

SELECCIÓN-CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS

1. *Lecanicillium* (= *verticillium*) *lecanii* como antagonista de *Hemileia vastatrix* causante de la roya anaranjada del café

Esteban González

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Autopista Nacional y Carretera de Jamaica, Apdo. 10, San José de las Lajas, La Habana, CP 32700, eglez@censa.edu.cu; eglezfu@yahoo.es

El cultivo del café en Cuba está priorizado por la entrada de divisas que genera y su amplia demanda en la población como bebida de gran hábito de consumo. La roya anaranjada, causada por *Hemileia vastatrix*, está considerada como el patógeno de mayor importancia entre las enfermedades que afectan a este cultivo. Su control a escala mundial se ha efectuado principalmente mediante el empleo de fungicidas, los que bien manejados han tenido éxitos, aunque con incrementos de los costos de producción, contaminación del ambiente, destrucción de la fauna beneficiosa y el riesgo de aparición de fungorresistencia. Por ello este trabajo estuvo dirigido a obtener aislamientos nativos de *L. lecanii* con el objetivo de seleccionar una cepa promisorio para contribuir al manejo agroecológico de esta plaga. De un amplio grupo de aislados tomados desde pústulas de la roya y de la guagua verde (*Coccus viridis*) se seleccionaron ocho de ellos provenientes de la región centro-occidental del país, unido a dos cepas de referencia que fueron comparadas para determinar las particularidades bioecológicas y evaluar su patogenicidad *in vitro* y entonces llevar al campo la más promisorio. Los aislamientos obtenidos presentan acción micoparasítica y entomopatogénica. Las mejores condiciones de desarrollo se encontraron a 25°C, pH entre 5 y 7, Hr superior a 80% y oscuridad continua con un porcentaje de parasitismo sobre los soros superior a 95%, donde se redujo el índice de infección de forma similar al oxiclورو de cobre.

Lecanicillium (= *verticillium*) *lecanii* as an antagonistic agent of *Hemileia vastatrix*

Coffee is a crop of high priority in Cuba for the foreign currency it generates and its wide demand as a drink

of high consumption by the people. The orange coffee rust, caused by *Hemileia vastatrix*, has been considered the most important disease among those affecting this crop. At world scale, orange coffee rust has been mainly controlled by the use of fungicides, which have been successful when are well managed but with increases of production costs, environment pollution, destruction of beneficial fauna and the risk of appearing resistance to the fungus. Due to this, the objective of this work was to obtain a promissory strain of *L. lecanii* selected from native isolates to contribute to the agroecological management of this pest. Eight isolates proceeding from the central region of the country were selected, from a large group taken from rust sorus and of the green scale (*Coccus viridis*). They were compared with two reference strains to determine their bioecological particularities and to evaluate their pathogenicity *in vitro* to take the most promissory strain to the field. The isolates selected showed mycoparasitic and entomopathogenic action. The best growth conditions were 25°C, pH between 5 and 7, RH higher to 80% and permanent darkness with a percentage of parasitism on the sorus higher to 95%, where the infection rate was reduced similarly to the use of copper oxichloride.

2. Aislamiento y caracterización de una nueva cepa de *Bacillus mycoides* antagonista de bacterias fitopatógenas y hongos y filamentosos

Ileana Sánchez Ortiz,¹ Jesús Mena Campos,¹ Yamilka Ramírez Núñez,¹ Gilda Jiménez Montejo,² Graciela García Rivero,² Marieta Marín Bruzos,¹ Licette León Barreras¹ y Eulogio Pimentel Vázquez¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey. Gaveta Postal 387, CP 70100, Camagüey, Cuba, ileana.sanchez@cigb.edu.cu

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Ave. Finlay Km 2½ e/ Planta de Nitrógeno y Circunvalación Norte, Camagüey, Cuba

A causa de los efectos negativos de los plaguicidas químicos sobre el medio ambiente y la salud humana, se han fomentado trabajos de investigación con el fin de

obtener agentes biológicos para el control de plagas y enfermedades como una alternativa poderosa para reducir pérdidas en la agricultura. El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, en Cuba, se ha unido a esta línea investigativa para desarrollar nuevos productos compatibles con el medio ambiente. En este trabajo se aisló del aire de un laboratorio una nueva cepa bacteriana que inhibió el crecimiento de hongos sobre medio papa-dextrosa-agar. Se llevó a cabo su caracterización microbiológica y la evaluación *in vitro* de la actividad biológica contra patógenos de plantas. La bacteria se identificó por el programa computarizado SPIM 2.0 del Centro de Ingeniería y Genética de Camagüey (CIGB Camagüey). El efecto antagonista del aislado llamado *Bacillus mycoides* CIGBLX se demostró en ensayos *in vitro* con diferentes medios de cultivo, contra hongos de interés agrícola como *Pestalotia palmarum*, *Alternaria longipes* y *Sarocladium oryzae*, y bacterias como *Erwinia chrysantemi*, *Pseudomonas viridiflava* y *Burkholderia glumae*. Se proponen algunas hipótesis sobre el posible mecanismo de acción que rige estos efectos antagonistas. Se piensa que la cepa CIGBLX de *Bacillus mycoides* produce una o más sustancias con efecto antimicrobiano, o un grupo de componentes con acciones distintas, útiles como control biológico agrícola en un futuro.

Isolation and characterization of a new strain of *Bacillus mycoides* antagonist of phytopathogens bacteria and filamentous fungi

Due to the negative effects of chemical pesticides on the environment and human health many researchers have been encouraged to obtain biological agents to control pests and diseases as a powerful alternative to reduce losses in agriculture. The Center of Genetic Engineering and Biotechnology of Camagüey, Cuba, has joined to this research line for develop new products compatibles with the environment. In this work a new bacterial strain that inhibited growth of fungi on Potato Dextrose-Agar was isolated from the air of a laboratory. Then was performed its microbiological characterization and the evaluation of the biological activity *in vitro* against pathogens of plants. The bacterium was identified by computer software SPIM 2.0. The antagonistic effect of the isolation named *Bacillus mycoides* CIGBLX against fungi of agricultural interest, like *Pestalotia palmarum*, *Alternaria longipes* and *Sarocladium oryzae*, and bacteria like

Erwinia chrysantemi, *Pseudomonas viridiflava* and *Burkholderia glumae*, was demonstrated *in vitro* assays with different culture media. Some hypotheses on the possible action mechanism that ruled these antagonistic effects are proposed. *Bacillus mycoides* strain CIGBLX is thought to produce one or more substances with antimicrobial effects, or a set of components with distinct actions useful as agricultural biological control in the future.

3. Potencialidad de un aislado de *Trichoderma* sp. como agente para el biocontrol de *Phytophthora parasitica* Dastur en cítricos

Miguel Aranguren González,¹ Alina García Pérez,¹ Yenía Suárez González¹ y Adys Gómez Montes de Oca²

¹ Unidad Científica Tecnológica, Jagüey Grande, del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

² Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7a. no. 3005 e/ 30 y 32, Playa, Ciudad de La Habana, micologia@ift.cu

Se evaluó la capacidad antagónica de la cepa B-32 de *Trichoderma* sp. frente al patógeno *Phytophthora parasitica* Dastur, causante de la pudrición del pie de los cítricos. El aislado inhibió el crecimiento del patógeno de forma total en la prueba *in vitro*. La habilidad del antagonista para impedir *in vivo* el desarrollo de la enfermedad se evaluó en semillero, con la utilización de plántulas de las especies de cítricos mandarino Cleopatra (tolerante) y pomelo Duncan (muy susceptible), en un suelo contaminado con alto inóculo de *P. parasitica*. Después de un mes de aplicación de suspensiones de *Trichoderma* a 1×10^9 esporas/mL al suelo, se observó que las plántulas en las variantes infectadas mostraron una mortalidad de 8,3% y de 60% para el mandarino Cleopatra y el pomelo Duncan, respectivamente, pero sin la presencia del antagonista. No se encontraron plántulas muertas en el tratamiento donde se aplicó *Trichoderma*, lo que pone en evidencia las potencialidades de este agente para el biocontrol de *P. parasitica* en cítricos.

Potentiality of a *Trichoderma* sp. isolate as biocontrol agent against *Phytophthora parasitica* in citrus

Antagonist capacity of *Trichoderma* sp B-32 strain was evaluated against *Phytophthora parasitica* Dastur which causes foot rot citrus disease. Isolate inhibited pathogen

growth totally *in vitro*. *Trichoderma* capacity to prevent pathogen development *in vivo* was evaluated in Cleopatra mandarin (tolerant) and Duncan grapefruit (very susceptible) seedlings, in a soil with high inoculum contamination of *P. parasitica*. Plants mortality were 8.3% and 60% for Cleopatra and Duncan seedling respectability after applying of 1×10^9 spores/mL *Trichoderma* suspension for a month without presence of antagonist. Not dead seedlings were found where *Trichoderma* was applied. These results show the potential capacity of *Trichoderma* as biocontrol agent against *Phytophthora parasitica*.

4. Perspectivas del biocontrol de hongos en la semilla botánica de la caña de azúcar en Cuba

Isabel Alfonso,¹ F. Alfonso,¹ M. J. Rivera¹ y Pilar Villa²

¹ Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CAI Martínez Prieto Km 2½, Boyeros, Ciudad de La Habana

² Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana, isabel@inica.cu

El empleo de biocontroladores antagonistas de hongos fitopatógenos se ha incrementado notablemente. En Cuba la semilla botánica de la caña de azúcar posee un alto valor genético y económico que puede afectarse por la incidencia de la microbiota patógena y asociada. Los géneros *Curvularia*, *Bipolaris* y *Exserohilum* sobresalen por su prevalencia y patogenicidad. Se presenta el antagonismo *in vitro* e *in vivo* de diferentes especies de *Aspergillus* y *Trichoderma*, así como el efecto del bioproducto Gluticid frente a *Curvularia senegalensis*, *Bipolaris spicifera* y *Exserohilum rostratum*, hongos patógenos aislados de semilla botánica de la caña de azúcar. *Aspergillus versicolor*, *A. sacchari* y *A. nidulans* manifestaron alta competencia por el sustrato y una marcada antibiosis, y evidenciaron la segregación de sustancias bioactivas al reducir el crecimiento micelial de los patógenos. *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, en cultivo dual con los patógenos, mostraron mayor rapidez de colonización del sustrato con más de 50% de las placas y en ocasiones cubrieron las colonias de *C. senegalensis* y *B. spicifera*. La reducción del crecimiento micelial de los patógenos en el filtrado de los antagonistas demostró la capacidad antibiótica de las dos especies de *Trichoderma*, aunque *T. harzianum* mostró mayor efectividad. Gluticid (200 ppm) disminuyó el crecimiento micelial y la germinación conidial de los patógenos con una reducción mayor de 80% de la micoflora presente en la semilla botánica. El uso de estos biocontroles tiene un

impacto ambiental, pues son inoocuos al hombre y no dañan el medio ambiente, además de ser económicamente más baratos que los productos químicos.

