclerocios varió desde 0,33 a 1,67 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela que no se iba a tratar con *C. minitans*, y en ella se obtuvo una media de 0,83 esclerocios por 100g de suelo, mientras que el número medio de esclerocios en la subparcela que se iba a tratar con *C. minitans* varió de 0 a 1,33 esclerocios por 100g de suelo, obteniéndose una media de 0,67 esclerocios por 100g de suelo. De entre los esclerocios obtenidos, fueron viables solo los encontrados en las muestras 8.1 y 8.2 de la subparcela que sería tratada con *C. minitans*. Dichos esclerocios se identificaron como pertenecientes a la especie *S. minor*.

En la parcela 1, en el año 2016 (Tabla 2) el número medio de esclerocios varió desde 0 a 0,33 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela que no iba a ser tratada con *C. minitans* y se obtuvo una media de 0,13 esclerocios por 100g de suelo. Mientras que en la subparcela tratada con *C. minitans* el número medio de esclerocios varió de 0 a 0,67 esclerocios por 100g de suelo, con una media de 0,20 esclerocios por 100g de suelo. De entre los esclerocios obtenidos, fueron viables el esclerocio encontrado en la muestra 3.1 de la subparcela sin *C. minitans* y los esclerocios encontrados en las muestras 3.2 y 3.3 de la subparcela tratada con *C. minitans*. Todos los esclerocios viables eran de la especie *S. sclerotiorum*.

En la parcela 2, en el primer año de estudio (2015, Tabla 3) el número medio de esclerocios varió desde 0,33 a 2,33 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela que no se iba a tratar con *C. minitans* y se obtuvo una media de 1,07 esclerocios por 100g de suelo. Por otro lado, el número medio de esclerocios en la subparcela que se iba a tratar con *C. minitans* el conteo varió de 0 a 1 esclerocios por 100g de suelo, obteniéndose una media de 0,53 por 100g de suelo. De los esclerocios obtenidos fueron viables el encontrado en la muestra 2.2 de la subparcela sin *C. minitans* y uno de los cuatro esclerocios encontrados en la muestra 7.1 de la subparcela sin *C. minitans*. Ambos esclerocios viables se identificaron como pertenecientes a la especie *S. minor*.

En la parcela 2, el segundo año de estudio (2016, Tabla 4), el número medio de esclerocios varió desde 0 a 1 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela que no iba a ser tratada con *C. minitans* y se obtuvo una media de 0,43 esclerocios por 100g de suelo. Mientras que en la subparcela tratada con *C. minitans* el número medio de esclerocios varió de 0 a 1,33 esclerocios por 100g de suelo, con una media de 0,57 esclerocios por 100g de suelo. De los esclerocios obtenidos fueron viables los esclerocios de *S. sclerotiorum* encontrados en la muestra 1.2 y 6.3 de la subparcela tratada con *C. minitans*.

En la parcela 3, en el primer año de estudio (2015, Tabla 5), el número medio de esclerocios varió desde 0 a 0,33 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela que no iba a tratada con *C. minitans* y se obtuvo una media de 0,13 esclerocios por 100g de suelo. Mientras que en la subparcela tratada con *C. minitans* el número medio de esclerocios varió de 0 a 0,67 esclerocios

por 100g de suelo, con una media de 0,37 esclerocios por 100g de suelo. De los esclerocios obtenidos ninguno germinó en las placas de PDAS, por tanto, se determinó que ninguno era viable.

En la parcela 3, en el año 2016 (Tabla 6) el número medio de esclerocios varió desde 0 a 0,67 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela que no iba a ser tratada con *C. minitans* y se obtuvo una media de 0,27 esclerocios por 100g de suelo. Mientras que en la subparcela tratada con *C. minitans* el número medio de esclerocios varió de 0 a 1,67 esclerocios por 100g de suelo, con una media de 0,40 esclerocios por 100g de suelo. De los esclerocios obtenidos en esta parcela ninguno germinó en las placas de PDAS, por ello, se determinó que ninguno era viable como en el primer año.

