



..
Maestría en Ciencias Agrícolas

Mención: Sistemas Agroecológicos y Sostenibles de Producción

Tesis presentada en opción al título de Máster en Ciencias Agrícolas

Título:

Efecto de los fungicidas Celest-top, *Trichoderma* y TMTD en la protección de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Autor: Ing. Yaidalys Martínez Suris

Tutor: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Enildo Abreu Cruz

Matanzas, 2021



**"UNIVERSIDAD DE MATANZAS"
SEDE "CAMILO CIENFUEGOS"
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



Maestría en Ciencias Agrícolas

Mención: Sistemas Agroecológicos y Sostenibles de Producción

Tesis presentada en opción al título de Máster en Ciencias Agrícolas

Título:

Efecto de los fungicidas Celest-top, *Trichoderma* y TMTD en la protección de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Autor: Ing. Yaidalys Martínez Suris

Tutor: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Enildo Abreu Cruz

Matanzas, 2021

Pensamiento

En la ciencia no existen calzadas reales, y quien aspire a remontar sus luminosas cumbres; ha de estar dispuesto a escalar la montaña por senderos escabrosos.

Karl Marx.

Agradecimientos

A mis tutores, por permitirme ser parte de su vida y poder aprender tantas cosas en mi vida profesional.

A mis compañeros de trabajo, Pavel Bacallao, Ibelkis Reyes, Xiomelis González por ayudarme de manera incondicional en la investigación, al igual que los compañeros del Laboratorio de Sanidad vegetal, Marialys y Yudit.

A todos mis familiares y amigos, que de una u otra forma contribuyeron a la realización del presente trabajo.

*A todos, **GRACIAS!***

Dedicatoria

A Dios, por permitirme cumplir este gran logro en mi vida, gracias señor por ser misericordioso y darme fuerzas en los momentos tan difíciles que enfrenté en el camino, gracias.

A mi princesa Carolina, mi razón de ser.

A mi madre, Maritza Suris Peraza, por ser el gran amor de mi vida, por empujarme a seguir adelante con mis estudios, por enseñarme a enfrentar las dificultades de la vida, y por ser quien soy.

A mi compañero de vida, Fabiel Padrón, por ser tan comprensivo, dedicado, por darme ánimo y fuerza para concluir la investigación.

GRACIAS!

Resumen

El tratamiento actual de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) con diferentes fungicidas químicos no asegura la total desinfección de las mismas, debido a que se presentan problemas de resistencia microbiana a estos productos. De ahí que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes productos químicos y biológicos en el control de fitopatógenos y en la respuesta fisiológica de las semillas de frijol. Para ello se realizó la evaluación *in vitro* del efecto de *Trichoderma* Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD, en el control de hongos fitopatógenos en las semillas de frijol, la determinación del efecto de estos productos en la respuesta fisiológica de estas en condiciones semicontroladas y por último, se realizó el cálculo de los indicadores económicos con el uso de estos fungicidas en el tratamiento de las semillas. Se demostró que de todos los tratamientos el Celest top 312 FS provocó mayor inhibición micelial en todos los hongos a excepción de *Sclerotium rolfsii*. A partir del análisis integrado del efecto de cada uno de los productos en los indicadores que se evaluaron se concluyó que CELEST TOP fue el fungicida con mejores resultados, ya que tuvo mayor efecto en la germinación de la semilla, en la longitud del hipocótilo, la raíz y las plántulas, el peso fresco y seco y por otra parte presentó una alta actividad antifúngica, al inhibir el desarrollo de *Fusarium* spp., *Macrophomina* spp. y *Rhizoctonia* spp.

Índice	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
I.1 Importancia del cultivo del frijol en la alimentación	6
I.2 El cultivo de frijol en el mundo	7
I.2.1 El cultivo de frijol en Cuba	7
I.3 Generalidades del cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8
I.3.1 Caracterización botánica y etapa de desarrollo de la planta del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8
• Características morfológicas del frijol	9
I.3.2 Variedades comerciales del cultivo de frijol en Cuba	11
I.3.3 Exigencias edafoclimáticas para la producción de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>, L.)	12
• Exigencias edáficas	12
• Exigencias nutricionales	13
• Exigencias hídricas	13
• Requerimientos climáticos	14
I.4 Técnicas de recolección y almacenamiento	14
• Requisitos para realizar la recolección	14
• Almacenamiento	15
I.5 Precisiones de calidad para la producción de semillas de frijol	15
• Semilla	15
Calidad de la semilla	15
I.6 Origen de la contaminación fúngica de las semillas	16
• Presencia de hongos en el suelo	16
• Presencia de hongos en almacén	18
I.7 Tratamiento de las semillas frente a hongos fitopatógenos	18
• Fungicidas	19
• Tratamientos físicos	19
• Tratamiento con bioplaguicidas: extractos de plantas, compuestos naturales y agentes biocontroladores	20

I.8 Caracterización de los productos utilizados en el estudio.....	20
Celest top 312 FS	20
• TMTD 80 % PH (Tetrametil Tiuram Disulfuro).....	21
• <i>Trichoderma</i> spp.	22
• Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.....	24
I.9 Técnicas de análisis de calidad de la semilla	25
• Prueba de germinación.....	26
• Evaluación de plántulas	27
• Prueba de vigor	27
• Prueba para determinar la contaminación por hongos	28
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
II.1 Material vegetal utilizado en el experimento.....	29
II.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antimicrobiano de <i>Trichoderma</i> Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80 % sobre hongos fitopatógenos de <i>Phaseolus</i>	29
II.3 Evaluación del efecto de <i>Trichoderma</i> Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80 % en el control o prevención del desarrollo de hongos fitopatógenos en semillas de <i>Phaseolus</i> en condiciones controladas.....	30
II.4 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de <i>Trichoderma</i> Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80% en los parámetros fisiológicos durante el crecimiento de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	33
II.5 Procesamiento estadístico de los datos	34
II.6 Valoración económica y ambiental.....	35
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
III.1 Efecto <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80 % sobre hongos fitopatógenos de <i>Phaseolus</i> spp.....	36
III.2 Efecto <i>in vitro</i> de diferentes antifúngicos en el control o prevención del desarrollo de hongos fitopatógenos en semillas de <i>Phaseolus</i> bajo condiciones controladas.....	42
III.3 Efecto <i>in vitro</i> de diferentes antifúngicos en indicadores fisiológicos de <i>Phaseolus vulgaris</i> durante la primera etapa del desarrollo vegetativo.....	44
III.5 Análisis económico	56
III.6 Análisis ambiental.....	58
CONCLUSIONES	62

RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Superficie cosechada (ha) y producción agrícola (t) en los últimos años en Cuba.	8
Tabla 2	Características de las principales variedades comerciales.	11
Tabla 3	Patógenos fungosos asociados a semillas de frijol	17
Tabla 4	Porcentaje de incidencia (%) de diferentes hongos fitopatógenos con la aplicación de antifúngicos.	42
Tabla 5	Efecto de diferentes antifúngicos en el porcentaje de germinación (%).	49
Tabla 6	Ganancias obtenidas en el cultivo de frijol negro Triunfo-70.	56
Tabla 7	Gastos de aplicación de los productos.	56
Tabla 8	Resultados económicos del tratamiento de semillas con los diferentes fungicidas a escala de laboratorio.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Morfología de la planta de frijol	9
Figura 2	Hábitos de crecimiento del frijol (<i>P. vulgaris</i> L.)	10
Figura 3	Etapas de desarrollo fenológico del frijol	10
Figura 4	Estructura química de los componentes del Celest-top	21
Figura 5	Estructura molecular del Thiram	22
Figura 6	Observación de <i>Trichoderma</i> spp	25
Figura 7	Diagrama de flujo para el diagnóstico de hongos	32
Figura 8	Efecto antimicrobiano de los diferentes productos frente a hongos fitopatógenos de <i>Phaseolus vulgaris</i> (<i>Fusarium</i> spp. y <i>Sclerotium rolfsii</i>)	37
Figura 9	Efecto antimicrobiano de los diferentes productos frente a hongos fitopatógenos de <i>Phaseolus vulgaris</i> (<i>Macrophomina phaseolina</i> . y <i>Rhizoctonia solani</i>)	38
Figura 10	Efecto de diferentes antifúngicos en el porcentaje de germinación de la semilla	45
Figura 11	Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud del hipocótilo	46
Figura 12	Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud de la raíz (<i>in vitro</i>)	47
Figura 13	Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud de la plántula	51
Figura 14	Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud de la raíz (<i>in vivo</i>)	52
Figura 15	Efecto de diferentes antifúngicos en el peso fresco de las plántulas	54
Figura 16	Efecto de diferentes antifúngicos en el peso seco de las plántulas	55

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

a.i.	Ingrediente activo
Aapresid	Asociación Argentina de productores en siembras directas
ANOVA	Análisis de varianza
CCB	Cámara de Comercio de Bogotá
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
cm	Centímetro
CNSV	Centro Nacional de Sanidad Vegetal
d	Días
DE	Desviación estándar
EE	Error estándar
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
FS	Fluido soluble
g	Gramo
h	Hora
ha	Hectárea
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola
IICA	Instituto de Investigaciones de Ciencias Agrícolas
INIFAT	Instituto de investigaciones fundamentales en Agricultura Tropical
INISAV	Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal
ISO	Organización Internacional de Normalización
kg	Kilogramo
L	Litro
LCCV	Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal
m ³ ha ⁻¹	Metros cubico por hectárea
mg	Miligramo
MINAG	Ministerio de la Agricultura

MIP	Manejo integrado de plagas
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NC	Norma cubana
NRAG	Norma ramal de la Agricultura
°C	Grados Celsius
ONEI	Oficina Nacional de Estadística e Información
PC	Producto comercial
PESEM-	Plan estratégico sectorial multianual del Ministerio de la
MINAGRI	Agricultura
PH	Polvo húmedo
PK	Proteína kinasa
r	Coeficiente de correlación
sp.	Especie
spp.	Especies
t	Tonelada métrica
TAM	Toxicidades agudas en mamíferos
TMTD	Tetrametil Tiuram Disulfuro
UEB	Unidad Empresarial de Base

Introducción

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) durante el período 2010-2016, registró una tasa media anual de crecimiento de 1,42 %, lo que significó un aumento de 2170 millones de toneladas en ese período (FAO, 2018). En Cuba, el frijol, junto con el arroz y las viandas, constituye un alimento de preferencia en la dieta cotidiana; y es, por demás, uno de los elementos proteicos básicos que la conforman. Por tal motivo, es importante asegurar el cumplimiento de los programas de producción de frijol en el país (Pacheco *et al.*, 2016).

Una disminución importante de la cantidad de frijol planificado para producir en el plan del 2020 se informó por autoridades del Ministerio de Agricultura de Cuba. El recrudecimiento de la agresión estadounidense provocó el encarecimiento de productos básicos para la siembra, pues ahora se debe recurrir a mercados lejanos para obtenerlos, el déficit de plaguicidas y las limitaciones con el combustible para las labores de preparación de tierra, siembra, atenciones culturales y cosecha. Para este año se fijó la siembra de 22 mil hectáreas del grano (de 47 mil 100 planificadas al inicio de la campaña de frío) y la entrega de 25 mil 300 toneladas con destino al balance de alimento de la población (de 54 mil 550 toneladas planificadas a entregar inicialmente), por lo que el país deberá invertir en el exterior para la compra de este alimento y garantizar la canasta básica (Granma, 2020).

El Ministerio de la Agricultura debe garantizar producciones de frijol para un adecuado nivel de autoabastecimiento, que disminuya las importaciones y los gastos en divisas por este concepto. Un factor que incide en los bajos rendimientos y los altos costos de producción es la elevada incidencia de organismos nocivos, que se convierten con frecuencia en plagas (Blanco y Leyva, 2013).

La persistencia de varios hongos fitopatógenos tales como *Fusarium* spp., *Sclerotium* spp., *Rhizoctonia solani* y otros, se incrementa con los años debido a los cambios que se presentan en las prácticas agrícolas y al uso indiscriminado de los productos químicos, los que provocan contaminación con efectos perjudiciales, no solo hacia el cultivo de importancia económica, sino sobre los organismos patógenos, ya que

desarrollan resistencia a estos productos en correspondencia a las estrategias aplicadas durante años (Cid *et al.*, 2014).

En la actualidad, el control de enfermedades se realiza mediante el uso de fungicidas y fumigantes, que se caracterizan por una elevada eficacia y por una gran rapidez en el control, pero también por ser tóxicos inespecíficos que eliminan junto con los organismos fitopatógenos, otros organismos benéficos, y si se usan en forma indiscriminada provocan fungoresistencia, toxicidad y contaminación ambiental (Gómez *et al.*, 2013).

El uso de plaguicidas contribuye enormemente al incremento del rendimiento de los cultivos y a la obtención de productos de mejor calidad (Popp *et al.*, 2013). Sin embargo, el empleo de estos productos es hoy altamente cuestionado ya que, si bien al aplicar un plaguicida, lo único que se busca es disminuir la población plaga objetivo, al mismo tiempo se producen otros efectos. Entre ellos se mencionan, el desarrollo de resistencia a los plaguicidas por parte de los microorganismos, la intoxicación y muerte de otras especies y la contaminación de suelos, aire y cuerpos de agua, ya sea con los productos utilizados, como con sus metabolitos (Aparicio *et al.*, 2015).

El tratamiento de semillas es una de las medidas preventivas milenarias, utilizadas por el hombre para reducir las afectaciones causadas por agentes fitopatógenos. Esta práctica, en su sentido más amplio, corresponde a la aplicación de agentes físicos, químicos y biológicos para la desinfección de las semillas, además de mejorar la germinación y el crecimiento de los cultivos (Ojeda, 2014; Rojas, 2016).

Cuando los pesticidas se aplican en las propias semillas que se siembran, antes de que se pueda saber si realmente sería necesario usar o no un pesticida, es evidente que se vulnera cualquier criterio razonable de gestión integrada de plagas. Se trata además de prácticas de uso meramente “preventivo” de plaguicidas que claramente suponen una liberación absolutamente innecesaria de grandes cantidades de veneno en el medio ambiente y que, además de sus graves efectos ecológicos podrían también tener consecuencias sanitarias (Prada, 2017).

Desde una visión más amplia, los efectos de la aplicación de plaguicidas alcanzan a los seres humanos involucrados en su producción, manipuleo y transporte, a aquellos relacionados con la aplicación propiamente dicha, limpieza de equipos y disposición de los envases vacíos y, finalmente, a los consumidores no solo a través de los alimentos tratados que puedan contener residuos, sino también por tener contacto con los plaguicidas en aguas, aire o suelos contaminados. Si, además, la aplicación no se hace de la manera correcta, los efectos nocivos se incrementan, deriva en la intoxicación de personas por aplicación directa, lo cual se suma a que frecuentemente se hacen más aplicaciones de las necesarias y también en dosis también mayores a las necesarias (Sarandón *et al.*, 2015).

Una vez que ingresa al suelo, el plaguicida se reparte en las fases sólida, líquida y gaseosa: en la fase líquida se dispone para transformarse o degradarse química, física o microbiológicamente a otros compuestos; o puede transportarse por el agua hacia horizontes más profundos y finalmente llegar al agua subterránea; en la fase sólida se retiene con diferente fuerza en lugares de enlace de los coloides orgánicos (materia orgánica) e inorgánicos (arcillas) del suelo (Aparicio *et al.*, 2015).

Si se consulta el Registro de Productos Fitosanitarios, se aprecia que hay multitud de fungicidas e insecticidas autorizados para usarse en las semillas (procloraz, tebuconazol, imazalil, imidacloprid, fludioxonil, maneb, metalaxil, clotianidina, tiacloprid, etc.). El empleo de estos plaguicidas obedece a diversas razones, entre ellas, evitar que las semillas se contaminen con hongos u otros organismos del suelo o, como sucede con algunos insecticidas sistémicos que comienzan a funcionar cuando esas semillas se recubren con ellos y germinan, el veneno se absorbe por las raíces y se extiende por todo el interior del vegetal, a fin de combatir los posibles insectos plaga en el primer periodo vegetativo de la planta (Prada, 2017).

Hoy en Cuba se emplean tecnologías muy eficaces en el “tratamiento a las semillas” con la utilización de insecticidas o fungicidas que se impregnan en los granos para protegerla de hongos, bacterias o insectos nocivos que afectan a la semilla o plántula en su primer estadio de vida. Existen diferentes productos destinados a esta actividad

y en la UEB Semillas Matanzas se utilizan productos como Celes top 312 FS y Gaucho MT 390 FS en la protección del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

En esta empresa se detectó durante varias campañas, que aún después de realizar la aplicación de los productos, las semillas mantienen la presencia de hongos fitopatógenos, además de ser productos costosos para el país; por estas razones se sugiere por varios autores (Ramírez, 2014; Ortega *et al.*, 2016; Cabrera *et al.*, 2017) la utilización de organismos antagonistas de los agentes infecciosos, debido a que ellos desplazan a estos de manera natural, son amigables con el medioambiente y tienen bajos costos.

Ricci y Kahan (2005) consideran que en la actualidad el control biológico de las enfermedades de plantas toma una trascendental importancia. Esto es debido a que las problemáticas del control químico (efectos sobre la salud de aplicadores y consumidores; contaminación de los recursos ambientales como agua, suelo y atmósfera; generación de poblaciones de patógenos resistentes a los principios activos utilizados y falta de un control eficiente) trasciende al ámbito de la producción. Existen además fuertes presiones sociales que exigen la racionalización del uso del control químico y en respuesta a esto, se limita el uso de plaguicidas y se desarrollan programas de manejo integrado de las enfermedades en los que se da prioridad al uso de métodos de control no contaminantes.

Es así como se considera la alternativa de emplear cepas del género *Trichoderma* en el control de estos fitopatógenos y optimizar las aplicaciones de fungicidas químicos, para el desarrollo de una agricultura ecológica y sostenible. La producción de xilanasas y celulasas por *Trichoderma* se relaciona en muchos casos con la síntesis de etileno en las plantas, hormonas implicadas en la respuesta sistémica. La acción de estas enzimas sobre la pared celular de los hongos circundantes puede dar lugar a la liberación de moléculas que sirven como inductores del sistema de defensa vegetal (Valdés, 2014).

Problema

El tratamiento actual de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) con diferentes fungicidas químicos no asegura la total desinfección de las mismas, debido a que se presentan problemas de resistencia microbiana a estos productos. Por otra parte, existen dificultades con la germinación y vigor de las semillas, además de los altos precios de estos compuestos en el mercado internacional.

Hipótesis

La evaluación del efecto fungicida de diferentes productos químicos y biológicos en semillas de frijol permitirá definir el producto más efectivo en el control de fitopatógenos y la estimulación fisiológica de las plántulas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes productos químicos y biológicos en el control de fitopatógenos y en la respuesta fisiológica de semillas de frijol.

Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el efecto de diferentes productos químicos y biológicos para el control de hongos fitopatógenos en semillas de frijol.
2. Determinar el efecto de diferentes productos químicos y biológicos en la respuesta fisiológica de semillas de frijol en condiciones semicontroladas.
3. Calcular los indicadores económicos con el empleo de los fungicidas en el tratamiento de semillas de frijol.

Capítulo I. Revisión bibliográfica

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Importancia del cultivo del frijol en la alimentación

El frijol común destaca por su importancia socioeconómica y por la superficie destinada para la siembra y la producción en grano. Existen otros factores que hacen que el frijol tenga un lugar preferencial, uno de los cuales es su composición nutricional; de hecho, es una fuente rica de proteínas y minerales, como el zinc y el hierro. La semilla contiene entre 20% y 25% de proteína, sobresaliendo por su abundancia la faseolina, que posee un alto contenido de aminoácidos esenciales tales como la lisina y el triptófano, y que hay en el frijol en mayor cantidad que en los cereales. La lisina, por ejemplo, se utiliza para la producción de carnitina, que interviene en el transporte de los ácidos grasos a las células musculares y produce energía.

Entre los alimentos de origen vegetal, las leguminosas son importantes debido al alto porcentaje de proteína contenido en sus semillas; el frijol puede variar desde 16 hasta 33%, porcentaje que supera a los cereales (Castellanos *et al.*, 1994; Quesada, 2015).

Las leguminosas, además de complementar el valor nutricional de los cereales mediante el balance de aminoácidos, elevan la ingesta proteica en la dieta y es una fuente importante de calorías, hierro (una tasa de frijol proporciona cerca de 50 y 25% de las recomendaciones diarias de hierro), fibra, vitaminas del complejo B tiamina, piridoxina, niacina y ácido fólico y minerales, de 2% de lípidos insaturados libres de colesterol (La Bell, 1989).

El frijol representa una fuente importante de proteína vegetal, en aquellos estratos sociales en los que la proteína animal no puede formar parte de la dieta cotidiana; además, se reportan importantes beneficios en el consumo de esta leguminosa en la dieta, entre los que se incluye la reducción de los niveles de colesterol sanguíneo, auxiliar en el metabolismo de pacientes diabéticos, al lograr reducir los incrementos en los niveles de glucosa sanguínea y en la prevención de algunos tipos de cáncer, además de ser una fuente de proteína baja en colesterol y grasa (Pérez, 1999).

I.2 El cultivo de frijol en el mundo

En siete países se concentra el 63% de la cosecha mundial de la leguminosa: India, Myanmar, Brasil, Estados Unidos, México, China y Tanzania. El comercio de frijol en el mercado internacional es menor que otros productos agrícolas; en general, los principales productores se destacan también como importantes consumidores (FIRA, 2016).

A escala mundial el consumo de frijol, al igual que la producción, muestra una alta concentración. Los primeros cinco países consumidores participan en conjunto con el 57,7% del consumo mundial: India con 24,7%, Brasil con 19,0%, Estados Unidos con 5,5%, México con 5,3% y Tanzania con 3,3% (MINAG, 2017).