Perspectives of fungi biocontrol in sugarcane botanical seed in Cuba

The employment of antagonistic biocontrollers of phytopathogenic fungi has been increased notably. In Cuba, the botanical seed of sugar cane possesses high genetic and economic values that can be affected by the incidence of the pathogenic and associate mycobiota, the genus *Curvularia*, *Bipolaris* and *Exserohilum* stand out for its prevalence as well as its pathogenicity. The antagonism is presented *in vitro* and *in vivo* of different species of *Aspergillus* and *Trichoderma*, as well as the effect of the bioproduct Gluticid against *Curvularia senegalensis*, *Bipolaris spicifera* and *Exserohilum rostratum*, pathogenic fungi isolated from sugar cane botanical seed. *Aspergillus versicolor*, *A. sacchari* and *A. nidulans* manifested high competition for the substrate and a marked antibiosis, evidencing the segregation of bioactive substances when reducing the mycelia growth of the pathogens. *Trichoderma harzianum* and *T. viride*, in dual cultivation with the pathogenics, showed bigger speed of substrate colonization and reaching up to 50% of the dishes and covering in occasions the colonies of *C. senegalensis* and *B. spicifera*. Pathogens mycelia growth reduction in the filtrate of antagonists demonstrated the antibiotic capacity of the two species of *Trichoderma*, although *T. harzianum* showed bigger effectiveness. Gluticid (200 ppm) diminishes pathogens mycelia growth and conidial germination and reduced more than 80% the present mycoflora in botanical seeds. The use of these biocontrollers has an environmental impact, because they are innocuous to the man and they do not damage environment, they are also economically cheaper than chemical products.

5. Obtención y análisis de mutantes de *Trichoderma* spp. generados por luz UV

María A. Ortega Amaro,¹ Raúl Rodríguez Guerra,² Flora A. Becerra,² Juan F. Jiménez Bremont¹ y Sergio Casas Flores¹

¹ Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa San José 2055. Col. Lomas, 4ª. Secc., San Luis Potosí, México, SLP, teléf. (444) 834 2000, fax (444) 834 2010

² Unidad de Biotecnología. INIFAP, 78000, Fax (444) 834 2010, scasas@ipicyt.edu.mx

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como los hongos, constituyen la mayor causa de pérdida en la producción agrícola de ají chile, en el estado de Guanajuato. La manera tradicional de combatirlos se basa en el empleo de compuestos químicos (control químico), los que se caracterizan por ser tóxicos e inespecíficos. En este sentido, una estrategia que proporciona un buen resultado es la utilización de microorganismos que son antagonistas de los agentes infecciosos, y que los desplazan de una manera natural (control biológico). Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de las enfermedades de plantas producidas por hongos. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: competencia directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sea de naturaleza volátil o no volátil, y parasitismo directo. Un uso más extendido del control biológico requiere la obtención de agentes de biocontrol más eficaces de los que existen actualmente. Por lo tanto, se podría mejorar la actividad antagonista de una cepa aislada del estado de Guanajuato mediante mutaciones. Para ello las esporas se sometieron a mutagénesis con luz ultravioleta, en el rango de tiempo de exposición de la LD50. Actualmente se analizan las mutantes basadas en su velocidad de crecimiento, producción de antibióticos y a la capacidad antagonista frente a los hongos fitopatógenos de los géneros *Phytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* aislados del estado de Guanajuato. Un par de las cepas seleccionadas, M-19 y M-45, mostraron mayor actividad antagonista contra los fitopatógenos que la cepa original.

Isolation and analysis of mutants of *Trichoderma* spp. generated by UV light

Plant diseases generated by pathogen microorganisms, such as fungi, constitutes the main loss cause in the agricultural production of chile pepper in Guanajuato, México. The traditional way of control these phytopathogens is based on the use of chemical pesticides (chemical control), which are characterized for been toxic and non-specific. In this sense, an environment friendly and successful strategy, based on the utilization of antagonistic microorganisms against infectious agents that attack them in a natural way (biological control) has given good results. *Trichoderma*

species are widely used as antagonistic agents against phytopathogenic fungi. There are three mechanisms by which *Trichoderma* counteract the effect of phytopathogens: direct competence for space and nutrients, antibiotic metabolites production and direct parasitism. An extended use of biological control requires isolation of more efficient bio-control agents. In this way, it is necessary to improve the antagonistic activity of the available strains by generation of new strains. In order to obtain strains with enhanced activity, a bulk of conidias were exposed to ultraviolet light in the time rank of LD50. The obtained mutants are being analyzed based on of their growth velocity, antibiotic production and the antagonistic effect against phytopathogens fungi belonging to the genus *Phytophthora*, *Fusarium* and *Rhizoctonia* isolated from Guanajuato. A couple of selected strains, M-19 and M-45 showed higher antagonistic activity against phytopathogens than the parental strain.

6. Efecto del hongo *Trichoderma* sp. contra *Erwinia carnegiana* en el nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller

José L. Sánchez Ríos, Manuel Guerrero Andrade, Rodolfo A. Perea Cantera, José H. Salas Morales y Edilberto Castrejón Mendoza

Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Calzada del Hueso 1100 col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, CP 04960, México, teléf. 54837193, sanrijl@servidor.unam.mx

En México existen variedades del nopal que tienen diferentes usos como forraje, fruto (tuna, pitahaya) y verdura. El cultivo de este último se ha extendido; sin embargo, la producción del nopalito está limitada a causa de plagas y enfermedades, que ocasionan grandes pérdidas en la producción, así como en la calidad de los productos. Una de las enfermedades importantes del nopal es la mancha café, causada por la bacteria *Erwinia carnegiana*. Para su control se pueden utilizar antibióticos agrícolas, pero su alto costo para los agricultores, además del riesgo de la salud humana y la contaminación al ambiente, limita su uso, por lo que una alternativa como método de control de la enfermedad es el uso de organismos antagónicos (*Trichoderma* spp.) que actúan como control biológico por su capacidad natural de limitar el desarrollo de patógenos de plantas. En este sentido se evaluó el efecto antagónico de dos cepas de *Trichoderma* contra la bacteria *E. carnegiana*. El trabajo se realizó con muestras de cladodios obtenidas de la región de Milpa Alta del Distrito Fede-

ral y de la región de Chapingo, del estado de México. De las muestras de cladodios enfermos se aislaron las bacterias en medio B-King contenidas en placas de Petri. Se utilizaron además las cepas de *Trichoderma* 42000 y *Trichoderma* 42005 obtenidas de la Dirección General de Sanidad, que se sembraron en las mismas placas de Petri por la técnica dual para observar su efecto antagónico. Se encontró que las cepas del hongo de *Trichoderma* mostraron un efecto inhibitorio de 100% del crecimiento de la bacteria, por lo que se infiere que la producción de antibióticos producidos por estas cepas tienen acción contra *E. carnegiana*. Hubo una diferencia en 10% en la velocidad de crecimiento de la cepa *Trichoderma* 42000 sobre *E. carnegiana* en comparación con la cepa *Trichoderma* 42005.

***Trichoderma* fungi effect against *Erwinia carnegiana* in nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.**

There are different nopal varieties in Mexico that have different uses such as forage, fruit (tuna, pitahaya), vegetable, this last one has come widening its cultivation. However, the nopal production is restricted because of plagues and diseases which cause a large lost on it so that the product quality. One of the important diseases is brown spot caused by the bacteria *Erwinia carnegiana*. Agricultural drugs can be used to control it but the cost is high to the farmers, as well as the risk to human health and environment pollution restricts its use. Therefore, an optional method to disease control is the use of antagonistic organisms (*Trichoderma* spp.) which acts as a biological control because of its natural capability to confine the plant pathogenic development. In that way was evaluated the antagonistic effect of two *Trichoderma* strains against *E. carnegiana*. The assignment was done with two samples of cladode obtained from the region of Milpa Alta in Distrito Federal and the Chapingo region in Mexico State. Bacteria were isolated from cladode samples in B-King medium contained in Petri dish; moreover *Trichoderma* 42000 and *Trichoderma* 42005 strains, obtained from the Health General Office, were used as well. These last one were also sowed in the Petri dishes using the dual technique in order to observe its antagonistic effect. The *Trichoderma* fungi strains showed 100% inhibition effect on bacteria growing. So drugs produced by these strains had action against *E. carnegiana*. There was 10% difference in *Trichoderma* 42000 strain growing velocity over *E. carnegiana* in contrast with *Trichoderma* 42005 strain.

7. Paja de arroz, un sustrato natural para el aislamiento de especies de *Trichoderma* en suelos de la Empresa de Piña en Ciego de Ávila

Aliuska Sierra Peña,¹ Alexis A. Hernández Mansilla² y Aidante Carr Pérez³

¹Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9½, Ciego de Ávila, pfa_aliuska@agronomia.unica.cu

²Grupo Científico. Centro Meteorológico Provincial. Marcial Gómez 401, esq. Estrada, Ciego de Ávila, ahmansilla@yahoo.es; agro@meteoro.fica.inf.cu

³Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

Se ejecutó un trabajo en el Centro Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila con el objetivo de seleccionar un medio de cultivo para el aislamiento de *Trichoderma* spp. que permitiera procesar un alto volumen de muestras, así como conocer las especies presentes en los suelos de la Empresa de Piña, en Ciego de Ávila. Se tomaron muestras de la parte bioactiva del suelo, se trasladaron al laboratorio para procesarlas hasta obtener diluciones que se depositaron en placas que contenían los medios de cultivo agar-agua, agar-papa-dextrosa, paja de arroz, aserrín de casuarina y bagazo de caña. Las placas se incubaron durante 72 h a 25°C y total oscuridad, para su posterior aislamiento e identificación a nivel de género y especie, además de realizar la correspondiente prueba de patogenicidad. Se comprobó que el sustrato natural de paja de arroz resultó el mejor entre los medios probados para el aislamiento de *Trichoderma* spp. con poca contaminación y buen nivel de colonización. Se determinó que en las áreas dedicadas a la producción de esta fruta se encuentran presentes las especies *Trichoderma viride* Pers.:Fr., *Trichoderma atroviride* Bissett, *Trichoderma aureoviride* Rifai, las cuales no son patógenas al cultivo. Este trabajo constituye el primer informe de la presencia *T. atroviride* y *T. aureoviride* en el país.

Rice straw, a natural substratum for the isolation of *Trichoderma* species in soils of pineapple enterprise in Ciego de Ávila

With the objective of selecting a culture media for the isolation of *Trichoderma* spp., that allowed to process a high volume of samples, as well as to know the species present in the soils of Pineapple Enterprise in Ciego de Avila, was carried up a work at Bioplants Center in

Ciego de Ávila University. Samples from the bioactive part of the soil were taken to laboratory and processed to obtain dilutions; they were then placed on Petri dishes that contained culture media water-agar, potato-agar-dextrose, rice straw, casuarina sawdust and sugar cane bagasse. The plates were incubating for 72 h to 25°C and a complete darkness, for its next isolation and identification to a genus and species level, and also to do the corresponding pathogenic test. It was proved that the natural substratum of rice straw was the best among all the tested media for the isolation of *Trichoderma* spp. with a slight contamination and a good colonization level. It was determined that *Trichoderma viride*, Pers. Fr, *Trichoderma atroviride* Bissett and *Trichoderma aureoviride* Rifai are present in areas dedicated to pineapple production, which are not pathogens to this fruit plants. This work is the first information about *T. atroviride* and *T. aureoviride* in the country.