Con los datos de las tablas anteriormente mostradas, se realizó un estudio estadístico (ANOVA Simple  $P < 0,05$ ) comparando en cada parcela y año las diferencias entre la subparcela tratada con *C. minitans* y la no tratada con *C. minitans*. Dicho estudio se muestra en la Tabla 7.

En la parcela 1, en el primer año de estudio, la subparcela que no se iba a tratar con *C. minitans* tuvo un valor medio de 0,83 esclerocios por 100g de suelo y la subparcela que se iba a tratar con *C. minitans* después de la toma de muestras de suelo tuvo un valor medio de 0,67 por 100g de suelo esclerocios, ambos valores sin diferencias significativas.

En la parcela 1, en el primer segundo año de estudio, tras el tratamiento con *C. minitans*, la subparcela sin *C. minitans* tenía un valor medio de esclerocios de 0,13 por 100g de suelo y la parcela con *C. minitans* de 0,20 por 100g de suelo, dichos valores tampoco presentaron diferencias significativas.

En la parcela 2, en el primer año de estudio, el valor medio de esclerocios por 100g de suelo en la subparcela sin *C. minitans* y la subparcela que sería tratada con *C. minitans* después de la toma de muestras de suelo, eran de 1,07 y de 0,53, respectivamente. Dichos valores no mostraron diferencias significativas.

En la parcela 2, en el segundo año de estudio, tras el tratamiento con *C. minitans*, la subparcela sin *C. minitans* tenía un valor medio de esclerocios por 100g de suelo de 0,43 y la parcela con *C. minitans* de 0,57, dichos valores tampoco presentaron diferencias significativas.

En la parcela 3, en el primer año de estudio, se obtuvo una media de 0,13 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela sin *C. minitans* y 0,37 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela que sería tratada con *C. minitans*, dichos valores mostraron diferencias significativas.

En la parcela 3, en el segundo año de estudio, tras tratar con *C. minitans* los valores fueron de 0,27 esclerocios por 100g de suelo en la subparcela sin *C. minitans* y 0,40 esclerocios por 100g de suelo en la parcela con *C. minitans*, pero no hubo diferencias significativas entre ambos valores.



Tabla 1: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 1 en el año 2015

Muestra	Sin <i>C. minitans</i>				Con <i>C. minitans</i>			
	Submuestras <sup>a</sup>			Media <sup>b</sup>	Submuestras			Media
	1	2	3		1	2	3	
1	1 <sup>c</sup>	1	1	1,00	0	0	1	0,33
2	2	1	1	1,33	1	1	0	0,67
3	1	2	2	1,67	1	1	0	0,67
4	1	1	1	1,00	0	0	0	0,00
5	1	0	1	0,67	1	1	0	0,67
6	1	1	0	0,67	2	0	1	1,00
7	0	1	1	0,67	3	0	0	1,00
8	1	0	0	0,33	1 <sup>d</sup>	1	0	0,67
9	0	1	0	0,33	1	0	0	0,33
10	1	0	1	0,67	2	2	0	1,33
	<b>Total</b>			<b>0,83</b>	<b>Total</b>			<b>0,67</b>

<sup>a</sup>Cada submuestra es de 100 gr.

<sup>b</sup>Número medio de esclerocios por 100 gr de suelo.

<sup>c</sup>Representan el número de esclerocios obtenidos en total en cada subparcela.

<sup>d</sup>Los números sombreados representan esclerocios viables. El color de los números representan la especie a la que pertenecen. Los números azules representan esclerocios pertenecientes a la especie *S. sclerotiorum* y los esclerocios rojos son los pertenecientes a la especie *S. minor*.

Tabla 2: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 1 en el año 2016

Muestra	Sin <i>C. minitans</i>				Con <i>C. minitans</i>			
	Submuestras <sup>a</sup>			Media <sup>b</sup>	Submuestras			Media
	1	2	3		1	2	3	
1	0 <sup>c</sup>	0	0	0,00	0	0	0	0,00
2	0	1	0	0,33	0	0	0	0,00
3	1 <sup>d</sup>	0	0	0,33	0	1	1	0,67
4	0	0	0	0,00	1	0	0	0,33
5	0	0	1	0,33	0	0	0	0,00
6	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
7	0	0	0	0,00	0	1	0	0,33
8	0	1	0	0,33	1	0	0	0,33
9	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
10	0	0	0	0,00	1	0	0	0,33
	<b>Total</b>			<b>0,13</b>	<b>Total</b>			<b>0,20</b>

<sup>a</sup>Cada submuestra es de 100 gr.