I.2.1 El cultivo de frijol en Cuba

El cultivo del frijol en Cuba ha sido durante muchos años una práctica común del campesinado, cuya producción está encaminada a satisfacer las necesidades del país. Actualmente la producción es insuficiente como resultado de la elevación del nivel de vida de la población. Durante varios años la producción de frijoles ha estado limitada a la pequeña producción del agricultor privado, por lo que el Estado ha tenido que invertir grandes cantidades de divisas en la importación de este popular alimento para el consumo de la población (Expósito y García, 2011).

La necesidad de lograr el autoabastecimiento de granos y en específico del frijol hace indispensable que se amplíe y diversifique su cultivo de forma tal que aumenten rápidamente sus niveles de producción (Mireles, 2014).

La producción nacional, alcanza solo el tres por ciento de las necesidades del consumo, según estadísticas de venta al estado, por lo que es necesario, importar alrededor de 110000 t por año (85% del consumo nacional). Basados en estos principios, actualmente en las principales regiones productoras de frijol en Cuba, las distancias de siembras, cada vez más juntas en un surco convencional (0,45 a 0,50 m) y otras distancias inadecuadas, que promueven bajos rendimientos del grano, porque causan una mayor competencia de las plantas por los nutrientes, la humedad y la luz (Calero *et al.*, 2017)

En la tabla 1. se expone la superficie cosechada (ha) y producción agrícola (t) en los últimos años en Cuba según ONEI (2016, 2017, 2018).

Tabla 1. Superficie cosechada (ha) y producción de frijol (t) en los últimos años en Cuba.

Año	Superficie Cosechada (ha)			Producción (t)			Rend. (t/ha)
	Total (ha)	Sector estatal	Sector no estatal	Total (t)	Sector estatal	Sector no estatal	
2011	123 914	7082	116 832	133 000	4485	128 515	1,07
2012	123 434	5760	117 674	127 100	4435	122 665	1,03
2013	119 775	6509	113 266	129 800	5207	124 593	1,08
2014	129 911	6564	123 347	135 545	9505	126 040	1,04
2015	98 712	8771	89 941	117 556	10 526	107 030	1,19
2016	122 545	4792	117 753	136 570	6345	130 225	1,11
2017	118 410	13 529	104 881	132 174	16 184	115 990	1,12
2018	147 560	15 333	132 227	161 513	16 811	144 702	1,09

Rend. Rendimiento

En Cuba se siembran como promedio 87 000 ha anuales para su consumo seco, con un rendimiento medio de 0,86 ton/ha. El cual se encuentra por encima del promedio mundial que es de 0,83 ton/ha (MINAG, 2017).

I.3 Generalidades del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

I.3.1 Caracterización botánica y etapa de desarrollo de la planta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El cultivo de frijol se clasifica según su taxonomía en: Reino: Plantae, Subreino: Tracheobionta, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliosida, Subclase: Rosidae, Orden: Fabales, Familia: Fabaceae, Género: *Phaseolus*, Especie: *Phaseolus vulgaris* L. (Valladares, 2010; CCB 2015; Ramos y Sánchez, 2018).

Según el Manual Técnico Agrícola (2010), desde el punto de vista taxonómico el frijol es el prototipo del genero *Phaseolus*. Su nombre científico completo fue designado por Lineo en 1753 como *Phaseolus vulgaris* L. El género *Phaseolus* pertenece a la tribu *Phaseolae*, Subtribu *Phaseolinae* de la Familia *Leguminosae* y Subfamilia *Papilionoidae* dentro del orden *Rosales*. El género *Phaseolus* incluye aproximadamente 35 especies, de las cuales cuatro se cultivan. Las cuatro especies dentro del género *Phaseolus* que se cultivan son: *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *Latifolius* Freeman.

- **Características morfológicas del frijol**

Rodríguez (2017) describe el cultivo como una planta anual herbácea, que se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas. El sistema radical es superficial, ya que el mayor volumen de raíces se encuentra en los primeros 20 cm de profundidad del suelo, el tallo se considera el eje central de la planta, es herbáceo y cilíndrico, y se compone de una sucesión de nudos y entre nudos. En el momento de la germinación, el tallo se origina directamente del meristemo apical del embrión de la semilla. Las hojas pueden ser simples o compuestas y se desarrollan en los nudos del tallo y de las ramas. El frijol posee una flor típica papilionácea, y en su desarrollo se distinguen dos estados, el botón floral y la flor completamente abierta. Dado que se trata de una leguminosa, su fruto es una vaina que proviene de un ovario comprimido. En la figura 1 se presentan las características morfológicas del frijol.



Figura 1. Morfología de la planta de frijol (Tomado de Arias *et al.*, 2010).

Según Guerra *et al.* (2013), las plantas pertenecientes a la especie se caracterizan por tener diferentes hábitos de crecimiento, que van desde plantas muy compactas (tipo I) hasta muy ramificadas (tipos III y IV), en la figura 2 se presentan los hábitos de crecimiento del cultivo del frijol.

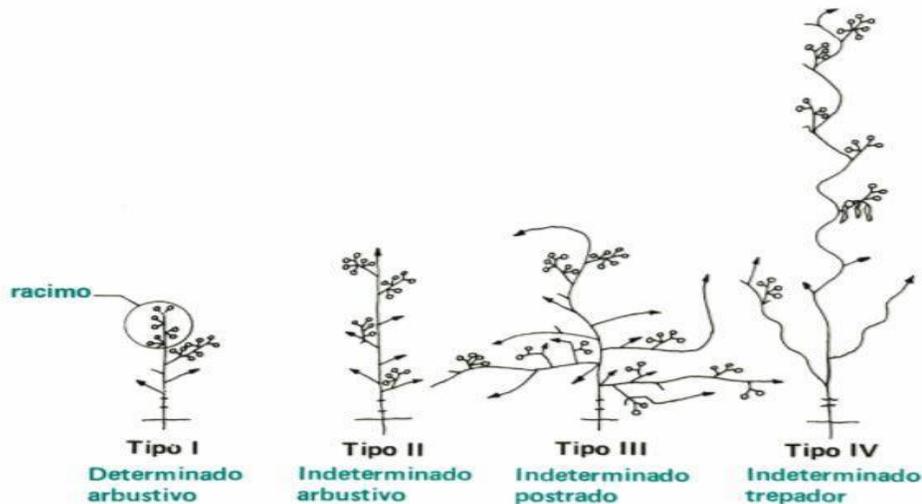


Figura 2. Hábitos de crecimiento del frijol (*P. vulgaris* L.) (Tomado por López y Garzón, 2015).

El desarrollo de la planta del frijol, comprende de manera general dos fases sucesivas, la fase vegetativa y la fase reproductiva, a lo largo de estas fases se han identificado 10 etapas de desarrollo definidas por CIAT desde 1981, las cuales se presentan en la figura 3.

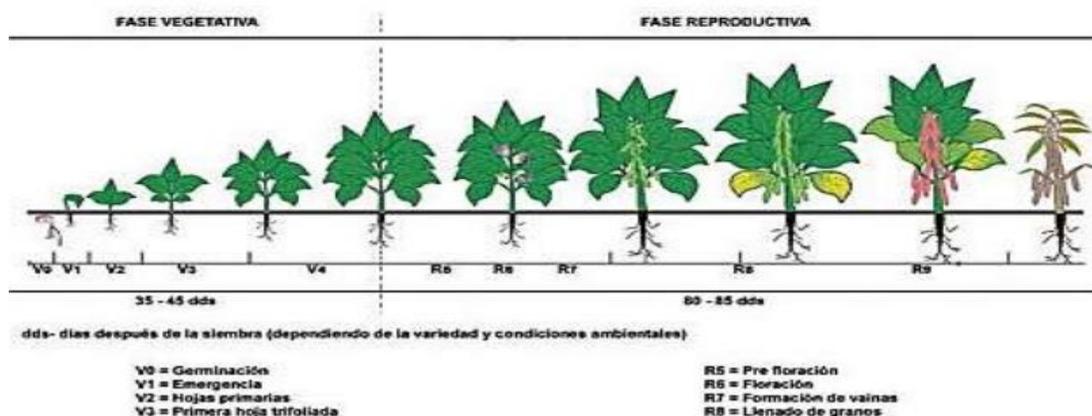


Figura 3. Etapas de desarrollo fenológico del frijol (Tomado de IICA, 2019).

I.3.2 Variedades comerciales del cultivo de frijol en Cuba

En Cuba se dispone de 38 cultivares mejorados de frijol común, registrados en el Listado Oficial de Variedades Comerciales (MINAG, 2018), pero se produce semilla certificada en cantidades muy inferiores a la demanda, lo que causa que la mayoría de los agricultores no dispongan de acceso a estas semillas.

En estas especies son numerosas las variedades comerciales según Faure *et al.*, (2013), se especifican en la tabla 2., donde se puede apreciar datos importantes de la variedad: color, hábito de crecimiento, período de floración, madurez fisiológica y de cosecha.

Tabla 2. Características de las principales variedades comerciales según Faure *et al.* (2013).

Variedades	Color del grano	HC	Días después de la siembra		
			DF	DMF	DMC
CC-25-9 N	Negro	III	47	86	100
BAT 304	Negro	III	38	68	75
Tazumal	Negro	II	41	75	86
Tomeguín 93	Negro	II	38	69	80
CUL 156	Negro	II	36	69	79
Liliana	Negro	II	41	72	84
Cubana 23	Negro	II	43	75	85
Triunfo 70	Negro	II	32	54	75
Milagros villareño	Negro	II	33	58	85
Velasco largo	Rojo	I	30	66	75
CC-25-9 R	Rojo	III	35	72	86
Guama 23	Rojo M	I	43	67	75
Delicias 364	Rojo	II	38	69	80
Buenaventura	Rojo	II	33	68	79
Wacuto	Rojo	II	36	56	80
Rubí	Rojo	II	34	64	81
Chévere	Blanco	III	39	71	81
Engañador	Crema	III	40	72	83
Quivicán	Blanco	II	37	70	86
Aluvia Española	Blanco	I	30	66	75
Lewa	Blanco	II	36	66	85

En dicha tabla se reporta el hábito de crecimiento (HC), días a la floración (DF), días a la madurez fisiológica (DMF) y días a la madurez de cosecha (DMC), de las diferentes variedades. La densidad de siembra, depende de varios factores. Entre los más importantes están los siguientes: fertilidad del suelo, humedad disponible, porcentaje de germinación y características agronómicas de la variedad.

En zonas donde los suelos son fértiles y la lluvia es abundante, deberá sembrarse una mayor cantidad de semilla que en los suelos medianamente pobres y con lluvias escasas y erráticas. Las variedades mejoradas soportan mayor densidad de población en comparación con las variedades criollas. Además, el grano debe quedar a una profundidad de cinco centímetros para que tenga la suficiente humedad y pueda germinar (Faure *et al.*, 2013; Esqueda *et al.*, 2016).

La distancia entre plantas es la herramienta más efectiva para mejorar la captura de la luz. La cantidad de plantas necesarias para lograr plena cobertura está en función del área foliar de cada una y de la disposición de sus hojas. Las bajas densidades afectan significativamente la captura de luz y, en consecuencia, en el crecimiento del cultivo (Blaco *et al.*, 2016; Olivera *et al.*, 2016).

I.3.3 Exigencias edafoclimáticas para la producción de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.)

- **Exigencias edáficas**

El frijol (*P. vulgaris* L.) requiere de suelos profundos y fértiles, con buenas propiedades físicas, capacidad de retención de humedad, alto contenido de materia orgánica, textura franco limosa, tolera también suelos francos arcillosos, crece bien en suelos con pH entre 5,5 y 6,5, de topografía plana u ondulada con buen drenaje, además absorbe grandes cantidades de N, K y Ca, y en menores cantidades S, Mg y P (Jara y Giraldo, 2016).

- **Exigencias nutricionales**

Las recomendaciones de fertilización están orientadas al suministro de N y P, elementos de mayor demanda del cultivo, lógicamente los requerimientos varían según el tipo de suelo, un análisis de suelo nos resuelve el problema de inmediato, desgraciadamente esta práctica no es muy accesible a los pequeños productores, quienes abastecen la mayor parte de la demanda de frijol (Escoto, 2015).

El requerimiento nutricional de la especie es variable. El Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de frijol (*P. vulgaris* L.) menciona al respecto la aplicación de 97 kg de Nitrógeno, 9 kg de Fósforo, 93 kg de Potasio, 54 kg de Calcio, 18 kg de Magnesio y 25 kg de Azufre (Arias *et al.*, 2007).

Según Manual de buenas prácticas de producción y beneficio de semillas (2013), la fertilización dependerá del tipo de suelo donde se realicen las siembras. La inoculación con *Rhizobium* es indispensable, esta puede dar buenos rendimientos en suelos fértiles sin hacer aplicaciones de fertilizantes de fórmula completa. Con la aplicación de *Rhizobium* a la semilla, más 20 a 30 kg/ha de N, diez días antes de la floración, se pueden alcanzar los mejores rendimientos. Por su parte Peña (2013), recomienda la aplicación de 105 kg/ha de Nitrógeno, 4.3 kg/ha de P, 99 kg/ha de K, 70 kg/ha de Ca, 6 kg/ha de Mg y 10 kg/ha de S.

- **Exigencias hídricas**

El frijol requiere 3,4 mm de agua por día desde la siembra hasta la etapa fenológica de prefloración, 6 mm por día durante la floración y 5 mm por día desde la formación de vainas hasta el llenado de grano. En general entre 200-400 mm de agua durante todo el ciclo. Las etapas críticas son 15 días antes de la floración y 18 a 22 días hasta la maduración de las primeras vainas (ICTA, 2010).

El cultivo necesita 10 riegos, con una norma neta total promedio de 3500 m³.ha⁻¹ durante todo el ciclo del cultivo, aunque depende de la variedad y el tipo de suelo. El suelo debe mantenerse en un 80% de capacidad de campo. El cultivo tiene cuatro etapas críticas, en las cuales no puede faltar el agua para que los rendimientos

agrícolas del cultivo no se afecten, que son la germinación, floración, formación y llenado de las legumbres (Álvarez *et al.*, 2014).

- **Requerimientos climáticos**

Los factores climáticos que más influyen en el desarrollo del cultivo son la temperatura y la luz; tanto en los valores promedio como en las variaciones diarias y estacionarias, tienen influencia en la duración de las etapas y en el comportamiento del cultivo (Arias *et al.*, 2007).

- ✓ Temperatura: la planta de frijol (*P. vulgaris* L.) crece bien en temperaturas promedio entre 10°C y 27°C, generalmente estas temperaturas predominan a elevaciones entre 400 y 1200 msnm. Las temperaturas extremas (5°C o 40°C) pueden ser soportadas por periodos cortos, pero en tiempos prolongados se generan daños irreversibles (Jara *et al.*, 2016).
- ✓ Luz: El frijol (*P. vulgaris* L.) es una especie de días cortos, los días largos tienden a causar demora en la floración y la madurez, cada hora más de luz por día puede retardar la maduración de dos a seis días. Factores como la temperatura y la luminosidad se pueden manejar culturalmente, al sembrar en las épocas apropiadas, cuando el cultivo tenga las condiciones favorables (Arias *et al.*, 2007).

I.4 Técnicas de recolección y almacenamiento

- **Requisitos para realizar la recolección**

La cosecha se comenzará cuando el cultivo haya alcanzado la madurez fisiológica, con una humedad del grano que no sea mayor que 18%, ni menor que 12,5% (NRAG 192:2011). Esta actividad se hace de forma manual, estas se recogen cuando presentan una deshidratación o tiene una madures del 70%, lo cual hace que todas las vainas de un cultivo no se recojan en un mismo tiempo. Además, se procura hacer las recolecciones de las vainas en temporadas con condiciones climáticas secas, para el ahorro de energía a la hora del proceso de secado (Martínez, 2015).

- **Almacenamiento**

El grano que se quiere almacenar debe de estar a una humedad de 12-13%, a fin de asegurar su buena conservación durante el almacenamiento. Los pequeños productores logran secar su grano exponiéndolo al sol, ya que los sistemas artificiales aumentan los costos. La mayoría de ellos también almacenan los granos en sacos, en lugares secos. El uso de silos metálicos brinda buenos resultados a los agricultores (Rosas, 1998; Ortiz *et al.*, 2016).

I.5 Precisiones de calidad para la producción de semillas de frijol

- **Semilla**

La semilla es el óvulo fecundado y maduro que se desarrolla dentro de la vaina. Está compuesta por un embrión o futura planta, rodeada por un alimento de reserva, este le da la oportunidad al embrión de crecer y desarrollar raíces, tallos, ramas y hojas para aprovechar la luz solar y tomar los nutrimentos del suelo. Posee además una protección exterior llamada tegumento o cáscara, que lo protege. El embrión permanece latente, hasta que penetre el agua, lo active y provoque la germinación, condición que se puede dar desde que la semilla termina su crecimiento (Ortiz, 2016).

Sin embargo, no es en su definición donde radica su importancia, sino en sus atributos agronómicos, es decir, atributos sanitarios, fisiológicos, pureza e identidad genética y físicos que determinan su potencial de rendimiento (PESEM-MINAGRI, 2015).

Calidad de la semilla

La semilla para siembra debe ser de calidad, que cumpla con los atributos de pureza genética (solo semilla de la variedad seleccionada), pureza física (libre de terrones, piedras, basura, semillas de maleza), calidad fitosanitaria (semilla libre de enfermedades que se transmiten por este medio) y calidad fisiológica (por lo menos 85 % germinación) (Lépiz *et al.*, 2015).

La calidad fisiológica de la semilla abarca la suma de todas las propiedades o características, las cuales determinan el nivel potencial del comportamiento de las semillas y el establecimiento del cultivo (Velázquez, 2014).

Según el Manual Técnico Agrícola (2010), uno de los aspectos que ayudan al agricultor a obtener excelentes cosechas de frijol, es sin duda, el uso de semilla certificada de buena calidad producida en época seca. El uso de semilla certificada trae los siguientes beneficios:

- ✓ Es limpia: No tiene restos de basura, paja, terrones y piedras.
- ✓ Es pura: La semilla no está mezclada con otras variedades, no tiene semilla de otros cultivos y no tiene semillas de malezas.
- ✓ Tiene buena germinación: De 100 semillas sembradas nacen por lo menos 85 a 90 plantas vigorosas, obteniéndose con esto una adecuada población de plantas.
- ✓ Es sana: Esta libre de insectos plaga y enfermedades. En frijol existen varias enfermedades que se transmiten por semilla, (Antracnosis, Mancha Angular entre otros).

Según Ortiz (2016), en una semilla de mala calidad, se pueden transportar hongos del suelo, que una vez introducidos al terreno, son de muy difícil control (*Fusarium*, *Sclerotium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, etc.).

I.6 Origen de la contaminación fúngica de las semillas

En la tabla 3 se presentan los principales agentes patógenos fungosos del frijol. Estos patógenos pueden localizarse en la parte exterior e interior de la semilla, produciendo diferentes síntomas como enanismo, exudaciones y bajo poder germinativo. En ocasiones, la semilla puede estar infectada y no presentar síntomas (González *et al.*, 2008^b).

- **Presencia de hongos en el suelo**

En Cuba el cultivo del frijol se ve afectado por diferentes enfermedades, las que limitan grandemente los rendimientos. Dentro de ellas se destacan las producidas por hongos patógenos del suelo, y se consideran más importantes las producidas por los géneros *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Fusarium* y *Sclerotium*, entre otras. La importancia de

estos hongos patógenos está determinada por las características que presentan bajo las condiciones climáticas (González *et al.*, 2015).

Tabla 3. Patógenos fúngicos asociados a semillas de frijol según Pérez (2013).

Patógenos fúngicos del frijol	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Kiessler	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. ex Fr.
<i>Alternaria brassicicola</i> (Schw.) W.	<i>Fusarium pallidoroseum</i> (Cooke) Sacc.
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.
<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Cercospora cruenta</i> Sacc.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griff. Et Maubl.
<i>Cercospora kikuchii</i> (Mats et Tomey) M.W.Gardner	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi). Goid.
<i>Cercospora sp.</i>	<i>Pestalotia sp.</i>
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link. ex Fr.	<i>Phoma sp.</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Sacc.	<i>Phomopsis sp.</i>
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav.	<i>Phyllosticta sp.</i>
<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	<i>Rhizopus sp.</i>
<i>Exserohilum rostratum</i> (Drechsler) Leonard et Suggs	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	

Por otra parte, el hongo *Macrophomina phaseolina* es capaz de atacar a más de 500 especies de plantas cultivadas, entre ellas sorgo, maíz y frijol, en las que produce la enfermedad conocida como pudrición carbonosa (Hernández *et al.*, 2015).

Sobre el cultivo del frijol común influye notablemente la incidencia de enfermedades fúngicas, entre las que se destacan las causadas por hongos que habitan en el suelo, como *Rhizoctonia solani* que provoca afectaciones considerables al cultivo (Nerey, 2010). Por eso, determinar el efecto de métodos no convencionales basados en el uso de medios biológicos y productos naturales para reducir la incidencia de estos hongos al cultivo del frijol común, constituye una prioridad.

- **Presencia de hongos en almacén**

Según Bolívar (2007), crecen en condiciones más secas de las que pueden soportar los hongos de campo, como ejemplos se pueden citar: *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Pueden invadir las semillas directamente, *Aspergillus* puede producir toxinas como aflatoxina y ocratoxina, mientras que *Penicillium*: produce Acido penicílico y citrinina. Los hongos de almacenamiento pueden infestar el grano en el campo si hay algún daño en la chala o tusa.

La relación de la humedad relativa y la humedad del grano con el crecimiento de los hongos está claramente demostrada, la razón por la que los hongos del género *Aspergillus* son los contaminantes más comunes del grano almacenado es que se adaptan mejor a las condiciones ambientales en que generalmente se almacena el frijol.