8. Especies del género *Trichoderma* presentes en Cuba y sustratos más frecuentes

Yamilka Pérez Bocourt y María O. López Mesa

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, yperez@inisav.cu

El género *Trichoderma* Persoon se ha utilizado ampliamente con buenos resultados en la lucha biológica. El Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal desde 1986 comenzó una colección de cepas de *Trichoderma* en la cual están representadas las secciones *Pachybasium*, *Longibrachiatum* y *Trichoderma*. A partir de un análisis de las cepas procedentes de 13 provincias de Cuba se conoció que las especies mayormente representadas son *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*, además de los sustratos donde más frecuentemente se han encontrado aislamientos de *Trichoderma*. Corresponden 49,2% a diferentes tipos de suelo, 24,6% a sustratos vegetales y 15,8% a sustratos micorrízicos. De 126 aislamientos de esta colección analizados, las especies presentes por secciones fueron *T. harzianum* en la sección *Pachybasium*; *T. longibrachiatum*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii* en la sección *Longibrachiatum*; y *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. viride* y *T. virens* en la sección *Trichoderma*.

Species of *Trichoderma* genus present in Cuba and more frequent substrates

Genus *Trichoderma* have been broadly studied and used with good results in biological control. Since 1986 Plant

Health Research Institute initiated a strains collection where sections *Pachybasium*, *Longibrachiatum* and *Trichoderma* are included. After an analysis of strains proceeding from thirteen provinces of Cuba, it was known that species more represented were *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*, also that the most frequent substrates where *Trichoderma* isolations have been found corresponded 49,2% to different kind of soils, 24,6% to plant substrates and 15,8%.to mycorrhizal fungi substrate. Present species from 126 isolates analyzed by section were *T. harzianum* for section *Pachybasium*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* for section *Longibrachiatum* and *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. viride* and *T. virens* for section *Trichoderma*.

9. Efecto bactericida *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*, cepa PSS, contra bacterias fitopatógenas

Marusia Stefanova, Yuliet Franco, María F. Coronado y Pilar Villa

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

La eficacia de la cepa PSS de *Pseudomonas aeruginosa* y del producto biológico Glutucid se comprobó en el laboratorio y el campo contra diversas especies fúngicas en papa, tomate, tabaco, frijol y cebolla, entre otros; sin embargo, se desconoce el efecto que puede tener contra las bacterias fitopatógenas registradas en estos y otros cultivos. Con tales propósitos se realizó el presente estudio que incluyó 20 aislamientos bacterianos de las especies *Dickeya chrysanthemi* (4), *Pectobacterium carotovorum* (6), *Xanthomonas phaseoli* (1), *Xanthomonas manihotis* (1), *Xanthomonas vesicatoria* (2), *Xanthomonas malvacearum* (1), *Xanthomonas campestris* (1), *Xanthomonas* sp. (4), del cepario del INISAV. La cepa PSS se sembró en tres puntos equidistantes sobre los medios de cultivo King B (KB) y agar nutriente (AN) en placas Petri, y el crecimiento bacteriano se retiró a las 48 y 72 h, respectivamente. Después de una exposición de la superficie de las placas a vapores de cloroformo, se sembraron, en el lugar de la bacteria retirada, los aislamientos bacterianos objeto de estudio y se evaluó el crecimiento en comparación con las placas testigo de ambos medios de cultivo. De todas las especies y aislamientos probados resultaron sensibles las cepas B13 y Q34 de *D. chrysanthemi*, que no mostraron crecimiento alguno en el medio de cultivo KB de la variante tratada. La cepa Q34 mostró un

menor crecimiento en el medio AN de la variante tratada al comparar con el testigo. Para las otras especies no se registró diferencia alguna entre las variantes y los testigos con respecto al crecimiento bacteriano. Los resultados señalan que los metabolitos producidos por la cepa PSS no poseen un marcado efecto bactericida, al menos contra los aislamientos probados en este estudio. La reducción del porcentaje de incidencia en algunas enfermedades bacterianas, observada en campo, puede estar relacionada con la resistencia inducida y el mayor vigor de las plantas, efectos que son parte del control que ejercen contra los fitopatógenos las rizobacterias, entre ellas *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactericide effect *in vitro* of *Pseudomonas aeruginosa*, strain PSS against phytopathogen bacteria

Efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* PSS strain and biological product Gluticid was probed both in laboratory and field conditions against some fungi species in potato, tomato, tobacco, bean and onion among others. However it is not known the effect of strain on phytopathogen bacteria registered in those and other crops. In that way this study included 20 bacterial isolates from species *Dickeya chrysanthemi* (4), *Pectobacterium carotovorum* (6), *Xanthomonas phaseoli* (1), *Xanthomonas manihotis* (1), *Xanthomonas vesicatoria* (2), *Xanthomonas malvacearum* (1), *Xanthomonas campestris* (1), *Xanthomonas* sp. (4), belonging to microorganisms bank of Bacteriology Laboratory of INISAV. PSS strain was sowed in three points with the same separation on cultura media King B (KB) and nutrient agar (AN) in Petri dishes, and bacterial growth was retired at 48 and 72 h, respectively. Petri dishes were exposed to chloroform vapours and in the place where bacteria was situated studied isolated were sowed, then growth was evaluated comparing with control dishes of both culture medias. Strains B13 and Q34 of *D. chrysanthemi* resulted sensible among the whole species and isolates proved, these did not show any growth in KB culture media of treated variant. Strain Q34 showed smaller growth in AN media of treated variant in comparing with control. There was not any difference in bacterial growth among variants and control for the other species. According to results metabolites produced by PSS strain have not pronounced bactericide effect, at least against isolates proved in this study. The percent of incidence reduction in some bacterial diseases observed in field, may be

correlated with induced resistance and high plant vigor effects, which are part of the control exerted against rizobacteria phytopatogens, as *Pseudomonas aeruginosa*.

10. Aplicación de bacterias rizosféricas para inducir resistencia en diferentes sistemas planta-patógeno

Annia Hernández Rodríguez,¹ Mayra Heydrich,¹ Yoseph Bigiramana² y Mónica Hofte²

¹ Universidad de La Habana, Departamento de Microbiología. Calle 25 esq. J, Ciudad de La Habana, CP 10347

² Universidad de Gent, Departamento de Protección Vegetal. Coupure Links 653, Gent, Bélgica, CP B-9000

Se evaluaron diferentes rizobacterias en la elicitación de resistencia sistémica inducida (RSI) en los sistemas frijol (*Phaseolus vulgaris*)-*Colletotrichum lindemuthianum* y tomate (*Lycopersicon esculentum*)-*Botrytis cinerea*. Como inductores se utilizaron las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-562, KMPCH y 7NSK2, *Pseudomonas fluorescens* WCS 417 y J-143, *Burkholderia cepacia* 0057, y el producto químico Benzothiadiazole (BTH). Para la elaboración de los inóculos fúngicos se utilizaron las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* 06/038 y *Botrytis cinerea* R16. Los resultados demostraron que en el cultivo del frijol las cepas de *P. aeruginosa* 7NSK2 y KMPCH, *P. fluorescens* WCS 417 y J-143, *B. cepacia* 0057 y el BTH, inducen resistencia en plantas contra *C. lindemuthianum*. Se destacaron por el mejor comportamiento las cepas de *P. aeruginosa* KMPCH y *P. fluorescens* J-143. En el cultivo del tomate todas las rizobacterias estudiadas y el BTH inducen resistencia contra *B. cinerea*. Las cepas de *B. cepacia* 0057, *P. fluorescens* J-143 y *P. aeruginosa* KMPCH manifestaron las mejores respuestas, lo que demostró un grado de inducción de resistencia en dependencia de la especie vegetal donde se aplicaron. Al aplicar los productos utilizados como elicitors, las respuestas de resistencia en plantas en los sistemas estudiados se mantuvieron de forma permanente durante todo el ciclo de desarrollo del cultivo. Esto demuestra la importancia de realizar dos aplicaciones a las plantas con vistas a obtener respuestas sostenidas en el tiempo.

Application of rizosferic bacteria to induce resistance in different plant-pathogen systems

Different rizobacteria was evaluated to elicit of induced systemic resistance (ISR) in systems bean (*Phaseolus*

vulgaris)-*Colletotrichum lindemuthianum* and tomato (*Lycopersicon esculentum*)-*Botrytis cinerea*. Strains of *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-562, KMPCH and 7NSK2, *Pseudomonas fluorescens* WCS 417 and J-143, *Burkholderia cepacia* 0057, and chemical product Benzothiadiazole (BTH) were used as inductors. *Colletotrichum lindemuthianum* 06/038 and *Botrytis cinerea* R16 strains were utilized for the elaboration of fungi inoculums. Results showed that strains *P. aeruginosa* 7NSK2 and KMPCH, *P. fluorescens* WCS 417 and J-143, *B. cepacia* 0057 and BTH were able to induce resistance against *C. lindemuthianum* in bean plants. *P. aeruginosa* KMPCH and *P. fluorescens* J-143 strains pointed up because better behavior. All rizobacteria studied and BTH induced resistance against *B. cinerea* in tomato crop. Strains *B. cepacia* 0057, *P. fluorescens* J-143 and *P. aeruginosa* KMPCH showed best responses which demonstrated a grade of resistance induction depending of plant specie where were applied. Resistance responses in plants when products used to elicit were applied kept in permanent form during crop develop cycle, these show the importance of realizing two applications of them to plants in order to get sustained responses in time.

11. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de cepas de *Streptomyces griseoviride* contra bacterias fitopatógenas en algunos cultivos agrícolas de Costa Rica

Miguel Obregón Gómez

Proyecto Alternativas al Bromuro de Metilo. PNUD-MINAE, Costa Rica, m.obregon@costarricense.cr

Se realizaron aislamientos de *Streptomyces griseoviride* de suelos y abonos orgánicos de distintas regiones de Costa Rica. En el laboratorio se hizo la purificación y la respectiva identificación. Las cepas fueron evaluadas *in vitro* contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia* y *Xanthomonas* spp. Las que mostraron mejores resultados se reprodujeron mediante fermentación en sustrato sólido y evaluaron en macetas con piña y cucurbitáceas, previamente inoculadas con las bacterias fitopatógenas. Los resultados de la investigación se resumen en el aislamiento e identificación de 20 cepas de *Streptomyces griseoviride* aisladas principalmente de abonos orgánicos, selección de las tres mejores cepas codificadas como St1L.s, St2gza y St3TB. Las evaluaciones *in vivo* de estas tres cepas demostraron un control similar o superior al de los bactericidas sintéticos.

Se estableció además un protocolo de reproducción masiva eficiente que utiliza arroz integral como sustrato. De acuerdo con los resultados se concluye que *Streptomyces griseoviride* es una opción buena y de bajo costo para el control de bacterias fitopatógenas en los sistemas de producción agrícola orgánica y convencional.

In vitro and *in vivo* evaluation of *Streptomyces griseoviride* strains on pathogenic bacteria of some crops in Costa Rica

Several strains of *Streptomyces* spp. were isolated from soil and organic fertilizers obtained from different regions of Costa Rica. Laboratory purification and strains identification were done. The plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* and *Erwinia* were tested against all isolates to study their efficacy *in vitro*. Then the best *Streptomyces* strains were reproduced by fermentation on solid substrate in order to test them on pineapple and cucurbits cultivated in pots. Twenty isolates were identified as *S. griseoviride* strains, obtained mainly from organic fertilizers. Tests showed that only three of them efficiently inhibited the growth of *Erwinia* and *Xanthomonas*, these three strains were codified as St1L.s, St2gza and St3TB and showed a similar or higher effect than synthetic antibiotics, when pathogenic bacteria were tested on field plots. Also the establishment of *Streptomyces* in treated soils was probed. As part of this work, an efficient fermentation method for mass production of *Streptomyces*, using brown rice as solid substrate, was established. According to the results of this work, it is conclude that *S. griseoviride* is a good biological option to control plant pathogenic bacteria, in organic and conventional production systems, at low cost.

