



Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Instituto de Biotecnología de las Plantas



Tesis para optar por el grado académico de
Máster en Agricultura Sostenible

**Manejo de enfermedades fúngicas en la
producción de semilla de papa cv. 'Romano' con
bioproductos**

Autor: Adrián Díaz Águila

Santa Clara

2016



Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Instituto de Biotecnología de las Plantas



Tesis para optar por el grado académico de
Máster en Agricultura Sostenible

Manejo de enfermedades fúngicas en la producción de semilla de papa cv. 'Romano' con bioproductos

Autor: Adrián Díaz Águila
Tutora: Dr.C. Yelenys Alvarado Capó
Consultante: MSc. Mayra C. Acosta Suárez

Santa Clara

2016

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

- A mi tutora Dra C. Yelenys Alvarado Capó por haberme brindado parte de sus conocimientos, por el tiempo dedicado, por su paciencia y perseverancia.
- A la MSc. Maira Acosta Suárez y los miembros del laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas por su especial colaboración en todo momento.
- Al proyecto Coinnovación en el marco del cual se desarrolló el presente trabajo y a todos los investigadores y técnicos del Instituto de Biotecnología de las Plantas y de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey que participaron.
- A mi familia por el constante apoyo que recibo, a ellos les debo todo lo que soy.
- A todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en la realización de este trabajo.

A todos, muchas gracias.

Resumen

RESUMEN

En la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey se ha aplicado durante varios años una alternativa de manejo agronómico del cultivo de la papa basada en la aplicación de diferentes productos biológicos de producción nacional. Sin embargo, no se había evaluado en la producción de semilla. El objetivo general de este trabajo consistió en determinar el efecto de alternativas de manejo agronómico en la producción de semilla de papa cv. 'Romano' sobre enfermedades fúngicas y los objetivos específicos: comprobar el efecto *in vitro* del bioproducto Versaklin® y *Trichoderma harzianum* Rifai sobre patógenos fúngicos del cultivo de la papa y comparar la respuesta de plantas de papa cv. 'Romano' bajo diferentes alternativas de manejo agronómico en campo frente a enfermedades fúngicas. Se comprobó que tanto *Trichoderma harzianum* CCIBP-Trich15 como Versaklin® inhibieron el crecimiento *in vitro* de los patógenos *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8 *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23, *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 y *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1. Los resultados indicaron que las alternativas de manejo agronómico tuvieron influencia en la respuesta de las plantas tanto a las enfermedades fúngicas como agronómica. De las enfermedades fúngicas del cultivo solo se detectó la incidencia de Tizón temprano, los primeros síntomas aparecieron en plantas sin aplicación de productos a partir de los 55 días después de la siembra pero la severidad mayor se alcanzó a los 70 días y se vieron afectados todos los tratamientos. La efectividad técnica (ET) de las alternativas de manejo agronómico frente al Tizón temprano mostraron la superioridad del tratamiento químico y el potencial de la AMA con Versaklin® ya que redujo la incidencia en 30% con respecto al tratamiento control y alcanzó un valor de ET que representa 60% del tratamiento químico. Mediante alternativas de manejo agronómico que incluyen el uso de bioproductos de fabricación nacional se pueden manejar las enfermedades fúngicas y producir semilla de papa cv. 'Romano'.

Índice

INDICE	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 La papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.). Origen, distribución e importancia económica	6
2.1.1 Cultivar Romano	9
2.2 Obtención de semilla de papa por biotecnología	9
2.2.1 Plantas <i>in vitro</i>	11
2.2.2 Minitubérculos	12
2.3 Principales enfermedades fúngicas de la papa	13
2.3.1 Tizón tardío de la papa	13
2.3.2 Tizón temprano de la papa	15
2.3.3 Pudrición seca o Fusariosis de la papa	16
2.3.4 Podredumbre gomosa	18
2.4 Control biológico de fitopatógenos	19
2.4.1 <i>Trichoderma</i>	21
2.4.1.1 Reproducción	21
2.4.1.2 Mecanismos de acción	22
2.5 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal	24
2.5.1 Empleo de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal en la propagación de papa	26
2.5.2 Bioproductos a base de la tecnología Microorganismos eficientes	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Efecto <i>in vitro</i> del bioproducto Versaklin® y <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai sobre patógenos fúngicos del cultivo de la papa	29

3.1.1 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> frente a patógenos fúngicos	30
3.1.1.1 Competencia	32
3.1.1.2 Interacción de las hifas (micoparasitismo)	32
3.1.1.3 Producción de metabolitos	32
3.1.2 Efecto <i>in vitro</i> de Versaklin® sobre patógenos fúngicos	33
3.2 Respuesta de plantas de papa cv. 'Romano' con diferentes alternativas de manejo agronómico frente a enfermedades fúngicas	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Efecto <i>in vitro</i> del bioproducto Versaklin® y <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai sobre patógenos fúngicos del cultivo de la papa	41
4.1.1 Antagonismos <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> frente a patógenos fúngicos	41
4.1.1.1 Competencia	43
4.1.1.2 Interacción de las hifas (Micoparasitismo)	45
4.1.1.3 Producción de metabolitos	48
4.1.2 Efecto <i>in vitro</i> de Versaklin® sobre patógenos fúngicos	51
4.2 Respuesta de plantas de papa cv. 'Romano' con diferentes alternativas de manejo agronómico frente a enfermedades fúngicas	53
5. CONCLUSIONES	65
6. RECOMENDACIONES	66
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8. ANEXOS	

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes para la alimentación humana. Las prácticas agronómicas tanto para la producción de semilla, como tubérculos para el consumo humano buscan obtener altos rendimientos y adecuada sanidad.

Es un cultivo básico en aquellas regiones donde las condiciones climáticas lo permiten, pues es característico de climas fríos, aunque se ha logrado su cultivo en climas tropicales, teniendo en cuenta los meses de invierno. El valor de la producción mundial supera los 360 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014) y ocupa el cuarto lugar en producción, después del trigo (*Triticum vulgare* Wuild.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el maíz (*Zea mays* L.).

La producción de este cultivo en Cuba es altamente costosa. La compra de semilla representa cerca del 40% de los costos ya que se importa principalmente de Canadá y Holanda. Es por esa causa que los científicos trabajan en la búsqueda de alternativas para la producción de semilla, resistente a enfermedades y adaptada a las condiciones climáticas del país (Agramonte *et al.*, 2010; Salomón *et al.*, 2014). Por otra parte, no es un cultivo sostenible por la cantidad de insumos, fertilizantes y pesticidas que demanda que elevan los costos, provocan contaminación en el aire y en el suelo (Den Herder *et al.*, 2010). Unido a ello se requiere el empleo de alternativas de manejo agronómico que disminuyan la incidencia de enfermedades en las plantas, mejoren el estado fisiológico de la plantación y propicien un incremento de los rendimientos mediante productos amigables con el ambiente y que no eleven los costos.

Ante esta problemática, el uso de microorganismos que contribuyan a la nutrición de la planta, el control de patógenos y permitan disminuir el uso de productos químicos ha cobrado gran importancia. En este sentido, algunos autores han referido resultados satisfactorios. Por ejemplo, Hicks *et al.* (2014) en ensayos en casa de cultivo y campo demostraron que el uso de cepas de *Trichoderma* controlaron *Rhizoctonia solani* Kuehn y promovieron el crecimiento de las plantas.

En Cuba, productos tales como Gluticid obtenido a partir de metabolitos bacterianos (Villa *et al.*, 2000) han sido evaluados para el control de patógenos en plantas (Castellanos *et al.*,

2005). En papa, los resultados de Rodríguez y Stefanova (2005) sugieren la posibilidad de utilizarlo en la protección temprana del cultivo contra el Tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer).

Además, Hernández (2001) obtuvo resultados satisfactorios en la producción sostenible de tubérculos-semilla de papa por semilla sexual con el empleo de un manejo agronómico integral de sustratos, diferentes métodos de siembra y biofertilización (bacterias nitrificadoras, fosfosolubilizadoras y hongos micorrizógenos).

Otros bioproductos a base del hongo antagonista *Trichoderma*, entomopatógenos como *Lecanicillium* (*Verticillium* Zimmeer) sp., *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Bacillus thuringiensis* (Berliner) y *Metarhizium anisopliae* (Mets.) Sor. se han evaluado para el manejo de plagas en numerosos cultivos, entre ellos la papa (Jiménez y Agramonte, 2002; Villa *et al.*, 2006; Reinoso *et al.*, 2007; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Fernández, 2011).

En la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey se ha aplicado durante varios años una alternativa de manejo agronómico del cultivo de la papa basada en la aplicación de diferentes productos biológicos de producción nacional. Entre ellos, se encuentran algunos para la nutrición de las plantas y otros para el manejo de plagas (Por ejemplo: Fitomas E, BIOBRAS 16, Ecomic, Thurisave, Metasave, Basisave, Verticid, Tricosave, producidos por LABIOFAM o en laboratorios de producción local).

Otro de los bioproductos que se ha utilizado en esta alternativa tanto para el tratamiento a la semilla de papa como para aplicación foliar se elabora con la tecnología conocida como Microorganismos eficientes (EM, del inglés: *Efficient microorganism*) (Higa, 1991) a escala artesanal o en pequeñas plantas. La tecnología EM con amplio espectro de aplicaciones, fue creada por el investigador japonés Teuro Higa (Higa y Wididana, 1991). EM consiste en cultivos mixtos de microorganismos benéficos naturales que coexisten en un medio líquido. Los inóculos microbianos se comercializan desde Japón como EM-1®, EM-X® o EM-Ceramic®. Estos contienen bacterias lácticas, bacterias fotosintéticas y levaduras de más de

80 especies diferentes. Tiene aplicaciones en la agricultura, en el control de desechos medioambientales, en productos de aseo y limpieza, en materiales de la construcción (Martirena *et al.*, 2014), etc. La tecnología y el uso de los EM se encuentra aplicada y los productos en venta en muchos países.

El concepto de EM, se basa en la coexistencia y co-prosperidad de varios microorganismos con una capacidad de reavivar, restaurar y conservar el medio en que se encuentren, son cuidadosamente seleccionados en su medio natural y multiplicados con diversos procedimientos. También se han descrito como la coexistencia de un cultivo mixto de microorganismos beneficiosos anaerobios y aeróbicos (Shalaby, 2011; Murányi, 2012).

La tecnología EM fue traída a Cuba por el movimiento de Agricultura Orgánica Costarricense y se introdujo en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey (EPPF-IH), en Matanzas en el año 2007. A partir de 2010 y apoyado por los proyectos PIAL y BIOMAS, financiados por COSUDE se desarrolló un programa de innovación tecnológica agrícola local para su aplicación en la agricultura cubana. En febrero de 2011 productores de ocho provincias contaban con esta tecnología en sus áreas, donde se ha sustituido la aplicación de productos químicos por EM (EPPF-IH, 2011). Sin embargo, la diversidad de materias primas y formas de producirlos no siempre conduce a resultados consistentes y repetibles. Por otra parte, se desconoce el efecto de los EM sobre los patógenos de los cultivos donde se ha observado una disminución de su incidencia entre los que se encuentra la papa.

Más recientemente, el Instituto Finlay desarrolló la producción industrial de un producto basado en los resultados y tecnologías de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey que se nombra Versaklin®. Atendiendo a los resultados de estas instituciones tanto en el cultivo agroecológico de papa como en la producción de un bioproducto sometido a un proceso estable, asegurado en su calidad y con estudios toxicológicos (Oliva *et al.*, 2014) y la necesidad de producir semilla de papa con bajos insumos se realizó el siguiente trabajo.

Hipótesis

En la producción de semilla de papa cv. 'Romano' se podrían manejar las enfermedades fúngicas del cultivo mediante alternativas de manejo agronómico en las que se empleen bioproductos de fabricación nacional, si se determina el efecto *in vitro* y se comprueban sus resultados en campo.

Objetivo general:

Determinar el efecto de alternativas de manejo agronómico en la producción de semilla de papa cv. 'Romano' sobre enfermedades fúngicas.

Objetivos específicos

1. Comprobar el efecto *in vitro* del bioproducto Versaklin® y *Trichoderma harzianum* Rifai sobre patógenos fúngicos del cultivo de la papa.
2. Comparar la respuesta de plantas de papa cv. 'Romano' bajo diferentes alternativas de manejo agronómico en campo frente a enfermedades fúngicas.

Novedad científica

Se informa por primera vez del uso de un bioproducto elaborado a base de la tecnología de Microorganismos Eficientes (Versaklin®) en el manejo de enfermedades fúngicas de la papa en la producción de semilla.

Aporte teórico

Con este trabajo se realiza un aporte al conocimiento de la interacción de *T. harzianum* con patógenos fúngicos del cultivo de la papa y los mecanismos por los cuales ejerce su acción antagonista. Además, se sientan las bases para estudios más profundos sobre producción agroecológica de la papa en las condiciones climáticas de Cuba.

Aporte práctico

Como resultado de este trabajo se cuenta con elementos para contribuir al diseño de estrategias para la producción de semilla de papa para pequeños productores con menos insumos y favorable impacto ambiental.

La tesis está estructurada en un primer acápite que contiene una revisión bibliográfica de fuentes documentales relacionadas con el tema de estudio, posteriormente se describen los materiales y métodos empleados, se informan y discuten los resultados científicos y se arriba a conclusiones y recomendaciones.

*Revisión
Bibliográfica*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La papa (*Solanum tuberosum* L.). Origen, distribución e importancia económica

La papa (*Solanum tuberosum* L.) fue domesticada por los ancestros de los agricultores andinos y fue cultivada, por lo menos, desde hace más de 7000 años. Su centro de origen estaría ubicado en las tierras altas de los Andes localizadas entre el centro de Perú y el centro de Bolivia, en las cercanías del lago Titicaca. Con el tiempo, el área de cultivo se extendió a muchos países en América Latina. Aún existen cultivares de papas nativas o tradicionales en México, Guatemala, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina y Chile. La papa fue introducida a Europa después del descubrimiento de América (Huamán *et al.*, 1997). Se llevó a España y Portugal, de dónde se dispersó a otras partes de Europa en los años 1500s. Durante los próximos dos siglos se exportó a Norteamérica, Australia, China. Su adopción universal como una fuente de hidrato de carbono no siempre ha sido bienvenida y han sido afectadas las campañas de propagación nacional, como en Francia en los 1760s, decretos reales en la Rusia, de nuevo en los 1760s, y la competencia de otros hidratos de carbono como arroz y la pasta a lo largo del camino (CIP, 2007).

Sin embargo, la papa a pesar de haberse originado en América, en la actualidad se cultiva en Europa, Asia y África, siendo China el mayor productor de este tubérculo, seguido por la India, Estados Unidos, Rusia, Alemania (FAOSTAT, 2014). Constituye un alimento básico para la alimentación. Además, este cultivo se ha convertido en una fuente generadora de empleo en comunidades rurales y de ingresos para la población.

Estévez *et al.* (2007) refieren que no se conoce con exactitud cómo se introdujo este cultivo en Cuba; el primer documento referenciado fue por Don Pablo de la Serna, 7 de febrero de 1778, el cual envió una comunicación al Real Consulado Español, donde exponía las dificultades existentes para la obtención de las semillas del cultivo en el país. A fines del siglo XIX, en Cuba, se comercializaba las regiones de Güines en provincia Habana, y en Potrerillo de Gibara, en la antigua provincia de Oriente. Las prácticas para el cultivo de papa eran

diferentes en ambas regiones, pues en Potrerillo utilizaban pequeñas semillas procedentes de Norteamérica y las plantaban enteras; en Güines utilizaban semillas de gran tamaño, de las Islas Canarias y España, las cuales cortaban antes de la plantación. Varios años después se comenzó a practicar la siembra de semillas cubanas, las cuales se troceaban y plantaban, además se hizo extensivo el método de guardar de una cosecha a otra, papas que tenían poco valor comercial (agosto- septiembre), aunque su desarrollo y producción eran malos siempre daba al que la cultivaba alguna ventaja económica, dado que en Cuba, la papa se produce prácticamente al nivel del mar en áreas llanas y se siembra en los meses de noviembre a enero. Esta época se enmarca fundamentalmente del 15 de noviembre al 20 de diciembre, debido a que en las plantaciones iniciadas después del mes de diciembre, los rendimientos son afectados por las altas temperaturas (ALAP, 2000).

Además, Estévez *et al.* (2007), alegan que en 1985 se inició el programa cubano de mejoramiento genético de la papa, del cual se cuenta con más de 500 clones cubanos de diferentes generaciones y diversas variedades cubanas. Este programa se ha trabajado con el objetivo de obtener nuevas variedades con características adecuadas para ser plantadas en la época óptima. Sin embargo, la evaluación de los nuevos genotipos fuera de época de plantación y a una mayor altitud ha sido poco explotado bajo las condiciones del país, lo cual, sería de gran utilidad ya que constituiría una alternativa para reducir el déficit del producto en esta época del año (Castillo *et al.*, 2001).

Clasificación taxonómica

Tipo: *Spermatophyta*

Clase: *Angiospermas*

Subclase: *Dicotiledonea*

Orden: *Tubbiflorae*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *S. tuberosum*

Subespecies: *andigenum, tuberosum* (Hawkes, 1990)

La importancia económica de la papa se fundamenta en que, por su elevada capacidad de producción de sustancias alimenticias por unidad de superficie, es tres veces mayor que en los cereales, lo que permite suplir de alimento a un elevado número de personas. Desde 2008 es el cultivo más importante para la producción de alimentos. Tal vez ningún otro cultivo en la historia contemporánea ha jugado un papel más importante en la seguridad alimentaria y la nutrición con un impacto en el bienestar social de la personas (Sarkar, 2008).

Este cultivo tiene un alto valor nutritivo, este cultivo aporta en 100 gramos de papa fresca: 78,0% de humedad, 2,1% de proteína, 18,5% de almidón, 1,0% de cenizas y 0,1% de grasas. Además, contiene minerales (560,0 mg de potasio, 50,0 mg de fósforo, 9,0 mg de calcio, 7,0 mg de sodio y 0,8 mg de hierro) y vitaminas (0,1 mg de Tiamina, 0,04 mg de Riboflavina, 20,0 mg de vitamina C y 1,5 mg de Niacina), lo cual coloca a la papa como uno de los cultivos estratégicos más importantes para contribuir a solucionar los problemas del hambre en el mundo (FAO, 2008).

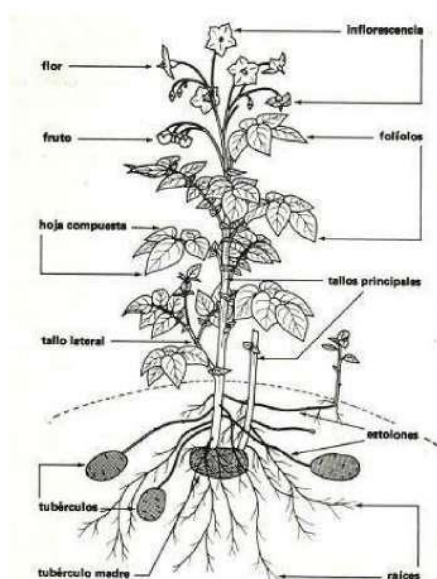


Figura 1. Esquema de una planta de papa. Tomado de: Huamán (1986).

2.1.1 Cultivar Romano

Los progenitores del cultivar 'Romano' son 'Draga' x 'Desirée'. Es una planta de mediana a corta; de follaje abundante, tallos de extendidos a semierguidos, gruesos y coloración antocianínica de fuerte a mediana; hojas muy grandes, de color verde a verde claro, silueta abierta; inflorescencias de poco a numerosas o ausentes, flores de color rojo violáceo; bayas poco numerosas o ausentes. Los tubérculos son grandes y uniformes, de forma oval redondeada, de piel roja, carne blanca amarillenta y ojos semiprofundos. Presenta una madurez semitemprana y muy buena resistencia al azuleado. Las cosechas tienen un buen rendimiento y además son uniformes. El contenido de materia seca es de mediano a bajo, recomendable preferiblemente para el consumo fresco. Es muy susceptible a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en las hojas y muy resistente en los tubérculos, bastante sensible al virus PRLV, medianamente resistente al virus X y resistente al virus A, muy resistente al virus Y, inmune a la sarna verrugosa, y sensible a la sarna común (Hans *et al.*, 2007).

2.2 Obtención de semilla de papa por biotecnología

En Cuba, se invierten anualmente millones de dólares en la compra de semilla de papa a Holanda y Canadá con el riesgo de que se introduzcan agentes patógenos, insectos y otros microorganismos que existen inevitablemente en toda importación de grandes volúmenes de materiales vegetales de siembra (Pérez, 1998). Debido a que los métodos tradicionales no garantizan la disminución de las enfermedades que afectan al cultivo de la papa, la producción de tubérculos *in vitro* (Wang y Hu, 1982) se ha convertido en la vía más eficiente para la propagación de este cultivo, que mantiene un alto grado de pureza varietal y calidad fitosanitaria. Los tubérculos *in vitro* producidos en sistemas semiautomatizados basados en la inmersión temporal de los explantes es superior a los obtenidos con el empleo de métodos convencionales (Jiménez *et al.*, 1999).

Scherwinski y Luces (2004) señalan que la papa se propaga vegetativamente por tubérculos-semillas, lo que asegura la conservación de características varietales durante generaciones

sucesivas. Sin embargo, debido a su forma de propagación asexual está sometida a un alto riesgo de contaminación por virus, hongos, bacterias e insectos, durante el período de cultivo y almacenamiento. También emplear el material vegetativo por ciclos repetidos puede ocasionar degeneración del cultivo por la acumulación de patógenos, especialmente virales. Incluso, puede ser propagada por semilla botánica, pero esta vía se emplea fundamentalmente para el mejoramiento genético. El valor potencial del cultivo de tejidos en la producción de papa ha sido ampliamente reconocido a nivel mundial. Esta tecnología se emplea en muchos países para obtener semilla libre de patógenos y por el consecuente beneficio para los productores (Hoque, 2010).

En la propagación de papa han sido empleados medios de cultivos en estado líquido y en estado semisólido, este último ha sido el más empleado (Ziv *et al.*, 1998). Según plantean Igarza *et al.* (2012) el empleo de plantas *in vitro* y microtubérculos en la producción de semilla de papa tiene ventajas con respecto a la semilla convencional ya que están libres de patógenos, se obtiene un gran número en cortos períodos de tiempo, se reducen los costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en campo. También pueden ser propagados en cualquier época del año, se facilita el intercambio de material genético y se reduce el riesgo de pérdidas genéticas al evitar la mezcla del material vegetal por cruzamiento.

Dentro de las problemáticas fundamentales en la producción de semilla de papa por métodos biotecnológicos se han encontrado las asociadas a pérdidas en el traslado a campo de las plantas *in vitro*. Ello ha elevado los requerimientos de atenciones culturales por personal altamente calificado, ha incrementado las pérdidas de tubérculos en la cosecha por daños o enfermedades así como en la conservación debido principalmente a la elevada presencia de microorganismos patógenos del suelo (Jiménez-Terry *et al.*, 2010).