I.7 Tratamiento de las semillas frente a hongos fitopatógenos

Aunque el tratamiento de las semillas no reemplaza la disponibilidad y el uso de semillas sanas, puede ser un medio eficaz para aumentar la emergencia de las plántulas cuando se usa en semillas de bajo vigor y cuando la cubierta de la semilla se ha dañado. De hecho, el tratamiento de las semillas puede convertirse en un medio extremadamente importante para erradicar o reducir los patógenos transmitidos por semillas, especialmente cuando estas se cultivan para la producción de semillas, o cuando se requiere una semilla de buena calidad con un menor porcentaje de infección micótica (Mancini y Romanazzi, 2013).

En el pasado, los tratamientos de semillas se llevaban a cabo principalmente mediante la aplicación de fungicidas, e incluso hasta ahora este es el medio más efectivo. Sin embargo, los nuevos métodos que excluyen el uso de fungicidas son cada vez más necesarios, especialmente en la agricultura orgánica. Un requisito previo para la agricultura ecológica es que las semillas u otros materiales de propagación deben producirse en condiciones de agricultura ecológica.

Dentro de los diferentes tratamientos a las semillas se encuentran los fungicidas, tratamientos físicos, biopesticidas como extractos de plantas, compuestos naturales y agentes biocontroladores.

- **Fungicidas**

Históricamente, los fungicidas se desarrollaron a partir de compuestos de azufre, cobre y mercurio. En el caso de los compuestos de mercurio, su toxicidad para los animales de sangre caliente y la acumulación de mercurio en el medio ambiente provocaron su prohibición (Jardine, 2013). Los nuevos fungicidas sistémicos reemplazaron en gran medida a los compuestos inorgánicos y pueden ser extremadamente eficientes. La toxicidad de estos compuestos para las semillas y el desarrollo de moléculas más nuevas y más específicas contribuyeron a la declinación del uso de dichos compuestos inorgánicos. Además, los fungicidas sistémicos suponen un menor riesgo para los cultivos, los animales y el medio ambiente, ya que pueden ser fácilmente degradados por microorganismos del suelo, lo que evita su acumulación (Buffington y Gaul, 2010).

Los fungicidas de contacto solo son efectivos contra las esporas de los hongos sobre la superficie de las semillas y, consecuentemente, no tienen efectos en las infecciones fúngicas internas de las semillas (Mancini y Romanazzi, 2013). Dentro de los principales fungicidas registrados en Cuba para la protección de las semillas figuran el captan, benomyl, tiran, carboxin + tiran, imazalil, tiabendazol, guazatina y propamocarb HCL, los cuales se usan fundamentalmente contra numerosos géneros de hongos presentes en semillas botánicas, etapa de poscosecha y otros (CNSV, 2016).

- **Tratamientos físicos**

Los tratamientos físicos consisten en tratamientos térmicos de semillas y entre los más comunes están los tratamientos con agua caliente, aire caliente y electrones. Los tratamientos de semillas con vapor aireado, regulado cuidadosamente a una intensidad adecuada, hacen posible la muerte de patógenos sin dañar las semillas. Durante el tratamiento de las semillas con electrones, estos actúan en milisegundos sobre la superficie de las semillas y destruyen el ADN de los organismos nocivos presentes (Schaerer, 2012).

- **Tratamiento con bioplaguicidas: extractos de plantas, compuestos naturales y agentes biocontroladores**

En general, los bioplaguicidas representan solo el 5% del mercado de las grandes compañías multinacionales. Sin embargo, la industria de los biocontroladores crece entre 8% y 12% por año y se espera que su crecimiento sea entre 15% y 20% para 2020, una de las mayores perspectivas entre todos los subsectores de los agronegocios. El crecimiento del mercado de estos biopesticidas se impulsará por el uso de agentes de biocontrol en los Programas Integrados de Manejo de Plagas en combinación con productos químicos, para su uso en grandes cultivos de extensión con alto valor económico o por cambios en las regulaciones y políticas que se centran en la seguridad ambiental. Desafortunadamente, las propiedades favorables de los productos de control biológico, como la seguridad para los humanos, la falta de residualidad, la seguridad con el medio ambiente, etc., son difíciles de explotar en un precio de venta (Gómez, 2018).

Los extractos de plantas incluyen aceites esenciales, de los cuales hay varios tipos que demuestran buena actividad antifúngica *in vitro*, entre los que se incluyen los aceites del árbol del té, clavo, menta, romero, laurel, orégano y tomillo (Wright *et al.*, 2003). Entre los compuestos naturales se encuentra la quitosana, la cual se deriva de la quitina del caparazón de cangrejos y es un biopolímero con propiedades antifúngicas (El Hadrami *et al.*, 2010).

En la actualidad también se utilizan microorganismos como agentes para el control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. Entre estos se encuentran *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseoviridis* (Choudhary *et al.*, 2008).

1.8 Caracterización de los productos utilizados en el estudio

Celest top 312 FS

Según Syngenta (2014), pertenece a la clase química de los Fenilpirroles, Triazol y Neonicotinoides. El Celest top se compone de 25 g de fludioxonil (fungicida), 25 g

difenoconazol (fungicida) y 262,5 g de thiamethoxam (insecticida). En la figura 4 se presenta la estructura química de cada uno de los componentes del Celest-top.

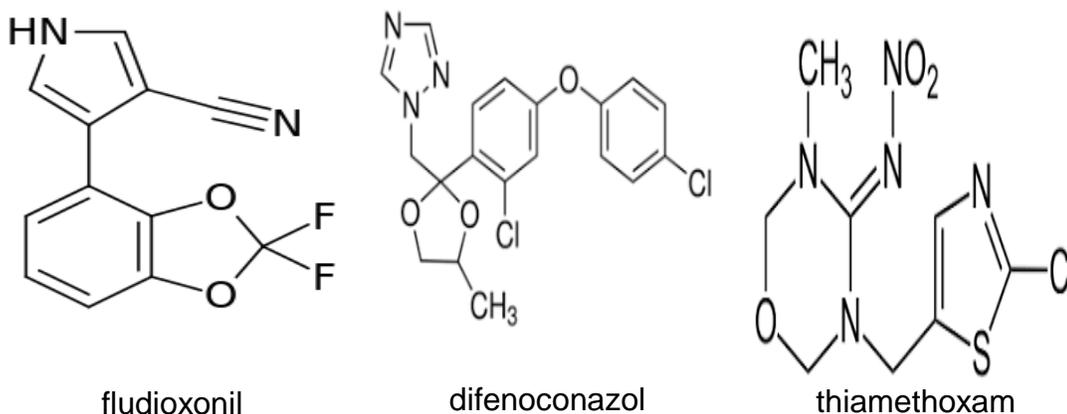


Figura 4. Estructura química de los componentes del Celest-top (Tomado de Wikipedia, 2019).

Pérez (2010) refiere que el fludioxonil es un inhibidor de la proteína kinasa PK III, involucrada en la ruta metabólica de la señal de la transducción y de la osmosensibilidad. El transporte dentro de las membranas se interrumpe; el difenoconazol detiene el desarrollo del hongo al interferir en la biosíntesis del ergosterol. El thiamethoxam tiene una fuerte acción sobre el sistema nervioso de los insectos.

Este producto controla hongos de las clases Ascomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos con acción protectante y sistémica, además controla insectos chupadores y raspadores en el comienzo del ciclo del cultivo. Recomienda utilizarse en el cultivo de frijol en dosis de 0,25 a 0,30 L PC/ 100 kg de semillas y controla a *Fusarium spp.*, *Cercospora spp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Diaporthe / Phomopsis* y *Cerotoma ruficornis*. Es sistémico y brinda mayor vigor a las raíces (Syngenta, 2014).

- **TMTD 80 % PH (Tetrametil Tiuram Disulfuro)**

El TMTD (Tetrametil Tiuram Disulfuro) 80%PH es un fungicida de contacto, no sistémico, para aplicación foliar, al suelo y tratamientos de semilla, de amplio espectro

y acción preventiva sobre enfermedades producidas por endoparásitos y hongos de suelo. Se emplea en semilleros contra hongos del suelo en dosis de 0,2% - 0,3% (Fernández, 2010).

En la figura 5 se presenta la estructura química del Tetrametil Tiuram Disulfuro (TMTD).

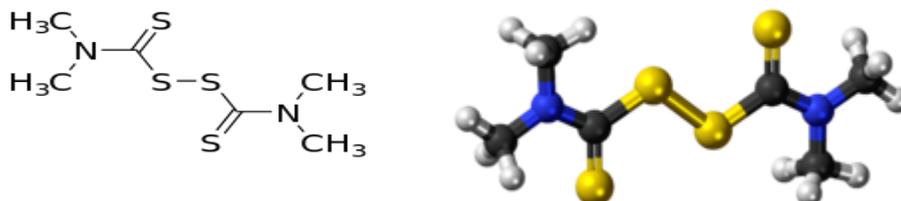


Figura.5. Estructura molecular del Thiuram (Tomado de Wikipedia, 2019).

Pertenece a la familia de los Ditiocarbamatos. Su persistencia en el suelo depende del pH, concentración y tipo de suelo, y puede oscilar entre 2 días y 32 semanas. Se degrada por vía bacteriana y por descomposición a dimetilditiocarbamato. Posee poca solubilidad en agua y tiene tendencia a adherirse al suelo, por lo que su capacidad de contaminación de aguas subterráneas es reducida. Se degrada rápidamente mediante hidrólisis y fotodegradación, sobre todo en condiciones ácidas, pudiéndose adsorber a las partículas en suspensión (Arvizu-Bernal *et al.*, 2011).

Según el CNSV (2016), se utiliza en el tratamiento de semilla botánica a razón de 90-368 g de ingrediente activo (i.a) por cada 100 kg de semillas.

- ***Trichoderma* spp.**

El interés por los hongos de este género, se debe a la capacidad de control ante diversos hongos fitopatógenos y por ende el uso en agricultura. De ellos, lo más importante es la competencia por nutrientes o espacio, el micoparasitismo y la antibiosis. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de la relación antagonista-patógena y de las condiciones ambientales (Hernández *et al.*, 2015).

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades producidas por hongos en las plantas, debido a su ubicuidad, a su facilidad para aislarse y cultivarse, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Mohammed *et al.*, 2004). Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos, los cuales

producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma, y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa.

Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser un agente de control biológico eficiente; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de plaguicidas y otros químicos; además, *Trichoderma* ofrece un control eficaz de enfermedades de las plantas, con un amplio rango de acción (Vázquez, 2010).

Este hongo segrega compuestos auxínicos como el ácido Indol Acético, que estimula la germinación, el crecimiento, desarrollo radicular y mejora la asimilación de nutrientes (Hernández *et al.*, 2012).

Especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que causan cambios estructurales a nivel celular del patógeno, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Camargo y Ávila, 2014).

Trichoderma harzianum coloniza fácilmente el sistema radicular en la planta, para ello desarrolla mecanismos que afectan y parasitan a otros hongos y así mismo obtienen nutrientes adicionales. Según Ortega *et al.* (2011) se reporta que *Trichoderma* sp. actúa como biocontrolador y colonizador del sistema radicular, micro parasitismo, antibiosis, competición por nutrientes, espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés hídrico y mejora la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos en el suelo.

Se conocen más sus efectos sobre patógenos del suelo que atacan la raíz (*Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*) y del follaje (*Botritis* y *Mildiu*), entre otros, para lo cual se realizan tratamientos a la semilla (botánica y agámica), aspersiones directas al suelo, aplicaciones sólidas directas al suelo y al hoyo de siembra o trasplante, así como a

través del sistema de riego, sea por gravedad o por goteo, según estudios de Vázquez (2010).

Diversos autores reportan que *Trichoderma* induce el crecimiento vegetal, al degradar el epispermo de la semilla y producir compuestos que mejoran la germinación y el crecimiento vegetal. Esto se debe a que aceleran el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios, los cuales aumentan el volumen, los pelos radiculares, la altura, así como el peso de la planta (Páramo y Hernández, 2017).

- **Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.**

Según Castro y Rivillas (2012), las diferentes especies de *Trichoderma* ejercen mecanismos de control mediante: competencia directa (por espacio y nutrientes), producción de metabolitos antibióticos, la inactivación de enzimas del agente patógeno, modificación de las condiciones ambientales, producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y por micoparasitismo. A continuación, se describen los tres principales:

Competencia: La competencia por espacio y/o nutrientes se considera uno de los mecanismos clásicos de biocontrol de este género. Tiene una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizosfera. Por otra parte, tiene una capacidad superior de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, y es muy versátil para utilizar sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que le permite colonizar el medio rápidamente y evitar la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat.

Producción de metabolitos (Antibiosis): El género *Trichoderma* tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, que juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento y el desarrollo de microorganismos patógenos. En estas interacciones se involucran enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos de bajo peso molecular.

Micoparasitismo: Es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento y la actividad lítica. La última etapa consiste en la producción de enzimas

líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* spp. En la figura 6 se muestran imágenes macroscópicas de *Trichoderma* cultivado en placas y microscópicas observadas al microscopio óptico y durante su acción antagónica frente a hongos patógenos.

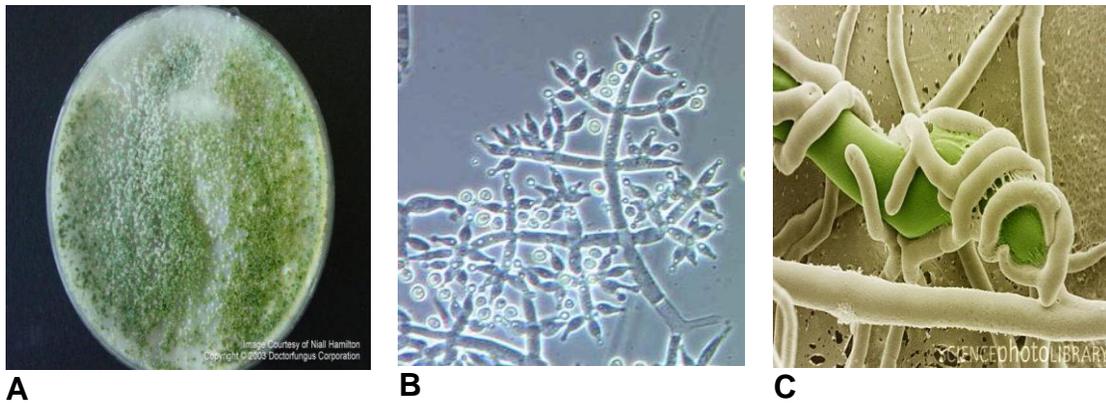


Figura 6. Observación de *Trichoderma* spp. A. cultivado en placas; B. Observación al microscopio óptico y C. Observación al microscopio electrónico de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia* spp. (Tomado de Vásquez, 2019).

Se demostró que algunas especies de este hongo, especialmente *Trichoderma harzianum* tienen el potencial de aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Lo anterior puede explicarse por la inhibición de patógenos menores y a la producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes.

1.9 Técnicas de análisis de calidad de la semilla

Entre las pruebas más importantes a realizar en semillas están: análisis de germinación, análisis de vigor, pureza física, porcentaje de daño, pureza varietal y análisis de humedad; además de enviar muestras de cada lote para su análisis fitosanitario después de terminado su procesamiento, donde a partir de los resultados, se realizan los tratamientos que recomiende la Institución Provincial de Sanidad Vegetal mediante un Certificado de Calidad.

- **Prueba de germinación**

La prueba de la germinación se realiza con el objetivo de determinar el potencial máximo de germinación de un lote de semillas, a su vez se puede utilizar para comparar la calidad de distintos lotes y estimar un valor de siembra en campo (Bocanegra, 2010).

Según la norma cubana NC 618:2008, el objeto de los ensayos de germinación es determinar, el máximo potencial de germinación de un lote de semillas. Estimar su valor para la siembra en terreno y proporcionar resultados que permitan comparar los diferentes lotes de semillas tratadas.

El método sobre arena. TS (Top of Sand):

- Se realiza a partir de que las semillas se presionarán contra la superficie de la arena.
- La arena se lavará y esterilizará, antes de su empleo como sustrato, para matar la totalidad de las bacterias, hongos, esporas, nemátodos y semillas extrañas.
- La cantidad de agua que se adicionará a la arena dependerá de sus características propias y del tamaño de las semillas que se ensayan.
- La cantidad de agua óptima se deberá determinar para las principales especies de manera que se emplee en los ensayos de rutina siempre dicha cantidad medida.
- Para las leguminosas de semillas grandes o para maíz, la arena contendrá el 60% de su capacidad de retención de agua.
- Si se utiliza la misma arena repetidamente para ensayos de muestras tratadas por productos químicos se sustituirá por otra cuando se suponga que puede ser la causa de provocar síntomas fitotóxicos debido a la acumulación de sustancias tóxicas.

- **Evaluación de plántulas**

Las plántulas normales son aquellas que desarrollan todas sus estructuras esenciales en condiciones controladas (agua, luz y temperatura), que tienen la capacidad de generar plantas de buen porte.

- ✓ Sistema radicular bien desarrollado, raíz primaria y raíces seminales.
- ✓ Hipocótilo con buen desarrollo sin daños en el tejido.
- ✓ Plúmula con buen crecimiento, con hojas bien desarrolladas.
- ✓ Un cotiledón en monocotiledóneas y dos cotiledones en dicotiledóneas.

Las plántulas con los siguientes defectos se clasifican como anormales:

- ✓ Raíz primaria dañada, sin desarrollo y/o emergencia, con poco vigor sin atravesar la testa de la semilla, con geotropismo negativo, sin raíces secundarias.
- ✓ Brote (hipocótilo, epicótilo, mesocótilo) sin desarrollo, ensanchado, torcido o sin emergencia.
- ✓ Cotiledones y hojas deformes, necróticas o dañadas por infecciones.

- **Prueba de vigor**

El vigor en las semillas es el potencial biológico que posee esta, la cual favorece el establecimiento rápido y uniforme bajo condiciones de campo, incluso desfavorables (González *et al.*, 2008a). Bocanegra (2010) plantea que el objetivo de la prueba de vigor de las semillas es proporcionar información acerca del valor de la plantación en una amplia gama de ambientes y/o el potencial de almacenamiento de una gran cantidad de semillas. La prueba proporciona información adicional a la prueba de germinación estándar para ayudar en la diferenciación de los lotes de semillas de germinación aceptables.

Según INIFAT (2015), diversas pruebas para evaluar el vigor se desarrollan y estas se agrupan en tres categorías:

- ✓ Pruebas de crecimiento y evaluación de plántulas (evaluación de estado actual). Se valora mediante tres indicadores: 1) Velocidad de germinación, 2) Tasa de crecimiento de la plántula y 3) Clasificación del vigor de las plántulas.
- ✓ Pruebas de stress. Se evalúan respuestas bajo condiciones específicas del ambiente. Se realiza generalmente a través de alguna de las siguientes pruebas: 1) Envejecimiento acelerado, 2) Pruebas de frío, 3) Germinación a temperaturas subóptimas, 4) Pruebas de sustrato humedecido y 5) Stress osmótico.
- ✓ Pruebas bioquímicas. Las más comunes son: 1) Prueba de tetrazolium, 2) Conductividad eléctrica, 3) La respiración, 4) La actividad de descarboxilasa del ácido glutámico y 5) El contenido de adenosina trifosfato.
- **Prueba para determinar la contaminación por hongos**

En la literatura revisada no se encontró ningún estudio que incluyera métodos de diagnóstico de hongos en granos almacenados. Aun así, existen métodos generales de diagnóstico de hongos en semillas que perfectamente pueden utilizarse en este caso. Dentro de los métodos, uno de los más usados en Cuba es la cámara húmeda, tiene la ventaja de ser barata, ya que no se necesitan recursos costosos, además fácil de ejecutar. Tiene un período de incubación de aproximadamente de 7-15 días según la especie y se requiere de personal calificado para la posterior determinación micológica.

Según el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal (LCCV, 2009), el procedimiento para el montaje de semillas botánicas mediante un ensayo biológico de crecimiento en cámara húmeda (Blotter test) (ISTA, 2009), tiene el objetivo de analizar las semillas en busca de los patógenos transmisibles en las mismas.

Capítulo II.
Materiales y métodos

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Material vegetal utilizado en el experimento

Se emplearon semillas certificadas de *P. vulgaris* L. Triunfo-70 (testa negra) registradas en el Listado oficial de variedades comerciales (MINAG, 2016) procedentes de la Unidad Estatal Básica (UEB) Semillas Matanzas. El poder germinativo de las semillas empleadas fue de 98%, la masa de 1000 semillas fue de 214,10 g, la pureza física de 99,5% y la humedad de 13,50% (véase Certificado de Calidad, anexo 1).

Las semillas no recibieron ningún tratamiento biológico o químico para el control de hongos e insectos durante su almacenaje.

II.2 Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de *Trichoderma* Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80 % sobre hongos fitopatógenos de *Phaseolus*.

La evaluación del efecto antimicrobiano de los productos frente a hongos fitopatógenos se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas.

Cepas indicadoras: Los hongos fitopatógenos de *Phaseolus* se obtuvieron del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (LPSV) de la Provincia Matanzas. Estas cepas estaban conservadas en placas con agar papa dextrosa a 5°C. Para activar los cultivos se sembraron en agar Sabouraud por 72 h a temperatura ambiente. Las cepas fueron: 1. *Fusarium* spp.; 2. *Sclerotium rolfsii*; 3. *Macrophomina phaseolina* y 4. *Rhizoctonia* spp.

Enfrentamiento de las cepas a los productos: Para determinar el efecto de los productos se empleó la técnica de difusión de sustancias en el agar de Schillinger y Look (1989). En las placas que contenían agar Sabouraud se realizaron tres pocillos con ayuda de un horador, donde se aplicaron los productos y un disco de crecimiento de los patógenos en el centro, de manera equidistante. Se desarrollaron tres réplicas para cada una de las cepas indicadoras, incubándose a temperatura ambiente por un período de 7 días. Se tomó como positivo la observación de halos de

inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos alrededor de los pocillos con los productos.