12. Tratamiento de semillas con hongos y bacterias antagonistas para el control biológico del tizón de la plántula de trigo producido por *Bipolaris sorokiniana*

G. Dal Bello,¹ C. Mónaco,¹ M. Cisterna,¹ A. Nico² y M. Carranza¹

¹ CIDEFI, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, 1900 La Plata; Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, fitopatologia@ceres.agro.unlp.edu.ar

² CMA El Chaparrillo. Carretera de Porzuna s/n, 13071, Ciudad Real, España

Se realizaron bioensayos en invernáculo para el control biológico del tizón de la plántula del trigo ocasionado por *Bipolaris sorokiniana* mediante el tratamiento de las semillas con hongos y bacterias antagonistas. Se probaron inicialmente, mediante cultivos dobles, 120 cepas de rizobacterias provenientes de suelos de cinco zonas trigueras de Argentina. Se evaluaron también siete cepas de *Trichoderma* spp. con demostrada capacidad de biocontrol frente a patógenos necrótrofos de trigo. Para la selección de las cepas por emplearse se efectuaron cultivos *in vitro* donde se analizó la capacidad antagonista frente al crecimiento micelial. Se estimaron la incidencia, la severidad y el peso seco en invernáculo luego de tres semanas de efectuada la siembra. De las bacterias empleadas 33 mostraron en placas de Petri con APG una moderada a elevada capacidad de inhibición micelial. Por otra parte, cultivos duales en frascos con caldo nutritivo demostraron que cuatro cepas de *Bacillus cereus* y un aislamiento de *Stenotrophomonas maltophilia* inhibieron en más de 77% la biomasa del hongo. Por su parte las *Trichoderma* arrojaron una inhibición del crecimiento micelial entre 51 y 71%. Como referencia se emplearon también semillas tratadas con el fungicida guazatine, que redujo en mayor medida ($P = 0,05$) el tizón de la plántula con respecto a los granos tratados con antagonistas y testigos. Las semillas tratadas con *Trichoderma* Tk1 y Th2, así como el guazatine incrementaron significativamente ($P = 0,05$) el peso seco de las plantas con referencia a los restantes tratamientos.

Fungal and bacterial antagonists seed treatment for biological control of *Bipolaris sorokiniana* wheat seedling blight produced by *Bipolaris sorokiniana*

Biossays to test the efficacy of selected bacterial and fungal antagonists applied to wheat seeds for protection against *Bipolaris sorokiniana* seedling blight were conducted under greenhouse conditions. Initially 120 wheat rhizobacteria from soils collected at five wheat fields in Argentina were screened by two different paired culture methods. Seven isolates of *Trichoderma* spp. that previously showed biocontrol activity against necrotrophic pathogens of wheat were also evaluated. *In vitro* tests, based on the ability of the antagonists to inhibit mycelial growth of the pathogen, were used to select the most effective isolates for further testing in a plant bioassay conducted on wheat seedlings. Severity, incidence and dry weight were estimated in the greenhouse three weeks after sowing. Out of 120

bacteria 33 showed moderate to strong inhibition to the mycelial growth of *B. sorokiniana* on potato dextrose agar in Petri dishes. Thereafter, dual cultures in flasks containing nutrient broth showed that four strains of *Bacillus cereus* and one isolate of *Stenotrophomonas maltophilia* exhibited the greatest inhibition (superior to 77%) to the fungal biomass. All *Trichoderma* spp. inhibited the mycelial growth of the pathogen between 51 and 71%. Coating seeds with the fungicide guazatine reduced severity of seedling blight ($P = 0.05$) compared with the plants from untreated seeds or treated with the antagonists. Seed treatments with *Trichoderma* isolates Tk1 and Th2, as well as with guazatine, significantly ($P = 0.05$) increased plant dry weight compared with untreated pathogen-infested seeds.

13. Levaduras antagonistas como agentes de control biológico de la podredumbre gris del tomate en poscosecha

C. Mónaco, G. Dal Bello, M. C. Rollan, G. Lampugnani, N. Arteta, C. Abramoff, L. Ronco y M. Stocco

Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 119, 1900 La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), fitopato@ceres.agro.unlp.edu.ar

El hongo patógeno *Botrytis cinerea* ocasiona podredumbres del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) durante el almacenamiento y comercialización de los frutos. Debido a que las frutas y hortalizas pueden ser una fuente directa para la ingestión de fungicidas, el control biológico de enfermedades de esos productos en poscosecha requiere ser investigada. Con el objeto de obtener levaduras antagonistas para controlar el moho gris del tomate en poscosecha, se realizaron aislamientos a partir de plantas solanáceas provenientes de ecosistemas hortícolas de La Plata en el nordeste de Buenos Aires, Argentina. De los 300 aislamientos enfrentados con *B. cinerea* mediante la técnica de cultivos dobles en placas de Petri con APG, 20 levaduras demostraron una mayor inhibición del crecimiento micelial del patógeno. El ensayo final se llevó a cabo sobre frutos de tomate desinfectados, variedad Larga Vida. Las heridas punzantes efectuadas en la epidermis se inocularon según un método simplificado de pequeños discos de papel de filtro estéril, embebidos en las suspensiones celulares de los antagonistas o las conidiales del patógeno. Se aplicaron superpuestos sobre cada lesión. Luego de incubar los tomates siete días

a 25°C, se seleccionaron 14 levaduras por su actividad antagonista hacia *B. cinerea*. *Rhodotorula* sp. y *Cryptococcus* sp. produjeron la mayor reducción de la enfermedad (60%) con respecto al control. Las levaduras son especialmente adecuadas para utilizarlas en poscosecha, y prueban que reducen eficazmente la incidencia de hongos patógenos en frutos de tomate. Estos agentes de biocontrol pueden además ser una alternativa no contaminante al control químico.

Antagonistic yeasts as postharvest biocontrol agents of gray mold rot of tomato

The fungal pathogen *Botrytis cinerea* causes severe rots on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit during storage and shelf life. Biological control of biotic postharvest diseases of stored food products is a logical area of research, because commodities such as fruits and vegetables can be a source of direct ingestion of fungicides. Aiming at the development of new antagonistic yeasts active in controlling postharvest grey mold rot of tomato, several isolates were recovered from Solanaceae plants grown in horticultural ecosystems at La Plata area in northeast Buenos Aires, Argentina. Of 300 isolates screened for inhibition of *B. cinerea* using the dual culture technique on agar (PDA) plates, 20 yeasts showed the stronger inhibition of the pathogen mycelial growth. The final assay was carried out *in vivo* on variety Larga Vida tomato fruit. Puncture wounds in surface-disinfested fruits were treated by means of a simplified method of inoculation: small sterile discs of filter paper imbibed in the cell suspension of the antagonists or the pathogen spore suspension, were superposed onto each wound. Fourteen yeast strains were selected for their remarkable antagonistic activity against *B. cinerea* on tomato after one-week storage at 25°C. *Rhodotorula* sp. and *Cryptococcus* sp. allowed the highest reduction of decay with 60% of the inoculated control. Yeasts are particularly suitable for post-harvest use, proving to be highly effective in reducing the incidence of fungal pathogens of tomato fruit. In addition, yeasts as biocontrol agents may be an environmentally friendly alternative to chemical control.

14. Selección de cepas antagonicas del género *Trichoderma* Persoon

María O. López Mesa e Ileana Sandoval Ramírez

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa. Ciudad de La Habana, molopez@inisav.cu

Se comprobó el antagonismo en cultivo dual de 105 cepas de *Trichoderma* de las secciones *Longibrachiatum*, *Pachybasium* y *Trichoderma* con respecto a los hongos patógenos *Phytophthora capsici*, *P. nicotianae*, *Macrophomina phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. o. f. sp. dianthi*. Los mejores efectos antagonicos *in vitro* se obtuvieron con ocho cepas de la Sección *Pachybasium*, determinadas todas como *T. harzianum*, una de la sección *Longibrachiatum* (*T. longibrachiatum*) y una de la sección *Trichoderma* (*T. atroviride*). Se comprobó el efecto antagonista *in vivo* en bandejas con plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* Lin.), por la inoculación del suelo con *P. capsici* y con plántulas de clavel (*Dianthus* sp.) con *P. nicotianae* y *F. o. f. sp. dianthi*. Se seleccionaron dos cepas de *T. harzianum* que mostraron una reducción de hasta 96% en la manifestación de esas patologías.

Selection of antagonic isolates of genus *Trichoderma* Persoon

The antagonistic effect in dual culture of 105 strains of *Trichoderma* from Sections: *Longibrachiatum*, *Pachybasium* and *Trichoderma* were proved respect to pathogenic fungi *Phytophthora capsici*, *P. nicotianae*, *Macrophomina phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. o. f. sp. dianthi*. The best results were obtained *in vitro* with eight strains of *Pachybasium* Section; all of these were determinate as *T. harzianum*; one strain from *Longibrachiatum* Section (*T. longibrachiatum*) and another from *Trichoderma* Section (*T. atroviride*). The antagonistic effect *in vivo* was proven in trays with pepper seedling (*Capsicum annuum*) by the inoculation of the soil with *P. capsici* and with carnation seedling (*Dianthus* sp.) with *P. nicotianae* and *F. o. f. sp. dianthi*. Two strains of *T. harzianum* that showed a reduction up to 96% in the manifestation of these pathologies were selected.

15. Evaluación *in vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

Alexis A. Hernández Mansilla,¹ Aliuska Sierra Peña² y Aidanet Carr Pérez³

¹ Centro Meteorológico Provincial. Calle Marcial Gómez 401, esq. Estrada, Ciego de Ávila, Cuba

² Ciego de Ávila, ahmansilla@meteo.fica.inf.cu; ahmansilla@yahoo.es

³ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

Se evaluó la actividad antagonista de las especies *T. viride*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. harzianum* (cepas A-34 y A-53) del género *Trichoderma* sobre *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium subglutinans*, fitopatógenos de vitropalantas de piña en la fase de aclimatización. El experimento se efectuó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), para lo cual se emplearon aislamientos de los antagonistas y fitopatógenos procedentes del Laboratorio de Fitopatología de la UNICA, a excepción de *T. harzianum*, que procedía de la micoteca del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Se realizó un crecimiento dual y se determinó el porcentaje de inhibición mediante la medición del diámetro de las colonias. Sus valores se procesaron mediante análisis de varianza. Los porcentajes de inhibición resultantes fueron de 50% en *P. nicotianae*, por efecto de *T. viride* con diferencias significativas de las demás especies antagonistas, excepto al compararlas con *T. atroviride* y *T. aureoviride*, que causaron una inhibición de 41% sin diferencias entre ellas. *R. solani*, con 53 y 58% ante *T. harzianum* (A-34) y (A-53) respectivamente, se señalan como las más eficientes sobre este fitopatógeno, y *F. subglutinans* con un porcentaje de inhibición de 48% ante *T. atroviride* y *T. harzianum* (A-53), sin diferencias significativas entre ellas y sí ante las restantes.