2.2.1 Plantas *in vitro*

La producción de plantas *in vitro* ha alcanzado un gran auge en el mundo y es empleado por muchos países en sus programas nacionales para la producción total o parcial de semilla. Este método constituye la mayor aplicación del cultivo de tejidos, siendo las tecnologías de propagación vía organogénesis las más empleadas para tales fines (Pérez *et al.*, 2000).

La propagación *in vitro* de papa es mediante el subcultivo de yemas axilares. Se pueden obtener tanto plantas *in vitro* como microtubérculos (Jiménez *et al.*, 1999). En el cultivo *in vitro* convencional las plantas se cultivan en recipientes cerrados en un entorno aséptico y con la presencia de un medio de cultivo sólido, semisólido o líquido. El medio de cultivo contiene, además, altas concentraciones de sacarosa como fuente de carbono, sales inorgánicas, vitaminas y otros aditivos en dependencia de la especie y de la técnica de cultivo (Aragón *et al.*, 2009).

Las plantas de papa propagadas *in vitro* pueden producir microtubérculos cuando se colocan en condiciones adecuadas (Estrada *et al.*, 1986; Jiménez *et al.*, 1999). Estos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta aunque algunos pueden formarse en el medio de cultivo (Hussey y Stacey, 1984). Estos ofrecen ventajas para el almacenamiento, traslado y plantación en casas de cultivo, así como permiten el intercambio de germoplasma (Kanwal y Shoaib, 2006). Además, la propagación del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) a través de las técnicas biotecnológicas de cultivo de tejidos tiene como objetivo fundamental la producción de grandes cantidades de plantas sanas y la conservación en condiciones controladas de diferentes genotipos (García *et al.*, 2001)

Para disminuir los efectos del cambio de ambiente *in vitro* a *ex vitro* se requiere de una fase llamada aclimatización, donde las plantas son adaptadas gradualmente a las nuevas condiciones ambientales. El grado de anomalías morfológicas y/o fisiológicas que ellas hayan desarrollado durante el cultivo *in vitro*, será lo que permita una mejor aclimatización. Una de los problemas fundamentales para la supervivencia *ex vitro* es la pobre capacidad fotosintética

desarrollada (Pospíšilová *et al.*, 1997), la cual viene de las restricciones de CO₂ y la baja intensidad luminosa durante el cultivo *in vitro* (Arigita *et al.*, 2002).

2.2.2 Minitubérculos

Los minitubérculos son pequeños tubérculos de papa obtenidos después de la aclimatización de plantas cultivadas *in vitro* y plantadas a alta densidad en casas de cultivo, canteros o contenedores donde se usan diferentes mezclas de sustratos. Con el uso de minitubérculos en un programa de semilla puede reducirse el número de multiplicaciones en campo y el tiempo necesario para obtener volúmenes adecuados de semilla de un cultivar (Lommen y Struik, 1992; 1994). Los minitubérculos pueden producirse durante todo el año siempre que las casas de cultivo cuenten con condiciones para ello y son principalmente utilizados para la producción de semilla prebásica o básica por siembra directa en campo (Ritter *et al.*, 2001).

Las principales desventajas de un programa de semilla de papa basado en métodos de propagación convencional están relacionadas con la baja tasa de multiplicación de las plantas crecidas en campo lo que resulta en un sistema lento e inflexible, con riesgo creciente de enfermedades virales, fúngicas o bacterianas a medida que se incrementa el número de multiplicaciones. Por ello, una de las alternativas para disminuir el número de multiplicaciones necesarias en campo para obtener suficiente cantidad de semilla, es producir minitubérculos en ambientes protegidos (Lommen, 1995).

Con el cultivo *in vitro* de plantas a partir de segmentos nodales se pueden producir plantas enraizadas que posteriormente se aclimatizan y pueden plantarse en casas de cultivo o campo para producir minitubérculos (Struik y Lommen, 1999).

A nivel mundial, los minitubérculos son comparados con plantas de selección clonal de segundo año, aunque en algunos países son reconocidos como semilla precertificada. Debido a la elevada tasa de multiplicación y a su tamaño, la oferta y demanda de los minitubérculos ha crecido rápidamente en los últimos años. Finalmente, su rápida obtención hace a los

minitubérculos muy recomendables para la introducción de nuevas variedades (Bojórquez, 2008).

Uno de los mayores inconvenientes que tiene el cultivo de papa en el país, es que depende para su producción de la compra de semillas en países como Francia, Holanda y Canadá, con inversiones cada año de 10 a 12 millones. En las condiciones tropicales no es económicamente viable la obtención de semilla por métodos tradicionales, debido a las grandes afectaciones virales, por lo que la única vía es producir a través de la micropropagación. Con este objetivo, desde inicios de los años 80, del siglo XX, comenzaron los trabajos en el país. La dificultad fundamental que presentó esta tecnología fue su bajo coeficiente de multiplicación, debido a que las plantas procedentes de cortes de esquejes producen un solo minitubérculo y es muy trabajosa (Pérez, 1998).

Teniendo en cuenta estos precedentes, el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), conjuntamente con otras instituciones científicas, han desarrollado desde 1994 la tecnología para producción de Semilla Original de papa por métodos biotecnológicos (Jiménez-Terry *et al.*, 2010).

2.3 Principales enfermedades fúngicas de la papa

La papa es afectada por numerosas enfermedades fúngicas foliares y postcosecha entre las que se destacan por su importancia económica el tizón tardío, el tizón temprano y las pudriciones secas y blandas.

2.3.1 Tizón tardío de la papa

El tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans* Mont de Bary) es la enfermedad más peligrosa y destructiva del cultivo, ya que en pocas horas con condiciones favorables para su aparición y desarrollo causa la defoliación y muerte de las plantas con reducción significativa en los rendimientos. En el follaje y en el tallo aparecen manchas pardas o negras purpúreas de diferentes tamaños. Las manchas en las hojas progresan desde el ápice y los bordes hacia su centro, mostrando un color verde pálido. En el envés de la hoja coincidiendo con las manchas

del haz, se aprecia una fructificación de color blanco o mildiu formado por los esporangios del hongo. En la planta la enfermedad comienza desde la base hacia la parte inferior del follaje. Los tubérculos afectados presentan pequeñas manchas pardas sobre la piel, de forma irregular, deprimidas y toman un color algo azulado, lo cual se aprecia al cortar el tubérculo donde resalta un color parduzco en el lugar de las lesiones. Las primeras manifestaciones de la enfermedad en el campo se presentan en zonas con acceso de humedad o donde quedaron grupos de plantas sin el nivel nutricional adecuado, o sin protección fitosanitaria (MINAGRI, 2012).

Manejo de la enfermedad

Para el manejo agroecológico de la enfermedad se pueden aplicar una serie de medidas entre las que se encuentran:

- ✓ Seleccionar la época de siembra de acuerdo con las características de las variedades.
- ✓ Seleccionar para la siembra variedades resistentes o tolerantes a la enfermedad.
- ✓ Plantar semillas libres del patógeno.
- ✓ Rotación de áreas, esmerada preparación y nivelación del suelo.
- ✓ Riego uniforme evitando encharcamientos.
- ✓ Fertilización adecuada y uniforme en toda el área.
- ✓ Eliminación de los focos o el saneamiento de hojas y tallos afectados.
- ✓ Mantener el cultivo libre de malezas, realizar el aporque oportunamente para evitar que los tubérculos queden expuestos al aire.
- ✓ Monitoreo sistémico de las plantaciones y condiciones climatológicas, para detectar a tiempo su aparición, eliminar rápidamente los residuos de cosechas.
- ✓ Aplicaciones foliares con productos de contacto cuando se halla logrado uniformar su brotación y aplicaciones con productos sistémicos al aparecer las primeras manchas o preventivos según pronósticos en aquellos lugares donde existan las condiciones para aplicarlos con alta seguridad.
- ✓ Aplicaciones de *Trichoderma harzianum* al fondo del surco antes de proceder al tape de las semillas.

2.3.2 Tizón temprano de la papa

El tizón temprano es después del tizón tardío, la enfermedad foliar más importante del cultivo de papa (Van der Waals *et al.*, 2003). Se presenta con mayor incidencia en las zonas paperas ubicadas en regiones húmedas y cálidas de países como India, Uruguay, Brasil y otros del Caribe. En Cuba, el tizón temprano se considera una enfermedad fúngica importante y se ha encontrado variabilidad genética y patogénica entre aislados procedentes de diferentes localidades del país (Pérez *et al.*, 2004). Esta enfermedad es causada por los hongos *Alternaria solani* (Cooke) Wint y *Alternaria alternata* (Fr) Keissl) que afectan principalmente las hojas y tubérculos.

Es una enfermedad típica de la senescencia. La infección inicial es más frecuente en las hojas inferiores más viejas, generalmente a partir de la floración. Inicialmente, las lesiones se evidencian como pequeñas manchas necróticas (1-2 mm) de color oscuro, que progresan en manchas ovoide-circulares tomando una coloración castaño negra a medida que se expanden. Generalmente los márgenes de las lesiones son angulares porque se encuentran limitadas por las nervaduras. Las zonas lesionadas quedan con consistencia seca y apariencia de papel. Frecuentemente, aunque no siempre, las manchas presentan anillos concéntricos (tejido necrótico abultado y hundido alternadamente). Alrededor de las lesiones y entre las mismas el tejido foliar se torna clorótico. A medida que se van formando nuevas lesiones y las viejas se expanden, la hoja íntegra se vuelve clorótica y luego necrótica. Finalmente, puede producirse defoliación y muerte anticipada de la planta. Si las condiciones ambientales son favorables, la infección asciende en el perfil del cultivo y las lesiones aumentan en número y tamaño a medida que las plantas maduran. En los tallos se desarrollan manchas necróticas, aunque en menor medida que en las hojas, mientras que en los tubérculos el síntoma es externo, con lesiones oscuras, hundidas, de forma circular a irregular, rodeadas por bordes abultados de color púrpura a bronceado. Internamente, se desarrolla una pudrición seca, de textura coriácea corchosa y de color amarillo a castaño oscuro. Las lesiones pueden aumentar de tamaño durante el almacenaje y los tubérculos pueden arrugarse en estados avanzados de infección. A excepción

de la reducción en el rendimiento del cultivo, rara vez causa daños de importancia en los tubérculos (SENASA, 2014).

Manejo de la enfermedad

Para el manejo agroecológico se han recomendado las siguientes medidas:

- ✓ Utilizar variedades resistentes o tolerantes a la enfermedad.
- ✓ Buena preparación y nivelación del suelo para evitar encharcamientos.
- ✓ Mantener la humedad requerida y uniforme durante todo el ciclo del cultivo.
- ✓ Garantizar los niveles nutricionales adecuados al cultivo con distribución uniforme en toda el área.
- ✓ El suelo debe estar húmedo al momento del tratamiento y la cobertura en toda la planta.
- ✓ Una alternativa puntual es desinfectar la semilla con *Trichoderma harzianum* Rifai.

2.3.3 Pudrición seca o Fusariosis de la papa

La fusariosis en papa está distribuida a nivel mundial. Esta enfermedad es causada por un complejo de especies de *Fusarium* que afectan todas las fases de desarrollo del cultivo; desde la fase de almacenamiento de la semilla hasta la fase de cosecha de los tubérculos. Los campos infestados de *Fusarium* exhiben una gran variabilidad en tamaño de las plantas, así como fallas. Esto retrasa y reduce la producción considerablemente. La pudrición seca de la papa es causada por *Fusarium* spp. principalmente por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc (Asscheman *et al.*, 1996).

El tubérculo que se utiliza como semilla, se infesta durante el período de almacenamiento a través de heridas o daños mecánicos, o durante la siembra por medio de heridas que se provocan durante la operación del enterrado y el tapado. La superficie de corte en los tubérculos grandes que se fraccionan, son la vía de penetración más importante. Aproximadamente después de una semana de almacenamiento, las porciones de tubérculos fraccionados muestran lesiones de color castaño a negro, y después de dos semanas presentan depresiones o concavidades (López *et al.*, 1995).

La pudrición por *Fusarium* puede ser acelerada ante la presencia de bacterias causantes de pudrición blanda. Cuando la infección es severa, las lesiones se unen, el fragmento de semilla se pudre, de la superficie hacia dentro, y las yemas se van destruyendo a medida que la necrosis progresa (Asscheman *et al.*, 1996).

En Cuba esta enfermedad es frecuente y causa anualmente pérdidas que han sido calculadas hasta en un 30 % de la cosecha (Martínez y Alemán, 2005). El síntoma más frecuente es una pudrición que comienza por el ombligo, se observa un oscurecimiento de la parte lesionada. El tejido de esa parte se seca y se vuelve esponjoso. En la superficie de la parte afectada aparecen pústulas blancas, rosadas, amarillentas y azules claras, en dependencia de las especies de *Fusarium* que prevalezcan. Los ataques pueden producirse además, por toda la superficie del tubérculo debido a heridas al cosechar.

Manejo de la enfermedad

Es importante que durante la siembra, los tubérculos no se fraccionen; porque las heridas son una de las principales vías de infección del patógeno. De ahí que haya que manipular cuidadosamente los tubérculos en las labores de siembra y cosecha, para prevenir los daños mecánicos que estos pudieran sufrir (Secor y Gudmestad, 1999).

En Cuba se produce la infección de los tubérculos fundamentalmente por los estolones, y aparece una gran proporción de tubérculos afectados en el campo antes de la cosecha, principalmente al morir el follaje debido a la senescencia; por lo tanto es preciso cosechar los tubérculos antes de que se desprendan de los estolones (López *et al.*, 1995).

Además, es importante mantener oscuras las cámaras de almacenamiento para los tubérculos de consumo; así como una buena aireación y extracción del CO₂ liberado durante la respiración (Martínez y Alemán, 2005).

La semilla de papa debe tratarse con formulaciones de fungicidas (en líquido o en polvo) antes de almacenarlas para que estén libres de enfermedades. Es recomendable, proporcionar una

alta humedad y buena ventilación a comienzos del período de almacenamiento para facilitar la cicatrización de las heridas que pudieran presentar las semillas de papa (Asscheman *et al.*, 1996).

2.3.4 Podredumbre gomosa

La podredumbre gomosa se desarrolla hacia el interior de los tubérculos y se libera un olor típico parecido al de leche agria, tienen una textura gomosa de color rosado que se vuelven a rojo con la exposición al aire. En condiciones de alta humedad el tubérculo se observa blanco por la presencia de hifas y esporas del hongo. El exudado que se sale de los tubérculos afectados puede causar la pudrición blanda en los tubérculos adyacentes. Producida por el hongo *Geotrichum candidum* Link, comúnmente encontrado en el suelo y en la piel de los tubérculos con síntomas de pudriciones causados por otros microorganismos (Asscheman *et al.*, 1996).

Manejo de la enfermedad

La principal medida preventiva es evitar suelos anegados para lograr un buen drenaje. Si se forman parches húmedos en los tubérculos, estos deben ser conservados por separado de los tubérculos sanos. Los tubérculos afectados deben secarse rápidamente, almacenado en un lugar fresco y deben ser rápidamente vendidos. El control químico no es recomendable (Asscheman *et al.*, 1996).

Una alternativa de control biológico ha sido desinfectar la semilla con *Trichoderma harzianum* (MINAGRI, 2012).

2.4 Control biológico de organismos fitopatógenos

Entre las tendencias actuales de la agricultura se encuentra el uso de prácticas más ecológicas como el control biológico, mediante el uso de microorganismos antagonistas, los cuales pueden limitar la iniciación y propagación de las enfermedades causadas por patógenos vegetales mediante mecanismos de competencia, antibiosis, inducción de resistencia, entre otros (Fernández-Larrea, 2001).

Según Agrios (2005) el control biológico de enfermedades consiste en el uso de microorganismos o los productos de su metabolismo para controlar las poblaciones de un patógeno o para proteger directamente a las plantas de los patógenos en el sitio de infección antes o después de que esta ocurra.

Puede ocurrir naturalmente o mediante la manipulación del ambiente, el hospedante, el antagonista o por introducción masiva de uno o más antagonistas. Entre las estrategias de control biológico se encuentran el combate biológico del inóculo, la protección biológica de la superficie vegetal y el combate a través de la inducción de resistencia (Cook y Baker, 1983; Bettiol *et al.*, 2014).

El control biológico está recibiendo mayor atención por el énfasis en la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola que tiende a reducir el uso de productos agroquímicos en dichos sistemas y las medidas regulatorias para disminuir la contaminación de alimentos con residuos de plaguicidas. Un concepto amplio de control biológico incluye a hongos, bacterias y virus, microfauna (insectos, ácaros, nemátodos), protozoarios (amebas), algas, plantas superiores (resistencia, residuos). Depende de la actividad de la comunidad de microorganismos e incluye a numerosas interacciones microbianas, existe en ecosistemas y agro ecosistemas con la influencia del hombre y las prácticas agrícolas sobre los controladores biológicos (Guzmán *et al.*, 2013; Bettiol *et al.*, 2014).

Entre las limitaciones que encuentran los productos biológicos para su utilización a gran escala están su menor disponibilidad, eficacia y espectro de acción en comparación con los plaguicidas químicos (Andrews, 1992).

El control biológico, debería estar orientado a aprovechar agentes o prácticas de control con diferentes mecanismos de acción, para dificultar la evolución de las plagas por la complejidad de los reguladores a los que se enfrentaría (Guzmán *et al.*, 2013).

El suelo es un reservorio natural de hongos, nemátodos, entomopatógenos, microorganismos fitopatógenos y antagonicos; se requiere detectar la presencia y diversidad de aislados nativos de éstos últimos, con el propósito de evaluarlos como agentes potenciales de control biológico. Además, las interacciones entre el hongo antagonista y los organismos fitopatógenos en cada enfermedad son diferentes, por lo tanto es necesario conocer con certeza él o los mecanismos de acción involucrados, que permitan formular estrategias que redunden en una tecnología de manejo para reducir las aspersiones de los productos químicos y tratar de disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad. El peligro de los efectos contaminantes al ambiente y la salud humana, promueven el uso de bioplaguicidas y la reducción del empleo de productos agroquímicos como fertilizantes y plaguicidas. Es por ello que la producción y aplicación de medios biológicos para el control de plagas resulta decisivo porque disminuyen los riesgos de desarrollo de resistencia por parte de los patógenos y de la existencia de residuos de fungicidas en los alimentos y las aguas (Vinale *et al.*, 2008).

La selección de agentes de control biológico es una tarea necesaria como alternativa menos agresiva para el ecosistema y el hombre. Para que estos tengan éxito, se deben considerar muchos factores como las condiciones climáticas y el hábitat, los cuales deben ser adecuados para su crecimiento y para que invadan o afecten a los fitopatógenos que se desean controlar. Por tal motivo, las especies nativas tiene mayor potencial, siendo importante, detectar su presencia en lugares donde se pretenda utilizarlos (Andrews, 1992; Roiger *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 2014).

Por lo anterior, el uso de agentes de control biológico representa una alternativa viable de ser evaluada, particularmente aquellos descritos como efectivos contra enfermedades aéreas, los cuales podrían ser capaces de competir con el organismo fitopatógeno antes de que penetre, ya sea por espacio y/o nutrientes y no le permita germinar, o bien afectarlo por la excreción de diversas sustancias antibióticas que disminuyan su crecimiento y potencial reproductivo. Entre ellos se pueden considerar a las especies del género *Trichoderma*, dadas sus características de ser eficaces en el control de fitopatógenos del suelo y foliares en algunos cultivos (Papavizas, 1985; Elad, 2000; Galleti *et al.*, 2008).

2.4.1 *Trichoderma*

Trichoderma es un género fúngico cuyas especies se encuentran distribuidas en todo el mundo. El potencial de estas para el control de patógenos fue enunciado por primera vez en la década del 30 del siglo pasado (Weinding, 1932).

La capacidad de *Trichoderma* spp. para reducir los daños en las plantas causados por enfermedades, cuyos agentes causales son hongos fitopatógenos, está relacionada con su fuerte actividad competitiva, a la antibiosis, producción de enzimas líticas, metabolitos secundarios y al micoparasitismo. Diferentes especies de este género son agentes de control biológico. En particular, *Trichoderma harzianum* Rifai, es la especie con más amplio espectro de control, bajo diferentes condiciones ambientales (Howell, 2003; Martínez *et al.*, 2013).

2.4.1.1 Reproducción

La reproducción de *Trichoderma* puede ser sexual o asexual. Su fase perfecta (estado teleomorfo) lo ubica en la Clase Ascomycetes, Serie Pyrenomycetes, Orden Hipocreales, Género *Hypocrea* que se caracteriza por poseer ascomas periteciales inmersos en estromas con alta variabilidad morfológica (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; Barrera, 2012).

En su estado anamorfo, las estructuras de reproducción son conidios, y además posee estructuras de resistencia (clamidosporas). Las clamidosporas son intercalares o terminales,

de forma cilíndricas a globosa; por su naturaleza, representan la forma de propagación más efectiva (Rifai, 1969; Samuels *et al.*, 2012).

Los conidióforos miden de 62,5-69,0 x 3,0-4,7 μm , son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, con verticilos terminales de hasta cuatro fiálides. Ocasionalmente surgen solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4 μm . Los conidios tienen aproximadamente de 3,8-4 x 3,1-3,7 μm , con forma citriforme y subglobosos. Las clamidosporas intercalares, formadas por el micelio sumergido, subglobosas, de pared dentada, color verde suave y un tamaño de 12,5-10,0 μm (Bisset, 1991; Druzhinina, *et al.*, 2005).

2.4.1.2 Mecanismos de acción

El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura, es el antagonismo contra microorganismos patógenos de las plantas, por su capacidad para producir enzimas extracelulares que causan desintegración y muerte en hongos fitopatógenos que habitan el suelo (*micoparasitismo*), en la degradación de paredes celulares de las hifas de hongos patogénicos (*depredación*), en la producción de compuestos químicos volátiles y antibióticos antifúngicos que inhiben hongos basidiomicetos (*amensalismo*), en la colonización directa del hongo por penetración hifal (*predación*), en la *competencia* por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo y por su gran adaptabilidad y rápido crecimiento, sin ser estos mutuamente excluyentes por lo que mientras uno parece ser el principal, en realidad pueden actuar en conjunto (Martínez *et al.* 2013).

La competencia se da principalmente por nutrientes y espacio, de ésta manera la causa más común de la muerte de un microorganismo es por inanición, puesto que requieren de nutrientes exógenos, como carbono, y hierro para germinar, penetrar e infectar el tejido, y si los sitios de

infección están ocupados por el organismo benéfico tendrá dificultades para prosperar el hongo fitopatógeno (Hernández, *et al.*, 2011).

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo, a través de la producción metabólica de moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas hidrolíticas las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y β -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos y producen un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación. A mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder antagónico se incrementa. Sin establecer contacto físico alguno *Trichoderma sp.* puede inhibir el crecimiento de otros hongos mediante la producción de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como gliotoxina, viridina y gliovirina (Harman, *et al.*, 2010).

Cuando un hongo parásito ataca directamente a un hongo patógeno es un micoparásito. Para que se lleve a cabo el micoparasitismo, el hongo antagonista produce exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante. El micoparasitismo involucra una secuencia de eventos, que incluyen la localización del blanco, a través de un crecimiento quimiotrópico, reconocimiento, ataque, lisis y adquisición de nutrientes. La producción de enzimas hidrolíticas y los factores que influyen en estos eventos están ligados entre sí (Martínez *et al.*, 2013).