II.3 Evaluación del efecto de *Trichoderma* Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80 % en el control o prevención del desarrollo de hongos fitopatógenos en semillas de *Phaseolus* en condiciones controladas.

El experimento se desarrolló en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas. Las semillas se pesaron y se ajustaron las dosis de los productos para 300 g de semillas. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones y se evaluaron los siguientes tratamientos:

1. Tratamiento 1: Control (semilla sin inoculación)
2. Tratamiento 2: 300 mL de Celest top 312 FS /100 kg de semillas (0,90 mL/300 g de semilla).
3. Tratamiento 3: 100 g de TMTD 80 % PH /46 kg de semillas (7 g /300 g de semilla)
4. Tratamiento 4: 5 g de *Trichoderma* Cepa A-53 /kg de semillas (15 mL /300 g de semilla)
5. Tratamiento 5: 5 g de *Trichoderma* Cepa A-53 /kg de semillas combinada con 100 g de TMTD 80 % PH /46 kg de semillas.

Para el desarrollo de este ensayo biológico se utilizó la técnica de crecimiento en cámara húmeda (Blotter test) (ISTA, 2009):

- ✓ Se esterilizó el papel de filtro y placas Petri en estufa por 1 h a 160°C.
- ✓ Se esterilizó la cantidad suficiente de agua del grifo en autoclave a 121°C por 20 minutos.
- ✓ Las semillas de la muestra se colocaron en una bandeja limpia y desinfectada con algodón embebido en etanol al 70%.
- ✓ Con la pinza desinfectada con etanol y por la llama, se tomaron tres papeles de filtro estériles a la vez y se sumergieron en agua estéril por unos segundos, se escurrió el exceso de agua y se colocaron en el fondo de las placas Petri.

- ✓ Se montaron por cada placa 25 semillas.
- ✓ Se examinaron las semillas, y se tomaron preferentemente las que presentaban signos externos anormales como manchas, decoloraciones, exudados, etc., o de lo contrario se seleccionaron semillas al azar.
- ✓ Las placas Petri se incubaron en un cuarto con temperatura controlada (15°C), colocadas en estantes con luz fluorescente blanca (2 bombillos de 20W) con ciclos alternos de oscuridad y luz de 12 horas.
- ✓ El tiempo de incubación fue en un rango de 7-15 días en que aparecen las primeras hojas y están listas las plántulas para examinarse.
- ✓ Durante el transcurso de la incubación se verificó que los papeles de filtro tuvieran la humedad necesaria.

El muestreo se realizó en el ENFRIGO Establecimiento 402 de Jovellanos, para el cual se tuvo en cuenta todas las especificaciones del Ministerio de la Agricultura según la NC 617: 2008. Las muestras se tomaron de un lote de producción frijol negro var. Triunfo 70, con un peso total de 5244 kg de semilla. Se utilizó una balanza digital (Navigator XT) para garantizar 300 g de muestra para cada tratamiento en estudio.

Se empleó la cepa *Trichoderma*: A-53 procedente del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Matanzas, con la que se preparó una suspensión de conidios de (10^8 conidios/mL). Se calculó la concentración de la cantidad de hongos por semillas peletizadas mediante el empleo de la cámara de Neubauer, al microscopio óptico (Motic).

Inoculación de los productos: se realizó la aplicación de los productos el día 28 de enero de 2019, se colocaron en un recipiente, al cual se le adicionaron los productos, se dejaron las semillas en reposo por 24 horas y al día siguiente se realizaron las siembras. El tratamiento 5 se realizó con la aplicación de TMTD el día 28 y *Trichoderma* se aplicó al día siguiente, antes de la siembra, dejándose en reposo por 10 min.

Determinación de patógenos en las semillas (%): se determinó la presencia de hongos a través del ensayo biológico de crecimiento en cámara húmeda (Blotter test, 2009).

Se utilizaron cuatro placas petri plásticas (200x20 mm), cubiertas de dos capas de papel de filtro humedecidas con agua destilada estéril (50%), en las que se colocaron 25 semillas en cada una (500 semillas en total) las mismas fueron incubadas bajo luz fría fluorescente blanca, con un periodo de luz oscuridad de 8/16 horas. Se realizaron observaciones para identificar y caracterizar los distintos patógenos fúngicos transmisibles en las siembras según CMI (Commonwealth Mycological Institute, 1997) e INISAV (Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 2013). Se realizaron anotaciones del porcentaje de semillas contaminadas por hongos y su identificación. En la figura 7 se presenta un diagrama con la secuencia experimental de esta etapa.

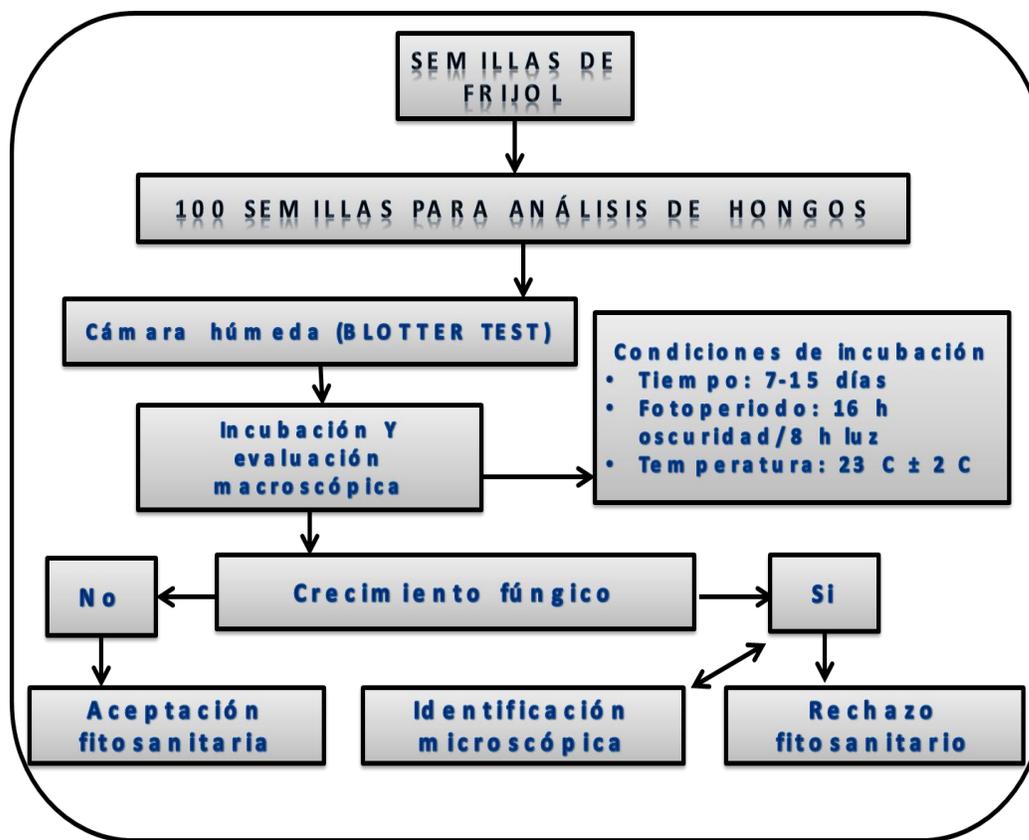


Figura 7. Diagrama de flujo para el diagnóstico de hongos.

II.4 Evaluación *in vivo* del efecto de *Trichoderma* Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80% en los parámetros fisiológicos durante el crecimiento de semillas de *Phaseolus vulgaris*

La evaluación del efecto de los diferentes productos en la fisiología de las semillas, se realizó bajo condiciones semicontroladas en el Laboratorio de Semillas de la UEB Semillas Matanzas, Jovellanos.

Procedimiento de muestreo: Se realizó un muestreo el día 8 de febrero de 2019, el tamaño de la muestra fue de 2,540 kg de semilla, en el momento de la extracción presentaron una humedad de 13,50%. Se utilizó la misma metodología descrita anteriormente.

Inoculación de los productos: se realizó la aplicación de los productos el día 8 de febrero de 2019, se efectuó el mismo procedimiento que en la etapa anterior.

Siembra de la semilla: Se realizó según la norma cubana NC 618:2008 por el método sobre arena TS (Top of Sand). Se contaron un total de 1000 semillas tomadas al azar, lo que representa 200 semillas (4 repeticiones con 50 semillas) por cada tratamiento y se utilizó como sustrato, arena de río esterilizada. Las semillas se colocaron en el sustrato húmedo y se sembraron separadas lo suficiente para evitar que se tocaran entre sí durante su desarrollo. Las bandejas se taparon con nylon transparente y se colocaron en una cámara climatizada a temperatura entre 20 - 25 °C y se mantuvieron en un periodo de luz oscuridad de 8/16 horas.

Se midieron los siguientes indicadores de acuerdo al Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio (2014):

Longitud del hipocótilo (cm): A los 5 días se midió con regla milimetrada la longitud del hipocótilo para cada tratamiento en estudio.

Vigor de la semilla (%): Se determinó el vigor relativo a partir del porcentaje de las plántulas normales. Esta forma de evaluación se sustenta en el principio de que las muestras que presentan un mayor porcentaje de plántulas normales en el primer conteo, son las más vigorosas. Es indirectamente un conteo de velocidad de

germinación. El procedimiento consistió en utilizar el valor promedio de las cuatro repeticiones a los cinco días de incubación.

Germinación de la semilla (%): Se determinó mediante la relación entre el número de semillas sembradas y el número de semillas que germinaron de manera normal.

Altura de la plántula (cm): Se determinó a partir de la medición desde el cuello de raíz hasta el meristemo más distal de la parte aérea de la planta.

Plántulas anormales o semillas muertas (%): Se determinó al extraer las plántulas con deformaciones o las que no germinaron, las mismas se contabilizaron por tratamiento.

Longitud de la raíz principal (cm): Se determinó midiendo desde el cuello de raíz hasta el extremo más distal de la raíz de la plántula.

Peso fresco de la raíz y parte aérea (g): Mediante el uso de una balanza digital, se registró el peso total de las plántulas por repeticiones para cada tratamiento.

Peso seco de la raíz y parte aérea (g): Las raíces se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de arena, posteriormente se secaron y se colocaron en bolsas de papel, las mismas se sometieron al secado continuo en una estufa por un periodo de 7 días a 60 °C. Una vez cumplido el tiempo se determinó el peso seco en una balanza analítica (Baxtram SW).

II.5 Procesamiento estadístico de los datos

En la investigación se empleó el análisis de varianza simple al utilizar el software Statgraphics Plus versión 5.1. Para las pruebas de significación se utilizó la prueba Duncan al 95 % de confiabilidad. Específicamente en el caso del porcentaje de semillas contaminadas los valores se transformaron a $\arcsen\sqrt{\% + 0,375}$ debido a que en algunos tratamientos el valor fue de 0 para ajustar la normalidad de los datos. Para el análisis de las proporciones se utilizó el software estadístico ComparPro versión (Font *et al.*, 2007).

II.6 Valoración económica y ambiental

En la valoración económica se realizó una proyección para un kilogramo de semilla, teniéndose en cuenta los resultados de su aplicación como antifúngico, las dosis empleadas y el precio en el mercado nacional. Los valores de costo unitario son reales en base a la unidad considerada en la dosis de aplicación. También se tomó un valor fijo de venta del frijol negro (30,70 CUP/kg) y total kilogramos de frijol (producción) en el año 2019 en la UEB Semillas Matanzas. Además, se hace una valoración teórica sobre los beneficios que reportan los resultados en el ámbito social y ambiental.

Capítulo III.
Resultados y discusión

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Efecto *in vitro* de *Trichoderma* Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80 % sobre hongos fitopatógenos de *Phaseolus* spp.

En las figuras 8 y 9 se aprecia el efecto que produjeron los diferentes productos en el crecimiento de los hongos fitopatógenos evaluados. Se puede observar que de todos los tratamientos el Celest top 312 FS provocó mayor inhibición micelial en todos los hongos a excepción de *S. rolfsii*. Según Syngenta (2014) este producto no es capaz de controlar a *Sclerotium*, organismo que produce podredumbre en raíz, tallos y semillas.

Por su parte, Vidal (2002) y Mishra *et al.* (2010) destacaron que los fenoles cumplen importantes funciones en las plantas, entre las que se encuentran, formar parte de los mecanismos de defensa contra organismos patógenos mediante la síntesis de fitoalexinas.

Estas son mayoritariamente polifenoles, principalmente isoflavonoides, que constituyen compuestos tóxicos para los microorganismos. Las fitoalexinas son responsables de la prevención de las infecciones, de la inhibición de enzimas producidas por los microorganismos patógenos que degradan las paredes celulares de las plantas, de la producción de lignina por las enzimas peroxidasas, polímero que se localiza en las paredes celulares de las plantas, dando resistencia al ataque de hongos y contribuyendo a la impermeabilización de la célula, de la inhibición de la formación de cutinasas, enzimas producidas por los organismos patógenos, además de la formación de sustratos de compuestos antifúngicos y la inducción de resistencia.

Celest®Top 312.5 FS constituye un producto compuesto por 262.5 g de Thiamethoxam, 25 g de Fludioxonil y 25 g de Difenoconazol, que posee amplio espectro de actividad porque incluye dos fungicidas y un insecticida, lo que permite el control de hongos de la semilla y de importantes plagas en el inicio del cultivo (Syngenta, 2003). Estudios realizados con Thiamethoxan en diversos laboratorios europeos informaron el efecto de este producto en la biosíntesis de proteínas

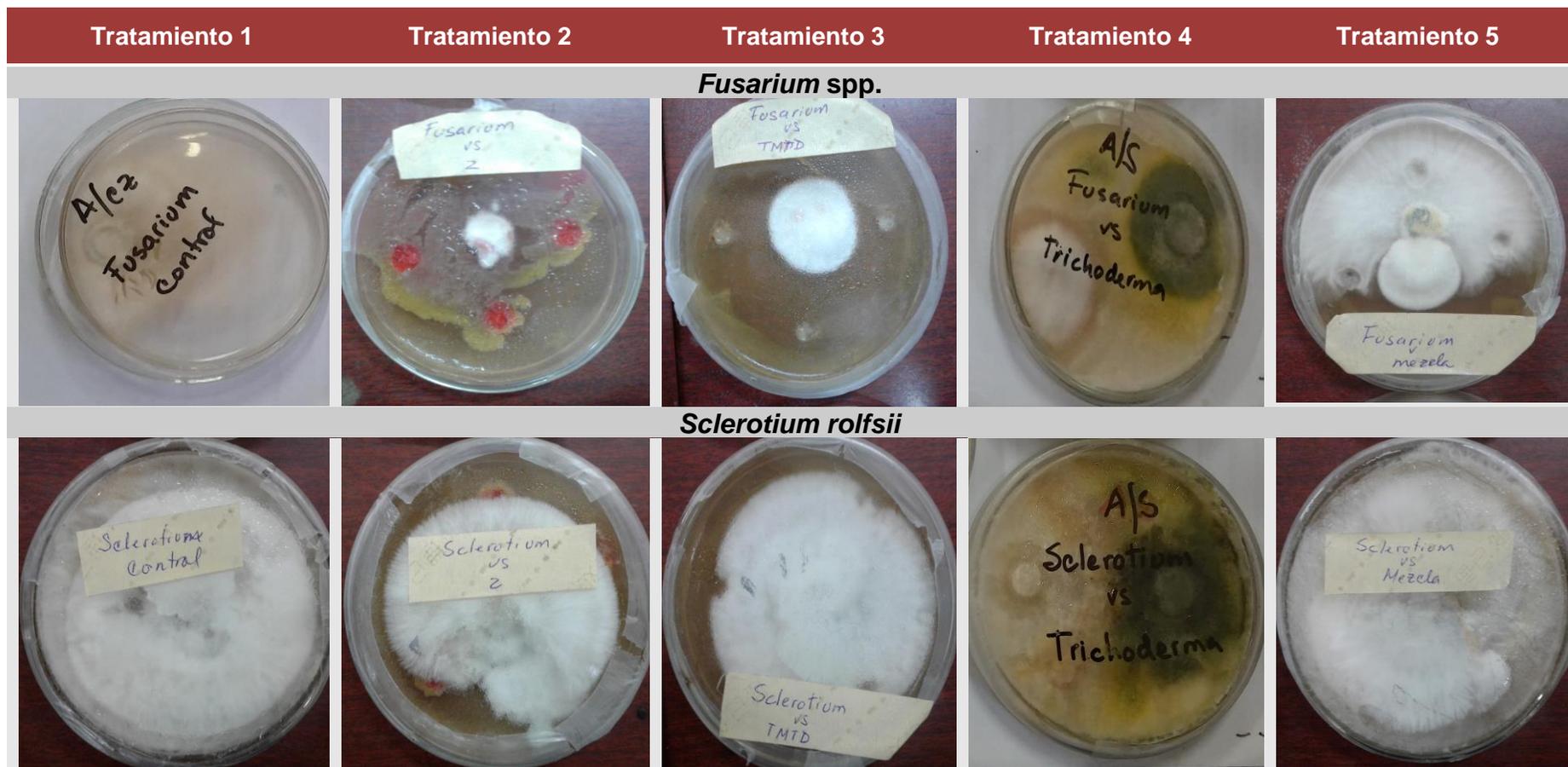


Figura 8. Efecto antimicrobiano de los diferentes productos frente a hongos fitopatógenos de *Phaseolus vulgaris* (*Fusarium spp.* y *Sclerotium rolfsii*).

1. Tratamiento 1: Control (semilla sin inoculación), 2. Tratamiento 2: 300 mL de Celest top 312 FS /100 kg de semillas (0,90 mL/300 g de semilla), 3. Tratamiento 3: 100 g de TMTD 80 % PH /46 kg de semillas (7 g /300 g de semilla), 4. Tratamiento 4: 5 g de *Trichoderma* Cepa A-53 /kg de semillas (15 mL /300 g de semilla), 5. Tratamiento 5: 5 g de *Trichoderma* Cepa A-53 /kg de semillas combinada con 100 g de TMTD 80 % PH /46 kg de semillas.

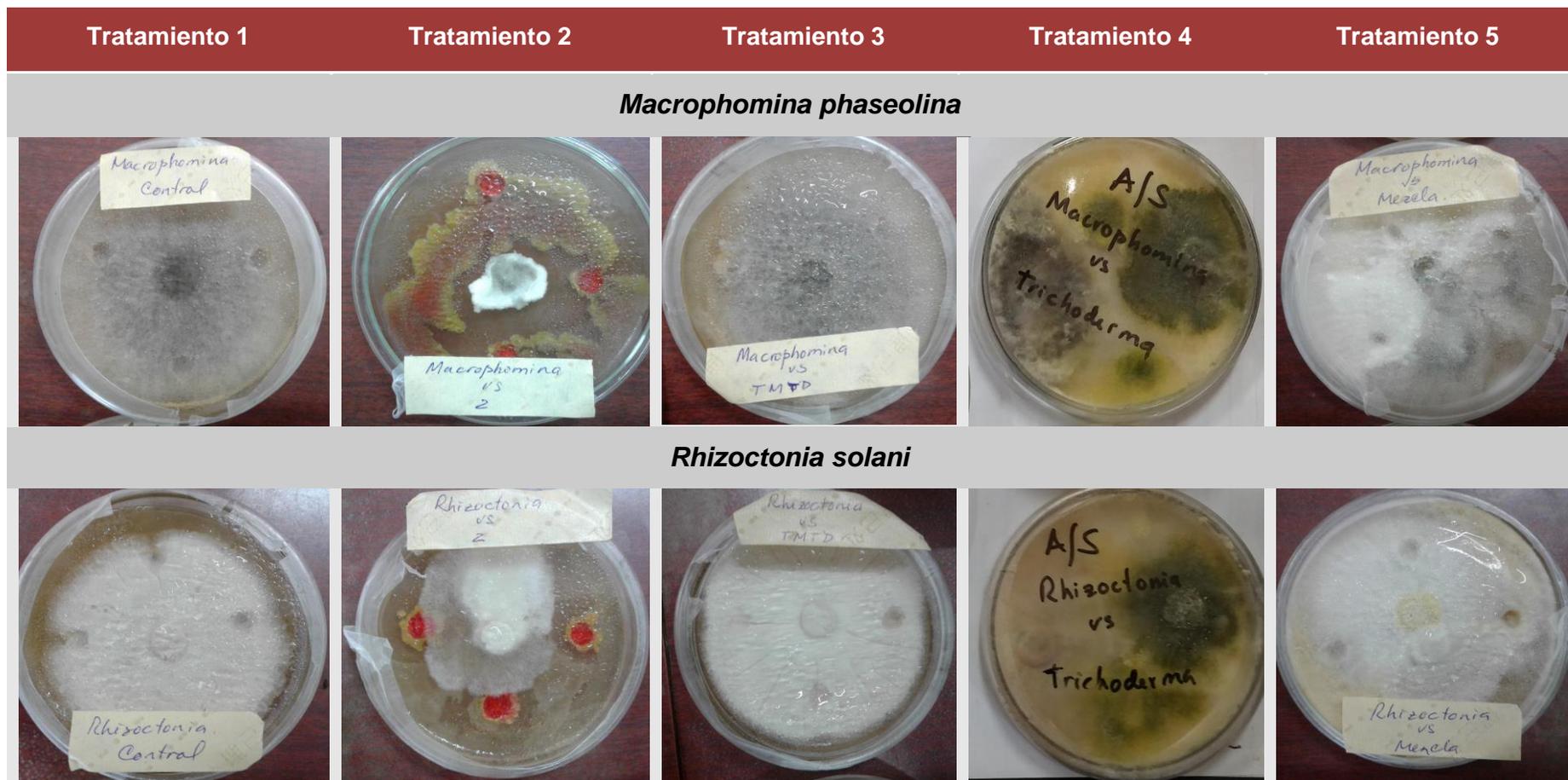


Figura 9. Efecto antimicrobiano de los diferentes productos frente a hongos fitopatógenos de *Phaseolus vulgaris* (*Macrophomina phaseolina*. y *Rhizoctonia solani*).