Antagonism evaluation *in vitro* of *Trichoderma* species on pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) vitroplants phytopathogenic fungi

The antagonistic activity of species *T. viride*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. harzianum* (strains A-34 and A-53) from genus *Trichoderma*, was evaluated on *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium subglutinans*, which are phytopathogens of pineapple vitroplants in the acclimatization phase. The experiment was developed at Genetics Improvement Laboratory of Bioplasmas Center in Ciego de Ávila University (UNICA). In this way phytopathogenic and antagonistic isolations from phytopathology laboratory of UNICA were used, except *T. harzianum* which was brought from the micothec of Plant Health Research Institute. A dual growth was performed and the inhibition percentage was determined by measuring colonies diameter, the values were processed by variance analysis. The inhibition percentages were 50% in *P. nicotianae*, by effect of *T. viride* with significant differences

of the rest antagonistic species, except when comparing with *T. atroviride* and *T. aureoviride*, which caused an inhibition of 41% without differences between them. *R. solani* with 53 and 58% on *T. harzianum* (A-34) and (A-53) respectively, which were the most efficient on this phytopathogenic and *F. subglutinans* with and inhibition percentage of 48% on *T. atroviride* and *T. harzianum* (A-53) with no significant differences between them but with the rest of the species study analyzed.

16. Efecto bactericida *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*, cepa PSS contra bacterias fitopatógenas

Marusia Stefanova, Yuliet Franco, María F. Coronado y Pilar Villa

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

La eficacia de la cepa PSS de *Pseudomonas aeruginosa* y del producto biológico Gluticid contra diversas especies fúngicas en papa, tomate, tabaco, frijol y cebolla, entre otros, está comprobada en laboratorio y campo; sin embargo, se desconoce el efecto que puede tener la cepa contra las bacterias fitopatógenas registradas en estos y otros cultivos. Con tales propósitos se realizó el presente estudio que incluyó 20 aislamientos bacterianos de las especies *Dickeya chrysanthemi* (4), *Pectobacterium carotovorum* (6), *Xanthomonas phaseoli* (1), *Xanthomonas manihotis* (1), *Xanthomonas vesicatoria* (2), *Xanthomonas malvacearum* (1), *Xanthomonas campestris* (1), *Xanthomonas* sp. (4), del cepario del laboratorio. La cepa PSS se sembró en tres puntos equidistantes sobre los medios de cultivo King B (KB) y agar nutriente (AN), en placas Petri, y retirado el crecimiento bacteriano a las 48 y 72 h, respectivamente. Después de una exposición de las superficies de las placas a vapores de cloroformo, los aislamientos bacterianos objeto de estudio se sembraron en el lugar de la bacteria retirada, y se evaluó el crecimiento en comparación con las placas testigo de ambos medios de cultivo. De todas las especies y aislamientos probados, resultaron sensibles las cepas B13 y Q34 de *D. chrysanthemi*, que no mostraron crecimiento alguno en el medio de cultivo KB de la variante tratada. La cepa Q34 mostró un menor crecimiento en el medio AN de la variante tratada al comparar con el testigo. Para las otras especies no se registró diferencia alguna entre las variantes y los testigos con respecto al crecimiento bacteriano. Estos resultados señalan que los metabolitos producidos por la cepa PSS no poseen un marcado efecto bactericida,

al menos contra los aislamientos en este estudio. La reducción del porcentaje de incidencia en algunas enfermedades bacterianas, observadas en campo, puede estar relacionada con la resistencia inducida y el mayor vigor de las plantas, efectos que son parte del control que ejercen las rizobacterias contra los fitopatógenos, entre ellas *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactericidal effect *in vitro* of *Pseudomonas aeruginosa*, PSS strain against phytopathogen bacterias

The efficacy of PSS strain of *Pseudomonas aeruginosa* and biological product Glutucid have been proved in laboratory and field conditions against different fungi species on potato, tomato, tobacco, bean and onion, among others; however, it is not known the effect of this strain against phytopathogen bacteria registered in these and others cultivations. In this study were included 20 isolates of the species *Dickeya chrysanthemi* (4), *Pectobacterium. carotovorum* (6), *Xanthomonas phaseoli* (1), *Xanthomonas manihotis* (1), *Xanthomonas vesicatoria* (2), *Xanthomonas malvacearum* (1), *Xanthomonas campestris* (1), *Xanthomonas* sp. (4). PSS strain was plated in Petri dish in three equidistant points on nutrient agar (NA) and King B (KB) media, and the growth was retired at 48 and 72 h later, respectively. Petri dishes surfaces were exposed to chloroform vapours and then were plated with the studied isolates in the place of the retired bacterium, and the growth were evaluated in comparing with controls of both culture media. From the whole species and isolates tested, B13 and Q34 strains of *Dickeya chrysanthemi* were sensitive, and they did not show any growth in KB medium of the treated variant. Strain Q34 showed less growth in AN medium of treated variant, compared with the control. The others strains did not show difference in bacterial growth between the treated variants and the control. These results indicate that metabolites produced by PSS strain have not a marked bactericide effect, at least against the isolates in this study. Incidence percentage reduction in some bacterial diseases observed in field conditions may be related with the induced resistance and higher plants vigour, these effects are part of the control that rhizobacteria exerts against phytopathogens, and *Pseudomonas aeruginosa* among them.

17. Aislamiento y selección de microorganismos antagonistas de *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. en la zona sur del estado de Anzoátegui

Jenny Chirinos

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado de Anzoátegui (CIAE-Anzoátegui) Km 5, Carretera El Tigre-Soledad, El Tigre, estado de Anzoátegui, teléfs.: 0283-2355482, 2351883,2350725, jchirinos@inia.gov.ve

La búsqueda de nuevas sustancias con propiedades inhibitorias sobre bacterias y hongos fitopatógenos se ha transformado en la actualidad en un campo muy activo de investigación. La presencia de enfermedades emergentes en cultivos de importancia económica para la exportación implica utilizar fungicidas con bajo impacto ambiental que permita obtener productos más saludables para el consumo. En este sentido microorganismos antagonistas de variados tipos pueden originar nuevas sustancias específicas. Este trabajo tuvo como objetivo el aislamiento y selección de cepas bacterianas antagonistas de los hongos *Fusarium* spp. y *Pestalotia* spp., causantes de marchitez vascular y antracnosis en tomate y pimentón, respectivamente. Las bacterias se obtuvieron de muestras de tallos y hojas de tomate. Las distintas partes vegetales se seccionaron y suspendieron en agua estéril. Asimismo se realizaron diluciones por siembra de sus alícuotas; otras partes de las plantas se usaron para realizar siembras directas. Una vez purificadas las bacterias, se enfrentaron con los hongos patógenos en placas que contenían PDA (papa-dextrosa-agar), donde se inocularon en forma de una línea central con ayuda del asa microbiológica. Las placas se incubaron durante 48 h a 28°C, y posteriormente se les inocularon discos de los hongos de 8 mm de diámetro. Todos los cultivos puros se enfrentaron con cinco cepas de *Fusarium* spp. y cuatro de *Colletotrichum* spp. Finalizadas las numerosas pruebas de antagonismos *in vitro*, se seleccionaron 10 cepas bacterianas que evidenciaron la capacidad de detener el crecimiento de los hongos evaluados. Las cepas bacterianas que tuvieron el mayor nivel de antagonismos fueron A12, A10, A5, A1, A3, A13, A6, A9, A8 y A7.

Isolation and selection of antagonist microorganisms to *Fusarium* spp. and *Colletotrichum* spp. in the south of Anzoátegui State

The searches of new substances with inhibitory properties to phitopathogens bacterias and fungI have

been actually an active field to research. The presence of emergent diseases in economics crops important to exportation, imply the use of fungicides with low environment impact in order to obtain healthiest products to consume, in this way different types of antagonist microorganisms can origin new specific substances. This work had as objective the isolation and selection of antagonist bacteria strains of fungi *Fusarium* spp. and *Pestalotia* spp. which causes vascular yellowish and antracnosis in tomato and pepper plants, respectively. Bacteria were obtained from stems and foliage of tomato plants. Different plant parts were cut and suspended in sterile water. In the same way, dilutions were realized planting their aliquots. Other parts of the plants were used to direct planting. When bacteria were purified, they were evaluated against pathogen fungi in plates containing PDA (potato-dextrose-agar), where they were inoculated as a central line with the aid of microbiological ring. Plates were incubated during 48 h at 28°C and fungi were inoculated in 8 mm diameter discs. All the pure crops were evaluated with five strains of *Fusarium* spp. and four of *Colletotrichum* spp. Finalized antagonism tests *in vitro* 10 bacterial strains were selected which evidenced their capacity to stop the evaluated fungus growth. Bacterial strains with highest antagonism levels were A12, A10, A5, A1, A3, A13, A6, A9, A8 and A7.

18. Sensibilidad de hongos fitopatógenos de arroz (*Oriza sativa* L.) ante metabolitos de cepas de *Pseudomonas* spp.

Alexis A. Hernández,¹ Marusia Stefanova² y Loreta Larrinaga²

¹ Centro Meteorológico Provincial. Calle Marcial Gómez 401 esq. Estrada, Ciego de Ávila, alexis.hernández@cav.ismet.cu

² Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, mstefanova@inisav.cu

La sensibilidad de hongos fitopatógenos importantes en el cultivo del arroz ante metabolitos producidos por las cepas CHAO (*Pseudomonas fluorescens*), PSS (*Pseudomonas aeruginosa*) y PS-11 (*Pseudomonas* sp.) se evaluó en placas Petri con los medios de cultivo Agar Nutriente (AN) y King B (KB). En un primer ensayo se sembraron discos a partir de colonias de aislados de *Pyricularia grisea*, *Sarocladium oryzae* y *Rhizoctonia solani*, y se realizaron observaciones a los tres, cinco, siete y nueve días. Se calculó el porcentaje de inhibi-

ción en comparación con placas testigo de ambos medios de cultivo sin metabolitos. En un segundo ensayo se realizaron pruebas con semillas de arroz procedentes del CAI Los Palacios, las que se colocaron en la superficie de las placas (AN y KB) con y sin metabolitos. En las variantes y los testigos se contabilizaron las semillas enfermas por patógenos fungosos y se determinó el porcentaje de afectación. Los resultados señalan que los aislamientos de *P. grisea* y *R. solani* fueron los más sensibles ante los metabolitos de las cepas CHAO y PS-11, con marcadas diferencias respecto al comportamiento de *S. oryzae*. El grado de inhibición de estos hongos aumentó con la concentración de los metabolitos. Las pruebas con semillas mostraron que tanto el porcentaje de afectación como el número de especies de hongos fitopatógenos disminuyen notablemente ante los metabolitos de PS-11. Se destacó el hongo *F. moniliforme* por la baja sensibilidad ante los metabolitos segregados por las tres cepas bacterianas estudiadas.

Sensibility of rice (*Oriza sativa* L.) phytopathogen fungi on *Pseudomonas* spp. strains metabolites

Sensibility of phytopathogen fungi important for rice crop against metabolites produced by strains CHAO (*Pseudomonas fluorescens*), PSS (*Pseudomonas aeruginosa*) and PS-11 (*Pseudomonas* sp.), was evaluated in Petri dishes with culture media Nutrient Agar (NA) and King B (KB). Discs of colonies from *Pyricularia grisea*, *Sarocladium oryzae* and *Rhizoctonia solani* isolates were sowed in a first assay, and they were observed at 3, 5, 7 and 9 days, Inhibition percent was calculated comparing to control Petri dishes of both culture media without metabolites. Rice seeds from CAI Los Palacios were tested in a second assay, these were situated on the surface of dishes (NA and KB) with and without metabolites; affected seeds by fungi pathogens were counted in both variants and control and damage percent was determinate. As results, *P. grisea* and *R. solani* had the highest sensibility against metabolites of CHAO and PS-11 strains, with marked differences respect behavior of *S. oryzae*. Inhibition grade of these fungi increased with metabolites concentration. Seeds assays showed that both damage percent and specie number of phytopathogen fungi decrease with PS-11 metabolites. *F. moniliforme* emphasizes for its low sensibility against metabolites segregate by three bacterial strains studied.