Entre las enzimas hidrolíticas que producen especies de *Trichoderma* se encuentran las quitinasas, glucanasas, proteasas y celulasas. Dichas enzimas están relacionadas en el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y así penetrar y micoparasitar al hospedante. Las quitinasas y glucanasas son las enzimas más descritas en el control biológico de fitopatógenos (Harman, 2006).

Diferentes especies de *Trichoderma* tienen la capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* fs. *dianthii* W.C. Snyder y

H.N. Hansen, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), *Colletotrichum gloesporioides* Penz. y Sacc., *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rosellinia bunodes* (Berk. y Broome) Sacc., *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Phytophthora cactorum* Lebert y Cohn., *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer, y *Cryptonectria parasitica* (Murrill) Barr (Martínez *et al.*, 2008).

En el control de enfermedades foliares *Trichoderma* spp. también ha demostrado ser efectivo ya que ha logrado reducir hasta un 75,0% a *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer, en ñame negro (*Dioscorea cayennensis* Lam.) y disminuir un 84,0% el daño por *Botrytis cinerea* Per.:Fr. en tomate (O'Neil *et al.*, 1996). Inclusive se tienen cepas de *Trichoderma* spp. resistentes a los fungicidas comúnmente utilizados, entre ellos, Benomil, Metalaxil y Propiconazol. De esta forma, se pueden utilizar al mismo tiempo y de manera alterna en un control integrado de fitopatógenos tales como *Pythium ultimum* Trow., *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, entre otros (Migheli *et al.*, 1995; Elad, 2000).

Pérez y Echemendia (1994) señalaron que bajo condiciones de infección natural de *Alternaria porri* [Ellis] Cif. obtuvieron una disminución de su incidencia en un 20,0% del hongo patógeno con la aplicación foliar de *Trichoderma harzianum* en plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). Resultados similares obtuvieron Carelys *et al.* (1997), frente a *Alternaria solani* Sor. en papa (*Solanum tuberosum* L.) en parcelas experimentales

2.5 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

El empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal constituye una estrategia en la agricultura sostenible, a nivel mundial. Su uso, está enfocado hacia el incremento de la nutrición de la planta (sustitución de fertilizantes químicos por biofertilizantes) y a la búsqueda de protección a enfermedades y plagas. Según Barea *et al.* (2005) los microorganismos intervienen en una serie de procesos como la descomposición, mineralización de compuestos orgánicos y la movilización de nutrientes en la interacción suelo-planta. Por otra parte, la sustentabilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso y manejo efectivo

de los recursos internos de los agroecosistemas. En este sentido, los biofertilizantes son un componente vital de los sistemas sustentables, ya que constituyen un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos (Dibut, 2006).

Según Mavrodi *et al.* (2006) la actividad de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal en general se inicia con mecanismos de quimiotaxis que están relacionados con la presencia de flagelos, quimiorreceptores y sistemas de regulación codificados genéticamente. Estos factores tienen gran importancia sobre la capacidad de colonizar la rizosfera y mantener la comunicación entre las células de la raíz con los microorganismos presentes en el suelo (Ahmad *et al.*, 2006).

Estos microorganismos, fundamentalmente bacterias, hongos filamentosos, actinomicetos y hongos micorrizógenos arbusculares se encuentran normalmente distribuidos en el suelo, pero en poblaciones insuficientes (entre 10^3 - 10^4 células por gramo de suelo) como para provocar el efecto beneficioso deseado sobre las plantas; de aquí, la importancia de aumentar el número poblacional de estos (entre 10^6 - 10^8 células /gramo de suelo) en función de potenciar su efecto, dando lugar como actividad resultante a la elaboración de biofertilizantes y bioestimuladores del crecimiento y desarrollo vegetal (Dibut, 2006), tal es el caso de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV).

Así, una de las vías que facilita la Microbiología del Suelo y la Biotecnología Agrícola aplicada, incluyendo la bioingeniería, consiste en la obtención de bioestimuladores a partir de la explotación de los microorganismos del suelo que, entre otras funciones, tienen la propiedad de producir sustancias fisiológicamente activas que, al interactuar con la planta, finalmente desencadenan en una mayor activación del metabolismo vegetal y consecuentemente actúan aumentando el desarrollo y el rendimiento (Dibut, 2006).

2.5.1 Empleo de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal en la propagación de papa

Según Hernández (2001) la papa alcanzó un rendimiento rentable con la inoculación de microorganismos a dosis reducidas de fertilizantes químicos, N y P en niveles del 10 al 15% menos, comparado con papa sin inocular y tratada con fertilizantes químicos.

Otros autores como Zuno-Floriano *et al.* (2009) utilizaron cepas de *Pseudomonas* obtenidas de las rizosfera de plántulas de papa, para la producción *in vitro*. El resultado fue que la cepa de *Pseudomonas* sp. formó una biopelícula alrededor de las raíces de plántula de papa a los siete días posteriores a la inoculación y, a su vez, logró establecerse en forma endofítica.

Nookaraju *et al.* (2011) realizaron un estudio, donde aislaron e identificaron 13 bacterias de la rizosfera de la papa y las probaron para ver su influencia en la tuberización de papa bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. Bajo las condiciones *in vitro*, se formaron microtubérculos como resultado de hinchamientos subapicales de estolones en el control, mientras que en algunos de los tratamientos con bacterias se formaron tubérculos mayormente sésiles en las axilas de los segmentos nodales. Detectaron aumentos significativos en la expresión del ARNm de LOX y en sus actividades enzimáticas en estolones y tubérculos de los tratamientos con rizobacterias en comparación con los controles sin tratamientos. También se observó una fuerte correlación positiva entre la expresión del gen LOX inducida por rizobacteria y el incremento de la inducción y rendimiento de tubérculo.

2.5.2 Bioproductos a base de la tecnología Microorganismos eficientes

Definición

La tecnología conocida como Microorganismos Eficientes (EM) (EM, por sus siglas del inglés: *Effective microorganism*) con amplio espectro de aplicaciones, fue creada por el investigador japonés Teuro Higa (Higa y Wididana, 1991). EM consiste en cultivos mixtos de microorganismos benéficos naturales que coexisten en un medio líquido. Los inóculos microbianos se comercializan desde Japón como EM-1®, EM-X® o EM-Ceramic®. Estos contienen bacterias lácticas, bacterias fotosintéticas y levaduras de más de 80 especies diferentes. Tiene aplicaciones en la agricultura, en el control de desechos medioambientales, en productos de aseo y limpieza, en materiales de la construcción, etc. Se encuentra aplicada y los productos en venta en muchos países.

El concepto de Microorganismos Eficientes, se basa en la coexistencia y co-prosperidad de varios microorganismos con una capacidad de reavivar, restaurar y conservar el medio en que se encuentren, son cuidadosamente seleccionados en su medio natural y multiplicados con diversos procedimientos. También se han descrito como la coexistencia de un cultivo mixto de microorganismos beneficiosos anaerobios y aeróbicos (Shalaby, 2011). Además, se les puede encontrar en la literatura como Microorganismos Benéficos (MB).

Origen y aplicaciones generales

Los EM surgen en los primeros años de la década del ochenta, del siglo XX, por el Dr. Teruo Higa, profesor de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Ryukyus, en Japón. Esta tecnología nace como respuesta a la necesidad de sustituir el uso intensivo de fertilizantes químicos y pesticidas en la agricultura y preservar la salud de los humanos (Higa, 1991; Yatim, 2009).

Los Microorganismos Eficientes procesan y consumen las sustancias que causan la putrefacción, los malos olores y las enfermedades, eliminando la mayoría de los microbios

patógenos por medio de la exclusión competitiva porque evitan que el oxígeno forme radicales libres, los cuales están asociados a ciertas enfermedades en plantas, animales y seres humanos; esto ocurre debido a que, como se explicó anteriormente, es un concentrado líquido que contiene bacterias, levaduras, y otra serie de microorganismos que al entrar en contacto con la materia orgánica segregan diferentes sustancias tales como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales quelados y antioxidantes que aceleran el proceso de descomposición y previenen el deterioro o la corrosión por oxidación, creando un ambiente benéfico para los seres vivos (Higa, 2003).

En la actualidad la tecnología EM se ha desarrollado para diversos propósitos en alrededor de 120 países por sus bajos precios. Muchos tipos se emplean con diversos fines. Por ejemplo, en la India, Sri Lanka, África y Sur América se utilizan en la agricultura, también para la alimentación de reses y tratamiento porcino, en la hotelería para la eliminación de olores desagradables, como limpiador y para el tratamiento de fosas sépticas. Se puede mencionar también que está catalogado como un abono altamente potencial e incluso es usado para la salud (Higa, 2003).

Está demostrado que el empleo de bioproductos en los cultivos agrícolas es una práctica que reduce la aplicación de fertilizantes químicos y de otros agroquímicos que dañan el medioambiente, además de que resultan menos costosos para los agricultores (Dibut, 1996). En Cuba, el Grupo Empresarial Labiofam cuenta entre sus productos con fungicidas, insecticidas y fertilizantes de origen biológico (Labiofam, 2014) que se aplican en diferentes cultivos agrícolas. La necesidad de producir semilla de papa con un menor costo económico y ambiental justifica la evaluación de alternativas de manejo agronómico que incluyan bioproductos de fabricación nacional.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey (EEPF) situada en Matanzas y en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas en Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Atendiendo a resultados previos de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey en la producción de papa con bioproductos de fabricación nacional para el manejo agronómico del cultivo se desarrollaron experimentos *in vitro* con los dos productos que se emplean para el manejo de enfermedades fúngicas y se comprobó en campo la respuesta de las plantas en la producción de semilla para categoría registrada.

3.1 Efecto *in vitro* del bioproducto Versaklin® y *Trichoderma harzianum* Rifai sobre patógenos fúngicos del cultivo de la papa

Con el objetivo de determinar el efecto *in vitro* del bioproducto Versaklin® y *T. harzianum* sobre patógenos fúngicos del cultivo de la papa se realizaron diferentes ensayos.

Cepas

Se emplearon cinco cepas pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas:

- *Alternaria alternata* (Fr) Keissl CCIBP-Aa 8,
- *Fusarium solani* (Mart.) Sacc CCIBP-Fus 23,
- *Geotrichum candidum* Link CCIBP-Geo 1,
- *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary CCIBP-Pi 1,
- *Trichoderma harzianum* Rifai CCIBP-Trich 15.

Medios de cultivo

Se utilizaron los medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA) (AES), Agar Extracto de Malta (AEM) (2%) y Caldo Papa Dextrosa (PDB) (Difco) a pH 5,6±0,2. Los medios de cultivos fueron

esterilizados mediante calor húmedo en autoclave (AC3701) a 121°C y 1,2 atm de presión durante 20 minutos.

Bioproducto

El bioproducto Versaklin® (Instituto Finlay) se obtiene por fermentación microbiana a partir de microorganismos nativos y subproductos de las industrias láctea y azucarera e incluye en su composición bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Oliva *et al.*, 2014). Además, desde el punto de vista químico contiene 28,7 mg L⁻¹ de nitrógeno total, 3,04 mg L⁻¹ de fósforo total, 1,44 g L⁻¹ de potasio, 28,2 mg L⁻¹ de sodio, 22,72 mg L⁻¹ de hierro total, 3,49 mg L⁻¹ de manganeso, 53,5 mg L⁻¹ de magnesio, 0,56 mg L⁻¹ de cobre, 0,39 mg L⁻¹ de níquel, 0,27 mg L⁻¹ de cobalto, 0,90 mg L⁻¹ de zinc y 22,56 mg L⁻¹ de calcio. Se comercializa en estado líquido y es de color ámbar.

3.1.1 Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* frente a patógenos fúngicos

El antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* CCIBP-Trich 15 frente a los hongos filamentosos fitopatógenos de la papa se comprobó mediante el método de cultivo dual (Martínez y Solano, 1994). Para ello, se emplearon placas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro con 20 mL L⁻¹ de medio de cultivo PDA. En un extremo de la placa Petri se colocó un disco de agar de 7 mm de diámetro con micelio del patógeno y en el extremo opuesto otro disco de 7 mm con micelio de la cepa de *T. harzianum* a 50 mm de separación entre ellos. Para el control, se inoculó en el extremo de una placa Petri un disco de agar de 7mm de diámetro con el patógeno en ausencia de la cepa de *T. harzianum*. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 28°C y oscuridad constante

Se evaluó la capacidad antagónica según la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) (Tabla 1) y las formas e intensidad del antagonismo por los criterios propuestos por Davet *et al.* (1981) a los siete días de incubación.

Tabla 1. Escala propuesta por Bell *et al.* (1982) empleada para medir el antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* sobre hongos filamentosos fitopatógenos del cultivo de la papa.

Grado	Capacidad antagónica
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo y ningún organismo parece dominar al otro
4	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i>
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio de cultivo.

Formas de antagonismo

- Antagonismo físico: las hifas de los dos hongos forman un relieve en la zona de contacto.
- Antagonismo químico: las hifas dan origen al fenómeno de lisis en la zona de contacto.
- Antagonismo hiperparasitario: las hifas del antagonista recubren las del parásito entrelazando o entrecruzándose con estos y ocupando el espacio vital.
- Antagonismo físico-químico: las hifas de los dos hongos no alcanzan a tomar contacto, dando origen a un espacio vacío.

Intensidad del antagonismo

- ++ Intensidad de antagonismo elevado (evidente, el patógeno es inhibido en el crecimiento más del 25%).
- + Intensidad de antagonismo intermedio (el patógeno es inhibido en el crecimiento menos del 25%).
- - Intensidad de antagonismo escasa (el patógeno no es inhibido en el crecimiento por el antagonista).

Además, se determinó si el antagonismo estaba mediado por los mecanismos de competencia, micoparasitismo o producción de metabolitos difundidos o volátiles.

3.1.1.1 Competencia

Se empleó el método de cultivo dual según lo descrito en 3.1.1. Cada 24 horas se midió el crecimiento radial del micelio de los hongos. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por la fórmula $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno control y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento a las 72 horas de inoculados (Ezziyyani *et al.*, 2003). Se realizaron diez réplicas por cada cepa de hongo fitopatógeno.

3.1.1.2 Interacción de las hifas (micoparasitismo)

El tipo de interacción hifal entre *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 y las cepas de hongos fitopatógenos (enrollamiento, penetración, vacuolización o lisis) se determinó por observación microscópica (aumento 400x) en microcultivos realizados por el método de Riddell (1950).

3.1.1.3 Producción de metabolitos

Se determinó si *Trichoderma harzianum* CCIBP-Trich 15 podía inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos mediante la producción de metabolitos secundarios volátiles o no volátiles.

Inhibición por metabolitos volátiles

Para los metabolitos volátiles se siguió el protocolo propuesto por Dennis y Webster (1971). En una tapa de una placa Petri de 90 mm de diámetro se añadió medio de cultivo PDA, en la cual se le colocó un disco de micelio de 7 mm de diámetro del patógeno. En la tapa de otra placa Petri se añadió medio de cultivo PDA en la cual se le colocó un disco de micelio de 7 mm de diámetro de la cepa de *T. harzianum*. Se colocaron las dos tapas una frente a la otra y se sellaron con Parafilm®. Como control se emplearon discos de agar de 7mm de diámetro en lugar de los patógenos. Las placas se incubaron a 28°C durante siete días. Pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro de la colonia de los patógenos y se comparó con el control en ausencia del antagonista. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial por

la fórmula descrita en el acápite 3.1.1.1. Se realizaron diez réplicas por cada cepa de hongo fitopatógeno.

Inhibición por metabolitos difundidos

Para los metabolitos difundidos se siguió el protocolo propuesto por Ajith y Lakshmidēvi (2010) con modificaciones. Para ello, se inocularon dos discos de micelio de 10 mm de diámetro de la cepa de *T. harzianum* en un Erlenmeyer de 250 mL L⁻¹ de capacidad con 100 mL L⁻¹ de medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB) a pH 5,6 ± 0,2. Los frascos se colocaron en zaranda (FLY-111B) a 27°C y 150 rpm durante 12 días. Transcurrido este tiempo se separó el micelio del hongo del filtrado de cultivo mediante membrana de 0,45 µm, luego el cultivo filtrado se centrifugó (Centrífuga 5810 R) a 12 000 rpm durante diez minutos, se desechó el *pellet* y se utilizó el sobrenadante que se volvió a filtrar mediante membrana de 0,22 µm. Se mezcló el filtrado de cultivo con medio de cultivo PDA a razón de 1:10 y se depositó en placas Petri (90 mm de diámetro). Una vez solidificado el medio de cultivo se inocularon discos de micelio de 7mm de diámetro de los hongos fitopatógenos en el centro de las placas, las cuales fueron incubadas durante siete días. Pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro de la colonia de los patógenos y se comparó con el control en ausencia de filtrado de cultivo. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial según la fórmula descrita en el acápite 3.1.1.1. Se realizaron diez réplicas por cada cepa de hongo fitopatógeno.

3.1.2 Efecto *in vitro* de Versaklin® sobre patógenos fúngicos

Para evaluar la actividad antifúngica del bioproducto Versaklin® se obtuvo el filtrado de cultivo libre de células microbianas mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y luego se empleó un filtro de 0,45µm.

El efecto antifúngico *in vitro* se evaluó por dilución en agar. Para ello, se prepararon Erlenmeyers de 100 ml L⁻¹ de capacidad con 45 ml L⁻¹ de medio de cultivo PDA más 5 ml L⁻¹ de filtrado de cultivo de Versaklin® para una dilución de 1:10. Este medio de cultivo se vertió en placas Petri de vidrio de 52 mm de diámetro. Se tomaron discos de micelio de 7 mm de diámetro de las cepas de hongos filamentosos, provenientes de colonias crecidas en medio

de cultivo (PDA) y se inocularon en dichas placas Petri. Además, se inocularon los hongos filamentosos en placas Petri con medio de cultivo PDA sin Versaklin® que fueron utilizadas como controles. Las placas se incubaron durante siete días a 28°C y oscuridad constante. Se midió diariamente el diámetro de la colonia de cada cepa (Mosquera *et al.*, 2009). El experimento constó de cuatro réplicas. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial mediante fórmula descrita en el acápite 3.1.1.1.

3.2 Respuesta de plantas de papa cv. 'Romano' con diferentes alternativas de manejo agronómico frente a enfermedades fúngicas

Con el objetivo de determinar la incidencia e intensidad de enfermedades fúngicas en el cultivo de papa cv. 'Romano' sometidas a diferentes alternativas de manejo agronómico se diseñó un experimento de campo para el cual se tuvieron en cuenta los aspectos incluidos en el Instructivo técnico de la Papa (MINAGRI, 2012) y en la norma cubana: Norma Ramal NRAG 211:2011 Semillas de papa (*Solanum tuberosum* L.). Certificación (NRAG, 2011). La siembra se realizó el 25 de diciembre de 2013 y la cosecha 70 días después.

Material vegetal

Se emplearon minitubérculos de papa cultivar 'Romano' obtenido como semilla básica en el Instituto de Biotecnología de las Plantas que se plantaron para obtener semilla registrada.

Condiciones de cultivo y diseño experimental

La investigación se realizó en un suelo de topografía llana, con pendiente de 0,5 a 1,0%, y está clasificado por Hernández-Cruz *et al.* (2003) como Ferralítico Rojo lixiviado, húmico nodular ferruginoso hidratado, de rápida desecación, arcilloso y profundo sobre calizas, con un pH ligeramente ácido de 6,2-6,4. La preparación del suelo, siembra y labores culturales se realizaron de acuerdo con lo descrito en el Instructivo Técnico de la papa (MINAGRI, 2012). Previo a la plantación no se detectó infestación por nemátodos del género *Meloidogyne* (NRAG, 2011).

Durante los meses de crecimiento y desarrollo de las plantas los valores de temperatura y humedad relativa medios fueron de 22,5°C y 76%, respectivamente (Anexo 1).

El riego se efectuó por aspersión con una norma de 250 a 300 m³ ha⁻¹ y frecuencia cada 4 días con ajustes según precipitaciones y humedad del suelo. La eliminación de malezas se realizó de forma mecanizada y manual.

Se empleó un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones (4x4) con una distancia entre parcelas de 1,5 m, distancia entre bloques de 2,5 m. Se plantaron 25 tubérculos por surco a una distancia de 0,90 x 0,25 m (67,5 m² por parcela).

Se conformaron cuatro tratamientos que consideraron las siguientes alternativas de manejo agronómico (AMA):

Tratamiento I

Previo a la siembra, los tubérculos se sumergieron en una solución acuosa con el bioproducto Versaklin® (20,0 L en 200 L de agua) y se dejaron secar al aire. Se añadieron 3,0 kg de materia orgánica (cachaza procesada y humus de lombriz en una relación 2:1) por metro lineal en el fondo del surco equivalente a 33,0 t ha⁻¹. El manejo fitosanitario a la plantación y la fertilización foliar se realizaron solo con el bioproducto Versaklin® (20 L ha⁻¹) cada cinco días después del riego (**MEF-MO**).

Tratamiento II

Previo a la siembra, los tubérculos se sumergieron durante 2 min en una solución acuosa que contenía los bioproductos Versaklin® (20,0 L), Ecomic (20,0 kg) y Tricosave TS3-G (5,0 kg) en 200,0 L de agua y se dejaron secar al aire. Se añadieron 3,0 kg de materia orgánica (cachaza procesada y humus de lombriz en una relación 2:1) por metro lineal en el fondo del surco equivalente a 33,0 t ha⁻¹. El manejo fitosanitario a la plantación y la fertilización foliar se realizaron con bioproductos de producción nacional (Tabla 3, Figura 1) (Propuesta por Estación Experimental Pastos y Forrajes Indio Hatuey) (**Biológico**)

Tratamiento III

Tratamiento sin aplicación de productos foliar o al tubérculo. Se añadieron 3,0 kg de materia orgánica (cachaza procesada y humus de lombriz en una relación 2:1) por metro lineal en el fondo del surco equivalente a 33,0 t ha⁻¹ (**MO**).

Tratamiento IV

Manejo fitosanitario con productos químicos (Tabla 2) y fertilización con fórmula completa 8-14-17 (60-75-70 kg ha⁻¹) (**Químico**).



Figura 1. Bioproductos de producción nacional empleados para el manejo agronómico de plantas de papa cv. 'Romano' para la producción de semilla.

Los tratamientos se dispusieron en el terreno considerando que la dirección del viento no favoreciera la dispersión de inóculo del tratamiento control al resto de los tratamientos.

El contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y azufre del suelo en las parcelas de cada tratamiento se muestra en el Anexo 2.

Productos empleados y dosis de aplicación

Los productos para el manejo fitosanitario o para la nutrición de las plantas se emplearon de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes y se tuvieron en cuenta los requerimientos básicos a observar en la aplicación de plaguicidas descritos en el Instructivo técnico de la papa (MINAGRI, 2012).

Las dosis y frecuencias de aplicación de los bioproductos estuvieron en correspondencia con resultados previos de la alternativa de manejo agronómico correspondiente al tratamiento Biológico obtenidos en EEPF Indio Hatuey (resultados no mostrados).