<sup>b</sup>Número medio de esclerocios por 100 gr de suelo.

<sup>c</sup>Representan el número de esclerocios obtenidos en total en cada subparcela.

<sup>d</sup>Los números sombreados representan esclerocios viables. El color de los números representan la especie a la que pertenecen. Los números azules representan esclerocios pertenecientes a la especie *S. sclerotiorum* y los esclerocios rojos son los pertenecientes a la especie *S. minor*.

Tabla 3: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 2 en el año 2015

Muestra	Sin <i>C. minitans</i>				Con <i>C. minitans</i>			
	Submuestras <sup>a</sup>			Media <sup>b</sup>	Submuestras			Media
	1	2	3		1	2	3	
1	0 <sup>c</sup>	1	1	0,67	0	1	1	0,67
2	1	1 <sup>d</sup>	0	0,67	1	0	0	0,33
3	3	1	2	2,00	0	0	2	0,67
4	0	0	1	0,33	1	2	0	1,00
5	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
6	0	2	0	0,67	0	1	1	0,67
7	1/4	2	1	2,33	1	0	0	0,33
8	1	1	1	1,00	0	0	0	0,00
9	1	2	0	1,00	1	0	0	0,33
10	0	2	3	1,67	2	0	1	1,00
	<b>Total</b>			<b>1,07</b>	<b>Total</b>			<b>0,53</b>

<sup>a</sup>Cada submuestra es de 100 gr.

<sup>b</sup>Número medio de esclerocios por 100 gr de suelo.

<sup>c</sup>Representan el número de esclerocios obtenidos en total en cada subparcela.

<sup>d</sup>Los números sombreados representan esclerocios viables. El color de los números representan la especie a la que pertenecen. Los números azules representan esclerocios pertenecientes a la especie *S. sclerotiorum* y los esclerocios rojos son los pertenecientes a la especie *S. minor*.

Tabla 4: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 2 en el año 2016

Muestra	Sin <i>C. minitans</i>				Con <i>C. minitans</i>			
	Submuestras <sup>a</sup>			Media <sup>b</sup>	Submuestras			Media
	1	2	3		1	2	3	
1	0 <sup>c</sup>	1	0	0,33	2	1 <sup>d</sup>	0	1,00
2	0	0	0	0,00	1	1	2	1,33
3	0	1	1	0,67	0	1	0	0,33
4	1	0	1	0,67	1	0	0	0,33
5	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
6	1	1	1	1,00	0	1	2	1,00
7	1	0	1	0,67	0	0	0	0,00
8	0	0	0	0,00	1	1	0	0,67
9	0	1	1	0,67	1	1	0	0,67
10	1	0	0	0,33	0	1	0	0,33
	<b>Total</b>			<b>0,43</b>	<b>Total</b>			<b>0,57</b>

<sup>a</sup>Cada submuestra es de 100 gr.

<sup>b</sup>Número medio de esclerocios por 100 gr de suelo.

<sup>c</sup>Representan el número de esclerocios obtenidos en total en cada subparcela.

<sup>d</sup>Los números sombreados representan esclerocios viables. El color de los números representan la especie a la que pertenecen. Los números azules representan esclerocios pertenecientes a la especie *S. sclerotiorum* y los esclerocios rojos son los pertenecientes a la especie *S. minor*.

Tabla 5: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 3 en el año 2015

Muestra	<i>Sin C. minitans</i>				<i>Con C. minitans</i>			
	Submuestras <sup>a</sup>			Media <sup>b</sup>	Submuestras			Media
	1	2	3		1	2	3	
1	0 <sup>c</sup>	1	0	0,33	0	0	1	0,33
2	1	0	0	0,33	0	0	0	0,00
3	0	0	0	0,00	0	0	2	0,67
4	0	0	0	0,00	0	2	0	0,67
5	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
6	0	0	0	0,00	0	0	1	0,33
7	0	1	0	0,33	0	1	1	0,67
8	0	0	0	0,00	1	0	1	0,67
9	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
10	1	0	0	0,33	0	1	0	0,33
	<b>Total</b>			<b>0,13</b>	<b>Total</b>			<b>0,37</b>

<sup>a</sup>Cada submuestra es de 100 gr.