19. Cepas de *Trichoderma* spp. para control biológico de *Sclerotium rolfsii* en soya (*Glycine max* L.)

Sueli C. M. de Mello, Zilá R. Ávila y Diogo M. P. A. Gomes

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP.02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, smello@cenargen.embrapa.br

En Brasil se ha registrado la ocurrencia de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diversos cultivos, incluida la soya (*Glycine max* L.), en varias regiones del país. Informaciones de literatura indican que el uso de control biológico ofrece perspectivas para disminuir las poblaciones del patógeno. Este trabajo tuvo como objetivo enriquecer la Colección de Hongos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología con nuevos aislamientos de *Trichoderma* identificados al nivel específico, y seleccionar aquellos con potencial para el control de *S. rolfsii*. La prospección de cepas nativas de *Trichoderma* se desarrolló en áreas agrícolas de la región del Distrito Federal, Brasil. Se identificaron 21 cepas pertenecientes a las especies *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. crassum* y *T. viride*. La cepa 219 perteneciente a la especie *T. harzianum* se aisló de una muestra del producto comercial Trichodermil. Se utilizó un aislado representativo del patógeno (CEN216) cedido por el sector de fitopatología de Embrapa Cerrado. La inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii* se estudió *in vitro* en cultivo dual y mediante incorporación de filtrado de colonias de *Trichoderma* al medio agar-papa-dextrosa (PDA), donde se sembró el patógeno. El potencial de control biológico de las cepas también se estudió *in vivo*. En general, las cepas más eficientes en las pruebas de inhibición fueron también las que presentaron mejor actividad supresora sobre *S. rolfsii* en plantas de soya. Los resultados indican que diferentes mecanismos de acción pueden estar involucrados en las interacciones antagónicas, en dependencia de la cepa considerada.

Trichoderma spp. isolates for biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in soybean (*Glycine max* L.)

The fungus *Sclerotium rolfsii* Sacc. is a widespread soil-borne pathogen in Brazil, attacking a large number of plants including soybean (*Glycine max* L.). Literature information has indicated the use of *Trichoderma* species as a viable alternative for reducing pathogen populations. This work was carried out with the objective of enriching the Culture Collection of Fungi for Biocontrol of Plant Pathogens from Embrapa Genetic Resources and Biotechnology with new *Trichoderma* spp.

isolates identified at species level and to select isolates for reducing the harmful effect of the pathogen. Twenty one isolates, belonging to *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. crassum* and *T. viride* species were obtained from various soil samples in cultured areas around Brasília (DF). One isolate (CEN219) belong to *T. harzianum* species was obtained from the commercial formulation called Trichodermil. Inhibition of the mycelial growth of the pathogen isolate was studied *in vitro* by dual culture method and by the incorporation of culture filtrate of *Trichoderma* at potato-dextrose-agar media previous to sow the pathogen. The antagonist action of these isolates was also evaluated *in vivo*. In general, isolates that performed high mycoparasitic activity in vitro assays also demonstrated good reduction of the disease in greenhouse. These results suggest antagonistic capability regarding the production of toxic metabolites as well as for parasitism and competition mechanisms.

20. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)

Teresa Reyes Rondón, Giselle Rodríguez Gutiérrez, Ana D. Pupo Zayas, Luciano Alarcón Pérez y Yenny Limonta Cutiño

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Calle Genaro Rojas 86 e/ Marcelino Diéguez y Antonio Barrera, Las Tunas, CP 75200, lapsavlt@enet.cu

A partir de plantas de arroz de la variedad J-104 con síntomas de *Pyricularia grisea* y *Rhizoctonia solani* se realizaron siembras *in vitro* en agua-agar y agar-peptona-dextrosa, por los métodos tradicionales, de partes de tallos, hojas y raíces dañadas. Se realizaron las identificaciones y descripciones de los hongos aislados según las claves CMI (1983) con el objetivo de comprobar la efectividad antagónica e hiperparasítica de *Trichoderma harzianum* contra ambos patógenos. Para los ensayos de biocontrol se realizaron pruebas *in vitro* en cultivo dual de agar-peptona-dextrosa entre los patógenos y dos aislamientos de *T. harzianum* procedentes del cepario de mantenimiento del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Las Tunas (cepas A-53 y A-34), generalizadas en la producción para el biocontrol de diferentes patógenos del suelo. Diariamente se midió el diámetro de las colonias, así como el nivel de competencia por el sustrato y el hiperparasitismo del patógeno.

no, según el nivel de crecimiento y esporulación sobre las colonias. Se demostró la elevada actividad hiperparasítica y competitiva de las cepas A-34 y A-53 de *T. harzianum*, que exhibieron buenas potencialidades para el control de estos patógenos. Estadísticamente se encontraron diferencias altamente significativas a las 96 h, con un crecimiento promedio lineal en 7,37 cm en la cepa A-53 y 7,10 cm en la cepa A-34. En el caso de los patógenos el crecimiento promedio fue de 3,63 cm en *P. grisea* y 2,62 cm en *R. solani*.

***In vitro* effectiveness of *Trichoderma harzianum* on biocontrol of *Rhizoctonia solani* Kühn and *Pyricularia grisea* (Sacc.) isolated from rice crop (*Oryza sativa* L.)**

Stems, leaves and roots pieces of rice plants of variety J-104 with *Pyricularia grisea* (Sacc.) and *Rhizoctonia solani* Kühn symptoms were plated *in vitro* in agar-water and agar-peptone-dextrose by traditional methods. Observed symptoms were identified and described by CMI keys (1983) for verifying antagonist and hyperparasitic effectivity of *Trichoderma harzianum* against both pathogens. Bioassays of dual cultures agar-peptone-dextrose were realized for biocontrol tests between pathogens and two *T. harzianum* strains (A-34 and A-53) from the strain storage of biological control in Pant Health Provincial Laboratory of Las Tunas, generalized in mass production against different soil pathogens. Diameter of colonies was measured daily and so was the competence level by the substrate and the hyperparasitism of the pathogen, according to the growing level and sporulation over colonies. Results demonstrated high hyperparasitic and competitive activity of strains A-34 and A-53 of *T. harzianum*, which exhibit good potentialities for the control of these pathogens. Highly significant differences to 96 hours were found in statistic tests with a lineal rate growing of 7.37 cm in A-34 strain and 7.10 cm in A-53 strain. Rate growing was 3.63 cm *P. grisea* and 2.62 cm *R. solani* in the case of pathogens.

21. Estudio del efecto protector de *Bacillus* spp. sobre el desarrollo de la pudrición blanda de la papa (*Solanum tuberosum* L.)

Yaritzá Reinoso,¹ Luis Casadesús,¹ Armando García,² Jorge Gutiérrez,¹ Ernesto García¹ y Victoria Pazos¹

¹ Facultad de Biología, Departamento de Microbiología y Virología. Calle 25 no. 455 e/ I y J, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10400, yreinoso@fbio.uh.cu

² Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ Lombillo y San Pedro, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10400

La pudrición blanda bacteriana, causada por *Pectobacterium carotovorum*, se presenta en una amplia variedad de cultivos, y es una de las más severas enfermedades poscosecha de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en el mundo. Una de las alternativas ecológicas adoptadas en este sentido es el uso de microorganismos como agentes de control biológico, entre los que se encuentran los miembros del género *Bacillus*. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto protector de 23 cepas de *Bacillus* sp. sobre el desarrollo de la pudrición blanda de la papa. Para ello se trataron rodajas de papa con cultivos bacterianos de 24 h y posteriormente se inocularon con una cepa de *P. carotovorum*, a dos concentraciones diferentes. Las rodajas se mantuvieron durante 24 h en condiciones de temperatura y humedad favorables para el desarrollo de la pudrición. Transcurrido este tiempo se evaluó la efectividad de los tratamientos respecto a los controles no tratados, para lo cual se tuvo en cuenta la aparición o no de los síntomas característicos de la enfermedad. Las cepas G15, G19 y G25 solamente tuvieron efecto protector en las rodajas tratadas con la menor concentración de *P. carotovorum*, mientras que B1, G10, Q7 y Q18 inhibieron el desarrollo de la pudrición en las dos variantes analizadas. El resto de las cepas estudiadas no mostraron protección, y en algunos casos se observó un incremento en la severidad de las lesiones.

A study of *Bacillus* spp. protector effect on potato bacterial soft rot (*Solanum tuberosum* L.) development

Bacterial soft rot, caused by *Pectobacterium carotovorum*, happens in a wide variety of cultivations and it is one of the most severe postharvest diseases of potato (*Solanum tuberosum* L.) in the world. One of the ecological alternatives adopted in this sense is the use of microorganisms as biological control agents, among those are the members of genus *Bacillus*. The objective of present work was to determine the protective effect of 23 *Bacillus* sp. strains on the development of potato soft rot. Potato slices were treated with bacterial cultures of 24 h growing and then were inoculated with two different concentrations of a *P. carotovorum* strain. The slices stayed during 24 h in favourable conditions of temperature and humidity for the development of

soft rot. After this time treatments effectiveness was evaluated in comparing with non treated controls, observing the appearance or not of disease characteristic symptoms. G15, G19 and G25 strains only had protective effect in the slices treated with the smallest concentration of *P. carotovorum*; while B1, G10, Q7 and Q18 inhibited the development of soft rot in the two analyzed variants. The rest of studied strains did not show protection, although in some cases was observed an increment of lesions severity.

22. Aislados de *Bacillus* spp. promisorios para el control de hongos fitopatógenos

Acenet I. Sosa López,¹ Bertha Carrera Solís,¹ Orietta Fernández-Larrea Vega¹ y Dania Torres Campos²

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, asosa@inisav.cu

² Facultad de Biología de la Universidad de Habana. Calle 25 no. 455 esq. J, Vedado, Plaza de La Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10500

Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida capaces de producir efectos de control sobre varias especies de agentes fitopatógenos. A partir de la extracción de muestras de suelos, rizosferas y otros hábitats, se obtuvo un total de 626 aislados pertenecientes al género *Bacillus* por ser gram positivos, presentar células bacilares en forma de bastón, producir endoesporas y ser catalasa positivos. De ellos 303 se identificaron como *Bacillus thuringiensis* por presentar cristales parasporales, y 323 pertenecen a otras especies de *Bacillus*. Se realizó un primer ensayo para determinar la presencia de estos microorganismos en los hábitats antes mencionados, y se observó el predominio de *B. thuringiensis* sobre el resto de los *Bacillus* aislados o viceversa, en dependencia de la localidad donde se realizó el aislamiento. Un segundo ensayo fue para evaluar *in vitro* el efecto antagonista de *Bacillus* spp. contra *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*, principales hongos fitopatógenos que afectan el cultivo del tabaco en Cuba en la época de establecimiento de los semilleros. Se obtuvo que del total de aislados identificados como otros *Bacillus*, 30 mostraron efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de tales patógenos, y de ellos seis se seleccionaron como los aislados más promisorios.