1. Tratamiento 1: Control (semilla sin inoculación), 2. Tratamiento 2: 300 mL de Celest top 312 FS /100 kg de semillas (0,90 mL/300 g de semilla), 3. Tratamiento 3: 100 g de TMTD 80 % PH /46 kg de semillas (7 g /300 g de semilla), 4. Tratamiento 4: 5 g de *Trichoderma* Cepa A-53 /kg de semillas (15 mL /300 g de semilla), 5. Tratamiento 5: 5 g de *Trichoderma* Cepa A-53 /kg de semillas combinada con 100 g de TMTD 80 % PH /46 kg de semillas.

específicas que tienen participación en diversos mecanismos de defensa de las plantas. Según esos estudios, thiamethoxan trabaja en los factores de transcripción genética y en la expresión de los genes (sin causar alteraciones). Esta acción sobre la expresión de determinados genes induce a que los mismos actúen en dos direcciones; en la acción de las proteínas de las membranas y en las enzimas metabólicas (Zhang *et al.*, 2002). Por la vía de las proteínas de la membrana, causa cambios en la transportación de iones y favorece la nutrición mineral, en tanto por la vía de las enzimas metabólicas, induce la formación de hormonas precursoras de aminoácidos y fitohormonas que conducen a la síntesis de hormonas. Ambas vías fisiológicas condicionan respuestas en las plantas ante factores adversos de tipos abióticos y bióticos.

En segundo lugar, la cepa de *T. harzianum* detuvo significativamente el crecimiento de los fitopatógenos desde las 48 h. Se corroboró lo planteado por Martínez *et al.* (2015), quienes refieren que a partir de ese tiempo este hongo no permite el crecimiento y desarrollo de los microorganismos indicadores, observándose un crecimiento rápido de las hifas, las que se ramifican y manifiestan la esporulación asexual en conidios unicelulares de color verde.

Franco y Orrego (2013) obtuvieron quince aislados nativos de *Trichoderma* spp. y dos de ellos presentaron mayor potencial antagónico *in vitro* frente a los organismos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina* y *Phytophthora* spp. Estos autores refieren que el fungicida curasemilla Carboxin +Thiram es compatible con los aislados nativos de *Trichoderma* spp. y no produce efectos negativos en la esporulación de este.

Es posible que la causa de los resultados del presente trabajo se relacione con lo planteado por Duarte-Leal *et al.* (2018), quienes informaron que existen especies de *Trichoderma*, como *Trichoderma harzianum* Rifai, que produce una gama de antibióticos (trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina) que participan en la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros trabajos, como lo reportado por Martínez (2011), quien informa que a los siete días (168 horas) las tres cepas

comerciales que se seleccionaron para los enfrentamientos duales manifestaron efecto antagonista sobre los dos aislamientos de *S. rolfsii* y *F. solani* de semillas de frijol, en ese momento la cepa A-53 penetraba el micelio de ambos y se enrollaba en las hifas del mismo, al provocar hiperparasitismo en la totalidad de la colonia de los dos fitopatógenos.

El fenómeno de que los aislados de *Trichoderma* tuvieran contactos rápidamente entre los primeros dos días, indican que existe agresividad; en este sentido, Michel-Aceves *et al.* (2008), evaluaron la capacidad antagónica mediante el método del papel celofán y la clase de antagonismo con la técnica de cultivos duales, reportaron valores similares con contacto desde el segundo día después de la inoculación entre *T. harzianum* y *A. solani*, lo que muestra gran agresividad de la cepa antagónica y susceptibilidad del fitopatógeno. Es importante destacar que entre menor sea el tiempo de contacto entre el antagonista y el fitopatógeno, existe mayor agresividad por parte de *Trichoderma* y, en consecuencia, menor resistencia por parte del patógeno (Michel-Aceves, 2013).

El buen desempeño de *Trichoderma* ante los cuatro patógenos es un indicador de la alta actividad de los mecanismos de biocontrol disponibles por parte de la cepa. En las pruebas *in vitro* se obtuvo evidencia de los procesos de competencia, antibiosis y parasitismo que logran la inhibición y destrucción de los patógenos de interés. El grado en que los afecta también está en función de la estructura celular propia de esos patógenos, que permiten el accionar del biocontrolador (Astorga-Quiroz *et al.*, 2014 y Vinay *et al.*, 2018).

La utilización de estos productos en la protección de las semillas es indispensable, ya que las pudriciones radicales son enfermedades que pueden provocarse por hongos habitantes del suelo como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotium* o *Macrophomina*. Cuando el ataque de estos hongos se produce en los primeros días después de la siembra se reduce la emergencia de las plántulas. Ataques más tardíos causan pudrición de las raíces (Aapresid, 2016). De ahí que es crucial la determinación de cuál

producto es el más eficiente en la inhibición de estos hongos para su aplicación antes de realizar la siembra.

Por otro lado, también se aprecia que *Fusarium* spp. fue el hongo más sensible a todos los tratamientos. El Celest top fue capaz de controlar su crecimiento, al igual que *Trichoderma*, quien manifiesta capacidad de competencia y antagonismo *in vitro* frente a *Fusarium* spp. Este resultado coincide con lo obtenido por Chavarría (2016), quien mediante la utilización de aislados nativos de *Trichoderma* spp, evaluó en condiciones de micro invernadero el efecto de aislados sobre el mal del talluelo en tomate, donde obtuvo que, a los tres días de crecimiento, los aislados de *Trichoderma* spp entraron en contacto con la colonia de *Fusarium* spp y a los ocho días, el antagonista cubrió por completo el micelio del fitopatógeno.

Similares resultados obtuvieron Crovo y Clemente (2015) en semillas de soja, al comparar la eficiencia de un fungicida biológico (*Trichoderma harzianum*) y uno químico (fludioxonil+metalaxil-M+tiabendazol), donde demostraron que el biofungicida mostró mayor control que el fungicida fludioxonil+metalaxil-M+tiabendazol, para los tres patógenos *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* spp. y *Phomopsis* spp.

El desarrollo de *Sclerotium rolfsii* fue abarcador en las placas; sin embargo, el mayor control lo ejerció *Trichoderma* spp., el mismo es capaz de inhibir la germinación de las esporas y la elongación de hifas (Cruz *et al.*, 2017). *Sclerotium rolfsii* inicia su infección en las raíces bajo la superficie del suelo, avanza por los tejidos internos del tallo y, bajo condiciones de alta humedad, produce un crecimiento blanco, algodonoso, en forma de estrías gruesas que se observan sobre la base del tallo, lo cual constituye el micelio del hongo. Sobre ese cuerpo fungoso se forman pequeños esclerocios blancos, redondos, que conforme maduran se tornan de color café a café oscuro (Araya y Gutiérrez, 2015).

Macrophomina phaseolina infecta a las raíces y avanza por el tallo, produce canchales hundidos y necrosis del tejido cerca de la superficie del suelo. Sobre el tejido infectado se producen diminutos esclerocios negros, que dan al tallo un aspecto ceniciento, de

color gris (Araya y Gutiérrez, 2015). El mismo fue mayormente controlado por Celest top, seguido por *Trichoderma*, los cuales fueron capaces de inhibir su crecimiento.

III.2 Efecto *in vitro* de diferentes antifúngicos en el control o prevención del desarrollo de hongos fitopatógenos en semillas de *Phaseolus* bajo condiciones controladas.

En la tabla 4. se presenta el efecto de los antifúngicos evaluados en la incidencia de diferentes hongos fitopatógenos en semillas de frijol. Se comprobó que todos los productos fueron capaces de inhibir en gran medida en relación al control, donde se evidenció la generación de gran número de hongos.

Tabla 4. Porcentaje de incidencia (%) de diferentes hongos fitopatógenos con la aplicación de antifúngicos.

PATÓGENOS	Control	%	CELEST TOP	%	TMTD	%	<i>Trichoderma</i>	%	<i>Trichoderma</i> + TMTD	%	P ±EE
<i>R. solani</i>	90	18	0	0	5	1	10	2	0	0	
<i>Fusarium sp.</i>	50	10	5	1	5	1	5	1	0	0	
<i>Sclerotium rolfsii</i>	65	13	5	1	0	0	0	0	0	0	
<i>Macrophomina phaseolina</i>	0	0	0	0	5	1	5	1	0	0	0,03 3,019
Total	205	41 ^a	10	2 ^c	15	3 ^b	20	4 ^b	0	0	

El análisis se realizó con los datos transformados a $\arcsen\sqrt{\% + 0,375}$ En la tabla aparecen los datos originales. a,b,c proporciones con letras diferentes presentan diferencias para $P < 0,05$.

La combinación *Trichoderma* +TMTD no fue capaz de controlar a los patógenos *in vitro* pero si en condiciones *in vivo*, esto pudiera deberse a la acción sinérgica de la mezcla de ambos productos bajo otras situaciones experimentales.

Al evaluar el porcentaje de incidencia de semillas con afectaciones se observó que la combinación de *Trichoderma* y TMTD es la que mayor efecto antagonista mostró sobre los patógenos. Sin embargo, aunque no hubo crecimiento de los patógenos se observó que las semillas germinaron, pero con poco vigor y mayor grosor de los tallos en las

plántulas, a diferencia de los demás productos evaluados. Esto corrobora lo expuesto por Muiño *et al.* (2006), quienes realizaron pruebas *in vitro* con los fungicidas oxiclورو de cobre, metalaxil y dimetomorf, los cuales fueron compatibles con diferentes especies de *Trichoderma*, mientras que zineb, mancozeb y tiram mostraron ligera toxicidad. Esto explica el comportamiento de las plántulas germinadas ante la presencia de la mezcla.

El menor valor de incidencia de las enfermedades se alcanzó cuando se protegió la semilla con el Celest Top 312 FS, el cual difirió significativamente con el control positivo. Similares resultados obtuvieron Ojeda (2014) y Rojas (2016) al mostrar que Celest Top 312.5 FS posee un amplio espectro de acción, lo que permite el control de hongos de la semilla y de importantes insectos plagas en el inicio del cultivo.

Syngenta (2009), publica que el plaguicida Thiamethoxam + Difenconazol + Fludioxonil pertenece al grupo de los Fenilpirroles, Triazol y Neonicotinoides, controla hongos e insectos chupadores y raspadores. Es penetrante, sistémico y provoca un mayor vigor en las raíces, con larga actividad residual para el fludioxonil y sistémico para el difenconazol, en el caso del Thiamethoxam tiene una fuerte acción sistémica, actúa por contacto e ingestión. Sin embargo, Syngenta (2011a) publica que el fludioxonil bloquea la acción de una enzima proteíno-quinasa, encargada de catalizar la fosforilación de la enzima reguladora de la síntesis del glicerol, compuesto que se encarga de regular la presión osmótica intercelular, a través de los procesos de intercambio de la membrana plasmática. De esta manera, la enzima reguladora no se desactiva y se estimula la síntesis del glicerol que, al acumularse, produce una hipertrofia que acaba destruyendo las células del hongo. Este modo de acción bioquímico es específico de los fenilpirroles.

Estos resultados difieren con los obtenidos por otros autores como Cruz-Triana *et al.* (2018), quienes realizaron un estudio del comportamiento del cultivar *Phaseolus vulgaris* L. ante las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. y *Uromyces appendiculatus* (Pers.), al tratarse con la cepa Ta. 13 de *Trichoderma asperellum* y Celest top, observaron que las aplicaciones con el producto biológico disminuyeron significativamente la incidencia y severidad de las enfermedades evaluadas y

mostraron un elevado potencial para el control de enfermedades producidas por *Fusarium* spp., a diferencia del control químico.

Por otro lado, Donmez *et al.* (2015), señalan que los agentes de biocontrol podrían desempeñar un papel esencial en el manejo de las enfermedades de la podredumbre de las raíces en papa y frijol común.

Se puede comprobar que la actividad antagonista de los productos no tiene correlación con los resultados obtenidos en el enfrentamiento de los patógenos en condiciones *in vitro*, ya que en este entran en juego otros factores que pueden interactuar y variar la actividad antibiótica frente el antagonista-patógeno.

Las semillas contaminadas por *Fusarium* spp. no germinaron y al encontrarse bajo condiciones de alta humedad, se observó el crecimiento de conidios de color crema sobre la semilla. Por otra parte, se apreció crecimiento de *Trichoderma* sobre *Fusarium*, lo que demuestra que la actividad controladora la realizan a través de la competencia por el espacio, el micoparasitismo y la antibiosis del biocontrol (Díaz, 2011). Se evidenció además que en una misma semilla pueden encontrarse varios microorganismos.

III.3 Efecto *in vitro* de diferentes antifúngicos en indicadores fisiológicos de *Phaseolus vulgaris* durante la primera etapa del desarrollo vegetativo.

En la figura 10 se presentan los resultados del porcentaje de germinación de las semillas ante el efecto de los antifúngicos evaluados. Se manifiesta que todos los productos aumentaron ($P < 0,001$) la germinación en relación al grupo control.

Al analizar estadísticamente los valores de germinación de las semillas según los tratamientos ensayados en placas (figura 10), no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos Celest top (99%), *Trichoderma* (99%), TMTD (95%) y la combinación *Trichoderma* +TMTD (95%). En cambio, en el grupo control (43%) si se presentaron diferencias con relación al resto de las variables debido a la contaminación por los hongos que no permitieron que las plántulas emergieran.

Se analizó el porcentaje de germinación a los 7 días después de la siembra, momento en que se considera que la germinación culmina en todas las semillas. Se conoce que la germinación de esta especie se produce entre los 5 y 7 días (NC 618:2008 y Vargas *et al.*, 2018).

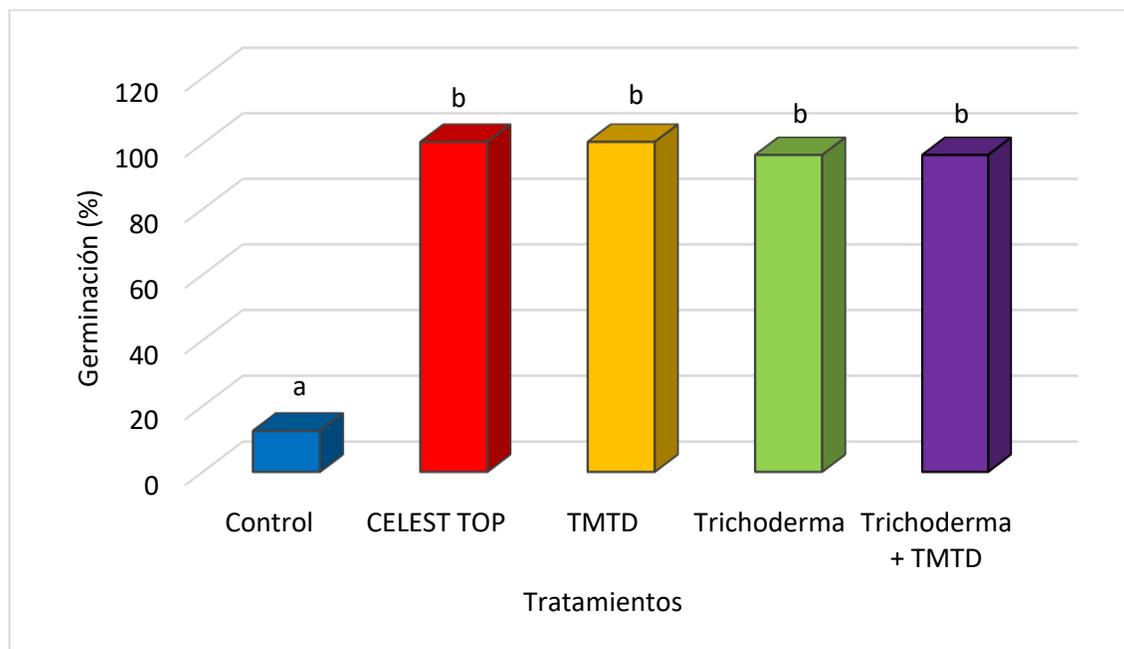


Figura 10. Efecto de diferentes antifúngicos en el porcentaje de germinación de la semilla. EE: 2,03. P=0,001 (Duncan, 1955).

Según Novo *et al.* (2009), cuando se induce la aplicación por inmersión durante una hora en Thiram se produce el incremento de la germinación de semillas de zanahorias. En otros cultivos, Meneses *et al.* (2010), trataron semillas de arroz con la formulación de Thiamethoxam + Difenconazol + Fludioxonil, para lo cual se evaluaron dos dosis (60 y 100 g i.a. /100 Kg. de semilla) y el porcentaje de germinación a los cuatro días de la aplicación del plaguicida y observaron que oscilaba entre 87,6 - 89,6%. A los 50 días después del tratamiento de la semilla con 100 g/100 kg de semilla, el porcentaje de germinación fue de 74,3 %, aún en esa fecha el resto de los tratamientos se encontraban por encima del 80,0%.

Resultados similares obtuvo Pérez *et al.* (2009), los cuales muestran que el fludioxonil es efectivo para la desinfección de patógenos fúngicos de la semilla de arroz y presenta mejor eficacia que la mezcla de benomyl + TMTD, con las dosis de 5 y 10 g

i.a. /100 kg de semillas de arroz, la cual generó mayores incrementos de la germinación, inhibición del desarrollo de necrosis en las plántulas y mejor efecto inhibitorio del crecimiento de las especies fúngicas presentes en las semillas.

En cambio, Afane *et al.* (2017) evaluaron 11 mezclas diferentes que incluyen fungicidas (Fludioxonil), insecticidas (Thiamethoxam), micronutrientes, nematicidas, reguladores de crecimiento y polímeros en semillas de soja, donde concluyeron que la germinación fue superior al 80%, además que es posible almacenarlas hasta 180 días. Este resultado indica que *Trichoderma* constituye una alternativa para incrementar la velocidad de germinación de las semillas. En este sentido, resultados similares obtuvieron Serbelló *et al.* (2014), quienes determinaron el efecto de diferentes alternativas biológicas sobre la germinación de las semillas de *Carica papaya* L., donde concluyeron que la aplicación de Fitomás-E y *Trichoderma harzianum* incrementó la velocidad de germinación y redujo el ciclo de las posturas de fruta bomba en la fase de vivero.

En el experimento que se realizó en condiciones controladas, las plántulas obtenidas del tratamiento con Celest top mostró mayor crecimiento del hipocótilo (15,21 cm), con diferencias estadísticas respecto al resto de los tratamientos (figura 11).

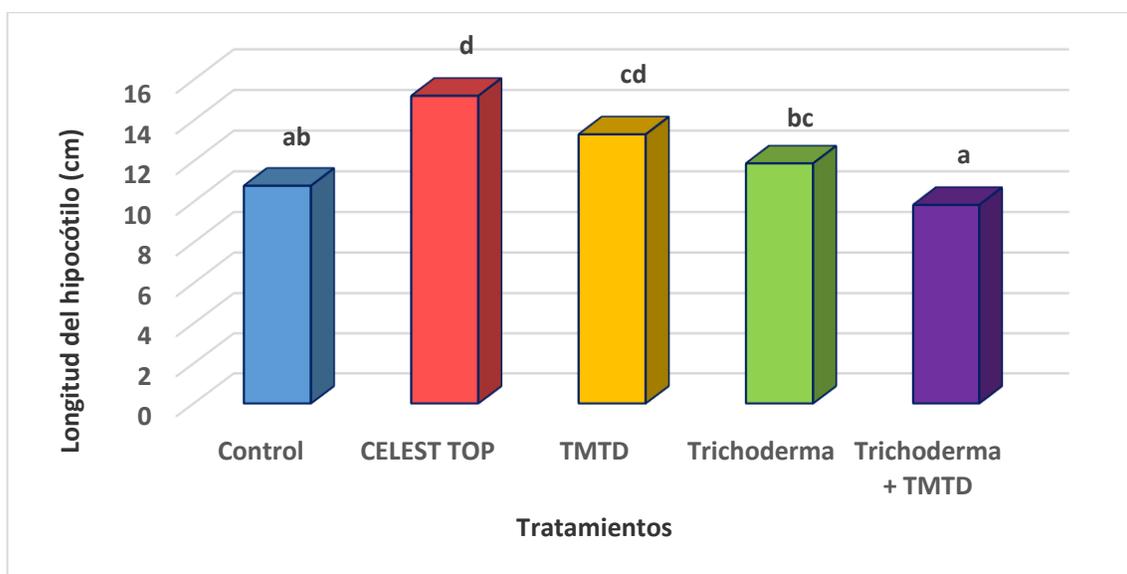


Figura 11. Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud del hipocótilo. EE: 0,67. P=0,0001 (Duncan, 1955).

El análisis del promedio de longitud del hipocótilo de las plántulas permitió observar que el T2 Celest top fue el más efectivo al estimular el crecimiento. La combinación del *Trichoderma* +TMTD (9,84 cm) fue el de menor acción y el tratamiento con *Trichoderma* (11,88 cm), tuvo semejanza con el control (10,78 cm).

Estos resultados indican que el T2 promueve el crecimiento del hipocótilo y con ello la longitud de la planta. Morfológicamente en el hipocótilo comienzan a formarse los haces vasculares que llevarán hacia las hojas el agua y los micronutrientes necesarios para realizar la fotosíntesis. Estos resultados se asemejan con los presentados por Morales *et al.* (2012), cuando trató a las semillas con fludioxonil a una dosis de 25 g i.a.L⁻¹, se incrementó la biomasa seca del epicótilo de plántulas de arroz, respecto a Carboxin+Thiram en dosis de 200 g i.a.L⁻¹ y el testigo tratado con agua.

Cabe resaltar, que el T5 (combinación del *Trichoderma* +TMTD) provocó mayor grosor del hipocótilo y menor tamaño, en comparación a los demás tratamientos.

El análisis del promedio de la longitud de la raíz principal de las plántulas en la siembra sobre papel (figura 12) permite mostrar que existen semejanzas entre las variantes, observándose que el tratamiento con Celest top es el que mejor se comportó en tal sentido.