<sup>b</sup>Número medio de esclerocios por 100 gr de suelo.

<sup>c</sup>Representan el número de esclerocios obtenidos en total en cada subparcela.

Tabla 6: Cuantificación de esclerocios en la Parcela 3 en el año 2016

Muestra	<i>Sin C. minitans</i>				<i>Con C. minitans</i>			
	Submuestras <sup>a</sup>			Media <sup>b</sup>	Submuestras			Media
	1	2	3		1	2	3	
1	0 <sup>c</sup>	1	0	0,33	0	1	0	0,33
2	1	0	1	0,67	0	0	0	0,00
3	0	0	2	0,67	2	2	1	1,67
4	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
5	1	0	0	0,33	1	0	0	0,33
6	0	0	0	0,00	0	0	1	0,33
7	1	1	0	0,67	0	1	0	0,33
8	0	0	0	0,00	0	1	0	0,33
9	0	0	0	0,00	0	0	1	0,33
10	0	0	0	0,00	1	0	0	0,33
	<b>Total</b>			<b>0,27</b>	<b>Total</b>			<b>0,40</b>

<sup>a</sup>Cada submuestra es de 100 gr.

<sup>b</sup>Número medio de esclerocios por 100 gr de suelo.

<sup>c</sup>Representan el número de esclerocios obtenidos en total en cada subparcela.

Tabla 7: Comparación de los valores medios de numero de esclerocios por 100 gr de suelo entre las subparcelas con o sin aplicación *C. minitans* en las parcelas de estudios (1,2 y 3) en los años 2015 y 2016.

Parcela	2015		2016	
	Sin <i>C. minitans</i>	Con <i>C. minitans</i>	Sin <i>C. minitans</i>	Con <i>C. minitans</i>
1	0,83±0,4	0,67±0,4	0,13±0,2	0,20±0,2
2	1,07±0,7	0,53±0,3	0,43±0,35	0,57±0,44
3	0,13±0,17	0,37*±0,29	0,27±0,3	0,40±0,5

\* Diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

En este trabajo se ha puesto a punto una metodología de tamizado húmedo de suelo para la cuantificación de esclerocios de *S. sclerotiorum* y *S. minor* en suelos de cultivo de lechuga. Esta metodología fue descrita anteriormente por Subbarao *et al.* (1994).

La mayoría de los métodos de cuantificación de esclerocios se basan en evaluar una cantidad conocida de suelo naturalmente infestado usando: i) tamizado húmedo, ii) modificaciones de tamizado en húmedo como el tamizado húmedo, seguido por flotación de glicerol, o iii) la adaptación de métodos comúnmente usados para extracción de nematodos. No obstante, Subbarao *et al.* (1994) recomienda usar la metodología del tamizado húmedo porque tiene la ventaja de ser rápida y cómoda.

Esta metodología ya ha sido usada anteriormente en otros trabajos en los que se precisó un estudio del nivel de la población de esclerocios de *Sclerotinia* spp. en suelo, tales como los publicados por Wu *et al.* (2008) y Chitrampalam *et al.* (2010a y b).

Por otro lado, esta metodología presenta ciertas dificultades para la persona que la lleva a cabo. Entre las dificultades que se encontraron durante la realización de este trabajo para poner a punto esta metodología en el laboratorio se puede destacar:

1. La dificultad de distinguir en muchas ocasiones los esclerocios de otras partículas de suelo como piedras, turba o materia orgánica prensada u otras partículas con tamaño y color similares a la de los esclerocios.
2. La dificultad en obtener germinación y cultivos puros de *Sclerotinia* spp. a partir de los esclerocios latentes recogidos del suelo.