Isolates of *Bacillus* spp. most promissory for phytopathogen fungi control

It has been demonstrated that bacteria of genus *Bacillus* have a great potential as antagonists, in great part due to the production of lytic enzymes, antibiotics and other substances with biocide activity which are capable of controlling several phytopathogenic species. A total of 626 isolates from genus *Bacillus* were obtained by the extraction of soil, rhizospheres and other field habitats samples, which resulted Gram-positive, rod-shaped spore formation, endospore forming bacteria and catalase-positive. From them, 303 were identified as *Bacillus thuringiensis* because they presented parasporal crystals, and 323 belonged to others *Bacillus* species. A first assay to determine the presence of these microorganisms in the habitats studied was realized; *B. thuringiensis* was predominant over the others isolate *Bacillus* or vice versa, depending on the isolate location. A second assay has been realized to evaluate *in vitro* antagonistic effect of *Bacillus* spp. against *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium aphanidermatum*, main fungiof tobacco crop in Cuba when seedlings are establishing. From the whole isolates identified as others *Bacillus*, 30 showed inhibitory effect on mycelial growth of those pathogens, and six of them were chosen as more promissory.

23. Caracterización de *Trichoderma* con marcadores moleculares ISSR y RAPD

Stenglein, S. A.,¹ V. Martínez,¹ M. Saparrat,¹ C. Bonfiglio² y P. A. Balatti³

¹ Instituto de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, CONICET.

² Síntesis Química SAIC

³ CICBA

Trichoderma es un género de hongos de la clase Deuteromicetes que controla patógenos del suelo debido a su velocidad de crecimiento y desarrollo, y a que producen inhibidores del crecimiento. Se han identificado 33 especies, caracterizadas por el color verde del micelio. El objetivo de este trabajo fue caracterizar con marcadores moleculares del tipo Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) y Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) diversas especies de *Trichoderma* que se evalúan respecto a su capacidad para controlar los patógenos causantes del *damping-off*. Se analizaron los patrones de amplificación de tres cepas de *T. harzianum*, dos de *T. koningii*, una de *T. aurioviride*, una de *T. virens* y una de *Gliocladium roseum*. La amplificación de los

fragmentos se realizó con 15 primers ISSR en un termociclador, y se visualizó el ADN luego de la electroforesis con bromuro de etidio y UV. El análisis de agrupamiento se realizó con los marcadores generados por 10 primers. Todos los marcadores generaron un patrón de amplificación claro y reproducible para cada aislamiento, y amplificaron un total de 171 bandas, de las cuales 163 fueron polimórficas. El fenograma obtenido a partir de la matriz de similitud de Jaccard permitió agrupar a las cepas bajo estudio. Los marcadores ISSR permitieron identificar y diferenciar los aislamientos y generar fingerprints específicos. Las amplificaciones con primers RAPD tienen como objetivo identificar marcadores específicos.

***Trichoderma* characterization with ISSR and RAPD molecular markers**

Trichoderma is a fungi genus of Deuromycete class that inhibits soil plant pathogens due to its growth rate and development and also to the synthesis of metabolic inhibitors. Thirty-three species have been described belonging to *Trichoderma* and they are all characterized by the green color of the mycelia. The purpose of this work is to characterize by means of molecular markers such as Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), different species of *Trichoderma*, whose capacity as biocontrol organisms is under evaluation. The amplification patterns of the genome of three strains of *T. harzianum*, two of *T. koningii* and a strain of *T. aurioviride*, *T. virens* and *Gliocladium rosseum* were performed. Cluster analysis was made based on the amplification pattern of ten primers. The total number of DNA fragments analyzed was 171 and among them 163 were polymorphic. Based on this a phenogram was made and ISSR markers allowed us to identify and differentiate isolates of the fungus. Some of the fingerprints or the combination of amplification reactions generated specific fingerprints. RAPD amplifications are under way in order to identify specific fragments.

24. La biología molecular de las interacciones entre *Trichoderma*, hongos fitopatógenos y plantas: oportunidades para desarrollar nuevos métodos de control de enfermedades

Matteo Lorito

Department of Ar. Bo.Pa.Ve., Plant Pathology Section, University of Naples and CNR IPP-Institute for Plants Protection. Via Università 100, 80055 Portici (Napoli), Italia

El biocontrol de hongos del género *Trichoderma* ha desarrollado una habilidad asombrosa para interactuar tanto de forma parasítica como simbióticamente, con diferentes sustratos y organismos vivos, incluidas las plantas y otros microbios. Estos hongos pueden utilizar una variada fuente de nutrientes. Están entre los microbios más resistentes a las toxinas y productos químicos naturales o producidos por el hombre, y pueden degradar efectivamente algunas de ellas, incluidos hidrocarburos, compuestos clorofenólicos, polisacáridos y plaguicidas xenobióticos. Muchas cepas de *Trichoderma* son fuertes invasores oportunistas, de rápido crecimiento y productoras de antibióticos poderosos. Estas propiedades hacen a estos hongos muy exitosos ecológicamente, ya que las cepas se han encontrado en la agricultura, pradera nativa, bosque, ciénaga salada y suelos desérticos de todas las zonas climáticas, así como en agua de lago, material vegetal muerto, raíces vivas de virtualmente cualquier especie de planta, semillas y aire. *Trichoderma* spp. se usa ampliamente en la agricultura y la industria. Las cepas de *T. reesei* se aplican típicamente para la producción de proteínas y el biocontrol; los aislados se usan como bioplaguicidas, bioprotectores, bioestimulantes y biofertilizantes en una amplia variedad de plantas. Esto es posible porque los propágulos de *Trichoderma* pueden producirse con bajo costo y en grandes cantidades, muy concentradas, en formulaciones líquida y sólida, y se guardan por meses. En la actualidad se pueden encontrar más de cincuenta productos diferentes a base de *Trichoderma* registrados en muchos países diferentes de cinco continentes, y se venden y aplican para proteger y mejorar el rendimiento de vegetales, ornamentales y árboles frutales. Adicionalmente se han desarrollado métodos para modificar genéticamente estos hongos de una manera muy precisa, lo que permite el mejoramiento de su capacidad para segregar enzimas, matar patógenos de plantas o estimular el crecimiento de las plantas y la resistencia a enfermedades. Estos resultados están basados en la investigación sobre *Trichoderma* spp. llevada a cabo en los últimos veinte años, en que se han descubierto las bases molecular y genética de los mecanismos involucrados en muchos procesos biológicos útiles y beneficiosos.

The molecular biology of the interactions between *Trichoderma*, phytopathogenic fungi and plants: opportunities for developing novel disease control methods

Biocontrol fungi of the genus *Trichoderma* have developed an astonishing ability to interact, both parasitically and symbiotically, with different

substrates and living organisms, including plants and other microbes. These fungi can utilize a variety of nutrient sources, are among the most resistant microbes to natural and man-made chemicals and toxins, and are able to effectively degrade some of them, including hydrocarbons, chlorophenolic compounds, polysaccharides and xenobiotic pesticides. Many strains of *Trichoderma* are strong opportunistic invaders, fast growing, spore and powerful antibiotic producers. These properties make these fungi ecologically very successful since strains have been found in agricultural, native prairie, forest, salt marsh, and desert soils of all climatic zones, as well as in lake water, dead plant material, living roots of virtually any plant species, seeds and air. *Trichoderma* spp. are widely used in agriculture and industry: *T. reesei* strains are typically applied for protein production and biocontrol, isolates are used as biopesticides,

bioprotectants, biostimulants and biofertilizers on a wide variety of plants. This is possible because *Trichoderma* propagules can be produced cheaply and in large quantities, highly concentrated, both in liquid and dry formulations, and stored for months. Today, more than 50 different *Trichoderma*-based agricultural products can be found as registered in many different countries in five continents, and are sold and applied to protect and improve yield of vegetable, ornamentals and fruit trees. In addition, methods have been developed to genetically modify these fungi in a very precise manner, which allows the improvement of their ability to secrete desired enzymes, kill plant pathogens or stimulate plant growth and resistance to diseases. These results are based on the research carried out on *Trichoderma* spp. in the last 20 years, that have uncovered the molecular and genetic bases of the mechanisms involved in many beneficial or useful biological processes.

REPRODUCCIÓN DE ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO

1. Condiciones de producción de un metabolito activo a partir de una cepa de *Bacillus megaterium* para el control de los hongos fitopatógenos *Bipolaris* spp. y *Exserohyllum* spp.

Bertha Carreras, Orietta Fernández-Larrea y María E. Márquez

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, bcarreras@inisav.cu

Se estudiaron las condiciones de producción de un metabolito activo a partir de una cepa de la especie *Bacillus megaterium* para el control de los hongos *Bipolaris* spp. y *Exserohyllum* spp. Se determinó la influencia de la melaza de caña a diferentes concentraciones, así como la relación entre el consumo de azúcares reductores, la cinética de crecimiento y la producción del metabolito activo. Se demostró que a concentraciones de melaza entre 1 y 5% se detectaba actividad antifúngica, pero no a concentraciones superiores. La cinética de consumo de azúcares reductores estuvo asociada a la producción del metabolito activo, y se correspondió la máxima producción con la fase logarítmica final de crecimiento de la bacteria y con un mayor consumo de azúcares reductores del medio. Entre los valores de pH estudiados no hubo diferencia en cuanto al desarrollo de la bacteria.

Production conditions of active metabolite from *Bacillus megaterium* strain for the control of phytopathogen fungi *Bipolaris* spp. and *Exserohyllum* spp.

Production conditions of an active metabolite from a *Bacillus megaterium* strain were studied for the control of soil fungi *Bipolaris* spp. and *Exserohyllum* spp. The influence of different concentrations of sugarcane molasses and the relationship between the consumption of reducing sugars, growth kinetic and metabolite production was determined. Sugarcane molasses showed antifungal activity in concentrations between 1 and 5%, but not in higher concentrations.

Consumption kinetic of reducing sugars had associated to active metabolite production, and maximum production corresponded with final logarithmic phase of bacterial growth and with more consumption of reducing sugars from medium. There were not differences of bacterium development among values of pH studied.

2. Efectividad del Biobac, obtenido a partir de *Bacillus subtilis* (cepa INIFAT-101) como biocontrolador de enfermedades y estimulador del crecimiento vegetal

Grisel Tejada,¹ Janet Rodríguez,¹ Rosa García,¹ Rafael Martínez Viera,¹ Bernardo Dibut, Juan J. Castellanos,¹ Lissett Gutiérrez,¹ Liuba Plana,¹ Yoania Ríos,¹ María E. Simanca,¹ Maricel Ortega,¹ Carlos Lamela,² Alberto Martínez,³ Lázaro Izquierdo,⁴ Grisel Croche¹ y Luis Fey¹

¹ Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt (INIFAT). Calle 1a. esq. a 2, Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana

² Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CAI Martínez Prieto Km 2½, Boyeros, Ciudad de La Habana, CP 19390

³ Organopónico Van Troi

El control biológico emerge como una estrategia promisoría en el manejo de las enfermedades de las plantas. Algunas bacterias del género *Bacillus* se consideran como muy efectivas para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Esta investigación tuvo como principal objetivo caracterizar microbiológicamente la cepa INIFAT-101 de *Bacillus subtilis* y demostrar su capacidad para producir, mediante fermentación sumergida, metabolitos extra e intracelulares con actividad bactericida y fungicida, lo cual se evidenció al controlar el crecimiento *in vitro* de diferentes microorganismos fitopatógenos, como *Alternaria solani*, *Alternaria porri* y *Xanthomonas vesicatoria*. La electroforesis SDS-PAGE evidenció que existe mayor diversidad proteica en la biomasa que en el sobrenadante libre de células. El bioproducto integral viable, resultante del proceso fermentativo, mostró la mayor actividad fungicida y bactericida. Todas las fracciones del bioproducto demostraron actividad estimuladora del crecimiento ve-

getal en plántulas de tomate, y de ellas se destacaron el integral viable y el sobrenadante autoclaveado, ya que se logró incrementar el área foliar y el número de hojas en estas plántulas. Además, la aplicación del bio-producto fue viable en condiciones controladas y no controladas para diferentes cultivos como cebolla, tomate, trigo, remolacha y otros, lo que confirma la potencialidad de esta cepa y de sus metabolitos para lograr un efecto estimulador del crecimiento vegetal.