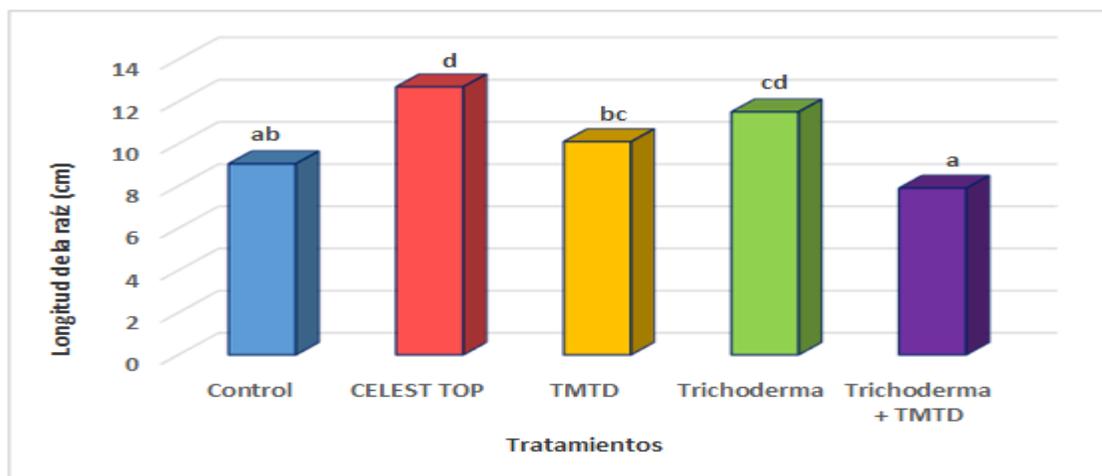


Figura 12. Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud de la raíz. EE: 0,54. P=0,0001 (Duncan, 1955).

En la figura 12 se muestra que se produjo un aumento del crecimiento de la raíz en las plántulas obtenidas de la inoculación con Celest top (12,7 cm) y *Trichoderma* (11,5 cm) a su vez con T3 TMTD (10,1 cm). En el caso de la combinación de *Trichoderma* +TMTD (7,9 cm), se observó poco desarrollo de la raíz y en algunas plántulas no existencia de la misma, donde se comprobó que pudo ocurrir un efecto fitotóxico debido a la combinación de un producto biológico y un químico. El mismo mostró semejanza con el testigo (9,0 cm).

Acebedo (2009) realizó un estudio sobre el efecto del Thiamethoxam en semillas de maíz y arroz, donde concluyó que estimula el crecimiento de las radículas y que este efecto es respuesta al genotipo empleado. Por su parte Salinas y Soriano (2014), evaluaron el efecto de *Trichoderma viride* FP-UNT 01 nativa coinoculado con *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc455-02 en el crecimiento de *Capsicum annuum* “ají paprika”, donde concluyeron que el control inoculado con *T. viride* FP-UNT 01 nativa presentó efecto estimulante en el crecimiento de las plántulas, reflejándose en el incremento de longitud de raíz, número de raíces laterales y peso seco de la parte radicular. Estas se evaluaron a los 20 y 30 días después de su inoculación y mostraron diferencias significativas con el control negativo.

Los resultados hasta aquí expuestos, constituyen un aporte al estudio del efecto de Celest top en las semillas de *Phaseolus vulgaris*, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas para la longitud del hipocótilo, de la raíz y de las plántulas, lo cual demuestra su potencial como bioestimulante en comparación con el control y demás tratamientos.

III.4 Efecto *in vivo* de *Trichoderma* Cepa A-53, Celest top 312 FS y TMTD 80% en los parámetros fisiológicos durante el crecimiento de semillas de *Phaseolus vulgaris*

En la tabla 5 se muestra el porcentaje de germinación o plántulas normales de las semillas de *P. vulgaris* en siembra sobre arena. Se obtuvieron resultados favorables al observarse entre 92 y 98% de germinación, solo destacar que la combinación de

Trichoderma con TMTD provocó el desarrollo de plántulas anormales, con insuficiente desarrollo de la raíz principal y crecimiento de la plántula, así como tallos enrollados.

Tabla 5. Efecto de diferentes antifúngicos en el porcentaje de germinación (%).

Germinación	Control	CELEST TOP	TMTD	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> + TMTD	P ±EE
Plántulas normales	97,5 ^b	95,5 ^b	94,0 ^b	97,0 ^b	85,5 ^a	0,0015 1,77
Plántulas anormales	2,5 ^a	4,5 ^a	6,0 ^a	3,0 ^a	14,5 ^b	0,0015 1,77

La capacidad de germinación y el vigor son los atributos principales involucrados en la calidad fisiológica de la semilla. La germinación es el proceso fisiológico mediante el cual emergen y desarrollan, a partir del embrión, las estructuras esenciales para la formación de una planta normal. Este proceso inicia con una variedad de actividades anabólicas y catabólicas, como la respiración, la síntesis de proteínas y la movilización de las reservas después de la absorción de agua (Desai, 2004). De ahí que este sea un indicador de calidad de la semilla.

La estimulación de crecimiento puede ser dependiente también de la etapa fisiológica de la planta; no obstante crecimiento inicial acelerado puede favorecer la planta por escape de enfermedades propias de patógenos que atacan en estados iniciales, como fue demostrado bajo sistemas *in vitro* (Hoyos-Carvajal *et al.* 2015).

No se presentan diferencias significativas en cuanto al número de plantas germinadas que el tratamiento con Celest top y el control, resultados obtenidos en la prueba de germinación en condiciones *in vivo*, en el sentido de que existe una influencia de los activos del formulado en la fisiología de las plantas, que favorece entre otros procesos la germinación. Por lo anterior, Acebedo (2009) concluyó que Thiamethoxam no reduce la calidad de la semilla en cinco híbridos de maíz ni de cinco variedades de arroz, pero mostró un efecto potencial sobre el vigor y la germinación del cultivo.

González (2013), expuso que resulta conveniente realizar la aplicación de los fungicidas Metalaxil, Fludioxinil, carbendazim y tiram en semillas de Alfalfa, ya que se podría conservar por un período mayor de cuatro meses sin reducir la germinación.

En cuanto al tratamiento con *Trichoderma* existe semejanza con el Control, se obtuvo mayor cantidad de plantas normales o sanas, lo que implica que esta contribuyó a proteger las plantas de frijol para reducir el número de semillas dañadas por hongos, en ambos tratamientos se obtuvo un 48% de plantas normales.

Se pudo observar crecimiento del *Sclerotium rolfsii* en la superficie de la arena en el tratamiento de las semillas con TMTD, este resultado demuestra que el producto no es capaz de controlar a dicho patógeno y corrobora lo obtenido en las pruebas *in vitro*.

En el caso de la combinación de *Trichoderma* +TMTD se obtuvo el mayor porcentaje de plántulas anormales, lo que corrobora el resultado que se obtuvo *in vitro* al observarse menor crecimiento de las plántulas y raíz. Según Araya y Gutiérrez (2015), los defectos incluyen raíces primarias atrofiadas; hipocótilo y epicótilos cortos y gruesos, retorcidos o enrollados; dirección invertida del desarrollo, como, por ejemplo, yemas dobladas hacia abajo; y deficiencias clorofílicas (plántulas blancas o amarillas).

La longitud de las plántulas (figura 13) obtenidas en siembras pasado 7 días de incubación muestra que existe semejanza entre Celest top (27,65cm) y Control (26,73cm) con mayor crecimiento entre los tratamientos, donde difieren respecto al TMTD (23,07cm) y *Trichoderma* (22,46cm), y el T5 (combinación de *Trichoderma* +TMTD) (16,60cm) difiere significativamente al resto de las variantes.

La altura de las plantas en el tratamiento con Celest top 312.5 FS (262,5 g Thiamethoxam, 25 g Fludioxonil, 25 g Difenconazol), presentó el valor muy similar al testigo en este ensayo. Estos resultados confirman el efecto bioactivador del Celest top, al demostrarse un mejor establecimiento y crecimiento inicial del cultivo, lo que concuerda con los resultados descritos por Clavijo *et al.* (2005) en Colombia y Rojas (2016) en Cuba, quienes encontraron un claro efecto bioactivador del thiamethoxan en ensayos con semillas de soya, maíz, arroz y algodón. Según estos investigadores, se demostró que thiamethoxan incrementa la velocidad enzimática, al favorecer el crecimiento de los meristemas.

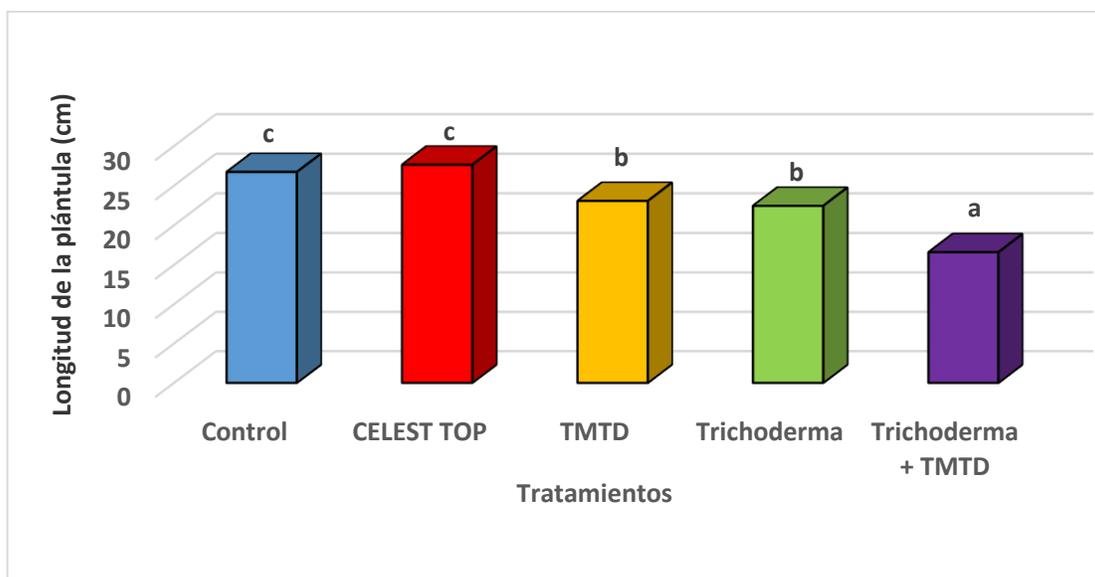


Figura 13. Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud de la plántula. EE: 0,89. $P=0,0001$ (Duncan, 1955).

De acuerdo con Liriano *et al.* (2015) y Benedetto *et al.* (2017) varios microorganismos tienen la capacidad de generar reguladores de crecimiento que aprovechan las plantas, para aumentar el crecimiento de las raíces y de la parte aérea de los vegetales.

Existen evidencias experimentales que *Trichoderma* spp. puede incrementar el crecimiento, aun cuando el suelo esté libre de patógenos, al actuar como bioestimulador (Olmedo y Casas, 2014 y Landero *et al.*, 2019).

En relación a la longitud promedio de la raíz de las plántulas de *Phaseolus vulgaris* en la siembra en arena (figura 14), el análisis de varianza demostró que existe diferencias y semejanzas entre los tratamientos. Se observó que existen diferencias entre el tratamiento T2 y T4 o T5. Según resultados obtenidos por Cruz *et al.* (2015), la longitud de las raíces y del diámetro de la nube de raíces, se incrementó con la aplicación con Celest Top 312 FS en relación al control tanto a los 7, 14 y 21 después de germinadas, así como en el número de hojas.

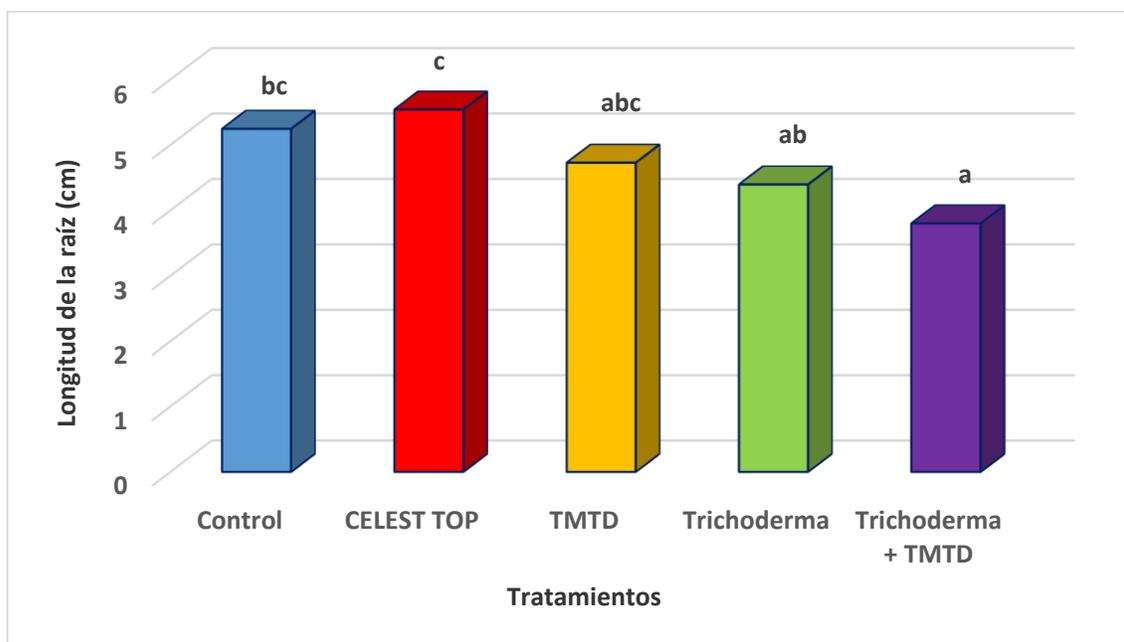


Figura 14. Efecto de diferentes antifúngicos en la longitud de la raíz. EE: 0,36. $P=0,016$ (Duncan, 1955).

Resultados similares se informaron por Clavijo *et al.* (2005) quienes explican que el incremento del desarrollo de las raíces en las plántulas tratadas se debe, al impacto de Thiamethoxam (uno de los ingredientes activos de Celest Top 312.5 FS) sobre la enzima glucosa -6-fosfato deshidrogenasa, que estimula la iniciación de la ruta de las pentosas de fosfato, al aprovechar el oxígeno presente y producir sustratos para la respiración, y por lo tanto, la germinación.

Díaz *et al.* (2013) destacaron que al tratar la semilla de soya con los protectantes Celest Top, Gaucho MT y *Trichoderma harzianum* en condiciones de campo, los tratamientos aceleraron el proceso de germinación y redujeron el porcentaje de raíces con síntomas de pudrición, además encontraron un incremento de la altura promedio de las plantas.

Romero-García *et al.* (2016), concluyen que el *Trichoderma harzianum* tiene afinidad por los exudados de semillas y raíces de *Phaseolus vulgaris* para transformarlos en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, lo anterior explica su efecto positivo en

la fenología y biomasa de esta leguminosa, lo cual puede considerarse como una ventaja para evitar el uso de fungicidas químicos.

En este sentido, Mohiddin *et al.* (2010) refiere que las especies de *Trichoderma* durante interacciones con plantas exhiben entre otras características: aumento de la raíz, disparan su crecimiento y contribuyen a la resistencia o tolerancia de enfermedades. Asimismo, Hernández *et al.* (2011) mencionan que algunas especies de *Trichoderma* tienen capacidad para incrementar significativamente la biomasa de la raíz y el follaje de las plantas.

La interacción de la raíz de las plantas y *Trichoderma* conlleva a la fase de reconocimiento, ataque, penetración, colonización y transferencia de nutrientes. Al tener una relación simbiótica, la planta también aporta una serie de beneficios al agente de biocontrol, como es el transporte de sacarosa por parte de la planta y su posterior hidrólisis por *Trichoderma*, al influir en su expansión a la rizosfera y su penetración en la raíz misma (Mayo, 2017).

Por otra parte, Pereira *et al.* (2014) y Stewart *et al.* (2014), obtuvieron que la inoculación con *Trichoderma harzianum* promovió el crecimiento del frijol común, el tamaño en general, el área foliar, el área de la raíz y el número de raíces laterales en comparación con las plantas cultivadas sin presencia de hongos.

En los resultados obtenidos del peso fresco de las plántulas (figura 15), se refleja que dos de los tratamientos difieren al resto de las variantes. Se observa que la masa de las plántulas disminuyó significativamente de las semillas inoculadas con *Trichoderma* (28,74g) y la combinación de *Trichoderma* +TMTD (25,46g), en comparación con el control no inoculado. Sin embargo, no se muestra diferencia entre las plántulas de la aplicación de Celest top (86,37g) y TMTD (83,75g) con el Control (89,25g).

La medición del peso fresco de las plántulas indica que el proceso de movilización y transferencia de los nutrientes del endospermo al embrión para crear las plántulas no se afectó por la inoculación de las semillas con Celest top y TMTD.

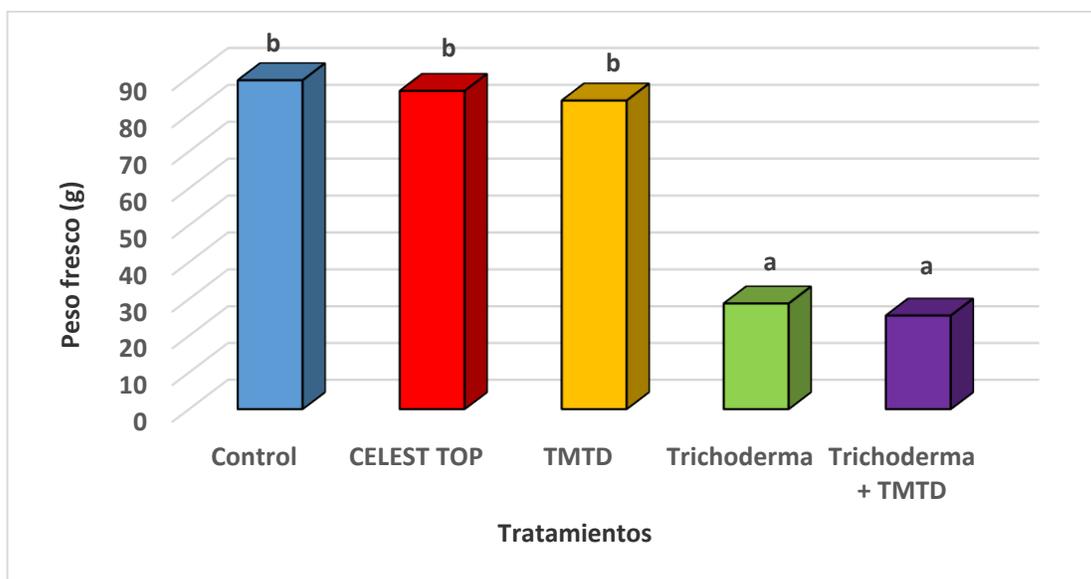


Figura 15. Efecto de diferentes antifúngicos en el peso fresco de las plántulas. EE: 16,44. $P=0,004$ (Duncan, 1955).

Camargo-Cepeda y Ricardo (2014) opinan que la aplicación de *Trichoderma* spp. influye en variables fisiológicas como germinación, área foliar, peso seco y fresco de la raíz, peso seco y fresco de la parte aérea y longitud de raíz, al favorecer el rendimiento productivo del cultivo. Sin embargo, difieren de los obtenidos por Jiménez *et al.* (2011), quienes reportan valores de masa fresca inferiores respecto al control, donde aplicaron *Trichoderma harzianum*, dato que coincide con los obtenidos en el presente trabajo.

Páramo y Hernández (2017) afirman que el *Trichoderma* acelera el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios, los cuales aumentan el volumen, la altura, así como el peso de la planta.

El comportamiento del peso seco de las plántulas (figura 16) muestra que existen semejanzas entre las semillas tratadas con Celest top (4,85 g) y TMTD (4,75 g) respecto al control (4,63 g). Se observan diferencias estadísticas en relación a las semillas peletizadas con *Trichoderma* (3,45 g) y a la combinación *Trichoderma* +TMTD (3,44 g).

Se conoce que la longitud y peso seco de las raíces determinan el tamaño del sistema radical y el volumen de suelo que pueden explorar para la absorción de agua y nutrientes; la velocidad de crecimiento (tasa relativa de crecimiento o tasa de elongación radical) y la abundancia de las ramificaciones de las raíces laterales, son también características importantes para el desarrollo de un sistema radical extendido y profundo, que pueda capturar humedad eficazmente en las capas cercanas a la superficie del suelo y a mayor profundidad (Barrios-Gómez *et al.*, 2012).

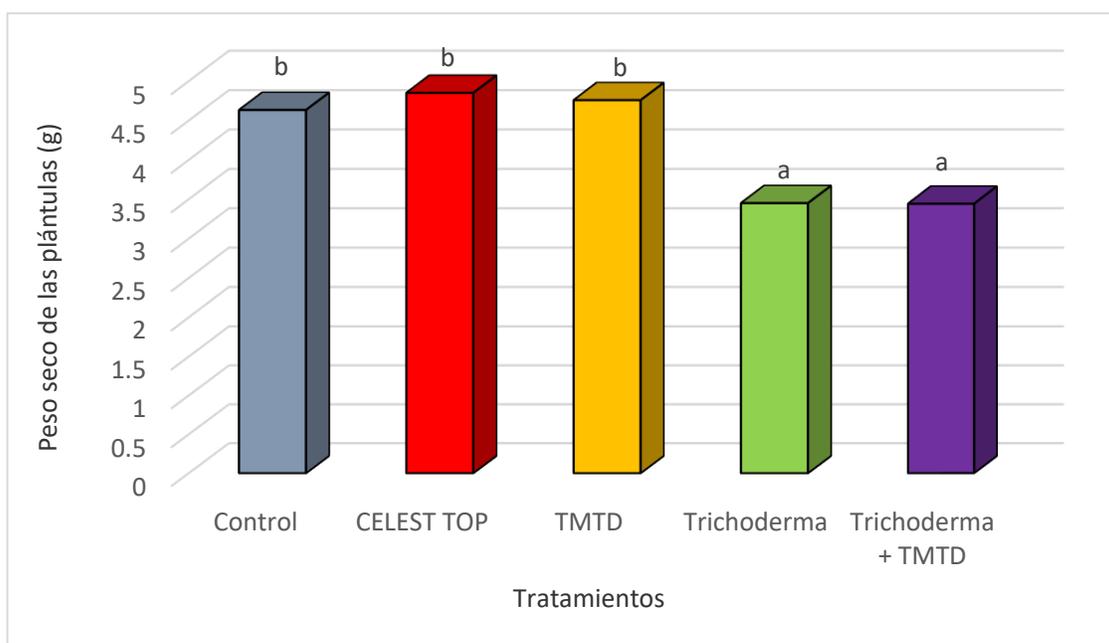


Figura 16. Efecto de diferentes antifúngicos en el peso seco de las plántulas. EE: 0,34. P=0,0143 (Duncan, 1955).