Para resolver el primer inconveniente y comprobar si las partículas separadas eran efectivamente esclerocios, en numerosas ocasiones se procedió a observarlas con la lupa y a presionarlas para comprobar la firmeza de las mismas, ya que los esclerocios son masas de hifas apelmazadas rodeadas por una capa de melanina resistente (Chitrampalama y Pryor, 2013). Además, para saber si los esclerocios eran viables, se procedió a desinfectar superficialmente las partículas consideradas esclerocios con lejía doméstica al 25% durante 1 minuto y medio y se lavaron dos veces con agua esterilizada (Chitrampalama y Pryor, 2013), sembrándose individualmente en placas de medio de cultivo PDAS y se incubó a 20°C durante una semana.

Respecto al segundo problema, se encontró que en las partículas seleccionadas como esclerocios crecían en numerosas ocasiones hongos saprofitos porque eran partículas en contacto con el suelo y estaban muy colonizadas a pesar de haberlas desinfectado externamente con lejía. Por ello, la obtención de cultivos puros fue muy difícil.

Por lo tanto, como consecuencia de estos problemas, el número de esclerocios viables frente al número de esclerocios encontrados fue muy bajo y esto dificulta en gran medida la interpretación de los resultados obtenidos.

La relación entre el número de esclerocios viables frente al número de esclerocios totales encontrados se puede observar en la Tabla 8.

Tabla 8: Relación entre el número de esclerocios viables frente al número de esclerocios totales encontrados.

Parcela	2015		2016	
	Sin contans	Con contans	Sin contans	Con contans
1	0/25	2/20	1/4	2/6
2	2/32	0/16	0/13	3/17
3	0/4	0/11	0/8	0/12

Cabe destacar, que cada una de las metodologías utilizada en estudios anteriores tiene sus ventajas y desventajas. Basándonos en los trabajos de Subbarao *et al.* (1994), se decidió que el uso del tamizado húmedo podría proporcionar una gran ventaja a la hora de abordar el trabajo, la rapidez, ya que las identificaciones de los patógenos en el suelo requieren métodos rápidos y eficaces para grandes cantidades y volúmenes de muestra. Consultando otras referencias bibliográficas con relación a la extracción de esclerocios del suelo se observó que en los suelos con mucha materia orgánica esta técnica era menos eficiente debido a la gran cantidad de partículas de del mismo color y en el mismo rango de tamaño de los esclerocios (Abd-Elrazik y Lorbeer, 1980), aunque, en general, éste no era nuestro caso.

En relación a los resultados obtenidos en cada una de las parcelas y años estudiados, los datos finales obtenidos no permiten sacar conclusiones sobre el posible efecto que la aplicación de *C. minitans* haya podido tener en el suelo. Se pudo observar que en la mayoría de las parcelas no hubo diferencias significativas en las subparcelas tratadas. Cabe destacar que solo se encontraron diferencias significativas entre la zona tratada y no tratada en la parcela 3, en el primer año de estudio, momento en el cual todavía no se había realizado el tratamiento con *C. minitans*. Aunque en un primer momento este resultado pueda parecer extraño, se puede considerar como algo normal, debido a que los esclerocios de *S. sclerotiorum* y *S. minor* no se distribuyen uniformemente en el suelo, sino que frecuentemente presentan una distribución agregada (Subbarao, 1998).

Que no se observara una reducción en el número de esclerocios presentes en las parcelas tratadas con *C. minitans* en comparación con las no tratadas puede deberse a varios motivos:

En primer lugar, por una posible aplicación incorrecta del *C. minitans*. Este hongo se comercializa como un preparado fitosanitario granulado dispersable en agua, que contiene esporas de *C. minitans*, que es un hongo hiperparásito activo contra los esclerocios y el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* y *S. minor* en el suelo. *C. minitans* cepa CON/M/91-08 parasita los esclerocios presentes en el suelo. De este modo, el número de esclerocios viables en el suelo disminuye. El hongo ataca a los esclerocios mediante la formación de un micelio filamentosos que destruye dichas estructuras de resistencia. (Bayer Crop Science, 2017). Las recomendaciones de la etiqueta del producto son principalmente realizar el tratamiento antes de la plantación, a 5-15 cm de profundidad y a razón de 4kg/ha. Por ello, cabe la posibilidad de que el producto no fuera efectivo porque el tratamiento se realizó a razón de 2kg/ha, además, es importante la aplicación del mismo con un riego abundante. Por otro lado, también tiene gran importancia las condiciones en las que se utiliza el producto; se debe aplicar preferentemente al atardecer, cuando baja la temperatura y aumenta la humedad. La actividad de *C. minitans* es óptima entre 12 y 25°C (temperatura del suelo) con suelo húmedo. Por debajo de 0°C o por encima de 27°C su actividad se detiene. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, *C. minitans* retoma su actividad. Sin embargo, no sabemos con certeza si los tratamientos en campo fueron realizados ajustándose al máximo las recomendaciones de uso.

Otro aspecto muy importante es la posibilidad de que un año de estudio no sea suficiente para comprobar el efecto del tratamiento con *C. minitans* en la reducción de esclerocios en el suelo. De hecho, Chitrampalam *et al.* (2010b) realizó un experimento de tres años de duración para determinar la eficacia de *C. minitans* en la pudrición blanca de la lechuga provocada por *Sclerotinia* spp. frente a fungicida registrado con las materias activas Pyraclostrobin y Epoxiconazole. Todas las pruebas demostraron que el número de esclerocios disminuía significativamente al pasar los tres ciclos de cultivo con la utilización de *C. minitans* frente a dicho fungicida. Otros estudios, sin embargo, han demostrado que la realización del tratamiento durante un ciclo de cultivo puede ser efectiva. Chitrampalam *et al.* (2010a) realizaron experimentos con una sola aplicación de *C. minitans* al momento de la siembra que redujeron significativamente la incidencia de la podredumbre blanca en todos los tipos de lechuga incluso bajo una alta presión de la enfermedad. Además, no hubo diferencias significativas entre las dosis de aplicación recomendadas y más altas (4.4 kg/ha) con el agente de biocontrol *C. minitans* o entre una o dos aplicaciones del producto, las cuales se realizaban después del aclareo aproximadamente 4 semanas después de la siembra.

## 5. Conclusión

---

- En los suelos de las tres parcelas de lechuga estudiadas en los que se aplicó el agente de biocontrol *Coniothyrium minitans*, no se encontraron diferencias significativas en el número de esclerocios por 100 gramos de suelo entre las subparcelas tratadas y no tratadas una vez transcurrido un año desde el momento de la aplicación.

## 6. Bibliografía

---

Abd-Elrazik, A. A. y Lorbeer, J. W., 1980. *Rapid separation of Sclerotinia minor sclerotia from artificially and naturally infested organic soil*, Ithaca: Department of Plant Pathology, New York State College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University. *Phytopathology* 70: 892-894.

Bayer Crop Science, E., 2017. *Bayer Crop Science España*. [En línea] Available at: <http://www.cropscience.bayer.es/Productos/Fungicidas/Contans-WG.aspx> [Último acceso: 11 octubre 2017].

Chitrapalama, P. y Pryor, B. M., 2013. *Population density and spatial pattern of sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum in desert lettuce production fields*, Arizona: University of Arizona, Department of Plant Sciences, Division of Plant Pathology and Microbiology. *Canadian Journal of Plant Pathology*, DOI: 10.1080/07060661.2013.841758.

Chitrapalam, P., Turini, T. A., Matheron, M. E. y Pryor, B. M., 2010a. *Effect of Sclerotium Density and Irrigation on Disease Incidence and on Efficacy of Coniothyrium minitans in Suppressing Lettuce Drop Caused by Sclerotinia sclerotiorum*, Tucson: Division of Plant Pathology and Microbiology, Department of Plant Sciences, University of Arizona. *Plant Dis.* 94:1118-1124..

Chitrapalam, P., Wu, B. M., Koike, S. T. y Subbarao, K. V., 2010b. *Interactions Between Coniothyrium minitans and Sclerotinia minor Affect Biocontrol Efficacy of C. minitans*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California. *Phytopathology* 101:358-366..