Especialmente, para la frecuencia de aplicación de los bioproductos y productos químicos para el manejo fitosanitario en los tratamientos biológico y químico, respectivamente, se estableció según muestreos efectuados a la plantación de acuerdo con lo establecido por el “Resumen ampliado de Metodologías de Señalización y Pronóstico”.

Los muestreos se realizaron con una frecuencia semanal por el método de las diagonales, puntos en las diagonales (en cada punto se toman las plantas a evaluar a su alrededor) o diagonal en zigzag (Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, 2005) (Anexo 3).

Los bioproductos considerados para el manejo de enfermedades fúngicas fueron Versaklin® (incluido en el tratamiento MEF-MO y biológico) y *Trichoderma* (Tricosave TS3-G) (tratamiento Biológico).

Tabla 2. Productos empleados en el manejo agronómico del tratamiento IV (Químico).

Producto	Uso	Dosis
Actara (Tiametoxan)	Insecticida	0,5 kg ha ⁻¹
Monarca SE(10,0+1,25)(Tiacloprid+ciflutrin(beta)	Insecticida	5,0 L ha ⁻¹
Methomex PS90	Insecticida	0,5 kg ha ⁻¹
Muralla CE (7,5+2,5) (imidacloprid+ciflutrin)	Insecticida	0,5 L ha ⁻¹
Cupro PH50 (Oxicloruro de cobre)	Fungicida	0,7 L ha ⁻¹
Amistar CS 25	Fungicida	0,5 L ha ⁻¹
Urea	Fertilizante	4,0 kg ha ⁻¹

Durante todo el periodo se observó la plantación para realizar selección negativa de plantas según lo establecido en la NRAG 211: 2011 (NRAG, 2011).

Tabla 3. Bioproductos de producción nacional empleados en el manejo agronómico del tratamiento II (Propuesta por Estación experimental Pastos y forrajes Indio Hatuey).

Bioproducto	Microorganismos/ uso propuesto	Dosis	Frecuencia
Versaklin® (Instituto Finlay)	Bacterias, levaduras y hongos filamentosos/ nutrición, control de patógenos	20,0 L ha ⁻¹	Tratamiento al tubérculo y cada 5 días
Tricosave TS-3G (LABIOFAM)	<i>Trichoderma harzianum</i> cepa TS3 / Para el control biológico de hongos fitopatógenos*	5,0 kg ha ⁻¹	Según monitoreo, después de la aparición de los primeros síntomas, semanal
Vertisave-5 (LABIOFAM)	<i>Lecanicillium lecanii</i> cepa LBVL-5 (<i>Verticillium lecani</i>) / control de larvas y adultos de varios insectos*	5,0 g ha ⁻¹	Según monitoreo, cuando aparecen los primeros índices de plagas y repetir cada 7 días
Thurisave-24 SC (LABIOFAM)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> H-3 cepa LBT-24/ Como insecticida para el control de larvas de lepidópteros defoliadores*	10,0 kg ha ⁻¹	Según monitoreo, aplicar teniendo en cuenta el umbral de plaga
Thurisave-13 (LABIOFAM)	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa LBT-13 / Acaricida, control de plagas*	5,0 kg ha ⁻¹	Según monitoreo, aplicar teniendo en cuenta el umbral de plaga
Metasave (LABIOFAM)	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin / control de larvas y adultos de varios insectos*	5,0 kg ha ⁻¹	Según monitoreo, aplicar teniendo en cuenta el umbral de plaga
Fitomas E (LABIOFAM)	Estimulante de la nutrición, crecimiento y desarrollo*	1,0 L ha ⁻¹	A los 33 días**
Fertimang (LABIOFAM)	Fertilizante*	4,0 L ha ⁻¹	A los 42 días**
BIOBRAS 16 (LABIOFAM):	Regulador del crecimiento y desarrollo vegetal*	100,0 mL ha ⁻¹	A los 55 días**
Ecomic (LABIOFAM)	Hongos micorrízicos arbusculares del género <i>Glomus</i> / biofertilizante*	20,0 kg/200L	Tratamiento al tubérculo

* *Vademecum* (LABIOFAM, 2014), ** días después de la siembra

Evaluaciones

Las evaluaciones se realizaron desde la siembra hasta la cosecha a los 70 días. Se consideraron 20 plantas por parcela (80 plantas por tratamiento) del centro de cada una tanto para las evaluaciones fitosanitarias como para los componentes del rendimiento.

Para la evaluación de las enfermedades fúngicas se siguieron las indicaciones del “Resumen ampliado de Metodologías de Señalización y Pronóstico (Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, 2005).

La incidencia de enfermedades fúngicas se consideró como la proporción de plantas que mostraron síntomas de las enfermedades fúngicas descritas del cultivo. Se cuantificaron las plantas con síntomas por tratamiento y se calculó la incidencia en porcentaje de plantas afectadas a los 30, 45, 60 y 70 días después de la siembra.

Para determinar la intensidad de las enfermedades foliares se empleó la escala de seis grados: 0) planta sana (1) primeros síntomas o manchas en las hojas (2) las manchas ocupan hasta un 10% de la superficie de la planta (3) entre 11 y 25% (4) entre 26 y 50% (5) más del 50% de la superficie de la planta (Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, 2005).

Posteriormente se calculó la intensidad (%) mediante la fórmula de Townsend y Heuberger (1945):

$$\% I = \frac{\sum(a * b)}{N * K} * 100$$

Dónde:

a – grado

b - cantidad de plantas afectadas en cada grado

N – total de plantas evaluadas

K – último grado de la escala

Además, de la enfermedad de mayor incidencia se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) y estimó la efectividad técnica de las AMA a los 70 días posteriores a la siembra a través de la variable intensidad y las fórmulas:

ABCPE: se calculó mediante la fórmula de Shaner y Finney (1977):

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

donde Y_i expresa la severidad (en función de la intensidad acorde con la escala), X_i =tiempo (días) a la i -ésima observación y n =número total de observaciones.

Efectividad técnica:

$$ET = \frac{P - P_1}{P} * 100 \quad \text{Dónde: } P \text{ Intensidad de la enfermedad en el tratamiento control,}$$

P_1 – Intensidad de la enfermedad en el tratamiento AMA

Para esta variable se consideró como control el tratamiento donde no se aplicaron productos para el manejo fitosanitario (tratamiento III, MO).

En la cosecha (70 días) se cuantificó el número de tubérculos por planta así como se determinó la masa fresca (g) y seca (g) de los tubérculos. Para la masa seca, se dejaron secar a 70°C hasta peso constante. Además, los tubérculos se clasificaron por su diámetro (calibre) en cada tratamiento.

Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 21,0 para Windows. Las variables se sometieron a análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas. Al no cumplirse los supuestos la comparación de medias se efectuó mediante pruebas no paramétricas.

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto *in vitro* del bioproducto Versaklin® y *Trichoderma harzianum* Rifai sobre patógenos fúngicos del cultivo de la papa

Se comprobó en los ensayos *in vitro* que tanto el bioproducto Versaklin® como *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 afectaron el crecimiento de las cepas de patógenos fúngicos que se utilizaron.

4.1.1 Antagonismos *in vitro* de *Trichoderma harzianum* frente a patógenos fúngicos

Se observó antagonismo *in vitro* de la cepa de *T. harzianum* frente a los hongos fitopatógenos ensayados.

La capacidad antagónica de *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 fue de grado uno frente a *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8, *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 y *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 porque a los siete días de incubación en cultivo dual sobrecreció completamente las colonias de los patógenos y cubrió totalmente la superficie del medio de cultivo. Frente a *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1 fue de grado 2 porque *T. harzianum* sobrecreció las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.

La forma de antagonismo fue hiperparasitario frente a *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8, *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 y *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 ya que sus hifas recubrieron la de los patógenos entrelazando o entrecruzándose con estos y ocuparon el espacio vital (Figura 2 A, B) mientras que frente a *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1 la forma de antagonismo fue físico porque ambos hongos forman un relieve en la zona de contacto (Figura 2 C,D).

La intensidad de antagonismo de *T. harzianum* frente a las cuatro cepas de hongos fitopatógenos fue elevada porque inhibió su crecimiento en más del 25%. Este resultado confirma capacidad de cepas de *Trichoderma* para el control biológico de hongos fitopatógenos referida previamente por otros autores (Howell, 2003; Reyes *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2014).

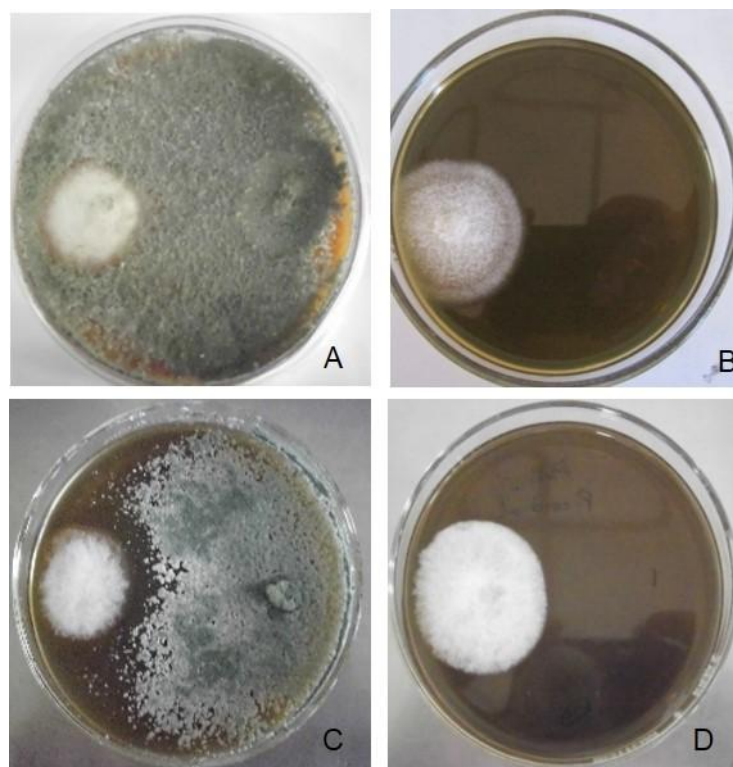


Figura 2. Formas de antagonismo de *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 sobre patógenos fúngicos en cultivo dual. Antagonismo hiperparasitario sobre *F. solani* CCIBP-Fus 23 (A) Control (B), antagonismo físico frente a *P. infestans* CCIBP-Pi 1 (C). Control (D).

Los resultados encontrados en esta investigación coinciden con los descritos por otros investigadores que refieren antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de diferentes cultivos. Por ejemplo, Arzate *et al.* (2006) en estudios de enfrentamiento *in vitro* de cepas de *Trichoderma* con *M. fijiensis* indicaron que el micelio del antagonista hizo contacto con el patógeno en cultivo dual a las 24h de incubación en todas las cepas evaluadas y que el antagonismo se clasificó de grado 1. De igual forma, Osorio-Hernández *et al.* (2011) refirieron que aislados de *Trichoderma* spp. mostraron antagonismo de grado 1 según la escala de Bell *et al.* (1982) en cultivo dual frente a *Phytophthora capsici* Leonian.

4.1.1.1 Competencia

A las 72 horas de incubación el crecimiento radial de *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 fue mayor que el de los hongos fitopatógenos. Se observó competencia por el espacio vital (Figura 3).

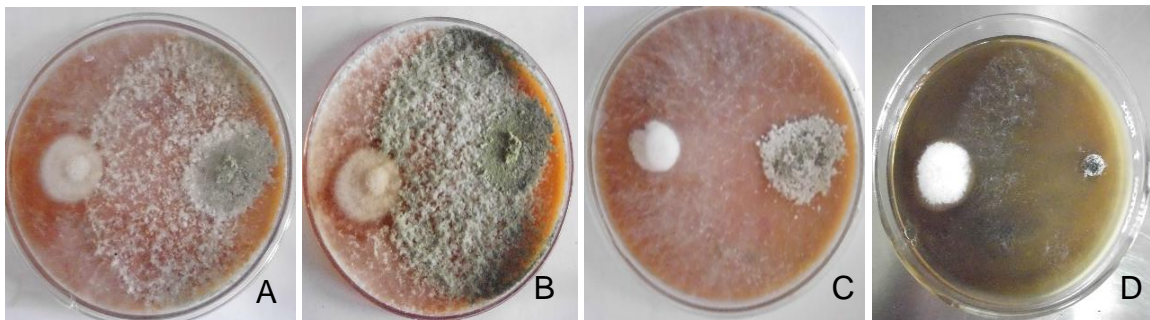


Figura 3. Cepa de *Trichoderma harzianum* CCIBP-Trich 15 en cultivo dual con *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8 (A), *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 (B), *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo1 (C) y *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1 (D) a las 72 horas de incubación en medio de cultivo PDA.

La cepa CCIBP-Trich 15 en cultivo dual inhibió el crecimiento radial de los patógenos *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8, *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 y *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 por encima del 50% y *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1 en más del 40% (Figura 4).

Los resultados de esta investigación se corresponden con los informados por otros autores sobre el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos. En este sentido, Suárez *et al.* (2008) comprobaron mayor competencia por los nutrientes y el espacio vital de *T. harzianum* frente a *Fusarium solani* (Mart) Sacc y asociaron este fenómeno con la velocidad de crecimiento, una mayor intensidad metabólica así como una mayor tasa de incorporación y asimilación de nutrientes. Asimismo, Salazar *et al.* (2011) evaluaron la actividad *in vitro* de *Trichoderma* sp. frente a *Fusarium oxysporum* Schltld. (agente causal de la fusariosis del tomate; *Solanum lycopersicum* L.) y observaron una disminución del porcentaje de crecimiento del patógeno con respecto a las especies de antagonistas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo a pesar de que estos autores utilizaron otra especie hospedante.

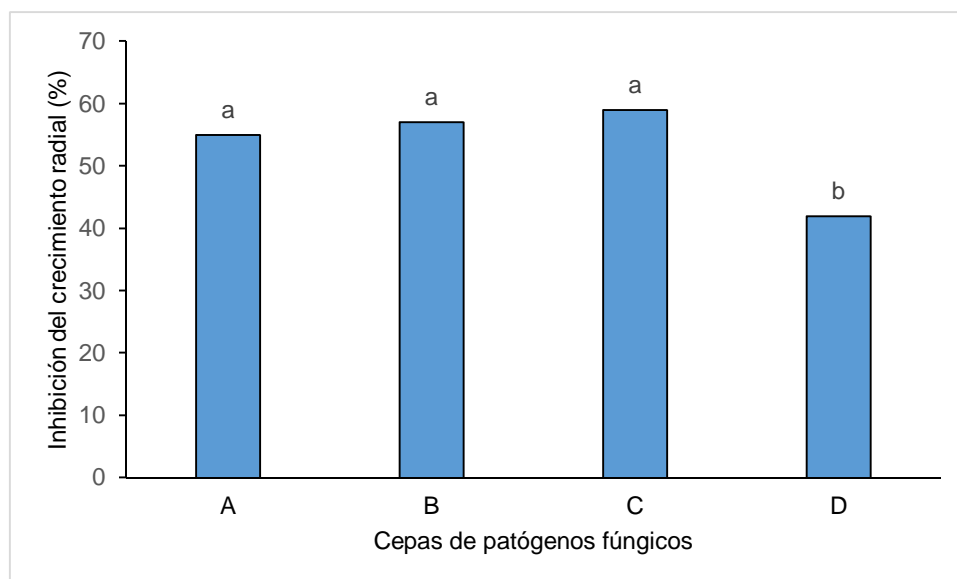


Figura 4. Inhibición del crecimiento radial de las cepas de *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8 (A), *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 (B), *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 (C) y *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1 (D) por *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 en cultivo dual. Letras diferentes sobre barras indican diferencias entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0,05$. $n=10$

De igual forma, Osorio-Hernández *et al.* (2011) evaluaron el efecto antagonista *in vitro* de 31 cepas de *Trichoderma* frente a *Phytophthora capsici* Leonian y observaron que el 97% de las cepas mostraron competencia y cubrieron la placa completamente.

Con respecto a patógenos de otros cultivos también se ha comprobado el efecto antagonista de esta especie de *Trichoderma*. Por ejemplo, Alvindia (2012) informó sobre la inhibición del crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en cultivo dual con la cepa de *T. harzianum* DGA01, aislada de frutos de banano, después de diez semanas de incubación. Este autor destacó como la característica más importante del antagonista (su rápido crecimiento) que en 48h le permitió cubrir totalmente el medio de cultivo en una placa Petri de 90 mm de diámetro. Recientemente, Acosta-Suárez *et al.* (2013) mostraron en un estudio similar que una cepa de *Trichoderma harzianum* inhibió el crecimiento de *M. fijiensis* por competencia y micoparasitismo.

4.1.1.2 Interacción de las hifas (Micoparasitismo)

Se demostró el micoparasitismo del antagonista CCIBP-Trich 15 sobre las cepas de hongos fitopatógenos. Según se ha descrito este es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico donde *Trichoderma* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes, reconocimiento donde se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato, adhesión y enrollamiento que ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno y actividad lítica que comprende 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*. El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante que muestra síntomas de disgregación. Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Chet *et al.*, 1981; Chet y Benhamou, 1998; Howell, 2003; Küçük y Kivanç, 2004; Nico *et al.*, 2005; Harman, 2006; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008).

En el parasitismo a nivel microscópico no todas estas interacciones son siempre observadas, pues al parecer dependen del aislamiento de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del ambiente (Harman, 2006). En este estudio se observaron algunas en las interacciones entre la cepa de *Trichoderma harzianum* y los hongos fitopatógenos ensayados.

La primera etapa del micoparasitismo (crecimiento quimiotrófico del antagonista hacia el patógeno) se observó para los cuatro hongos filamentosos ensayados. La adhesión y enrollamiento se detectó microscópicamente en el micelio de *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 (Figura 5).

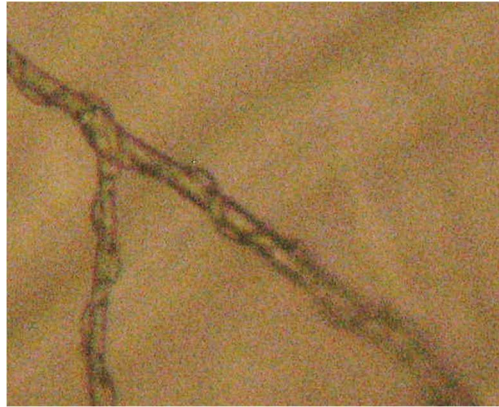


Figura 5. Enrollamiento de hifas de *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 sobre hifas de *Geotrichum candidum* (CCIBP-Geo 1) en microcultivo. Aumento 400x.

La actividad lítica se observó en el micelio de *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 con daños en la integridad de la pared celular de las hifas y derrame del contenido celular (Figura 6). Estos resultados sugieren la posible presencia de enzimas extracelulares de *Trichoderma harzianum* CCIBP-Trich 15 con actividad lítica sobre las hifas de este patógeno.

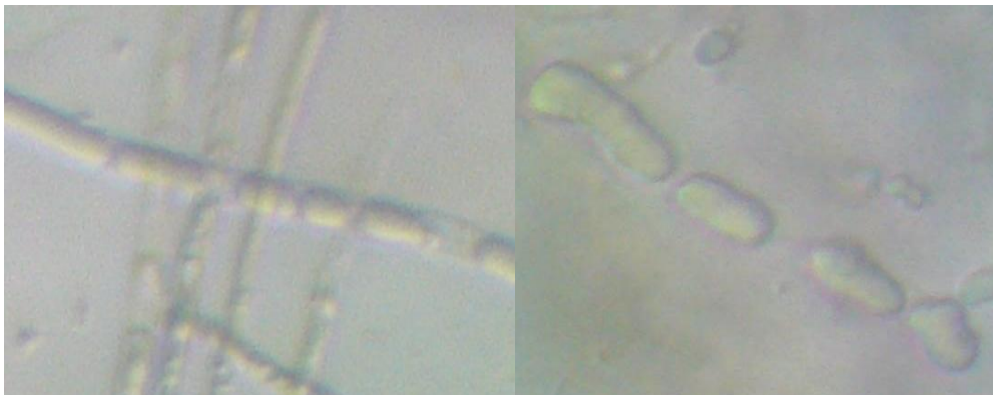


Figura 6. Observación microscópica de la actividad lítica de la cepa CCIBP-Trich 15 sobre hifas de *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 donde se aprecia derrame celular. Aumento 400x.

Las enzimas desempeñan una función esencial en el micoparasitismo, ya que la penetración de la hifa de *Trichoderma* en su hospedante está regida por la maquinaria enzimática de este antagonista. En otras interacciones, se ha comprobado que diferentes especies de *Trichoderma* lograron producir polisacaridasas, proteasas y lipasas, compuestos que pueden intervenir en la degradación de la pared de las células de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) (Chérif y Benhamou, 1990). De igual forma, Haran *et al.* (1996) encontraron diferentes niveles de producción de enzimas hidrolíticas, cuando *Trichoderma* se enfrentó a *Sclerotium rolfsii* Sacc. o *R. solani*, y además, la actividad de una de las enzimas producida durante la acción parasítica de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii*, no se detectó en la interacción *Trichoderma* vs *R. solani*, lo que evidenció la existencia de una selectividad en la producción enzimática por el antagonista en dependencia del agente fitopatógeno a controlar.

Entre las enzimas, se considera fundamental la β -1,3 glucanasa, estrechamente relacionada con la degradación de la pared celular de patógenos (Sanz *et al.*, 2005) Además, de esta, Djonoviae *et al.* (2006) demostraron que la β -1,6-glucanasa (Tvbgn3) presente en *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) Arx, estaba involucrada en la regulación del micoparasitismo del hongo fitopatógeno *Pythium ultimum* Trow, pues se indujo en presencia de paredes celulares de este último, confirmado posteriormente a través de bioensayo con plantas. Se ha evidenciado también una correlación positiva entre la secreción de β -1,3 glucanasa y N-acetylhexosaminidasa con la capacidad controladora de aislamientos de *Trichoderma* (Larralde-Corona *et al.*, 2008). Para dar continuidad a este trabajo de investigación se podría determinar la secreción de enzimas en presencia de los hongos fitopatógenos ensayados.

Los resultados de esta investigación se corresponden con estudios previos sobre la capacidad antagonista *in vitro* de cepas de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos. Por ejemplo, se ha referido que degrada la pared celular y destruye las hifas y estructuras reproductivas de *Sclerotium cepivorum* Schltdl (Vera *et al.*, 2005), alta capacidad antagónica contra *Rhizoctonia solani* Kuehn con diferentes tipos de interacción hifal como lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración (Martínez *et al.*, 2008), así como inhiben por competencia e hiperparasitismo el

crecimiento de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidy y *Fusarium oxysporum* (Hernández *et al.*, 2011), entre otros. Igualmente, frente a *M. fijiensis* autores como Acosta-Suárez *et al.* (2013), han indicado estas evidencias de micoparasitismo.

4.1.1.3 Producción de metabolitos

La cepa CCIBP-Trich-15 produjo metabolitos volátiles y no volátiles en medio de cultivo que inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos ensayados, excepto a *G. candidum* (CCIBP-Geo 1). Este último resultado, unido al tipo de antagonismo de *T. harzianum* frente a *G. candidum* que fue hiperparasitario y las observaciones microscópicas donde se constató enrollamiento de las hifas del antagonista sobre el patógeno, apuntan hacia una acción directa de micoparasitismo.