Martínez (2013) realizó un estudio para evaluar el efecto de distintas cepas de *Trichoderma* en el cultivo de melón, donde destaca que las cepas no provocaron diferencias respecto al control. Resultados similares obtuvieron Beyhaut y Sicardi (2013), cuando trataron semillas de soja con curasemillas (fungicida/insecticida/sin curar), dos tipos de inoculantes (turba/líquido), entre los cuales se encontraban cepas de *Bradyrhizobium elkanii* U-1301 y U-1302, el fungicida C+T (carbendazim + tiram) y un insecticida (Imidacloprid y Tiametoxam). Estos autores concluyeron que para un tiempo de espera de siete días, todos los principios activos causaron una reducción del peso seco aéreo de las plantas.

III.5 Análisis económico

En las tablas 6 y 7 se presentan datos actualizados del comportamiento de la producción de frijol y su precio de venta en el año 2019 y los gastos que se registran con la aplicación de productos antifúngicos.

Tabla 6. Ganancias obtenidas en el cultivo de frijol negro Triunfo-70 en el año 2020.

Indicador	U/M		Ganancia
Producción (año 2019)	kg	114047,5	
Precio de venta	\$/kg	30,70	\$3501258,25

Tabla 7. Gastos de aplicación de los productos.

Indicador	U/M		Gastos
Trabajador	U	4	
Salario/Trabajador	\$/U	275,00	\$1100,00
Producción	Kg/h	1380	
Jornada diaria	h/día	5	
Energía	kW/h	3,5	17,5 kW/día
Costo	\$/kW	0,22	3,85 \$/día

Según los resultados obtenidos en la producción de frijol negro variedad Triunfo-70 del año 2019 de la UEB Semillas Matanzas, se obtuvo una ganancia de \$ 703 644,00 (CUP). Para realizar este proceso es necesaria la participación del capital humano, donde se incurre en un gasto de \$ 1100,00 total por meses. La tratadora Arktos es capaz de producir 1380 kg/h, por lo que, se gasta 17,5 kW de energía diaria para \$ 3,85 (cup) en el periodo.

En la tabla 8 se presentan los resultados del análisis económico realizado al tratamiento de las semillas con los diferentes fungicidas

Tabla 8. Resultados económicos del tratamiento de semillas con los diferentes fungicidas a escala de laboratorio.

Grupos		Control		CELEST TOP		TMTD		Trichoderma		Trichoderma + TMTD	
Costos Fijos											
Conceptos	UM	Cantidad	Precio CUP	Cantidad	Precio CUP	Cantidad	Precio CUP	Cantidad	Precio CUP	Cantidad	Precio CUP
Semillas acopiadas	kg	1	23,05	1	23,05	1	23,05	1	23,05	1	23,05
Fungicida	mL	-	-	0,003	0,60	0,098	0,21	0,005	0,05	0,005+0,098	0,26
	kg										
Total de costos fijos	CUP		23,05		23,65		23,26		23,10		23,31
Ingresos											
Semillas certificadas	kg	1	30,70	1	30,70	1	30,70	1	30,70	1	30,70
Ingresos totales	CUP		30,70		30,70		30,70		30,70		30,70
Ganancias (Ingresos-costos)	CUP	-	7,65		7,05		7,44		7,60		7,39

Como se aprecia en la tabla 8, desde el punto de vista económico se obtienen mayores ingresos sin el empleo de los diferentes fungicidas, sin embargo, sería necesario realizar un estudio económico que incluyera los resultados a nivel de campo, ya que, sin el análisis de los resultados de la germinación, desarrollo de plantas anormales, incidencia de microorganismos patógenos, vigor de las plantas, etc, no se puede realizar una valoración de los resultados económicos. Los experimentos desarrollados en el presente trabajo se hicieron a escala de laboratorio, por lo tanto, son insuficientes para ser concluyentes.

No obstante, por las observaciones de los indicadores fisiológicos, especialmente la germinación de la semilla, se pudo constatar que todos los productos empleados incrementan el porcentaje de germinación a nivel de laboratorio si se comparan con el control. A partir del análisis integrado del efecto de cada uno de los productos en los indicadores que se evaluaron se puede resumir que CELEST TOP fue el fungicida con mejores resultados, ya que tuvo mayor efecto en la germinación de la semilla, en la longitud del hipocótilo, la raíz y las plántulas, el peso fresco y seco y por otra parte presentó una alta actividad antifúngica, al inhibir el desarrollo de *Fusarium* spp., *Macrophomina* spp. y *Rhizoctonia* spp.

En la UBB Semillas Matanzas se aplica como fungicida Celest top, el cual tiene un costo de \$ 0,60 (CUP) por kg de semilla y se obtienen ingresos de 7,05 CUP por cada kg de semilla tratada. Aunque existe una diferencia de 0,60 CUP de ingresos en relación al control, es un fungicida efectivo frente a hongos patógenos y estimulación de los indicadores fisiológicos.

III.6 Análisis ambiental

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, mundialmente conocida como FAO (por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*) establece que un plaguicida “es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento,

transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales” (FAO, 1990).

Los plaguicidas existen desde el comienzo de la agricultura, en el amanecer de la historia. Si antes eran productos naturales, hoy son el resultado de síntesis química. Esto los ha hecho mucho más eficaces para combatir plagas, pero mucho más susceptibles de contaminar el ambiente y deteriorar la salud humana. En la actualidad prevalecen las sustancias utilizadas para controlar malezas, insectos, hongos y ácaros. Un caso particular son los llamados curasemillas, principalmente fungicidas o insecticidas, que solo se utilizan para tratar semillas en espera de la siembra (Bedmar, 2011). Esta técnica emplea la aplicación de productos químicos preventivos tempranos para reducir el número de aplicaciones posteriores, que puede ser esencial para proteger a las plántulas durante el periodo crítico de establecimiento del cultivo y reducir la exposición de los organismos benéficos al producto (Syngenta, 2011b).

Para satisfacer las necesidades de la demanda creciente de alimentos y responder de manera efectiva a la mayor demanda de recursos naturales limitados, se necesitan nuevas estrategias para aumentar el rendimiento de los cultivos. En todo el mundo, cada vez son más las investigaciones que apuntan a la salud de la raíz como la clave para el mejoramiento de la productividad de los cultivos en el futuro. El tratamiento de las semillas es una de las estrategias para garantizar raíces más fuertes y sanas con la protección de los sistemas radiculares de las enfermedades originadas en el suelo. Se estima que el 80% de todos los problemas de las plantas comienzan por problemas en el suelo o en la raíz (Syngenta, 2011b).

Según Cruz *et al.* (2015), el Celest Top controla patógenos como Ascomicetos Basidiomicetos y Deuteromicetes presentes en la semilla. Representa una nueva química y un avance tecnológico. Garantiza homogeneidad en la solución al ser disuelto en agua y brinda calidad en el tratamiento. Evita problemas de decantación y taponamiento de los equipos de tratamiento. Protege el cultivo durante la etapa crítica de establecimiento. Disminuye el deterioro de la semilla en almacenamiento y previene la erosión biológica de la semilla. Permite la permanencia más prolongada del producto

alrededor de la semilla. Garantiza un mayor número de plantas con mejor desarrollo y más rendimiento de la forma siguiente: 1. Mejor aprovechamiento de agua, de nutrientes, lo que evita y controla las malezas dañinas y a su vez reduce el tiempo de exposición a los organismos del suelo. 2. Mejor enraizamiento, y confiere más resistencia al estrés (hídrico, pH y nutrientes). 3. Permite mejor flexibilidad en el manejo de la siembra, con el almacenamiento de semillas tratadas, sin perder germinación ni vigor. 4. Mejor protección contra insectos. 5. Mejor productividad.

Por otro lado, según Carrillo *et al.* (2015) y González (2018), destacan que el uso de los insecticidas, especialmente imidacloprid, chlotianidin y thiamethoxam (ingrediente activo Celest top), son los más cuestionados en el tratamiento a la semilla, sin embargo, constituyen actualmente el 30% del mercado mundial de insecticidas y el 80% de los tratamientos que se aplican a la semilla. Debido a que son solubles en agua, lo cual les permite moverse sistémicamente a través de la planta, vía xilema (aplicaciones a la semilla pueden originar residuos en las flores o bien residuos en el suelo pueden ser transportados a la parte aérea), además pueden contaminar medios acuáticos y el suelo por su residualidad.

En tal sentido Prada (2017), anunció que el uso de plaguicidas sintéticos (insecticidas/fungicidas) puede destruir los mecanismos de control biológico que mantienen a raya a las plagas e incluso hacer que organismos que no se comportaban como plagas lo hagan al desaparecer sus enemigos naturales (plagas secundarias).

En el presente trabajo los mejores resultados estuvieron en las semillas tratadas con Celest top, por encima de lo obtenido con la aplicación de *Trichoderma* spp. Se hace necesario realizar una nueva evaluación con la utilización de otras cepas de este hongo, ya que varios autores manifiestan que el control biológico mediante el uso de microorganismos benéficos del suelo, en especial, diferentes especies de *Trichoderma*, representa un medio sostenible para eliminar una amplia gama de patógenos habitantes del suelo (Camargo y Ávila, 2014).

Se hace necesario enfatizar que se deben continuar los estudios sobre los efectos de otras cepas del biofungicida *Trichoderma* spp., ya que este microorganismo también tiene la capacidad de biotransformar la celulosa, acelerar la reproducción celular, mineralizar el nitrógeno y algunas proteínas presentes en el suelo, lo cual permite que

estos procesos biológicos de degradación favorezcan el crecimiento de la planta (Sánchez-García *et al.*, 2017).

Es primordial señalar que aquellos trabajadores que efectúan la aplicación de los productos a las semillas, se realizan la prueba de la Colinesterasa de manera periódica, debido a los efectos que pudieran producir los productos que se utilizan en el proceso hacia las personas. Según el Listado de plaguicidas (2016), el Celest top de acuerdo a la clasificación toxicológica es considerado un producto ligeramente peligroso (TAM:III).

Los resultados que se obtienen muestran la posibilidad de aplicar alternativas biológicas y orgánicas en el manejo de fitopatógenos, las cuales permiten establecer una estrategia que sustituya el uso de fungicidas sintéticos, y se garantice el carácter agroecológico de las producciones de legumbres en los campos afectados por estos hongos, dirigido, fundamentalmente, a la protección del ambiente y la salud del personal en el proceso de producción.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El fungicida Celest top demostró mayor efectividad frente a los hongos fitopatógenos en semillas de frijol a escala de laboratorio.
2. La germinación y el desarrollo fisiológico de las plántulas se favoreció con la aplicación del fungicida Celest top a las semillas de frijol a nivel de laboratorio.
3. El análisis de factibilidad económica de los fungicidas estudiados mostró resultados económicos favorables con la obtención de ganancias a escala de laboratorio.

V. Recomendaciones

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios que comprueben el biocontrol de los fungicidas propuestos, frente a los patógenos estudiados mediante pruebas de almacenamiento y campo.
2. Evaluar el efecto de otras cepas de *Trichoderma* como control biológico en semillas de frijol.
3. Evaluar la viabilidad de las semillas bajo el efecto de estos fungicidas en el tiempo.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo Carrillo, J.C. 2009. Evaluación del efecto de la aplicación de Thiamethoxam sobre la calidad de semilla de cinco híbridos de Maíz (*Zea maíz* L.) y cinco variedades de arroz (*Oryza sativa*). Tesis en opción al título de Máster en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia.
- Álvarez, F.A.; Benítez, G.R.; Rodríguez, A.E.; Grande, M.O.; Torres, M.M.; Pérez, R.P. 2014. Guía técnica para la producción de frijol común y maíz. p.7-21.
- Aparicio, V.; De Gerónimo, E.; Hernández Guijarro, K.; Pérez, D.; Portocarrero, R.; Vidal, C. 2015. Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. Ediciones INTA, 1ª Edición. 73 p.
- Araya, R.; Gutiérrez, M.V. 2015. Producción de semilla de alta calidad de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Costa Rica. Ediciones Didácticas Nexo E.I.R.L.238 p.
- Arias, J.H.; Jaramillo, M.; Rengifo, T. 2007. Manual: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijol (*P. vulgaris*, L.) Voluble. Centro de Investigación "La Selva". Medellín. 168 p.
- Arvizu, D.I.; García, J.C.; Bernal, M.; García, R.S.; Domínguez, M.C. 2011. Degradación del ditiocarbamato de sodio a diferentes condiciones del proceso: Matriz, pH, iluminación y tiempo. Libro electrónico coeditado con la Academia Mexicana de Ciencias, Artes, Tecnología y Humanidades. México D.F., México.89 p.
- Asociación Argentina de Productores En Siembras Directas (Aapresid). 2016. Primero la calidad, Estrategias para mejorar la próxima campaña. Red de Innovadores, Revista Técnica Soya. p. 4-8.
- Astorga, K; Meneses, K; Zúñiga, C; Brenes, J; Rivera, W. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha. 27(2):82-91.

- Barrios, E.J.; López, C.; Kohashi, J.; Acosta, J.A.; Miranda, S.; Canul, J. y Mayek, N. 2012. Comparison of morphological structures in bean root and hypocotyl. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(4): 6-12.
- Bedmar, F. 2011. Informe especial sobre los plaguicidas agrícolas. En: ¿Qué son los plaguicidas?, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 21(122):9-16.
- Benedetto, N., Corbo, M.R., Campaniello, D., Cataldi, M., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Flagella, Z. 2017. The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS Microbiology* 3:413-434.
- Beyhaut, E.; Sicardi, M. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en soja: compatibilidad entre curasemillas y rizobios. INIA TREINTA Y TRES - Estación Experimental del Este ARROZ - SOJA Resultados Experimentales. Capítulo 9:10-13.
- Blaco, M.; Corrales, C.; Chevez, O. y Campos, A. 2016. The growth and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an intercalated crop with coffee (*Coffea arabica* L.). *Mesoamerican Agronomy* 6:134-139.
- Blanco, Y.; Leyva, A. 2013. Las arvenses y su entomofauna asociada en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) posterior al periodo crítico de competencia. *Cultivos tropicales* 17(3): 51-65.
- Bocanegra, S. 2010. Efecto del insecticida Cruiser® 35 FS en las características de germinación, vigor, crecimiento radicular y plúmula de semillas de maíz (*Zea mays* L.) en comparación con otros insecticidas comerciales. Tesis en opción al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras.
- Bolívar, M. 2007. Manejo de Granos en Almacenamiento, causas de deterioro y prevención. *ILENDER*, Perú. 15:180-184.
- Buffington, B. ; Gaul. A. 2010. Category 4, Seed treatment, in Iowa Commercial Pesticide Applicator Manual, Kansas State University, Manhattan, KS. p. 40.

- Cabrera, Y.L.; Santana, Y.; Miranda, E. 2017. Efecto de la inoculación de *Rhizobium* sobre el crecimiento de (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones semi controladas. Centro de Información y Gestión Tecnológica (CIGET) Pinar del Río. 19 (1): 66-74.
- Calero, A.; Castillo, Y.; Quintero, E.; Pérez, Y.; Olivera, D. 2017. Efecto de cuatro densidades de siembra en el rendimiento agrícola del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia 7(1): 88-100.
- Cámara de Comercio de Bogotá (CCB).2015. Manual de frijol. Programa de Apoyo Agrícola y Agroindustrial Vicepresidencia de Fortalecimiento Empresarial Cámara de Comercio de Bogotá. 59 p.
- Camargo, D.F.; Ávila, E.R. 2014. Efectos del *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). Ciencia y Agricultura 11(1):91-100.
- Carrillo, R.; Neira, M.; Silvestre, L. 2015. Los insecticidas neonicotinoides y los apoideos: una situación que merece una preocupación especial. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Austral de Chile. 6 p.
- Castellanos, J.; Guzmán, H.; González, E.; Acosta-Gallegos, J. A.; Ochoa, R.; Mejía, C.; Pajarito, A.; Núñez, S. y Fernández, P. 1994. Efecto de la localidad de siembra sobre el contenido de proteína y otras características de calidad de frijol común, *Phaseolus vulgaris* L. Rev. Agric. Téc. Méx. 20:73-83.
- Castro, A.M.; Rivillas, C.A. 2012. *Trichoderma* spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. Centro Nacional de Investigaciones de Café "Pedro Uribe Mejía", Colombia. 38:33.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1981. Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.). Cali, Colombia. 50 p.
- Chavarria, M.R. 2016. Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp para el manejo de hongos causantes de mal del talluelo en tomate (*Solanum lycopersicum*

- L.). Tesis en opción al título de Máster en Agroecología y Desarrollo sostenible. Universidad Nacional Agraria, Nicaragua.
- Chiriboga, H., Gómez, G., Garcés, K. 2015. Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: En *Trichoderma* spp. para el control biológico de enfermedades. IICA, Paraguay. 28 p.
- Cid R, J. A.; Reveles H, M.; Velázquez V, R. y Mena C, J. 2014. Producción de semilla de frijol. Folleto Técnico No. 63. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. México. 69 p.
- Clavijo, P. J; Acevedo J.C; Frasser E. 2005. Efecto fisiológico de la aplicación de CRUISER® sobre el vigor de semillas de diferentes especies en Colombia. Presentación para productores. Universidad Nacional de Colombia – Syngenta. 66-73.
- CNSV. 2016. Lista oficial de plaguicidas autorizados. Registro Central de Plaguicidas, CNSV. Minag, La Habana. 146 p.
- Commonweath Mycological Institute (CMI). 1979. Description of pathogenic Fungi and Bacteria. England.
- Crovo, V.; Clemente, G.E. 2015. Eficacia de fungicidas de síntesis y biológico en base a *Trichoderma harzianum* para controlar patógenos de semillas de soja. Revista FAVE - Ciencias Agrarias 14(2):13.
- Cruz, A.; Rivero, D.; Martínez, B.; Echevarría, A.; Infante, D. 2018. Manejo de hongos fitopatógenos en *Phaseolus vulgaris* L. con la aplicación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Revista de Protección Veg. 33(3): 7 p.
- Cruz, A.; Rivero, D.; Martínez, B.; Echevarría, A.; Tania, A. 2017. Evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la Soya (*Glycine max* L.). Cultivos Tropicales, INCA 38(4):15- 21.
- Cruz, M.; Cruz, M.; Mesa, R.; Ortega, R. 2015. Efecto de Celest Top 312 FS sobre el vigor de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Sesión: La gestión de los

- plaguicidas químicos y su integración. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Fitosanidad 19 (2):142-147.
- Desai, B.B. 2004. Seed Handbook, Biology, Production, Processing, and Storage. Second edition. Marcel Dekker, INC. USA. 787 p.
- Díaz Castellano, M. 2011. Incidencia de *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el Manejo Integrado. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas). Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.
- Díaz, M.; Álvarez, J. F.; Rodríguez, H.; Naranjo, F.; Vidal, S.; Rodríguez, R.; Leiva, Y.; González, C.; Albuernes, F. 2013. Efectividad de *Trichoderma harzianum*, Gaucho MT y Celest Top, como protectantes de semillas de soya (*Glycine max.* (L.) Merrill). XIV Congreso Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana.
- Donmez, M. F.; Uysal, B.; Demirci, E.; Ercisli, S.; Cakmakci, R. 2015. Biological control of root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn on potato and bean using antagonist bacteria. Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus 14 (5):29-40.
- Duarte, Y.; Pozo, L.; Martínez, B. 2018. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislados de *Fusarium* spp. Rev. Protección Veg. 33(1):10.
- El Hadrami, A.; Adam, L.R.; El Hadrami, I.; Daayf, F. 2010. Review chitosan implant protection. Mar Drugs 8:968–987.
- Empresa Productora y Comercializadora de semilla (EPCS). 2017. Procedimiento para el tratamiento de semillas. Vig diciembre 2016.16 p.
- Escoto, N.D. 2015. Manual para el cultivo de frijol en Honduras. Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA). Tegucigalpa, Honduras. II Edición. 45 p.
- Esqueda, V.; Durán, A.; López, E. 2016. Effect of the time and type of weeding on residual moisture growing beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Mesoamerican Agronomy 8(1):59-64.