Dominique, B., Hervè, L. y Brigitte, M., 2005. *Enfermedades de las lechugas. Identificar, conocer, controlar*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 375 pp.

FAO, 2014. *FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/faostat/es/#compare> [Último acceso: 24 abril 2017].

García Morató, M., 1995. *Plagas, enfermedades y fisiopatías del cultivo de la lechuga en la comunidad valenciana*. Conselleria D'Agricultura, Pesca I Alimentació ed. Valencia: Generalitat Valenciana. 185 pp.

Hao, J. J. y Subbarao, K. V., 2006. *Dynamics of Lettuce Drop Incidence and Sclerotinia minor Inoculum Under Varied Crop Rotations*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California. *Plant Dis.* 90:269-278.

Imolehin, E. D., Grogan, R. G. y Duniway, J. M., 1980. *Effect of Temperature and Moisture Tension on Growth, Sclerotial Production, Germination and Infection by Sclerotinia minor*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California. *Phytopathology* 70:1153-1157.

Jones, E., Rabeendran, N. y Stewart, A., 2014. *Biocontrol of Sclerotinia sclerotiorum infection of cabbage by Coniothyrium minitans and Trichoderma spp.*, Lincoln, New Zealand: Agriculture and Life Sciences Faculty and Bio-Protection Centre, Lincoln University. *Biocontrol Science and Technology*, 24:12, 1363-1382.

Maroto Borrego, J. V., 2014. *Historia de la Agronomía*, Madrid: Mundi-Prensa. 444 pp.

Maroto Borrego, J. V. y Baixauli Soria, C., 2016. *Cultivos hortícolas al aire libre*, Madrid. : Cajamar Caja Rural. 788 pp.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2016. *Anuario de Estadística. Avance 2015*, Madrid: Gobierno de España.



- Patterson, C. L. y Grogan, R. G., 1985. *Differences in Epidemiology and Control of Lettuce Drop Caused by Sclerotinia minor and Sclerotinia sclerotiorum*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California. *Plant Disease* 69:766-770.
- Subbarao, K. V., 1998. *Progress Toward Integrated Management of Lettuce Drop*, University of California, Davis: Department of Plant Pathology. The American Phytopathological Society, Volume 82, Number 10, Pages 1.068-1.078 .
- Subbarao, K. V., Dacuyan, S., Koike, S. T. y Jackson, L. E., 1994. *Evaluation of Three Quantitative Assays for Sclerotinia minor*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California. *Phytopathology* 84: 1471-1475.
- Swaminathan, J., Pay, K. L. M. J. M. y Stewart, A., 1999. *Soil solarisation: A cultural practice to reduce viability of sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum in New Zealand soils*, Canterbury, New Zealand: Lincoln University. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. Vol. 27: 331-335.
- Vannacci, G., Triolo, E. y Materazzi, A., 1988. *Survival of Sclerotinia minor Jagger sclerotia in solarized soil*, Italy: Dipartimento Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose, Sezione Patologia Vegetale, Universitgt di Pisa. *Plant and Soil* 109, 49-55..
- Wu, B. M. y Subbarao, K. V., 2006. *Analyses of Lettuce Drop Incidence and Population Structure of Sclerotinia sclerotiorum and S. minor*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California. *Phytopathology* 96:1322-1329.
- Wu, B. M., Subbarao, K. V. y Liu, Y.-B., 2008. *Comparative Survival of Sclerotia of Sclerotinia minor and S. sclerotiorum*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California and USDA-ARS, U.S. Agricultural Research Station. *Phytopathology*.
- Wu, B. y Subbarao, K. V., 2003. *Effects of Irrigation and Tillage on Temporal and Spatial Dynamics of Sclerotinia minor Sclerotia and Lettuce Drop Incidence*, Davis: Department of Plant Pathology, University of California. *Phytopathology* 98:1144-1152.
- Zeng, W., Wang, D., Kirk, W. y Hao, J., 2012. *Use of Coniothyrium minitans and other microorganisms for reducing Sclerotinia sclerotiorum*, East Lansing, Michigan: Department of Plant Pathology, Michigan State University. *Biological Control*, Volume 60, Issue 2, Pages 225-232.