Los metabolitos difundidos por *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 inhibieron el crecimiento de los patógenos en mayor medida que los volátiles.

Inhibición por metabolitos volátiles

Los metabolitos volátiles inhibieron el crecimiento radial del micelio de las cepas de *A. alternata* CCIBP-Aa 8, *F. solani* CCIBP-Fus 23 y *P. infestans* CCIBP-Pi 1 por encima del 40% (Figura 7).

Atendiendo a estos resultados, la producción de metabolitos volátiles podría tener importancia en el tratamiento de semilla en condiciones controladas. Si se tiene en cuenta que *F. solani* se cuenta entre los patógenos principales que producen pérdidas durante el almacenamiento de las semillas (Carnegie *et al.*, 1998) y los resultados de este ensayo donde se alcanzó en esta cepa el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento, se podría valorar la continuidad de investigaciones en este sentido. Autores como Dal Bello *et al.* (1997) y Castillo *et al.* (2011) han demostrado el efecto inhibitorio de metabolitos volátiles producidos por cepas de *Trichoderma* sobre hongos del suelo fitopatógenos.

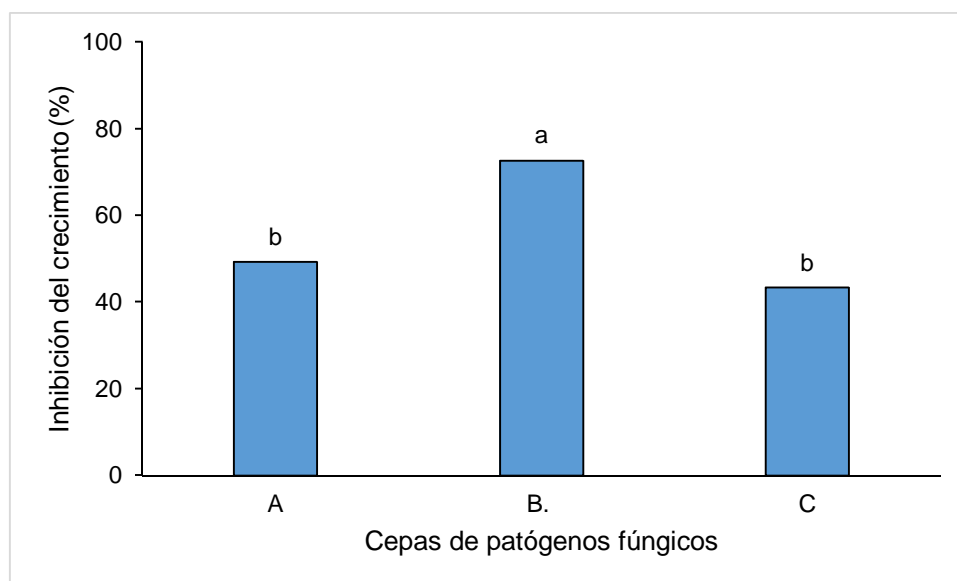


Figura 7. Inhibición del crecimiento radial de *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8(A), *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23 (B), y *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1(C) mediante metabolitos volátiles de la cepa *T. harzianum* CCIBP-Trich 15. Letras diferentes sobre barras indican diferencias entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0,05$. $n=10$

Varios compuestos han sido identificados como metabolitos volátiles producidos por cepas de *Trichoderma*. Por ejemplo, en estudios realizados por Sivasithamparam y Ghisalberti (1998) se identificaron compuestos del tipo de las alquilpironas (6-a-pentilpirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina). Por otra parte, Vinale *et al.* (2006) caracterizaron un grupo de metabolitos secundarios (azapilona, butenolide, 6-pentil-á-pirona, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, koniginina, ácido heptelídico, trichoviridina, ácido harziánico, gliotoxina, gliovirina, viridina, viridiol) obtenidos de la interacción entre *R. solani* y dos cepas comerciales (T22 y T39) de *T. harzianum*.

Inhibición por metabolitos difundidos

El crecimiento radial del micelio de las cepas de *A. alternata* CCIBP-Aa 8, *F. solani* CCIBP-Fus 23 y *P. infestans* CCIBP-Pi 1 se redujo por los metabolitos difundidos al medio de cultivo

por *T. harzianum* CCIBP-Trich 15. Las dos primeras cepas fueron las más inhibidas sin diferencias significativas entre ellas con más del 70% (Figura 8).

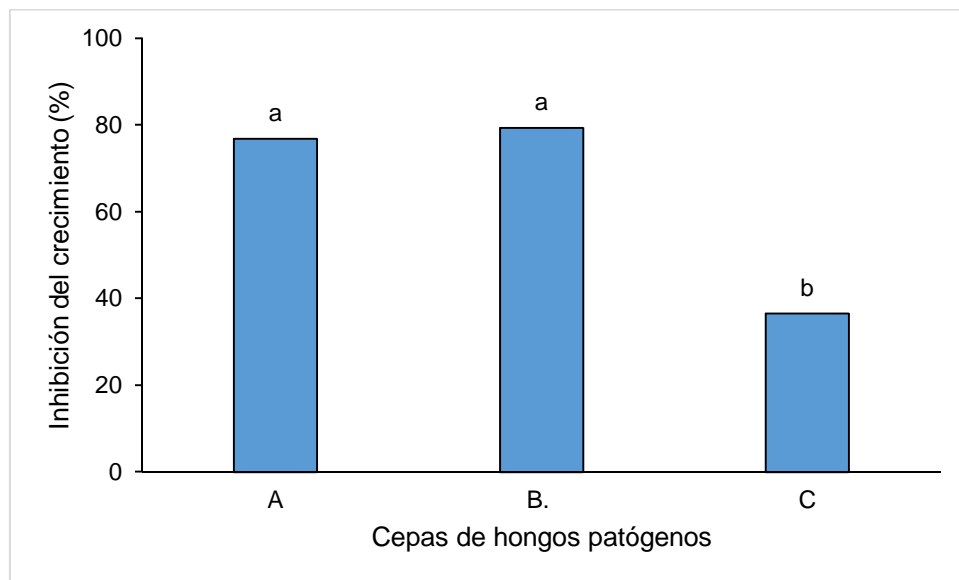


Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de *Alternaria alternata* (CCIBP-Aa 8) (A), *Fusarium solani* (CCIBP-Fus 23) (B), y *Phytophthora infestans* (CCIBP-Pi 1) (C) mediante metabolitos difundidos de la cepa *T. harzianum* CCIBP-Trich 15. Letras sobre barras indican diferencias entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0,05$. $n=10$

Estos resultados están en correspondencia con los referidos por Stefanova *et al.* (1999), quienes informaron la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislados de *Trichoderma* y comprobaron que reducían el crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan y *R. solani* en medios de cultivo donde se adicionaron filtrados de cultivo de los antagonistas. Informaron además, que al parecer estos causaban a nivel celular vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. Algunas de las enzimas no solo intervienen en el proceso de penetración y lisis, sino que actúan también como antibióticos, tal es el caso de la enzima endoquitinasa (Ech42) que causa hidrólisis en las paredes de *Botrytis cinerea* Pers y además inhibe la germinación de conidios y el crecimiento de tubos germinativos de varios hongos (Carsolio *et al.*, 1999). En este sentido, Rivero (2008), evaluó el efecto de antibiosis de dos aislados de *Trichoderma* en cultivo dual con *Alternaria padwickii*

(Ganguly) Ellis, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem., *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn y *Phoma* sp. Sacc. y refirieron inhibición significativa del crecimiento radial de estos patógenos. De igual forma, Stazzonelli *et al.* (2014) observaron la inhibición del 100% del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotium* (Lib.) de Bary por metabolitos no volátiles producidos por *Trichoderma koningiopsis* Samuels..

Un aspecto de interés resultó que *P. infestans* CCIBP-Pi 1 fue la cepa sobre la que menos inhibición causó *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 mediante sus metabolitos. Ello pudiera estar relacionado con la menor capacidad antagonica de esta cepa frente a la del patógeno a la que no logró sobrecrecer en el medio de cultivo. En este enfrentamiento se dan interacciones específicas entre las cepas que condicionan los resultados (Martínez *et al.*, 2013). Se tienen referencias de antagonismo de otras cepas de *Trichoderma* frente a dicho patógeno mediante diferentes mecanismos tales como competencia y producción de metabolitos (Yao *et al.*, 2015).

4.1.2 Efecto *in vitro* de Versaklin® sobre patógenos fúngicos

Se comprobó que el bioproducto Versaklin®, al igual que *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 inhibió el crecimiento de los patógenos fúngicos ensayados. En todos los casos, a las 72 h de incubación se observó un 100% de inhibición del crecimiento (Figura 9) lo cual resulta significativo si se tienen en cuenta que con *T. harzianum* CCIBP-Trich 15 a este mismo tiempo de evaluación el máximo valor alcanzado fue 59%.

Estos resultados están en correspondencia con los informados por Castro *et al.* (2010) quienes observaron inhibición del crecimiento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria* sp., *Thielaviopsis paradoxa*, *Phytophthora capsici*, *Aspergillus* sp., *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum* fs. *phaseoli* en presencia una solución de EM en el medio de cultivo (1,0-5,0% v/v). El bioproducto Versaklin®, obtenido en el Instituto Finlay a escala industrial mediante una tecnología similar a los EM (Oliva *et al.*, 2014) y contiene ácido láctico y ácido acético que podrían contribuir a su efecto antifúngico. En este caso se empleó el filtrado de cultivo libre de células microbianas,

por tanto el efecto antifúngico debe estar mediado por los metabolitos excretados al medio de cultivo y no por la presencia de otros microorganismos. Sin embargo, se requieren otros estudios para dilucidar los mecanismos de acción de este bioproducto sobre las cepas de hongos fitopatógenos ensayados.

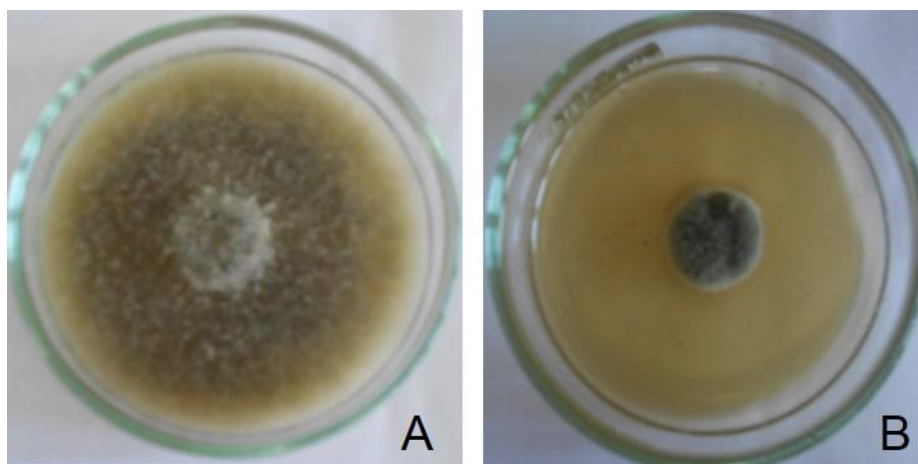


Figura 9. Inhibición del crecimiento radial de *Alternaria alternata* (CCIBP-Aa 8) por el bioproducto Versaklin®. A. Control, B. Inhibición del crecimiento por la presencia de Versaklin® en el medio de cultivo.

Los resultados de los ensayos *in vitro* demostraron que *T. harzianum* y el bioproducto Versaklin® inhiben el crecimiento de patógenos fúngicos del cultivo de la papa.

El empleo de bioproductos, basados en cepas de *Trichoderma* pudiera contribuir al diseño de estrategias para el manejo integrado de enfermedades en el cultivo de la papa. La máxima eficacia pudiera lograrse con el empleo de una cepa que se compruebe exhiba diferentes modos de acción frente a los principales patógenos del cultivo: competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis. Esto favorece el control por un lado y disminuye la posibilidad de que surja resistencia en el patógeno al antagonista (Vero y Mondino, 1999; Vero, 1999).

Ambos bioproductos podrían ser empleados en un manejo fitosanitario del cultivo sobre bases agroecológicas.

4.2 Respuesta de plantas de papa cv. 'Romano' con diferentes alternativas de manejo agronómico frente a enfermedades fúngicas

Desde la siembra hasta los 55 días no se observaron síntomas de enfermedades fúngicas en las plantas de los tratamientos evaluados. En general, la plantación se observaba homogénea, las plantas mostraban vigor y con características fenotípicas descritas para el cultivar 'Romano' (Figura 10). Sin embargo, manchas foliares asociadas al efecto de ozono fueron frecuentes a partir de los 45 días (Figura 11).



Figura 10. Plantación de papa cv. 'Romano' durante el ciclo de cultivo.

Aunque no se encontraron referencias bibliográficas que registren la incidencia de síntomas de afectaciones foliares por contaminación atmosférica con ozono troposférico en plantas de papa en Cuba, autores tales como Calvo *et al.* (2010) han informado de síntomas similares en cultivares de papa antigua de Canarias. En experimentos en campo y en estudios en condiciones controladas con diferentes concentraciones de ozono observaron síntomas de punteaduras necróticas similares a los observados en el cultivar 'Romano'. Además, en análisis de laboratorio no se comprobó la presencia de agentes causales de origen biológico. Según Ashmore (2005) el ozono es un contaminante ambiental, fuertemente oxidante y con un elevado poder tóxico para la vegetación y los cultivos.

En Cuba se han referido daños por ozono troposférico en el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) también con necrosis foliar. Las manchas pueden ser numerosas, pequeñas, irregulares y de color blanquecino en la primera fase, aumentando de tamaño y cambiando su color a pardo-marrón (Andreu *et al.*, 2010). No obstante, en el caso de papa se requieren otros estudios específicos sobre este particular.



Figura 11. Manchas foliares ocasionadas por ozono en hojas de papa cv. 'Romano'.

No se observaron en la plantación del cv. 'Romano' enfermedades transmitidas a través de la semilla tales como virosis. El material vegetal de origen fue semilla básica obtenida en el IBP a partir de material vegetal propagado *in vitro* y minitubérculos producidos en casa de cultivo con sustrato de zeolita (Jiménez-Terry *et al.*, 2010).

De las enfermedades fúngicas del cultivo solo se detectó la incidencia de Tizón temprano. Bajo las condiciones climáticas del periodo de ensayo (Anexo 1) los primeros síntomas aparecieron en plantas del tratamiento al que no se aplicaron productos para el manejo fitosanitario (tratamiento III, MO) a partir de 55 días después de la siembra pero la severidad mayor se alcanzó a los 70 días y se vieron afectados todos los tratamientos (Figuras 12). Se comprobó que la mayor incidencia se presentó en el tratamiento que solo incluyó materia orgánica en el suelo (tratamiento III, MO) en los dos tiempos de evaluación. A los 70 días después de la siembra alcanzó el 100% de las plantas, seguido por el tratamiento Biológico (tratamiento II) y en el que se aplicaba Versaklin® (MEF-MO) (tratamiento I). Todos con diferencia significativa con el tratamiento Químico (tratamiento IV) en ambos tiempos de evaluación. Se destaca el

tratamiento con Versaklin® y materia orgánica (MEF-MO) (tratamiento I) que redujo la incidencia en 30% con respecto al tratamiento sin aplicación de productos (tratamiento III) y solo superó al Químico (tratamiento IV) en 16% al final del ensayo. El bioproducto Versaklin® cuenta en su composición con microorganismos y sus metabolitos los cuales pudieran tener acción directa sobre el patógeno como se demostró en el acápite 4.1.2 o inducir resistencia en las plantas. Esto último requiere nuevas investigaciones.

En el tratamiento Biológico (tratamiento II) a pesar de contar con Versaklin® y Tricosave solo se redujo la incidencia en 11,25%. Ello pudo estar influenciado por las dosis, frecuencia de aplicación o la compatibilidad de los bioproductos empleados.

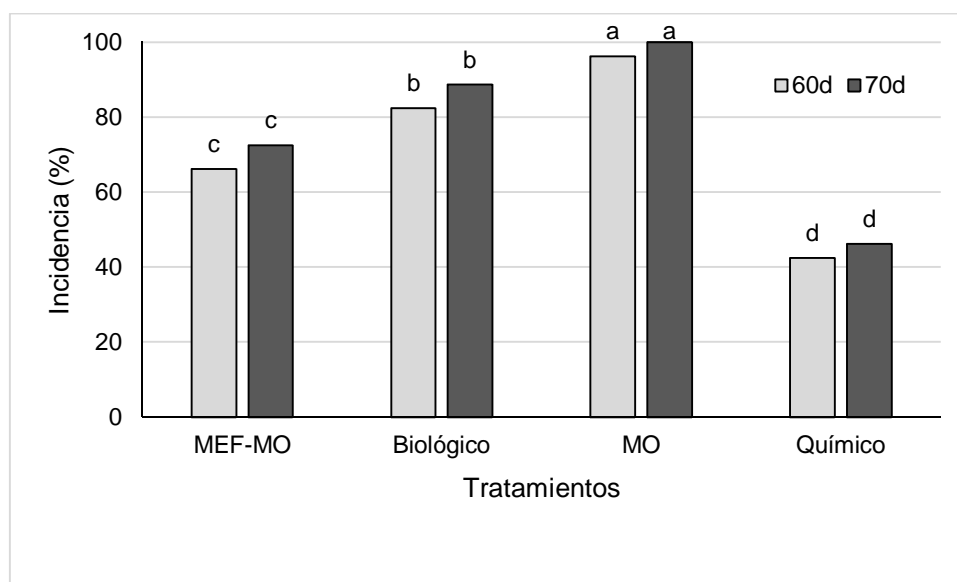


Figura 12. Incidencia de Tizón temprano en plantas de papa cv. 'Romano' cultivadas bajo diferentes alternativas de manejo agronómico. Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; MO (III), tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo; Químico (IV), manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo. *Letras sobre barras para cada tiempo de evaluación indican diferencias entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0,05$. $n=80$*

Con respecto a los síntomas, predominaron las plantas con manchas necróticas aisladas en las hojas de toda la planta, que se observaron de diferentes diámetros y con anillos concéntricos bien definidos (Figura 13). No se detectaron plantas con nervios completamente necrosados en las hojas superiores, defoliación, ni plantas atizonadas. En los tallos no se apreciaron síntomas.



Figura 13. Síntomas de Tizón temprano en plantas de papa cv. 'Romano'.

Un aspecto a destacar es que no se alcanzó el valor máximo de la escala (5, más del 50,0% de la superficie de la planta afectada) en ninguno de los tratamientos lo cual condujo a que la intensidad de la enfermedad no sobrepasara el 53,0% (Figura 14).

Los mayores valores de intensidad se alcanzaron en el tratamiento donde no se aplicaron productos para el manejo fitosanitario (MO, tratamiento III) con diferencias significativas con los demás tratamientos. Con respecto a este tratamiento, el empleo de Versaklin® (MEF-MO, tratamiento I) redujo la intensidad de la enfermedad en 23,0% y el tratamiento Biológico (II) en 15,5% al final del ciclo del cultivo.

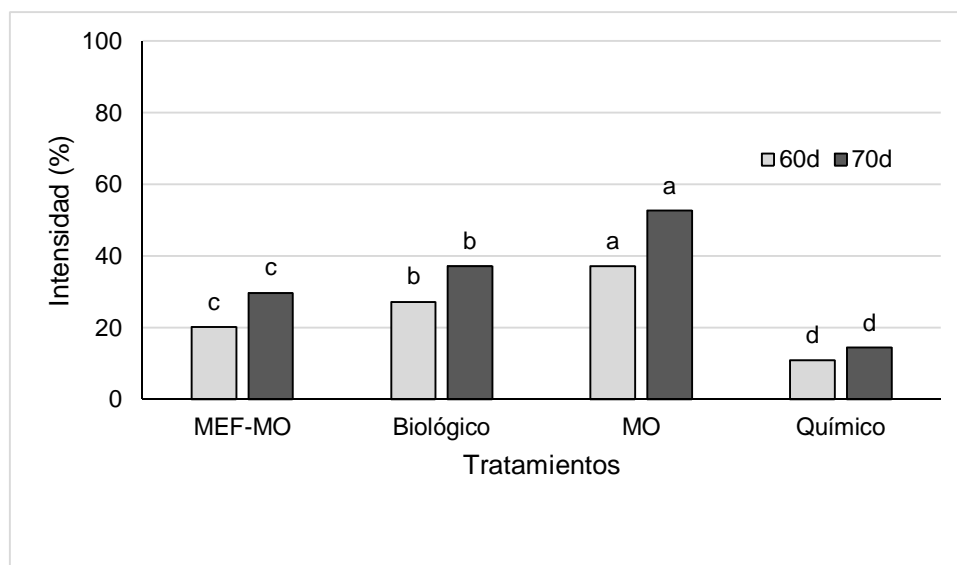


Figura 14. Intensidad de Tizón temprano en plantas de papa cv. 'Romano' cultivadas bajo diferentes alternativas de manejo agronómico. Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; MO (III), tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo; Químico (IV), manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo. *Letras sobre barras para cada tiempo de evaluación indican diferencias entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0,05$. $n=80$*

En el caso de esta enfermedad la infección foliar se favorece por temperaturas superiores a 25°C, alta humedad y el riego por aspersion (Zachmann, 1982). Estas tres condiciones estuvieron presentes. Durante los meses de crecimiento y desarrollo de las plantas aunque la temperatura media fue 22,5°C y la humedad relativa media 76%, los valores máximos de temperatura sobrepasaron 29°C. A partir de los 55 días posteriores a la siembra se produjo un incremento de la temperatura media con valores superiores a 25°C y temperatura máxima superior a 33°C (Figura 15, Anexo 1) lo cual coincidió con el periodo donde se detectó la incidencia del Tizón temprano. La germinación de las esporas del patógeno se facilita por la presencia de humedad pero puede inducirse por humedad relativa cercana a la saturación (van der Waals *et al.*, 2001), en el periodo en que incidió la enfermedad la humedad relativa media se mantuvo por encima del 70% con valores de humedad relativa máxima media de 95,8% y valores puntuales de 98% en varios días.

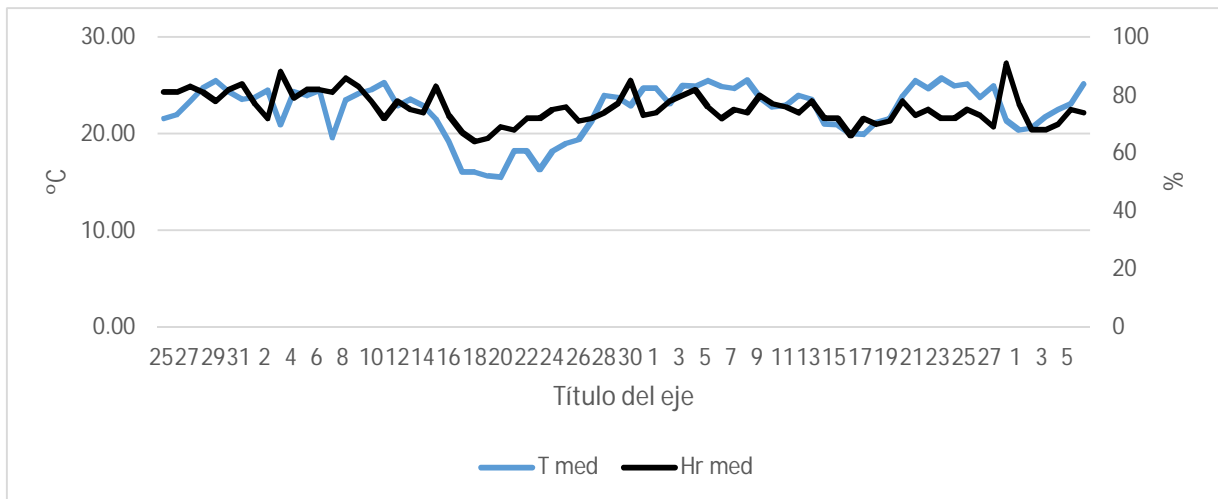


Figura 15. Valores de temperatura y humedad relativa medios por día durante el periodo de crecimiento y desarrollo de plantas de papa cv. 'Romano'.