- Expósito, R.; García, N. 2011. Comportamiento productivo de cultivares de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*, L.) en la Cooperativa de Créditos y Servicios "José Manuel Rodríguez" del municipio Jesús Menéndez. Observatorio de la Economía Latinoamericana. Disponible en: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/cu/2011/epgb.htm>. [Consulta: 7 de enero de 2020].
- FAO. 1990. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Roma. 40 p.
- FAO. 2018. FAOSTAT-statisticaldatabases. FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>. [Consulta: 4 de marzo de 2020].
- Faure, B.; Benítez, R.; León, N.; Chaveco, O.; Rodríguez, O. 2013. Guía técnica para el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Editora Agroecológica, Artemisa. 35 p.
- Fernández, G.L. 2015. Manual para la producción y conservación de semillas. Instituto de investigaciones fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), La Habana. p. 103-109.
- Fernández, Y. 2010. Empleo de organismos antagonistas y sustancias naturales en el tratamiento de las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. contra hongos fitopatógenos del suelo. Trabajo de Diploma (Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2016. Panorama Agroalimentario: Frijol 2016. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. 36 p.
- Font H Noda, Aida., Torres, Verena., Herrera, Magaly., Lizazo, D., Sarduy, Lucía. & Rodríguez, Lourdes. 2007. Paquete estadístico ComparPro versión 1. Instituto de Ciencia Animal, Dpto. Biomatemática

- Franco, B. M.; Orrego, A.L. 2013. Compatibilidad *in vitro* de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas. Universidad Nacional de Asunción (FCA-UNA), Paraguay. 15 (1):15-22.
- Gómez, H.; Soberanis, W.; Tenorio, M.; Torres del Águila, E. 2013. Manual de producción y uso de hongos antagonistas. Perú. 34p.
- Gómez, M.I. 2018. Comercialización de agentes de control biológico. En: Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Aplicaciones y perspectivas. Agrosavia, Capítulo 16,2:512 p.
- González, G.; Mendoza, F.M.; Covarrubias, J.; Morán, N.; Acosta, J.A. 2008^a. Rendimiento y calidad de semilla de frijol en dos épocas de siembra en la región del bajo. Agricultura Técnica en México 34(4):421-430.
- González, M.; Castellanos, L.; Ramos, M.; Pérez, G. 2008^b. Evaluación de cepas de *Trichoderma*spp. contra patógenos en semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz. Centro Agrícola 35(1):11-15.
- González, M.; Castellanos, L.; Ramos, M.; Pérez, G. 2015. Efectividad de *Trichoderma*spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol. Instituto de investigaciones de sanidad vegetal. Fitosanidad 9 (1):37-41.
- González, P. 2018. Efectos de los Neonicotinoides en las Abejas y Regulaciones de la Unión Europea, Estados Unidos de Norteamérica, Canadá y Chile. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile, Asesoría Técnica Parlamentaria. 6 p.
- González, S. 2013. Uso de curasemillas en alfalfa. In Reunión Técnica. La Estanzuela, INIA. Serie Actividades de Difusión no. 711. Sitio argentino de producción animal. p. 37-41.
- Granma. 2020. Bloqueo y plagas: Ministerio de la Agricultura en Cuba informa afectaciones en producción de frijol para la población. Disponible en: <http://www.granma.cu/cuba/2020-02-27/bloqueo-y-plagas-ministerio-de-la->

agricultura-en-cuba-informa-afectaciones-en-produccion-de-frijol-para-la-poblacion-27-02-2020-11-02-25. [Consulta: 4 de marzo de 2020].

Guerra, J.P.; Ramírez, G; Ramos, R. 2013. Tecnologías para la producción y el beneficio de semillas de granos y oleaginosas. En: Cultivo del frijol-alubias-habichuelas. Empresa productora y comercializadora de semillas (EPCS). p. 1-10.

Hernández, J.L.; Quiroz, J.D.; Díaz, A.; García, J.G., Bustamante, A.J.; Gill, H.R. 2012. Detection of metabolites in Flor de Mayo common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their response to inoculation with *Trichoderma harzianum*. African Journal of Biotechnology 11(55): 11767-11771.

Hernández, J.L.; Sánchez, M.I.; González, J.M.; Quiroz, J.D; García, J.G.; Gill, H.R. 2015. Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Brazilian Journal of Microbiology 46(4): 1093-1101.

Hernández, M.J.; Sánchez, P. M.; García, O. G.; Mayek, P. N.; González, P. J.; Quiroz, V.J. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México. Rev. Colomb. Biotecnol. XIII (2):176-185.

Hoyos, L.; Cardona, A.; Osorio, W.; Orduz, S. 2015. Efecto de diversos aislamientos de *Trichoderma* spp. en la absorción de nutrientes en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en dos tipos de suelo. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 9(2): 268-278.

Instituto de Ciencias y Tecnologías Agrícolas (ICTA). 2010. Manual Técnico Agrícola: Producción comercial y de semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Guatemala. 45 p.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), COSUDE.2019. Proyecto RED SICTA. Guía de identificación y manejo integrado de las enfermedades del frijol en América Central. Disponible en: <https://orton.catie.ac.cr/repdoc/A3846E/A3846E.PDF>. [Consulta: 8 de marzo de 2020].

Jara, C.E.; Giraldo, D.C. 2016. Manual: Manejo agronómico de frijol (*P. vulgaris* L.) Cartilla 1, Asociación Mundial de Investigación Agrícola (CGIAR), Programa de

- Investigación en Cambio Climático Agricultura y Seguridad alimentaria (CCAFS), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).8 p.
- Jardine, D. 2013. The evolution of seed treatment Phytopathol News. 47: 22.
- Jiménez, C.; Sanabria, N.; Altuna, G.; Alcano, M. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 28: 1-10.
- La Bell, F. 1989. Beans gain recognition for nutritional advantages. Food Processing 50(5):108-115.
- Landero, N.; Lara, F.M.; Rodríguez, A.; Pérez, A.; Ortiz, A. 2019. *Trichoderma* posible micoparásito de *Sporisorium reilianum* y su influencia en el rendimiento de maíz. Universidad Politécnica de Francisco I. Entreciencias 7(20): 13-23.
- Lépiz, R.; Sánchez, E.; López, E.; López, J.J.; Chavarín, I.E.; Meza, K.E. 2015. El cultivo del frijol en Jalisco. Tecnología para altos rendimientos. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.54p.
- Liriano, R.; Núñez, D.B.; Hernández, L.; Castro, A. 2015. Evaluación de microorganismos eficientes y *Trichoderma harzianum* en la producción de posturas de cebolla (*Allium cepa* L.). Universidad de Matanzas, Centro Agrícola 42(2):25-32.
- López, J.C.; Garzón, R.A. 2015. Comportamiento de cuatro cultivares de Frijol Arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) en la Granja La Esperanza, Municipio de Fusagasugá. Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá.
- Mancini, V.; Romanazzi, G. 2014. Seed treatments to control seed borne fungal pathogens of vegetable crops. Pest ManagSci.70: 860-868.
- Martínez Pareja, J.M. 2015. Diseño de sistema automático para el secado y desgrane del frijol. Tesis en opción al título de Tecnólogo en Mecatrónica. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. 2011. About to identification of some *Trichoderma* isolates reported in Revista de Protección Vegetal. Protección Veg. 25(2): 135.

- Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. 2015. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Veg.* 28(1):1-11.
- Martínez, J.J. 2013. Evaluación del uso de un aislado fúngico micopatógeno aplicado en sustrato en plántulas de melón. Tesis en opción al título de Ingeniero Técnico Agrícola. Universidad de Almería.
- Mayo Prieto, S. 2017. Evaluación del *Trichoderma* spp. en el control biológico de *Rhizoctonia solani* y la respuesta defensiva en plantas de alubias pertenecientes a IGP Alubia La Bañeza-León. Tesis en opción al título Doctor en Ingeniería de Biosistemas. Universidad de León.
- Meneses, R.; García, J.; Delgado, M. 2010. Influencia del tratamiento de Thiamethoxam + Difenconazol + Fludioxonil y el tiempo de almacenaje sobre la germinación de la semilla de arroz. Estación Territorial de Investigaciones del Arroz "Sur del Jíbaro". Sancti Spíritus. Cuba. *Revista Infociencia* 14(2):8.
- Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Ariza-Flores, R.; Barrios-Ayala, A.; Alarcón-Cruz, N. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuate. *Avances en Investigación Agropecuaria, Revista de investigación y difusión científica agropecuaria* 17(3): 89-107.
- Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Martínez-Rojero, R. D.; Ariza-Flores, R.; Barrios-Ayala, A.; Rebolledo-Martínez, A. 2008. Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. *Avances en Investigación Agropecuaria, Universidad de Colima* 12(3):55-68.
- Ministerio de la Agricultura (MINAG). 2017. Directivas del Frijol común: Campaña 2017-2018. La Habana. 30 p.
- Ministerio de la Agricultura (MINAG). 2018. Lista Oficial de Variedades Comerciales: Registro de Variedades Comerciales. Dirección de Certificación de Semillas, Ministerio de la Agricultura (MINAG). 55 p.

- Mireles, M. 2014. [diapositiva] Rol de las cooperativas en el nuevo contexto agropecuario cubano. Matanzas. CCS Sabino Pupo.
- Mishra J., Sing. R.D., Jadon V., Gausain M. 2010. Assessment of phenolic components and antioxidative activities of *Phaseolus vulgaris*. L. International Journey of Integrative Biology 9(1):26-30.
- Mohammed, E.; Pérez Sánchez, C.; Sid Ahmed, A.; Requena, M.A.; Candela, M.E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Universidad de Murcia, España. Anales de Biología, 26:35-45.
- Mohiddin, F.A.; Khan, M.R.; Khan, S.M.; Bhat, B.H. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? Plant Pathology Journal 9: 92-102.
- Morales, M.; Moratinos, H.; González, T.; Madriz, P. 2012. Efecto de fungicidas sobre las características fisiológicas y sanitarias de semillas de arroz durante el almacenamiento. UCV. Instituto de Agronomía, Maracay. Rev. Fac. Agron (LUZ) 29: 505-524.
- Muiño, B., Sáenz, M., Stefanova, M., Pomas, A., Díaz, I. 2006. Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco (*N. tabacum* L.). Fitosanidad 10(2):153.
- NC 617. 2008. Agricultura. Semillas agrícolas. Muestreo. Oficina Nacional de Normalización. Vig. mayo 2008.
- NC 618. 2008. Agricultura. Semillas agrícolas. Determinación de la germinación. Oficina Nacional de Normalización. Vig. mayo 2008.
- Nerey, Y.; Van Beneden, S.; Franca, S.; Jiménez, A.; Cupull, R. 2010. Influence of soil type and indigenous pathogenic fungi on bean hypocotyls rot caused by *Rhizoctonia solani* AG4 HGI in Cuba. Soil Biology & Biochemistry 42: 797-803.
- Novo, R.J.; Viglianco, A.; Pérez, M.A.; Caballo, A. 2009. Eficiencia de fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de zanahoria (*Daucus carota* L.)

- y su relación con la calidad fisiológica. *Revista Brasileira de Sementes* 31(4):160-167.
- NRAG 192: 2011. Semillas de frijoles y habichuelas (*Phaseolus vulgaris* L.). Certificación. Dirección de Calidad. Ministerio de la Agricultura. Vig. Marzo 2010.
- Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI). 2016. Anuario estadístico de Cuba. Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca. Edición 2017. Disponible en: <http://www.one.cu/aec2016/09%20Agricultura%20Ganaderia%20Silvicultura%20Pesca.pdf>. [Consulta: 13 de marzo de 2019].
- Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI). 2017. Anuario estadístico de Cuba. Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca. Edición 2018. Disponible en: <http://www.one.cu/aec2017/09%20Agricultura%20Ganaderia%20Silvicultura%20Pesca.pdf>. [Consulta: 13 de marzo de 2019].
- Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI). 2018. Anuario estadístico de Cuba. Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca. Edición 2019. Disponible en: <http://www.one.cu/aec2018/09%20Agricultura%20Ganaderia%20Silvicultura%20Pesca.pdf>. [Consulta: 18 de diciembre de 2019].
- Ojeda, T. A. 2014. Efecto del tratamiento a la semilla con Celest® Top sobre las plagas y el rendimiento agrícola en maní. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara.
- Olivera, A. V.; Morales, A. G.; Batista, F. S.; Alfonso, A. I.; Rodríguez, J. M., Montero, M. 2016. Comportamiento agroproductivo de diferentes variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*. L) en la finca “Las María” del municipio primero de enero. *Universidad & Ciencia* 5(2):52-78.
- Olmedo, V.; Casas, S. 2014. Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Chapter 32. p. 429-453.

- Ortega Aguilar, B.L.; Alarcón, A.; Ferrera, R. 2011. Effect of potassium bicarbonate on fungal growth and *sclerotia* of *Sclerotium cepivorum*. *Revista Mexicana de Micología* 33:53-61.
- Ortega, M.; Shagarodsky, T.; Dibut, B.L.; Ríos, Y.; Tejeda, G.; Gómez, L.A. 2016. Influencia de la interacción entre el cultivo del garbanzo (*Cicerarietinum* L.) y la inoculación con cepas seleccionadas de *Mesorhizobium* spp. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)* 37: 20-27.
- Ortiz, R. 2016. Protocolo para la producción de semillas de frijol. Programa de innovación de agricultura local (PIAL). Mayabeque, Ediciones INCA. 49 p.
- Pacheco, U.; Castellanos, R.M., Morales, M. 2016. Evaluación prospectiva de la eficiencia económica de la producción de frijol en la provincia Santiago de Cuba. *TERRA* 4: 71-97.
- Páramo, L.A.; Hernández, J.L. 2017. Caracterización de *Trichoderma viridae* y *T atroviridae* aislados de monumentos históricos en Ciudad de México. *Revista científica Nexo* 30(02):60-72.
- Peña, R.A. 2013. Manual técnico para la interpretación de análisis de suelos y fertilización de cultivos. Universidad de la Salle. Ediciones UNISALLE. 60 p.
- Pereira, J.L.; Queiroz, R.M.; Charneau, S.; Felix, C.R.; Ricart, C.A.; Lopes da Silva, F.; Stecca, A.; Steindorff, C.; Ulhoa, C.J.; Noronha, E.F. 2014. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *PLoS One* 9:1-23.
- Pérez Vicente, L. 2013. Enfermedades del frijol en Cuba: descripción y ciclo. Taller de lanzamiento del portafolio de Frijol y Soya Syngenta Iberoamericana (febrero 19-20/2013). La Habana. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). 21 p.
- Pérez, H. P. 1999. Diagnóstico de la calidad del grano de frijol para consumo directo e industrial para el Estado de México. CEVAMEX-INIFAP.

- Pérez, L.; Pueyo, M.; Pérez, M. 2009. Efectividad del Fludioxonil en la desinfección de semilla de arroz contra patógenos fúngicos. *Centro Agrícola* 36(4): 49-56.
- Pérez, M. 2010. Eficacia del Celest top 312.5 FS para la desinfección de semillas de Soya. En: *Tratamiento de semillas en Cuba. Resultados investigativos*. Syngenta Iberoamericana S.A. p. 45-51.
- Plan Estratégico Sectorial Multianual (PESEM-MINAGRI). 2015. Acrónimos y glosario de términos. Documento de consulta y complementario al Modelo Conceptual, aprobado en la Segunda Sesión de la Comisión Sectorial de Planeamiento Estratégico del Sector Agricultura y Riego, creado mediante Resolución Ministerial N° 0333-2014-MINAGRI. 28 p.
- PNO 02.002.2009. Ensayo biológico de crecimiento en cámara húmeda (Blotter test). Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal. Sistema de Gestión de Calidad. Vig. Octubre 2009.
- Popp, J., Petö, K.; Nagy, J. 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy Sustainable Development* 33:243-255.
- Prada, C. 2017. Alimentos con residuos de pesticidas, alteradores hormonales. Una grave amenaza para la salud consentida por las autoridades. En: *La farsa de la evaluación del "Impacto socio-económico"*. Fundación Vivo Sano, España. p. 141.
- Quesada, N. 2015. Importancia alimenticia del cultivo de frijol negro en Nicaragua. Instituto de Investigaciones Económicas y Sociales (INIES-UNAN). *Revista Universidad y Ciencia* 8(13):60-65.
- Ramírez, M. 2014. Bases para el manejo integrado de hongos fitopatógenos del suelo en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis en opción al título de Máster en Agricultura Sostenible. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara.
- Ramos, R; Sánchez, E. 2018. Tecnologías para la Producción y Beneficio de Semillas de Granos y Oleaginosas. Empresa productora y comercializadora de semillas (EPCS). MINAG.94 p.

- Ricci, M.; Kahan, A.E. 2005. Estudios biológicos y poblacionales de *Brevicoryne brassicae* L. y *Myszus persicae* Sulz. (Hemiptera: Aphidiae) sobre crucíferas cultivadas. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 31:3-9.
- Rodríguez, M. 2017. Respuesta agroproductiva de cuatro cultivares comerciales de *Phaseolus vulgaris* L. en época tardía. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara.
- Rojas, L.B. 2016. Efecto del tratamiento a las semillas con Celest® Top en indicadores de crecimiento, plagas y rendimientos agrícolas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara.
- Romero, V.E.; García, V.R.; Hernández, J.J.; Sánchez, J.M. 2016. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Scientia Agropecuaria, Universidad Nacional de Trujillo, Perú 7(3): 313-319.
- Rosas, J.C. 1998. El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano Academia Press. 52 p.
- Salinas, R.; Soriano, B. 2014. Efecto de *Trichoderma viride* y *Bradyrhizobium yuanningense* en el crecimiento de *Capsicum annuum* en condiciones de laboratorio. Universidad Nacional de Trujillo. Revista Científica de Estudiantes 2(2): 13.
- Sánchez, B.; Espinosa, E.; Villordo, E.; Rodríguez, R.; Mora, M.A. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma spp.* sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. Agrociencia 51(1): 63-79.
- Sarandón, S.J.; Flores, C.C.; Abbona, E.; Lermanó, M.J.; Blandi, M.L.; Oyhamburu, M.; Presutti M. 2015. Análisis del uso de agroquímicos asociado a las actividades agropecuarias de la Provincia de Buenos Aires. Disponible en: <http://www.defensorba.org.ar/bibliotecavirtual/>. [Consulta: 18 febrero de 2020].

- Schaerer, H. 2012. Seed treatments for healthy vegetable seedlings. cost action FA1105 meeting – organic greenhouse horticulture, State of the Art and Future Trends. p. 15-17.
- Schillinger, U. & Lucke, F.K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus* sake Isolated from meat. Appl. Environm. Microbiol. 55(8):1901-1906.
- Serbelló Guzmán, F.G.; Mesa Reynaldo, J.R.; Soto Ortiz, R. 2014. Efecto de diferentes alternativas biológicas, sobre el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas de fruta bomba (*Carica papaya* L.). Revista Agroecosistemas 2(1): 247-253.
- Statistical Graphics Corporation™. 2001. Statgraphics® Plus for Windows 5.1. Professional version. Copyright © 1994-2001.2001. [anónimo]. USA.
- Stewart, A.; Hill, R. 2014. Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. Biotechnology and Biology of Trichoderma. Chapter 31. 415-428.
- Syngenta Iberoamericana S.A. Sucursal en Cuba. 2014. Portafolio Cuba. Plaguicidas, control de vectores, semillas y uso seguro. Syngenta. 66 p.
- Syngenta Iberoamericana. 2009. Portafolio para el cultivo del Arroz. 2009/2010. La Habana. Syngenta Iberoamericana.
- Syngenta. 2003. CELEST 025 FS. Boletín Técnico. Disponible en:www.syngenta.com. [Consulta: 30 de noviembre de 2019].
- Syngenta. 2011a. SWITCH. Ficha Técnica. Disponible en:www.syngenta.com. [Consulta: 30 de noviembre de 2019].
- Syngenta. 2011b. La salud de la raíz – la clave para mejorar el rinde. 15 p. Disponible en: <https://docplayer.es/34667467-La-salud-de-la-raiz-la-clave-para-mejorar-el-rinde-libro-blanco-2011.html>. [Consulta: 30 de noviembre de 2019].
- Trafane L.G.; da Motta X.F.; Suarez, C.I.; da Silva, A.; Géri, E. M.; Madruga, L. 2017. Tratamiento de semillas de soja y su influencia sobre la calidad fisiológica a lo largo del almacenamiento. Universidad Federal de Pelotas/ Capão do Leão – RS. Agrociencia Uruguay 21(1):58.

- Valdés, E. 2014. Main characters, advantages and benefits of agricultural use as biocontrol *Trichoderma*. *Agroecosistemas* 2(1): 254-264.
- Valladares, C.A. 2010. Taxonomía y botánica de los cultivos de granos. Universidad Nacional autónoma de Honduras. Sección 10:01. Unidad II. Serie Lecturas Obligatorias. 28p.
- Vargas, A.; Watler, W.; Morales, M. 2018. Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en Costa Rica: Cultivo de frijol. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).79p.
- Vásquez, J. 2019. *Trichoderma harzianum*: características, morfología, reproducción. Disponible en: <https://www.lifeder.com/trichoderma-harzianum/>. [Consulta: 30 de noviembre de 2019].
- Velázquez, H. 2014. Estudio fisiológico en familias prolíficas de un lote de producción de semilla de la variedad de maíz JAGUAN. Tesis en opción al título de Máster Profesional, especialidad en Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila.
- Vidal L. 2002. Aislamiento y cuantificación de catequinas involucradas con la compatibilidad en injertos de guanábano (*Annona muricata*). Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Colima, México.
- Vinay, J. C.; Esqueda, V.A.; Tosquy, O.H.; Zetina, R.; Ríos, A.; Vázquez, M.V.; Del Angel, A.L.; Perdomo C. 2018. Reunión Científica-Tecnológica, Forestal y Agropecuaria, Veracruz. INIFAP, CP, UACH, INAPESCA, UV, TecNM. Medellín, Veracruz, México. Año 2, (1):13.
- Wikipedia. 2019. Difenoconazole. Disponible en: <https://www.wikidata.org/wiki/Q3027717>. Fecha de consulta: [Consulta: 30 de noviembre de 2019].
- Wright, B.; Rowse, H.R.; Whipps, J.M. 2003. Application of beneficial microorganisms to seeds during drum priming. *Biocontrol Sci Technol*, 13:599-614.

Zhang, Y.; Lamm, R.; Pillonel, C.; Lam, S.; RongXu, J. 2002. Osmoregulation and fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* *os-2* Gene Encodes a HOG1 Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 532-538.