El ABCPE, que es una variable de gran utilidad y se usa comúnmente para cuantificar la intensidad de la enfermedad en el tiempo e integra al patógeno, al hospedero y el ambiente (Pandey *et al.*, 2003) demostró que la progresión de la enfermedad fue significativamente mayor en el tratamiento donde no se aplicaron productos para el manejo fitosanitario (MO, tratamiento III) y menor en el tratamiento químico (Figura 16).

El tratamiento correspondiente a la AMA del tratamiento con Versaklin® y materia orgánica (MEF-MO, tratamiento I) se encontró en un valor entre el tratamiento MO (III) y el tratamiento químico (IV). Ello evidenció el potencial de esta alternativa que solo incluye a un bioproducto para el manejo de enfermedades como el Tizón temprano. Por ello, podría incluirse en una estrategia de manejo agronómico del cultivo con efecto también sobre la nutrición por el contenido de macro y micronutrientes. Aunque este bioproducto forma parte del tratamiento Biológico (II), donde también se aplica Tricosave, se requiere determinar su compatibilidad con el resto de los bioproductos que se emplean para el manejo de plagas y su efecto sobre estas ya que el ABCPE en dicho tratamiento fue significativamente mayor.

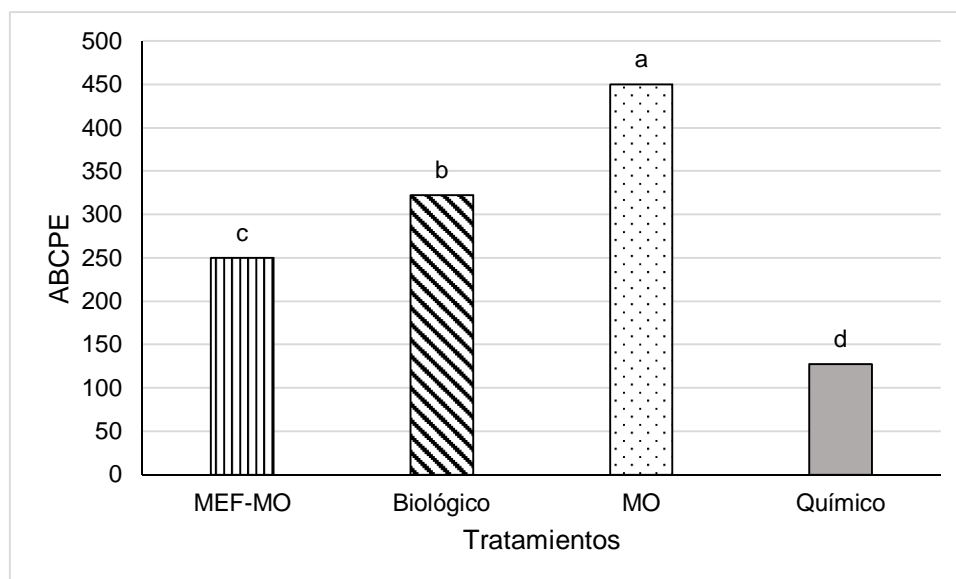


Figura 16. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) de Tizón temprano en plantas de papa cv. 'Romano' cultivadas bajo diferentes alternativas de manejo agronómico. Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; MO (III), tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo; Químico (IV), manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo. *Letras sobre barras indican diferencias entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0,05$.*

Considerando al tratamiento sin aplicación de productos como tratamiento control para el análisis de la efectividad técnica (ET) de las alternativas de manejo agronómico frente al Tizón temprano se comprobó la superioridad del tratamiento químico (IV) y el potencial de la AMA con Versaklin® (MEF-MO, tratamiento I) (Figura 17) que alcanzó un valor de ET que representa un 60% de la ET del tratamiento químico con solo un producto. Este resultado es importante ya que teniendo en cuenta los resultados de inhibición del crecimiento *in vitro* del resto de los patógenos podrían diseñarse otras alternativas de manejo donde se aplique de conjunto con productos químicos pero estos puedan reducirse en dosis y frecuencia de aplicación lo cual disminuiría el impacto negativo al ambiente y los costos de producción.

Por otra parte, *A. solani* es un patógeno policíclico con muchos ciclos posibles de infección durante el tiempo que dura el cultivo (Shuman, 1995) por lo cual probablemente se requiere

ajustar las dosis y frecuencia de aplicación de los bioproductos antifúngicos Versaklin® y Tricosave y verificar el efecto directo sobre el patógeno en las condiciones de campo para incrementar la efectividad técnica de los tratamientos MEF-MO y Biológico.

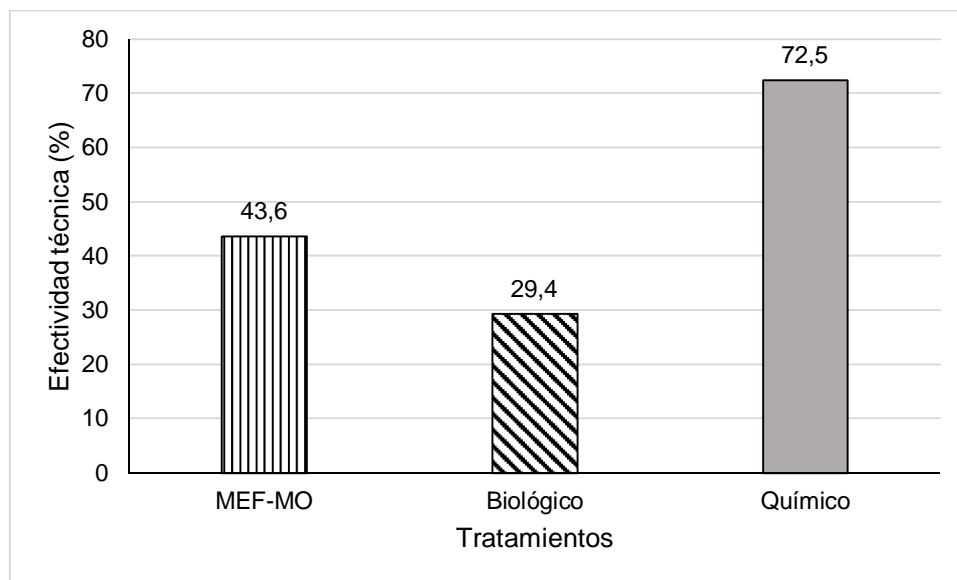


Figura 17. Efectividad técnica de alternativas de manejo agronómico frente al Tizón temprano de la papa. Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; Químico (IV), manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo.

Con respecto a las variables agronómicas se comprobó que también las alternativas de manejo agronómico influyeron en el número de tubérculos por planta, en su masa fresca, seca y la distribución de calibres.

El número de tubérculos no tuvo diferencias significativas entre el tratamiento químico (IV), MEF-MO (I) y MO (III) y sí entre el tratamiento químico (IV) y el biológico (II) (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con informes previos de Hernández (2001) quien refirió que en el cultivo de papa, con el uso de abonos orgánicos se podían obtener resultados similares a los alcanzados con fertilizantes químicos. De igual forma, apoyan resultados de Muñoz y Lucero (2008) quienes informaron de un efecto favorable de la fertilización orgánica en el cultivo de papa criolla (*Solanum phureja* L.). En este sentido, se ha comprobado que la incorporación de

materia orgánica al suelo puede favorecer el control de patógenos del suelo e incrementar el rendimiento en papa (Larkin y Tavantzis, 2013).

En el tratamiento Biológico (II) después de 55 días de la siembra se presentó clorosis generalizada en algunas plantas y daños en el tejido foliar posiblemente asociados a la toxicidad ocasionada por alguno de los productos aplicados en esas condiciones o por la interacción negativa entre ellos. Se requieren ajustar las frecuencias de aplicación de estos productos y verificar su compatibilidad, especialmente entre los aplicados para la nutrición y el manejo de plagas para lograr resultados repetibles y tener referencias del momento de aplicación según las condiciones lo requieran. Ello posiblemente condicionó los resultados agronómicos en este tratamiento.

Tabla 4. Efecto de alternativas de manejo agronómico en la producción de semilla de papa cv. 'Romano'

Tratamientos	Número de tubérculos/planta	Rangos medios	Masa fresca tubérculos/Planta (g)	Rangos medios
MEF-MO (I)	7,91	125,52 ab	356,83	106,78 b
Biológico (II)	7,08	105,20 b	346,95	103,42 b
MO (III)	7,75	114,53 ab	396,96	126,77 ab
Químico (IV)	8,33	135,00 a	438,81	143,43 a

Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; MO (III), tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo; Químico (IV), manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo. *Rangos medios con letras desiguales en una misma columna indican diferencias para $p < 0,05$ según prueba de Kruskal Wallis/ Mann Whitney. $n=80$*

A pesar de que en la masa fresca los resultados favorecieron al tratamiento químico (IV) sin diferencias con el MO (III), en la masa seca se comprobó que los valores más bajos ($p < 0,05$) se alcanzaron en dicho tratamiento (Figura 18). Este resultado apunta hacia nuevas investigaciones que esclarezcan el papel de la fertilización con materia orgánica y bioproductos en el contenido de materia seca de los tubérculos. Esta variable es un índice de calidad de los tubérculos y contiene información sobre la concentración de carbohidratos y agua y adquiere gran importancia en la conservación de los tubérculos y en su uso (Subedi y

Walsh, 2009). En observaciones previas de tubérculos obtenidos con la aplicación de la AMA propuesta por la EPPF Indio Hatuey se ha comprobado mayor durabilidad de los tubérculos en conservación y menores afectaciones por patógenos postcosecha (Martín, Comunicación personal).

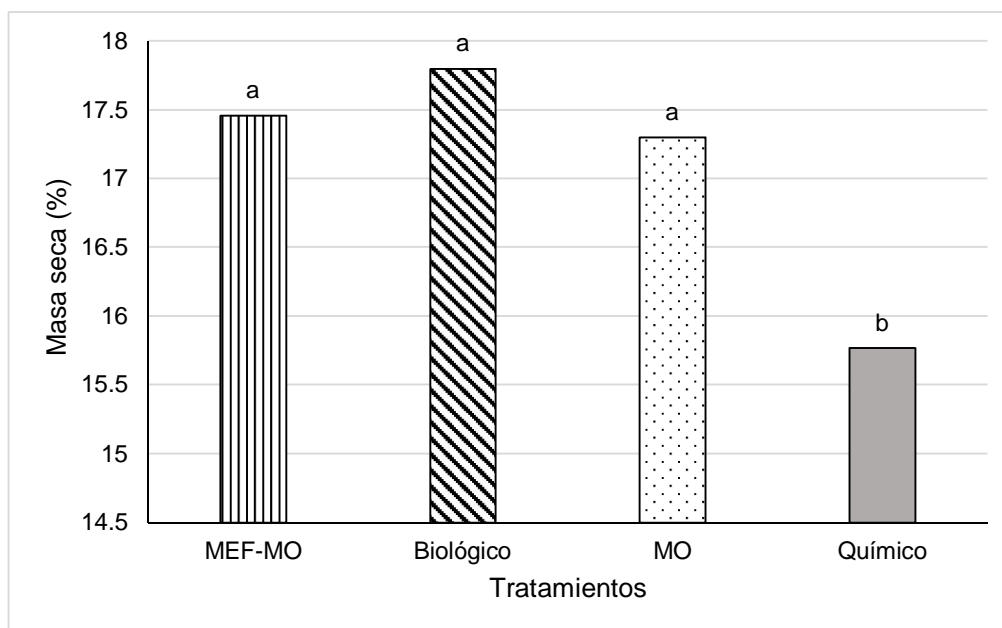


Figura 18. Masa seca de tubérculos obtenidos bajo diferentes alternativas de manejo agronómico. Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; MO (III), tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo; Químico (IV), manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo. Letras sobre barras indican diferencias entre los rangos medios según la prueba de Kruskal Wallis / Mann Whitney para $p < 0,05$.

En todos los tratamientos se obtuvieron tubérculos con diámetros (calibres) que oscilaron entre <25 y >60 mm (Tabla 5). Sin embargo, la mayor proporción de tubérculos con calibre para ser empleados como semilla se produjeron en los tratamientos MEF-MO (I) y Biológico (II) (Figura 19).

Tabla 5. Distribución de tubérculos según diámetro (calibre) obtenidos de plantas de papa cv. 'Romano' sometidas a diferentes alternativas de manejo agronómico.

Tratamiento	Tubérculos en cada calibre* (%)									
	<25	25-28	28-35	35-38	38-40	40-45	45-50	50-55	55-60	>60
MEF-MO (I)	10,73	5,47	9,47	14,31	8,42	13,05	18,10	14,31	5,47	0,42
Biológico (II)	5,64	5,17	10,11	13,64	11,76	16,23	15,52	13,64	7,29	1,17
MO (III)	5,80	7,09	13,11	9,89	6,23	14,40	16,77	16,34	9,46	1,07
Químico (IV)	5,69	4,47	6,09	10,16	9,14	12,60	21,34	20,12	8,53	1,42

Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; MO (III), tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo; Químico, manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo.* diámetro expresado en mm.

Se conoce que el diámetro de los tubérculos está determinado por diferentes factores tales como la duración del periodo de crecimiento. A medida que avanza el ciclo vegetativo del cultivo, el rendimiento y el porcentaje de tubérculos grandes se incrementa. Algunos productores de semilla para evitar la formación de tubérculos muy grandes emplean prácticas agronómicas como el corte del follaje. Según Pozo (1997), se puede obtener hasta el 100% de tubérculos para semilla en periodos menores a 90 días, independientemente del diámetro de semilla usado para la plantación. En este estudio con el cultivar 'Romano' y 70 días de cultivo se obtuvieron entre el 30 y el 42% de los tubérculos con calibre de semilla lo cual indica que es necesario ajustar algunas prácticas culturales para incrementar el número de tubérculos para este fin. Según Ojeda *et al.* (2010) el diámetro de los tubérculos determina el uso. La proporción que se obtiene por cada uno es un factor determinante de la producción, ya que se requieren tubérculos con características específicas para la industria, para semilla o consumo.

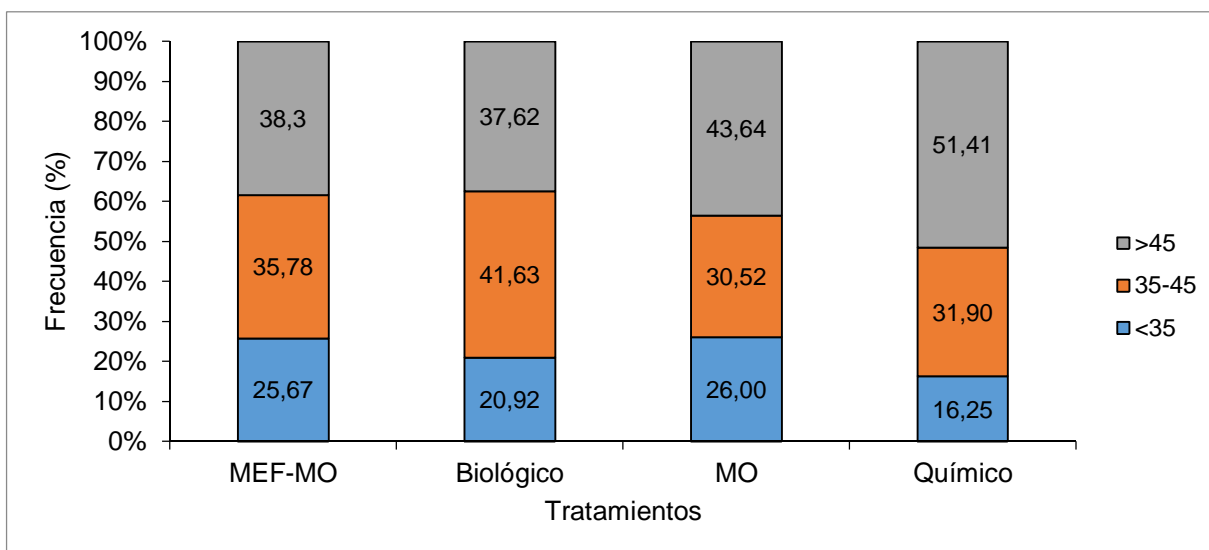


Figura 19. Distribución según diámetro de tubérculos obtenidos bajo diferentes alternativas de manejo agronómico. Tratamientos: MEF-MO (I), Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo; Biológico (II), propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo; MO (III), tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo; Químico (IV), manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo.

Los resultados de este estudio demostraron que es posible obtener semilla de papa cv. 'Romano' en las condiciones climáticas de Cuba con alternativas de manejo agronómico que incluyen el uso de bioproductos de fabricación nacional.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. *Trichoderma harzianum* CCIBP-Trich15 es antagonista *in vitro* de los patógenos fúngicos del cultivo de la papa *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8, *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23, *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 y *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1 y puede inhibir su crecimiento mediante diferentes mecanismos.
2. El bioproducto Versaklin® elaborado a base de la tecnología de microorganismos eficientes puede emplearse para el manejo de enfermedades fúngicas del cultivo de la papa ya que inhibe el crecimiento *in vitro* de los patógenos *Alternaria alternata* CCIBP-Aa 8, *Fusarium solani* CCIBP-Fus 23, *Geotrichum candidum* CCIBP-Geo 1 y *Phytophthora infestans* CCIBP-Pi 1 y reduce la incidencia de Tizón temprano en campo en 30% y su efectividad técnica alcanza el 60% de la obtenida con el manejo con productos químicos.
3. Las alternativas de manejo agronómico influyen en la respuesta de plantas de papa en campo frente al Tizón temprano y en sus variables agronómicas.
4. Mediante alternativas de manejo agronómico que incluyen el uso de bioproductos de fabricación nacional se pueden manejar las enfermedades fúngicas y producir semilla de papa cv. 'Romano'.

Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

1. La alternativa agronómica que incluye el uso del bioproducto Versaklin® y materia orgánica por su simplicidad y resultados pudiera instrumentarse en la producción agroecológica de semilla de papa por pequeños productores.
2. Evaluar los mecanismos de acción del bioproducto Versaklin® sobre el patógeno y las plantas.
3. Revisar las dosis, frecuencia de aplicación y compatibilidad de los bioproductos empleados en la alternativa de manejo agronómico propuesta por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey (nombrada en el trabajo como tratamiento Biológico) para incrementar su efectividad técnica en campo y evitar fitotoxicidad en las plantas.

*Referencias
Bibliográficas*

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-SUAREZ, M, PICHARDO T, ROQUE B, CRUZ-MARTIN M, MENA E, LEIVA-MORA M, CASTRO R, ALVARADO-CAPO Y (2013) Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Bioteconología Vegetal*, (13): 231-235.
- AGRAMONTE, D, JIMENEZ F, PÉREZ M, LEIVA M, GONZÁLEZ M, LEÓN M, VEITÍA N (2010) Estrategia y perspectivas del programa de producción de semilla biotecnológica de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara.
- AGRIOS, GN (2005) Fitopatología. 2 ed. UTEHA, México, DF. 838 p.
- AHMAD, F A I, KHAN M S (2006) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res*, 36: 1-9.
- AJITH, P S, LAKSHMIDEVI N (2010) Effect of Volatile and Non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of Anthracnose on Bell peppers. *Nature and Science*, 8: 265-269.
- ALAP (2000) Resumen. La agricultura no cañera en Cuba. La producción de papa. En: PAPA, X. C. L. D. L. (ed.). La Habana. Cuba.
- ALVINDIA, D G (2012) Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*, the causal pathogen of black sigatoka and leaf spot of banana. *Afr. J. Microbiol. Res*, 6 (15): 3690-3695.
- ANDREU, CM, ROJAS, M, MORALES, Y, PÉREZ, G, CUPULL, R (2010) Efectos del ozono troposférico en tabaco plantado en el territorio central de CubaREDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11 (03B):1-7
- ANDREWS, J H (1992) Biological Control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 603-635.
- ARAGÓN, C C L, GONZÁLEZ J, ESCALONA M, AMANCIO S (2009) Distinct patterns of responses in sugarcane plantlets (*Saccharum* spp. hybrid). Micropropagated in Jell Medium (JM) and by Temporary Immersion Bioreactors (TIB). *Acta Horticulturae*, 812: 441-446.

- ARIGITA, L G A, TAMÉS R S (2002) Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant*, 115: 166-173.
- ARIGITA, L, GONZÁLEZ, A, TAMÉS R S (2002) Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 115: 166–173.
- ARZATE, V J, CASIMIRO A M A, DOMINGUEZ M V M, SANTOS E O A (2006) Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 :98-104.
- ASHMORE, M R, (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28, 949–964.
- ASSCHEMAN, E, J A BOKX H, BRINKMAN C B, BUS P H, HOSMAT C P, MEIJERS A, MULDER K, SCHOLTE L, TURKENSTEEN L , WUSTMAN R, ZAAG, D E V (1996) *Potato diseases. Fungus Diseases*, Van der Zaag, Nivaa, Netherlands 15-17 pp.
- BAREA, J M P, M J, AZCON-AGUILAR C (2005) Microbial cooperation in the rizosphere. *J. Exp Bot*, 56.
- BARRERA, VA (2012) El género *Hypocrea* Fr. (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Universidad de Buenos Aires. Tesis de Doctorado. 241 pp.
- BELL, D K, WELLS H D, MARKAMAN, C R (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.
- BETTIOL, W, MARCELO A, BOECHAT M, ZAYAME V, MANTOVANELLO C, MURILLO J, COSTA J, JÚNIOR J, TEIXEIRA H, BITTENCOURT A (2014) Metodología para el control de calidad de productos biológicos a base de *Trichoderma*.
- BISSETT, J (1991) A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* 69:2357–2372.
- BOJÓRQUEZ, F (2008) Producción de minitubérculos: opción para una mejor alimentación [Online].
- BUDDENFORD-JOOSTEN, Woltering E J (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Reg*, 15: 1-16.

- CALDERÓN, A L V R, HIDALGO R, MORENO J D (2008) Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agronómica (Palmira)*, 57: 175-180.
- CALVO, E, JAIZME-VEGA, MC, CERVERÓ, J, RIOS, D, MARTIN, C, PALOMARES, A, PORCUNA, JL (2010) Efectos del ozono sobre cultivares de papa antigua de Canarias. IX Congreso de la SEAE. Lleida 6-9 de Octubre de 2010
- CARSOLIO, C, BENHAMOU N, HARAN S, CORTÉS C, GUTIERREZ A, CHET I, HERRERA-ESTRELLA A (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol*, 65: 929-935.
- CASTELLANOS, LOENIDES, STEFANOVA MARUSIA, VILLA PILAR, IRIMIA IRAIS, GONZALEZ MERCEDES, LORENZO MARIA ELANA (2005) Ensayos con el producto biológico GLUTICID para el control de *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* en el tomate en casas de cultivo protegido. *Fitosanidad*, 9 (2): 39-43.
- CASTILLO, F D H, PADILLA A M B, MORALES G G, SILLER M C, HERRERA R R, GONZALEZ N, REYES F C (2011) *In vitro* Antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6: 410-417.
- CASTILLO, L E, A SALOMON, J L HERNÁNDEZ, M M QUIÑONEZ, VARGAS D (2001) Comportamiento de diferentes genotipos de papa fuera de su época óptima de plantación. En: <http://www.redepapa.org/juan23.pdf> [Online].
- CHÉRIF, M, BENHAMOU N (1990) Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. radiscis-lycopersici. *Phytopathology*, 80: 1406-1414.
- CHET, I, BENHAMOU, H (1998) *Mycoparasitism and latic enzymes*. En: Harman G, Kubicek C. *Trichoderma & Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial applications Eds. Taylor & Francis. London, UK.
- CHET, I, HARMAN, G BAKER, R (1981) *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7: 29-38.
- CIP (2007) Potato. *International Potato Center*. Lima.
- COLEMAN, W K, DONNELLY D J, COLEMAN S E (2001) Potato Microtubers as Research Tools: A Review. *American Journal of Potato Research*, 78: 47-55.

- COMPANT, S D B, NOWAK J, CLÉMENT C, AIT BARKA E (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*, 71(9):4951-9.
- COOK, J, BAKER, K (1983) *Trichoderma*. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Third edition. APS Press. Minnesota-United States 58: 374-382.
- DAL BELLO, G M, MÓNACO C I, CHÁVES A R (1997) Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Rev Iberoam Micol*, 14: 131-134.
- DAVET, P, ARTIGUES M, MARTIN C (1981) Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique. *Agronomie*, 10: 933-936.
- DENNIS, C, WEBSTER J (1971) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* II production of Non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 57: 41-48.
- DIBUT, B (2006) Biofertilizantes como insumos en Agricultura Sostenible, México, INIFAT.
- DJONOVIAE, S, POZO M, KENERLEY C (2006) Tvbg3, a b-1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*, Is Involved in Mycoparasitism and Control of *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol*. 72: 7661-7670.
- DRUZHININA I, KUBICEK CP (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J Zhejiang*, 6B: 100-112.
- ELAD Y (2000) Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*, 19: 709-714.
- ESTÉVEZ, A, GUERRA J P, MANSO F (2007) Introducción, Desarrollo y Evolución de la papa en Cuba. En: Valdés, E A (eds.) *El cultivo de la papa en cuba*. INCA. La Habana
- ESTRADA, R, TOVAR P, DODDS J H (1986) Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 7: 3-10.
- FAO (2008) Año Internacional de la Papa. Recuperado de: <http://www.potato2008.org/es/index.html>. Consultado 23 noviembre 2010.
- FAOSTAT (2014) Producción de Papa. Recuperado de: <http://FAOSTAT.FAO.org/site/567/> Consultado 23 Nov 2015.

- FERNÁNDEZ-LARREA, O (2001) Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62: 96-100.
- FRIONI, L (2011) Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Orientación Gráfica Editorial. Buenos Aires.
- GALLETTI S, BURZI P, CERATO C, MARINELLO S, SALA E (2008) *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. *BioControl*, 53: 917–930.
- GARCÍA, L, SARRÍA Z, PICHARDO T, PÉREZ B (2001) Cultivo de meristemos para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas *in vitro*. *Bioteología Vegetal*, 1: 117-119.
- GARCÍA-BREIJO, F, ROSELLÓ J, SANTAMARINA-SIURANA, P (2006) Introducción al funcionamiento de las plantas. Universidad Politécnica de Valencia. Servicio de Publicación. Valencia.
- GUZMAN, M, OROZCO-SANTOS M, VICENTE L (2013) Sigatoka leaf spot diseases of bananas: dispersion, impact and evolution of management strategies in Latin American-Caribbean region. XX Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (Bananas e Plátanos) 9 a 13 de setembro . Acorbat. Brasil. Fortaleza, CE.
- HANS, M G P, SCHIPPER, E, SCHIPPER J K, BAARVELD HR (2007) Netherlands catalogue of potato varieties. NIVAP. Deng Haag.
- HARAN, S, SCHICKLER H, OPPENHEIM A, CHET I (1996) Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86: 980-985.
- HARMAN, G (2006) Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-194.
- HARMAN, GE, OBREGÓN, GM, SAMUELS, GJ, LORITO, M (2010) Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and developed world. *Plant Disease*, 94: 928-939.
- HAWKES, J G (1990) The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. *Belhaven Press*. London.

- HERNÁNDEZ, A (2001) Manejo agronómico integral de sustratos, métodos de siembra y biofertilización en la producción sostenible de tubérculos-semilla de papa por semilla sexual. *Cultivos Tropicales*, 22(2): 21-27.
- HERNÁNDEZ, M J L, SÁNCHEZ P M I, GARCÍA O G J, MAYEK P N, GONZÁLEZ P J M, QUIROZ V J D C (2011) Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos el noreste de México. *Rev. Colomb. Biotecnol*, XIII. 2: 176-185.
- HERNANDEZ-CRUZ, A, PÉREZ M, BOSCH D, RIVERO L, MATTA-CAMACHO E, RIOJA J, ASCANIO M, DE CABRERA M, MORALES M, ROJO N, MEDINA N (2003) Nuevos aportes a la Clasificación genética de suelos en el ámbito nacional e internacional. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. AGRINFOR. La Habana, Cuba. p 145.
- HIGA, T (1991) Effective microorganisms: A biotechnology for mankind. En: Proceedings of 1st Kyusei Nature Farming, ed. J. F. Parr, S. B. Hornick, and C. E. Whitman, 8–14. Washington, D.C.:USDA.
- HIGA, T (2003) Some properties of concrete mixed with effective microorganisms and the on-site investigation of structures. Japón.
- HIGA, T, GN WIDIDANA (1991) The concept and theories of effective microorganisms. p. 118-124. In Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman (ed.) Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
- HOQUE, M E (2010) *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Omics Journal*, 3: 7-11.
- HOWELL, C R (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.
- HOYOS-CARVAJAL, L, CHAPARRO P, ABRAMSKY M, CHET I, ORDUZ S (2008) Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agron Colomb*, 26: 451-458.
- HUAMÁN, Z (1986) Botánica sistemática y morfología de la Papa. Boletín de Información Técnica 6. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- HUAMÁN, Z (2007) Descriptores morfológicos de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Centro de la conservación de la biodiversidad agrícola de Tenerife. Tenerife: CCBAT

- HUAMÁN, ZA, GOLMIRZAI, T, AMOROS W (1997) The Potato. En: Dominic Fuccillo, Linda Sears & Paul Stapleton (eds). *Biodiversity in trust: conservation and use of plant genetic resources in CGIAR Centres*. Chapter 2 (pp. 21-28). Cambridge: Cambridge University Press
- HUAPE, L M (2009) Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) una opción en agricultura sustentable. Tesis para optar por el Título Profesional de Bióloga.
- HUSSEY, G, STACY N J (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot*, 53: 565-578.
- IGARZA-CASTRO, J, AGRAMONTE D, ALVARADO-CAPÓ Y, DE FERIA M, PUGH T (2012) Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*, 12 (1): 3-24
- JIMÉNEZ, E, PEREZ N, DE FERIA M, BARBÓN R, CAPOTE A, CHÁVEZ M, QUIALA E, PÉREZ JC (1999) Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59: 19-23.
- JIMÉNEZ, F A, AGRAMONTE D, PÉREZ J N, RAMÍREZ D, GUTIÉRREZ O, PÉREZ M (2001) Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. variedad Desireé. *Biotecnología Vegetal*, 1: 103-108.
- JIMÉNEZ-TERRY, F, AGRAMONTE D, PÉREZ M, LEÓN M, RODRÍGUEZ M, DE FERIA M, Y ALVARADO-CAPÓ (2010) Producción de minitubérculos de papa var. 'Desirée' en casa de cultivo con sustrato zeolita a partir de plantas cultivadas *in vitro*. *Biotecnología vegetal*, 10 (4): 219-228.
- KANWAL, A A, SHOAIB K (2006) *In vitro* Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Kuroda— a new variety in Pakistan. *Int. J. Agri. Biol*, 8: 337-340.
- KLOEPPER, J W (1994) Plant growth promoting rhizobacteria (other system) *Azospirillum*. *Plant Association*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA: Y. Okon, Ed.
- KLOEPPER, J W (1996) Biological control agents vary in specificity for host, pathogen control, ecological habitat and environmental conditions. *Bio. Sci*, 46: 406-409.
- KÜÇÜK, Ç, KIVANÇ M (2004) *In vitro* Antifungal Activity of Strains of *Trichoderma harzianum*. *Turk J Biol*, 28: 111-115.
- KULLNIG-GRADINGER, CM, SZAKACS, G, KUBICEK, CP (2002) Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological research*, 106:757-767

- LABIOFAM (2014) Vademecum. Grupo Empresarial Labiofam. MINAGRI. La Habana.
- LABORATORIO PROVINCIAL DE SANIDAD VEGETAL (2005) Resumen ampliado de Metodologías de Señalización y Pronóstico. Villa Clara.
- LARKIN RP, TAVANTZIS SM (2013) Use of biocontrol organisms and compost amendments for improved control of soilborne diseases and increased potato production. *Am J Potato Res*, 90:261 – 270
- LARRALDE-CORONA, C, SANTIAGO M, SIFUENTES A, RODRÍGUEZ I, SHIRAI K, NARVÁEZ J (2008) Control potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80: 167-177.
- LOMMEN, W J (1995) Basic studies on the production of potato minitubers by repeated harvesting: effects of crop husbandry on yield parameters. *Potato Research*, 35: 419-432.
- LOMMEN, W J, STRUIK P C (1992) Production of potato minitubers by repeated harvesting: effects of crop husbandry on yield parameters. *Potato Research*, 35: 419-432.
- LOMMEN, W J, STRUIK P C (1994) Field performance of potato minitubers with different fresh weights and conventional seed tubers: crop establishment and yield formation. *Potato Research*, 37: 301-313.
- LÓPEZ, L, VÁZQUEZ E, LÓPEZ R (1995) Raíces y tubérculos. Editorial Pueblo y Educación: Ciudad de La Habana, Cuba, 225 -305 pp
- MARTÍNEZ, B, REYES Y, INFANTE D, GONZÁLEZ E, BAÑOS H, CRUZ A (2008) Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev Protección Vegetal*, 23: 118-125.
- MARTÍNEZ, B, INFANTE, D, REYES Y (2013) *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.*, 28(1): 1-11
- MARTINEZ, B, OBRET Y, PEREZ S, REYES Y (2014) Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Sarocladium oryzae* (Sawada) *Protección Vegetal*. 29: 106-111.
- MARTINEZ, B, SOLANO T (1994) Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout . *Protección Vegetal*, 10: 221-225.

- MARTINEZ, C M, ALEMAN R (2005) Papa (*Solanum tuberosum* L.), cosecha, beneficio y almacenamiento. Caso cubano. *Centro Agrícola*, 32 (3): 5-11.
- MARTIRENA F, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ Y, CALLICO A, GONZALEZ R, Y DIAZ, BRACHO G, ALUJAS A, GUERRA DE LEON JO, ALVARADO-CAPÓ Y (2014) Microorganism-based bioplasticizer for cementitious materials. *Construction and Building Materials*, 60: 91–97
- MAVRODI, O V M D, PARK A, WELLER D, THOMASHOW L (2006) The role of dsbA in colonization of the wheat rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Microbiol Res*, 152: 863-872.
- MINAGRI (2012) Instructivo técnico para la producción de papa en Cuba. Dirección Nacional de Cultivos varios. INIVIT. Santo Domingo. Villa Clara.
- MUÑOZ L A, LUCERO A M (2008) Efecto de la fertilización orgánica en el cultivo de papa criolla *Solanum phureja*. *Agronomía Colombiana*, 26 (2): 340-346
- NICO, I, MONACO I, DEL BELLO G , ALIPPI H (2005) Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II Micoflora asociada y antagonismo *in vitro* de los aislados más frecuentes. *RIA*, 34: 29-44.
- NOOKARAJU, A K S, WOONG-YU J, WON PARK S (2011) Rhizobacteria Influence Potato Tubercization Through Enhancing Lipooxygenase Activity. *American Journal of Potato Research*, 88: 441-449.
- O'NEILL, T. M., NIV, A., ELAD, Y., AND SHTIENBERG, D (1996) Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 102:635-643.
- OJEDA, M, PÉREZ DE CAMACARO M, RODRÍGUEZ D, GALLARDO M, VALERA R (2010) Evaluación hortícola, producción y calidad postcosecha de clones avanzados de papa en la localidad de Duaca, estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 22(1): 17-28.
- OLIVA, R, FARIÑAS M, NÚÑEZ D, GARCÍA G , PÉREZ Q, NARANJO M, CALLICO A, BRACHO G, CAMPA C (2014) Estudio toxicológico de irritabilidad dérmica y oftálmica de Microorganismos Eficientes (VersaKlin®). *RETEL*, 1-14.
- OSORIO-HERNANDEZ, E, HERNANDEZ-CASTILLO F D, GALLEGOS-MORALES G, RODRIGUEZ-HERRERA R y CASTILLO-REYES F (2011) *In-vitro* behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian *African Journal of Agricultural Research*, 6: 4594-4600.

- PANDEY, K K, PANDEY P K, KALLO G, BANERJEE M K (2003) Resistance to early blight of tomato with respect to various parameters of disease epidemics. *J Gen Plant Pathol*, 69: 364–371.
- PAPAVIZAS, G (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual review Phytopatology*, 23: 23-54.
- PÉREZ, J N, SUAREZ C M, ORELLANA, P (2000) Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Biotecnología Vegetal*, 1 (1) : 3-12.
- PÉREZ, J N (1998) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara.
- PÉREZ, S, SNOWDON R, KUHNEMANN P (2004) Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities: AFLP genetic analysis. *Eur J Plant Pathol*, 110: 399-409.
- POSPÍSILOVÁ, J C, ČATSKÝ J, SESTÁK Z (1997) Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. *Handbook of photosynthesis*, 525-540.
- POZO, CM (1997) Producción de Tubérculos-semillas de Papa. Manual de Capacitación. Fascículo 2.3 Tuberización, tamaño de la semilla y corte de tubérculos. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- REINOSO, Y, VAILLANT, D, CASADESÚS, R L, GARCÍA, P E, PAZOS, V (2007) Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 11: 5-40.
- REYES, Y, MARTINEZ B, INFANTE D (2008) Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Rev Protección Vegetal*, 23: 112-117.
- RIDDELL, R W (1950) Permanent strained mycological preparation obtained by slide cultures. *Micología*, 82: 265-270.
- RIFAI MA (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycology Paper*, 116:1–56
- RITTER, E A B, RIGA P, HERRAN C, RELLUSO J, SAN JOSE M (2001) Comparison of hydroponic and aeroponic cultivation systems for the production of potato minitubers. *Potato Research*, 44: 127-135.

- RIVERO, D (2008) Identificación y control *in vitro* con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Protección Vegetal*, 2: 67.
- RODRIGUEZ, F, STEFANOVA M (2005) Control biológico del Tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de campo. *Fitosanidad*,9 (4): 35-37.
- ROIGER, D J, JEFFERS S N, CALDWELL R W (1991) Occurrence of *Trichoderma* species in Apple orchard and Woodland soils. *Soil Biology nad Biochemistry*, 23: 353-359.
- SALAZAR, L, SANABRIA N, APONTE G, ALCANO M, HERRERA R, COLMENARES D, ESPINOZA M, ALEMÁN L y SACRAMENTO M (2011) Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *Bioagro*, 23: 185-190.
- SAMUELS, GJ, CHAVERRI P, FARR DF, MCCRAY EB (2012) *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved November 5, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
- SANZ, L, MONTERO M, REDONDO J, LLOBELL A y MONTE E (2005) Expression of an b-1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS Journal*, 272: 493-499.
- SARKAR, D (2008) The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. *Plant Cell Rep*, Himachal Pradesh, India.
- SCHERWINSKI, P, LUCES G R (2004) Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. *Horticultura Brasileira*, 22: 197-201.
- SECOR, G A, GUDMESTAD N C (1999) Managing fungal diseases of potato. *Plant Patholgy*, 21: 213-221.
- SENASA (2014) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Ministerio de la Agricultura, Ganadería y Pesca. SANAVIMO. Sistema Nacional Argentino de vigilancia y monitoreo de plagas. [En línea] Disponible desde: <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/alternaria-solani> [Consultado: 1/10/ 2014].
- SHALABY, E (2011) Prospects of effective microorganisms technology in wastes treatmentin Egypt Consultado el 29 de Mayo, 2012, de <http://www.elsevier.com/locate/apjtb>.

- SHANER, G, FINNEY, R E (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Journal of Phytopathology*, 67 (2):1051-1056
- SIVASITHAMPARAM, K, GHISALBERTI L (1998) Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Harman, G. E. Kubicek, C. P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. London, 139-191.
- STAZZONELLI, E A, YASEM M G, PLOPER D L (2014) Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del género *Trichoderma*. *Rev. Agron. Noroeste Argen*, 34: 197-199.
- STEFANOVA, M, LEIVA A, LARRIGANAGA L, CORONADO M F (1999) Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*, 16: 509-516.
- STRUIK, P C, LOMME W J (1999) Improving the field performance of micro-minitubers. *Potato Research*, 42: 59-568.
- SUAREZ, C I, FERNANDEZ R J, VALERO N O, GOMEZ R M y PAEZ A R (2008) Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) Sacc., asociado a la marchitez en Maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. X: 35-43.
- SUAREZ, C I, FERNANDEZ R J, VALERO N O, GOMEZ R M y PAEZ A R (2008) Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) Sacc., asociado a la marchitez en Maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. X: 35-43.
- SUBEDI, P P, WALSH KB (2009) Assessment of Potato Dry Matter Concentration Using Short-Wave Near-Infrared Spectroscopy. *Potato Research*, 52:67 – 77
- VAN DER WAALS J E, KORSTEN L & AVELING T A S (2001) A review of early blight of potatoes. *African Plant Protection*, 7(2): 00–00
- VAN DER WAALS, J E D, F D N, VAN RIJ N, KORSTEN L (2003) Evaluation of plant-plus, a decision support system for control early blight on potatoes in South Africa. *Crop Prot*, 22: 821-828.
- VERA, R, MORENO B, ACEVEDO R, TRUJILLO E (2005) Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. *Revista Fitopatología Venezolana*, 18(1): 1-7.
- VERO, S M, MONDINO P (1999) Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*. 7: 1-10.

- VILLA, P, STEFANOVA, M., FRÍAS, A, DÍAZ DE VILLEGAS, M E, BELL, A, TORRES, E (2006) Producción de un biofungicida a partir de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS, efectivo en el control de hongos fitopatógenos. *Experiencia cubana*, 10: 146-147.
- VILLA, PILAR, MARIA E DIAZ de VILLEGA, MARUSIA STEFANOVA (2000) «Gluticid: producto biológico cubano para el control de fitopatógenos foliares y del suelo». *Anales Científicos, XX RELAR, IDEMA* : 293-301.
- VINALE, F, MARRA R, SCALA F, GHISALBERTI L, LORITO M, SIVASITHAMPARAM K (2006) Major secondary metabolites produced by two comercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 143-148.
- VINALE, F, SIVASITHAMPARAMB K, GHISALBERTIC E L, MARRAA R, WOO L, LORITO M (2008) *Trichoderma* plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1-10.
- WANG, P I, HU C Y (1982) *In vitro* mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. *Am. Potato Journal*, 59: 33-37.
- WEINDLING R (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22: 837-845
- YAO Y, LI Y, CHEN Z, ZHENG B, ZHANG L, NIU B, MENG J, LI A, ZHANG Y, WANG Q (2015) Biological Control of Potato Late Blight Using Isolates of *Trichoderma*. *Am. J. Potato Res.*, 92: 280-289
- YATIM, J M, RAHMAN, MOHD, A R (2009) Characterization and effects of the effective micro-organics (EM) and industrial waste (IW) material as partial mixture of concrete.
- ZIV, M, RONEN G, RAVIV M (1998) Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants *in vitro*. *Cell Dev Biol.-Plant*, 34: 152-158.
- ZUNO-FLORIANO, F, GALLEGOS-INFANTE J A, ROCHA-GÚZMAN N E, ALDANA-MADRID M L, VIRGEN-CALLEROS G, MILLER M G, MUÑOZ-RUIZ C V (2009) Producción *in vitro* de plántula de papa inoculada con *Pseudomonas* sp. *Terra Latinoamericana*. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Anexo

Anexo 1. Datos climáticos correspondientes al periodo del ensayo de evaluación del efecto de alternativas de manejo agronómico sobre enfermedades fúngicas en la producción de semilla de papa cv. 'Romano'. Diciembre de 2013 a marzo 2014. Fuente: Estación meteorológica Indio Hatuey.

Año	Mes	Día	Temperatura (°C)			Humedad relativa (%)		
			T min	T med	T max	Hr min	Hr med	Hr max
2013	12	25	14.4	21.6	29.0	53	81	98
2013	12	26	15.2	22.0	29.2	54	81	98
2013	12	27	18.3	23.4	29.8	59	83	97
2013	12	28	20.3	24.8	31.7	51	81	97
2013	12	29	20.5	25.5	33.1	45	78	96
2013	12	30	19.4	24.4	32.1	51	82	95
2013	12	31	18.0	23.6	30.9	56	84	97
2014	1	1	17.7	23.8	32.0	43	77	97
2014	1	2	18	24.5	32.1	37	72	97
2014	1	3	16.2	20.9	26.5	78	88	95
2014	1	4	21.3	24.4	28.6	59	79	90
2014	1	5	20.9	24.5	30.5	56	82	96
2014	1	6	19.3	24.0	30.4	51	82	97
2014	1	7	18.2	19.6	22.4	48	81	98
2014	1	8	20.0	23.5	28.6	66	86	99
2014	1	9	19.1	24.2	30.6	51	83	99
2014	1	10	17.4	24.6	31.9	41	78	98
2014	1	11	20.7	25.3	32.3	35	72	96
2014	1	12	16.8	22.9	31.7	44	78	98
2014	1	13	17.2	23.6	30.8	37	75	97
2014	1	14	17.2	22.9	31.6	34	74	98
2014	1	15	16.1	21.5	28.8	58	83	98
2014	1	16	12.2	19.2	24.1	53	73	94
2014	1	17	10.2	16.0	21.9	44	67	90
2014	1	18	7.1	16	25.2	26	64	95
2014	1	19	9.3	15.6	24.4	24	65	94
2014	1	20	5.3	15.5	25.5	34	69	94
2014	1	21	8.6	18.2	29.5	29	68	96
2014	1	22	12.6	18.2	24.4	41	72	93
2014	1	23	6	16.3	25.1	40	72	95
2014	1	24	10.2	18.2	27.8	44	75	93
2014	1	25	11.1	19	28.3	45	76	97
2014	1	26	10.5	19.4	29.4	35	71	94
2014	1	27	11.5	21.3	32.7	29	72	97
2014	1	28	15.7	24.0	32.4	40	74	96

2014	1	29	17.4	23.8	33.3	47	77	93
2014	1	30	19.2	22.9	28	63	85	98
2014	1	31	17.4	24.7	32.2	38	73	98
2014	2	1	16.1	24.7	33.0	38	74	97
2014	2	2	12.6	23.1	32.1	45	78	98
2014	2	3	18.3	25.0	33.1	48	80	96
2014	2	4	18.0	24.9	31.5	53	82	96
2014	2	5	18.0	25.5	32.5	47	76	95
2014	2	6	17.2	24.9	32.6	31	72	96
2014	2	7	16.5	24.7	32.6	42	75	94
2014	2	8	19.2	25.6	32.7	36	74	95
2014	2	9	16.2	23.8	30.0	53	80	98
2014	2	10	14.5	22.8	31.1	46	77	98
2014	2	11	12.9	22.9	32.0	41	76	98
2014	2	12	14.1	24.0	32.5	45	74	96
2014	2	13	17.6	23.6	32.3	48	78	95
2014	2	14	12.8	21.0	29.2	47	72	91
2014	2	15	11.8	20.9	28.9	32	72	95
2014	2	16	10.5	20.0	28.2	35	66	90
2014	2	17	7.2	19.9	29.6	47	72	91
2014	2	18	10.3	21.2	30.6	34	70	95
2014	2	19	9.9	21.6	31.4	39	71	91
2014	2	20	15.1	23.9	32.6	42	78	96
2014	2	21	16.5	25.5	33.5	33	73	94
2014	2	22	15.2	24.7	33.5	43	75	98
2014	2	23	17.9	25.8	34.1	35	72	96
2014	2	24	16.0	25.0	33.2	41	72	97
2014	2	25	16.8	25.2	31.1	45	75	98
2014	2	26	12.8	23.8	32.0	40	73	95
2014	2	27	14.9	25.0	33.0	30	69	96
2014	2	28	13.6	21.4	23.0	85	91	96
2014	3	1	11.2	20.4	28.0	48	77	97
2014	3	2	9.5	20.6	29.7	36	68	95
2014	3	3	10.9	21.7	30.9	34	68	92
2014	3	4	13.7	22.5	30.7	34	70	95
2014	3	5	13.7	23.1	32.4	38	75	96
2014	3	6	20.1	25.2	32.4	40	74	96

Anexo 2. Características del suelo en las áreas de cada alternativa de manejo agronómico al inicio del ensayo.

			Nitrógeno amoniacal (NH ₄ ⁺)		Nitrógeno nitrato(NO ₃ ⁻)		Nitrógeno nítrito (NO ₂ ⁻)		Fósforo (PO ₄)		Potasio (K)		Azufre (SO ₄)	
Tto	Prof. (cm)	pH (H ₂ O)	(ppm)	Val.	ppm	Val.	(ppm)	Val.	(ppm)	Val.	(ppm)	Val.	(ppm)	Val.
I	0-15	7.29	0.52	Media	0.31	Media	0.12	Medio alto	1023	Alto	2.4	Media	4	Baja
	15-30	7.1	0.34	Baja	0.18	Media	0.08	Media	1001	Alto	2.1	Media	5	Baja
II	0-15	7.55	1.2	Media	0.29	Media	0.11	Medio alto	1059	Alto	2.4	Media	5	Baja
	15-30	7.01	0.7	Media	0.2	Media	0.09	Media	1014	Alto	2.2	Media	6	Baja
III	0-15	7.62	1.1	Media	0.26	Media	0.14	Medio alto	1066	Alto	2.6	Media	3	Baja
	15-30	7.13	0.41	Baja	0.25	Media	0.1	Medio alto	1018	Alto	2	Media	4	Baja
IV	0-15	7.58	0.97	Media	0.27	Media	0.11	Medio alto	1562	Alto	2.5	Media	3	Baja
	15-30	7.05	0.33	Baja	0.18	Media	0.07	Media	1368	Alto	2.2	Media	5	Baja
Cachaza		7.51	0.23	Baja	2.4	Muy alto	0.17	Medio alto	1251	Alto	15.1	Muy Alto	67	Alto

Tratamientos:

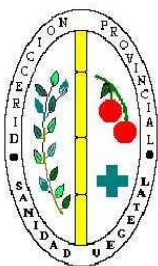
I. MEF-MO, Versaklin® aplicado al tubérculo y foliar, materia orgánica al suelo;

II Biológico, propuesta de manejo agronómico con bioproductos cubanos y materia orgánica al suelo;

III MO, tratamiento sin aplicación de productos y materia orgánica al suelo (control);

IV Químico, manejo agronómico con productos químicos y fórmula completa al suelo

Anexo 3. Metodología de señalización y pronóstico Sanidad Vegetal (selección de lo relativo al cultivo de la papa).



Resumen ampliado de Metodologías de Señalización y Pronóstico

Fitosanitario:

En el presente documento le resumimos las metodologías de muestreo de los principales organismos nocivos (plagas y enfermedades) que inciden en varios cultivos de importancia económica.

Es necesario que usted las estudie y las aplique hasta tener un dominio pleno de cada una de ellas. Su aplicación en los campos de producción le informará cual es la verdadera situación fitosanitaria que presenta el cultivo por lo que debe aplicarlas de forma correcta y cuidadosa.

No permita que en su Unidad se realicen aplicaciones si no está presente el organismo nocivo o aún no ha alcanzado los niveles (índices) que requieran aplicación. Recuerde que esto contribuirá en gran medida a la economía y rentabilidad de su Empresa o Cooperativa, contribuyendo directamente a la economía de nuestro país ya que todos los productos que hoy utilizamos son sumamente costosos y por lo tanto debemos velar por no malgastarlos.

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal

Villa Clara, 2005

Generalidades

Para determinar en campo el índice de infección y la distribución de un organismo nocivo se debe tener una libreta para anotar las evaluaciones o muestreos. Cada muestreo debe tener fecha, campo, cultivo y el nombre del organismo nocivo a evaluar. Los muestreos se harán por el método de las diagonales, puntos en las diagonales (en cada punto se toman las plantas a evaluar a tu alrededor) o diagonal en zigzag. En caso de tomar 5 puntos en cada diagonal, se evalúan en el mismo 10 plantas. En caso de tomar 10 puntos en la diagonal se evalúan 5 plantas en cada punto.

Figura 1. Modelo de asentamiento de los resultados del muestro

Punto	Planta	Organismos nocivos			Punto	Planta	Organismos nocivos			Punto	Planta	Organismos nocivos								
1	1				6	26				11	51				16	76				
	2					27					52					77				
	3					28					53					78				
	4					29					54					79				
	5					30					55					80				
2	6				7	31				12	56				17	81				
	7					32					57					82				
	8					33					58					83				
	9					34					59					84				
	10					35					60					85				
3	11				8	36				13	61				18	86				
	12					37					62					87				
	13					38					63					88				
	14					39					64					89				
	15					40					65					90				
4	16				9	41				14	66				19	91				
	17					42					67					92				
	18					43					68					93				
	19					44					69					94				
	20					45					70					95				
5	21				10	46				15	71				20	96				
	22					47					72					97				
	23					48					73					98				
	24					49					74					99				
	25					50					75					100				

Nota: En la columna de organismos nocivos se pone el nombre o símbolo de las plagas o enfermedades objeto de muestreo

% de Intensidad (% I)

$\% I = \frac{\sum(a * b)}{N * K} * 100$ Donde a – grado, b – cantidad de plantas afectadas en cada grado N – total de plantas evaluadas, K – último grado de la escala

% de Distribución (% D)

$\% D = \frac{n}{N} * 100$ Donde: n – Total de plantas afectadas, N – Total de plantas muestreadas

Efectividad Técnica (ET)

$ET = \frac{P - P_1}{P} * 100$ Donde P – cantidad de organismos nocivos antes del tratamiento P₁ - cantidad de organismos nocivos después del tratamiento

Ejemplo:

Para aplicar las escalas de infección debe proceder de la forma siguiente:

Nombre de enfermedad a evaluar:

Grados	0	1	2	3	4	5
Cantidad de plantas en cada grado	10	25	25	30	10	0

Figura 2. Diagrama de orientación para la evaluación de las plantas enfermas.

Se marcará mediante paloteo los valores que estimes (según metodologías), de acuerdo a las escalas a utilizar

Si se evalúan 100 plantas y el resultado es como se señala anteriormente se procede a multiplicar cada grado por el total de plantas con ese grado

$$\begin{aligned} 0 * 10 &= 0 \\ 1 * 25 &= 25 \\ 2 * 25 &= 50 \\ 3 * 30 &= 90 \\ 4 * 10 &= 40 \\ 5 * 0 &= 0 \end{aligned}$$

Luego se suman: $0 + 25 + 50 + 90 + 40 + 0 = 205$ y se aplica la siguiente fórmula: $\frac{205 * 100}{5 * 100} = \frac{20500}{500}$

El 5 es el mayor número de la escala de infección y el 100 es el número de plantas que se evaluó.

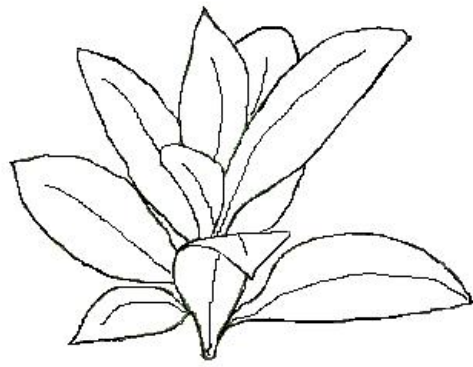
Entonces la enfermedad que se evaluó tuvo una intensidad o índice de infección del 41%.

Para determinar cuál es la distribución de la enfermedad se procede de la forma siguiente:

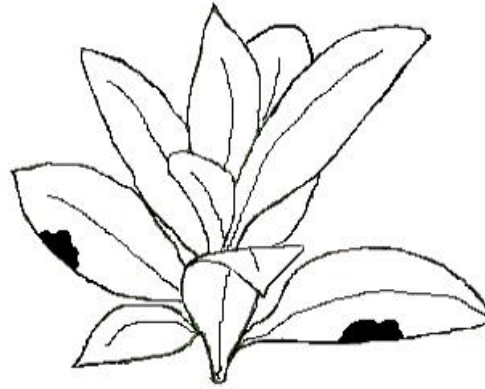
Si se evaluaron 100 plantas y de ellas habían 90 enfermas (porque 10 tenían grado 0 o sea estaban sanas) entonces se

procede así: $\frac{\text{Número de plantas enfermas} * 100}{\text{Total de plantas evaluadas}}$, en el ejemplo: $\frac{90 * 100}{100} = \frac{9000}{100} = 90\%$. Así se obtiene que la enfermedad está

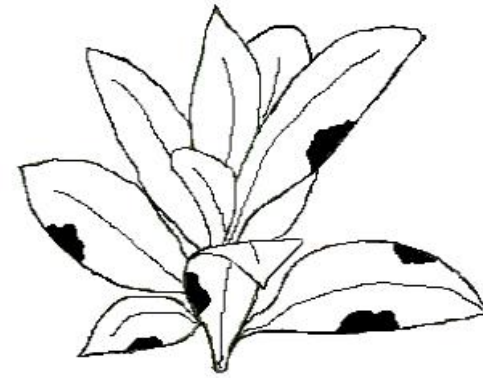
distribuida en el campo en un 90%.



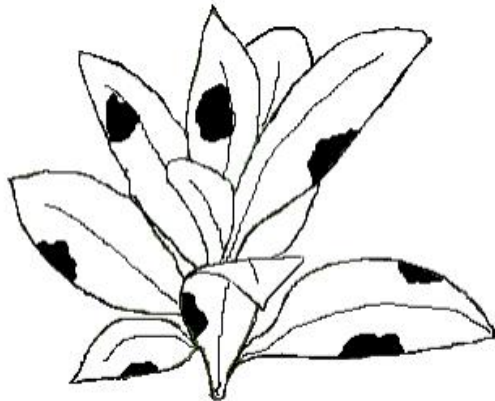
Grado 0



Grado 1



Grado 2



Grado 3



Grado 4



Grado 5

Figura 3. Esquema para evaluar la intensidad de las enfermedades

Cultivo: Papa

Organismo Causal	Método de muestreo	Índice para la señal	Gradología		
			Ligero	Medio	Intenso
<p><i>Myzus persicae</i> Sulzer <i>Aphis gossypii</i> Glover (Áfidos o pulgones)</p>	<p>Se observarán 33 puntos diferentes del campo distribuidos según la diagonal en zigzag o en forma de tablero de ajedrez. En cada punto se observa una planta revisando solamente 3 hojas completas (no foliolos) una del nivel inferior, una del medio y otra del nivel superior (se adicionará una más del nivel superior para un total de 100 hojas).</p>	<p>Cuando se presente el 5% de plantas (2) con 20 o más áfidos (1.5 por planta).</p>	<p>Menos del 5% de plantas infestadas por la plaga.</p>	<p>5 a 9% de plantas infestadas por la plaga con 20 áfidos o más.</p>	<p>Mayor de 9% de plantas infestadas por la plaga con 20 áfidos o más.</p>

<p><i>Myzus persicae</i> Sulzer (Áreas de producción de semillas)</p>	<p>Semilla registrada II 100 plantas, 3 hojas/planta 3 niveles. Semilla certificada I y II 50 plantas, 3 hojas/planta 3 niveles.</p>	<p>Registrada: 0.025 áfidos/planta Certificada I: 0.05 áfidos/planta Certificada II: 0.1 áfidos/planta</p>			
<p><i>Liriomyza trifolii</i> (Burgess) (Minador)</p>	<p>Se muestrean 33 plantas tomando una hoja de cada nivel (inferior, medio, superior y una mas para un total de 100 hojas). Al estereo se contarán las larvas vivas determinando el promedio por hoja. Los muestreos se harán del sur al norte en diagonal en zigzag.</p>	<p>1 larva viva por hoja Promedio de 66 hojas cuando los daños son localizados en los tercios inferiores 0.5 larvas vivas/hoja Promedio en 33 hojas cuando los daños son localizados en el tercio superior Si los biorreguladores son inferiores al 40% se harán observaciones para determinar la tendencia y la definición del modo de control.</p>	<p>Menos de 2 larvas vivas/hoja con un % de parasitismo superior al 40%.</p>	<p>De 2 a 5 larvas vivas/hoja y los biorreguladores por debajo del 40%.</p>	<p>Mayor de 5 larvas vivas/hoja con un % de parasitismo inferior al 40%.</p>
<p><i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks) (Ácaro blanco)</p>	<p>Se harán los chequeos hasta los 90 días. Se observarán 100 hojas jóvenes del nivel superior de 100 plantas en zigzag. Se analizarán al estereo anotando los ácaros presentes (hasta 5, más de 5 y no infestadas para el cálculo de la efectividad).</p>	<p>10 a 20% de hojas infestadas.</p>	<p>Menos de 2 ejemplares de cualquier estadio por hoja Menos de 10% de hojas infestadas.</p>	<p>De 2 a 5 ejemplares de cualquier estadio por hoja De 10 al 20% de hojas infestadas.</p>	<p>Más de 5 ejemplares de cualquier estadio por hoja Más de 20% de hojas infestadas.</p>

Thrips	Se observarán 33 puntos diferentes del campo distribuidos según la diagonal en zigzag o en forma de tablero de ajedrez. En cada punto se observa una planta revisando solamente tres hojas completas no foliolos una del nivel superior una del medio y otra del inferior, se adicionará una hoja más del nivel superior para un total de 100 hojas.	Más de 10 individuos por hoja Aplicar un insecticida de alta efectividad.	6 a 10 Thrips/hoja.	11 a 25 Thrips/hoja	Más de 25 Thrips/ hoja.
--------	--	--	------------------------	------------------------	-------------------------------

Cultivo: Papa (continuación).

Organismo Causal	Método de muestreo	Índice para la señal	Gradología		
			Ligero	Medio	Intenso
Crisomélidos	Se analizan 100 hojas/ha y se determina la intensidad de daño mediante la siguiente escala. (0) hojas sanas (1) 1 o 2 perforaciones independientes en el limbo de las hojas (2) de 6 a 10 perforaciones independientes en el limbo de la hoja (3) de 11 a 16 perforaciones en el limbo. Algunas grandes producto de la unión de varias pequeñas (4) Más de 16 perforaciones grandes producto de la unión de varias pequeñas, el limbo aparece perforado fuertemente $\% \text{ Intensidad de daño} = \frac{\sum(a*b)}{4N} * 100$ Σ - Sumatoria, a – Grado de la escala b – Cantidad de hojas en cada grado N – Total de hojas evaluadas 4 – último grado de la escala. Para determinar el número de perforaciones por hoja se calcula el promedio de las perforaciones en las hojas evaluadas. Por conteo directo: Se observan 100 plantas y se anotan los crisomélidos observados en las mismas, distribuidas en puntos en la diagonal. Jameo: 10 pases de jamo en 10 lugares del campo.	Intensidad de daño: 20 a 25% Conteo directo: 2 insectos por planta Jameo: 1 a 2 insectos por jamada	Por insectos en 10 pases de jamo		
			Menos de 1 insectos/ jamada	De 1 a 2 insectos/ jamada	Más de 2 insectos/ jamada
			Por hojas dañadas		
			1 o 2 perforaciones / hoja.	Hasta 6 perforaciones / hoja.	Más de 6 perforaciones / hoja.
			Conteo directo		
Menos de 2 insectos / planta.	De 2 a 3 insectos / planta.	Más de 3 insectos / planta.			

Spodoptera spp	Se observan 25 plantas /ha al azar en forma de diagonal o tablero de ajedrez. Se revisan todas las hojas de las plantas tanto por el haz como por el envés contando el número de masas de huevos o larvas encontradas.	Si se observa del 15 a 20% de infestación ya sea por masas de huevos o larvas de los 1 ^{ros} estadios. Si el mayor % es de huevos debemos esperar de 4 a 5 días para aplicar.	Menos del 15% de infestación.	Del 15 al 20% de infestación.	Más del 20% de infestación.
Phytophthora infestans (Montagne) de Bary (Tizón tardío)	Metodología para la evaluación del Tizón Tardío Las inspecciones a los campos deben realizarse con sumo cuidado para detectar los primeros síntomas, enfatizando en las áreas con mayor edad revisando los lugares bajos y donde existan encharcamientos. Una vez detectada la enfermedad las observaciones se realizarán como mínimo cada 2 días. Se observan 100 plantas /ha. Escala para la evaluación: (0) planta sana (1) Primeros síntomas o manchas en las hojas (2) Las manchas ocupan hasta un 10% de la superficie de la planta (3) Entre 11 y 25% (4) 26 y 50% (5) Más del 50% de la superficie de la planta.	Con los primeros síntomas.	Menos del 10% de la Superficie Foliar Afectada (SFA) ¹ .	10 a 25% de la SFA.	Más de 25% de la SFA.

¹ SFA *Superficie Foliar Afectada*. Se estima por el observador de forma visual de acuerdo con el esquema mostrado en la figura 3 de este documento y aplicando la fórmula de % de intensidad.

Cultivo: Papa (continuación).

Organismo Causal	Método de muestreo	Índice para la señal	Gradología		
			Liger o	Medi o	Intenso
<p><i>Phytophthora infestans</i> (Montagne) de Bary (Tizón tardío) Pronóstico</p>	<p>Pronóstico de Naumova modificado Cuando en 2 días consecutivos se presenten: humedad relativa media del día mayor o igual al 84%, humedad relativa mínima del día mayor o igual al 60%, Temperatura mínima del día mayor o igual a 11°C Período de Alerta: Si se presentan las condiciones anteriores y temperatura máxima del día entre 25 y 28°C Período de Crítico: Las condiciones inicialmente señaladas y temperatura máxima del día menor de 25°C Pronóstico del umbral de lluvias Se llevará a partir del 1ro de diciembre cada 4 semanas se acumulan 38 (Dic), 76 (Ene) y 114 (Feb) milímetros de lluvia. Con estos datos se ploteará una línea recta, cuando los valores acumulados de lluvia estén por encima de la recta y existan temperaturas medias menores de 24°C puede manifestarse epidemia del patógeno Pronóstico por McHardy (Provincial) Lluvia acumulada en 10 días consecutivos mayor o igual a 26 mm. Temperaturas mínimas mayores de 7°C y temperaturas medias menores de 25.5°C Tres días después de haberse dado estas condiciones deben aparecer las manchas hasta pasados los 7 días</p>	Según pronóstico			
<p><i>Alternaria solani</i> (Ell. and Mart.) Jones and Grout. (Tizón temprano) Pronóstico</p>	<p>Pronóstico: Si durante 2 días consecutivos se presentan humedad relativa media mayor o igual a 84% o humedad relativa mínima mayor o igual a 60% o ambas, temperatura mínima mayor o igual a 18°C y precipitación mayor o igual a 0.5 mm En plantas menores de 30 días buscar manchas En plantas de 50 a 60 días con 5 a 10% de intensidad se debe esperar un desarrollo violento.</p>	Según pronóstico			

<i>Alternaria solani</i> (Ell. and Mart.) Jones and Grout. (Tizón temprano)	Metodología para la evaluación del Tizón Temprano Se comenzarán las observaciones 14 días después de la brotación. Observando cuidadosamente las hojas de la planta. Se observan 100 plantas /ha Para la evaluación se empleará la escala descrita en Tizón Tardío	Con los primeros síntomas	Menos del 10% de la SFA	10 a 40% de la SFA	Más de 40% de SFA
---	---	---------------------------	-------------------------	--------------------	-------------------

BIBLIOGRAFÍA:

BRUNER S. C., L. C. SCARAMUZA, A. R. OTERO (1975): Catálogo de insectos que atacan a las plantas económicas de Cuba. La Habana, Editora Revolucionaria. 2da ed. Revisada y aumentada, 1975. 399p.

CUBA. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA. CENTRO NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL (2003): Manejo integrado de plagas en el cultivo de la papa. MINAGRI. Diciembre 2003

CUBA. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA. CENTRO NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL (2001): Programa de defensa cultivo del tabaco. MINAGRI. Cuba 2001

CUBA. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA. CENTRO NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL.(2002): Programa de defensa fitosanitaria para las hortalizas. MINAGRI. 2002

CUBA. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA. CENTRO NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL. (2000): Programa de defensa fitosanitaria para el cultivo de la papa.. MINAGRI. Ciudad de La Habana ,Diciembre 2000.

CUBA. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA. LABORATORIO PROVINCIAL DE SANIDAD VEGETAL HABANA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE SANIDAD VEGETAL, DEPARTAMENTO PROGRAMAS DE DEFENSA DEL CENTRO NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL.(1998 ?): Resumen de Metodologías de Señalización. 6 pp.

SUÁREZ PÉREZ R, RODRÍGUEZ MIRABAL A, FELIPE EIRIM A.(1986): Protección de plantas. La Habana, Editorial Pueblo y Educación. 156 p.