Biobac effectiveness, obtained by *Bacillus subtilis* (INIFAT-101 strain), as biocontrol of diseases and stimulator of vegetable growth

Biological control emerges like a promissory strategy in management of plant diseases. Some bacterias of *Bacillus* genus are considered as very effective to control foliar and root diseases. This investigation had as main objective to characterize microbiologically the strain INIFAT-101 of *Bacillus subtilis* and to demonstrate its capacity to produce, by means of submerged fermentation, intra and extra cellular metabolites with germicide and fungicide activity, which was evidenced when controlling the *in vitro* growth of different phytopathogen microorganisms, such as *Alternaria solani*, *Alternaria porri* y *Xanthomonas vesicatoria*. The SDS-PAGE electrophoresis evidenced that there are bigger protein diversity in the biomass than in overflow free of cells. Viable integral bioproduct, resultant of the fermentation process, showed the biggest fungicidal and germicide activity. All bioproduct fractions demonstrated growth stimulation activity on tomato plants, specially the Integral Viable and the Autoclaved Overflow, since it was possible to increase foliar area and number of leaves in these plants. The application of the bioproduct was viable under controlled and not controlled conditions for different crops like onion, tomato, wheat, beet and others, so that confirm the potentiality of this strain and their metabolites to achieve a stimulation effect of the vegetable growth.

3. Producción de biomasa de *Trichoderma* por fermentación líquida

Rosaima García,¹ María A. Durán¹ y Ramón Riera²

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida, Venezuela, rgcrespo@inia.gov.ve

² Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA), Mérida, Venezuela

Con el objeto de mejorar la eficiencia en la producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai se evaluó la metodolo-

gía de producción por fermentación líquida estática en forma artesanal. Para ello se utilizó como sustrato melaza de trapiche de caña panelera fresca producida en la zona y levadura panadera granulada (*Saccharomyces cerevisiae*). Se usaron frascos de vidrio transparente de 500 mL donde se colocaron 100 mL de solución de melaza a 5%, se aforó a 200 mL con agua destilada y se ajustó el pH a 5,5. Estos fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 15 PSI por 20 min, se dejaron reposar 24 h y luego se agregó 10 g de levadura (5%). Se inoculó con 5 mL de suspensiones de conidios de *Trichoderma harzianum* (1×10^{10} ufc), se agitaron e incubaron en forma estática inclinada durante 14 días hasta obtener la producción completa de conidios. Se encontró desarrollo de diferentes estructuras o biomasa del hongo (micelio, conidios y clamidosporas) a partir de dos días. La producción de conidios se completó entre 8-14 días, de acuerdo con la cepa $T_{12} = 1,8 \times 10^9$ ufc, $T_3 = 5,8 \times 10^8$ ufc, IUTE = $5,4 \times 10^8$ ufc, NATIBIOL = $4,2 \times 10^8$ ufc, $T_8 = 5,8 \times 10^8$ ufc, INPRODICA = $6,4 \times 10^8$ ufc, $T_2 = 3,6 \times 10^8$ ufc, $T_{11} = 2,8 \times 10^8$ ufc, $T_1 = 2,6 \times 10^8$ ufc y BIOAGRÍCOLA = 5×10^7 ufc. Con este proceso se acelera la obtención de inóculo del hongo para el proceso de producción, lo que se logra antes de tres días en relación con la producción normal de conidios por fermentación sólida usados para resuspender y aplicar como inóculo, el cual se alcanza entre seis y siete días.

Biomasa production of *Trichoderma* by liquid fermentation

In order to improve the efficiency of massive production of *Trichoderma harzianum* the production methodology by static liquid fermentation in handmade form was evaluated. French brown sugar loaf cane molasses produced in the zone and granulated Bakery yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) were utilized as substratum. In glass bottles of 500 mL were place 100 mL of 5% molasses solution, it was added distilled water to 200 mL, and pH was adjusted to 5.5. These were sterilized in autoclave to 121°C and 15 PSI for 20 minutes, putting at rest for 24 hours and then were added 10 g of yeast (5%). The inoculation was made with 5 mL of *Trichoderma harzianum* conidia suspensions (1×10^{10} UFC), shaken and incubated in inclined static form during 14 days until getting complete production of conidia. Develop of different structures or fungus biomass (mycelium, conidia and clamidosphora) since two days was found. Conidia production finished between 8 and 14 days, in accordance with strain $T_{12} = 1.8 \times 10^9$ ufc, $T_3 = 5.8 \times 10^8$ ufc, IUTE = 5.4×10^8 ufc, NATIBIOL = 4.2×10^8 ufc, $T_8 = 5.8 \times 10^8$ ufc, INPRODICA = 6.4×10^8 ufc, $T_2 = 3.6 \times 10^8$ ufc, $T_{11} = 2.8 \times 10^8$ ufc, $T_1 = 2.6 \times$

10^8 ufc and BIOAGRÍCOLA = 5×10^7 ufc. With this process is speeded up the obtaining of fungus inoculums for the production process, and it is obtained before three days with regard to normal conidia production by solid fermentation used to resuspend and apply as inoculums, which is reached between six and seven days.

4. Detección y aislamiento de metabolitos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS para el control de hongos fitopatógenos

Alina Frías Seoane,¹ Juan A. Mesa Díaz,² Juan E. Tacoronte Morales,² Pilar M. Villa Gómez,¹ Ileana Martínez,³ Esmérida Torres¹ y Michel Acosta³

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana, alina.frias@icidca.edu.cu; alinafrias2001@yahoo.es

² Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas (CIQ).

³ Instituto de Vacunas Finlay.

La bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* producen una amplia diversidad de metabolitos antimicrobianos, y su obtención por vía biotecnológica está fuertemente influenciada por parámetros fermentativos. La producción de estos metabolitos a partir de la cepa PSS de la especie *Pseudomonas aeruginosa* se llevó a cabo mediante cultivo sumergido en un medio de cultivo diseñado específicamente. El objetivo de este trabajo fue detectar y aislar los metabolitos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS, efectivos contra *Alternaria alternata*. Para ello se emplearon técnicas cromatográficas. La cepa PSS produjo metabolitos antimicrobianos sideróforos y proteasas, pero no HCN. Los ensayos cromatográficos permitieron identificar una fracción que es capaz de inhibir el desarrollo micelial del hongo *Alternaria alternata*. La identificación y elucidación estructural de estos metabolitos presentes en esa fracción es motivo de estudios en futuros trabajos.

Detection and isolation of antimicrobial metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain PSS for the control of phytopathogen fungi

Bacteria of genus *Pseudomonas* produce a wide diversity of antimicrobial metabolites and their obtainment by biotechnological methods is strongly influenced by the fermentative parameters. The production of these

metabolites from strain PSS was carried out by submerged fermentation in a specific designed culture medium. The objective of this work was to detect and isolate the antimicrobial metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain PSS, effective against *Alternaria alternata*; chromatographic techniques were applied for the characterization of them. Strain PSS produced antimicrobial metabolites siderophores and proteases but not HCN. The chromatographic analysis permitted to identify a fraction that was able to inhibit mycelia growth of *Alternaria alternata*. The identification and elucidation of the metabolites structure present in the fraction will be done in future works.

5. Separación y concentración de conidios aéreos de *Trichoderma harzianum* cepa A-34 mediante dos equipos presentes en el mercado: Mycoharvester MH-1 (Cabi, Inglaterra) y Tamiz vibratorio (Cuccolini, Italia)

Orestes Elósegui,¹ Orietta Fernández-Larrea,¹ Enrique Ponce,¹ Giovanni Borges,¹ Jesús Jiménez¹ y Luciano Rovesti²

¹ Instituto Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, oelesegui@inisav.cu

² Dudutech, Kenya, dudutech@kenyaweb.com

Trichoderma harzianum cepa A-34 se usa en Cuba ampliamente como hongo antagonista de diferentes patógenos de plantas como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, especies de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* en papa, tomate, col, tabaco y pimiento. Actualmente se trabaja para obtener una formulación estable al menos por 18 meses, por lo que se precisan métodos para extraer y/o formular las esporas (conidios mayormente). En este trabajo se evaluó la separación de conidios desarrollados sobre mezclas de arroz y cáscara de arroz en dos equipos: Mycoharvester modelo MH-1 (CABI, Inglaterra) y Tamiz vibratorio (Cuccolini, Italia). Con el MH-1 se recobró solamente 2,2% de los conidios del biopreparado original a una concentración final de $3,60 \times 10^{10}$ esporas/g, con tamaño de partícula inferior a 60 μ m y un tiempo de operación de 20 min. En contraposición, con el Tamiz vibratorio se obtuvo un rendimiento promedio de 23% a concentraciones finales de $5,25 \times 10^{10}$ esporas/g en un tiempo de operación de 10 min. Cuando el tiempo de operación se incrementó a 20 min se obtuvo un rendimiento de 29,7% a una concentración final de $4,50 \times 10^{10}$ esporas/g. Con el

Tamiz vibratorio el tamaño de partícula del recobrado fue inferior a 209 mm en ambos tratamientos. En el producto recobrado la viabilidad de las esporas y el nivel de contaminantes se mantuvieron dentro de valores permisibles de calidad.

Separation and concentration of aerial conidia of *Trichoderma harzianum* strain A-34 using two devices available in the market: Mycoharvester MH-1 (Cabi, UK) and a Sieve shaker (Cuccolini, Italy)

Trichoderma harzianum strain A-34 is used extensively in Cuba as an antagonistic fungus against different fungal plant pathogens such as *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* species belonging to Genera *Pythium* and *Phytophthora* in potato, tomato, cabbage, tobacco and pepper crops. At present the research is focused on obtaining formulations with a shelf life of 18 months at least. Hence, methods for harvesting and/or formulating spores (mainly conidia) are very necessary. The extraction of spores developed massively on a solid substrate (rice and rice husk) using two devices available in the market today: Mycoharvester model MH-1 (CABI, UK) and a sieve shaker (Cuccolini, Italy) was assessed in the current paper. Only 2.2% of total conidia were harvested with Mycoharvester MH-1 reaching a final concentration of 3.60×10^{10} spores/g and a particle size lower than 60 mm when operated for 20 min. In contrast, the sieve shaker harvested 23% of total conidia at a final concentration of a 5.25×10^{10} spores/g when operated for 10 min. When the operation time was increased to 20 min the sieve shaker harvested 29.7% of total conidia at a final concentration of a 4.50×10^{10} spores/g. In both latter treatments the spore dust harvested had a particle size lower than 209 mm. In all tests the spore viability and the contamination level were in the range of values allowed by the quality standards for *Trichoderma* bioproducts.

6. Selección de aislados naturales de *Trichoderma* spp. y producción sumergida de esporas en un tanque de fermentación agitada

Lucia Jakubíková,¹ Marek Nemèoviè,¹ Valéria Šubíková,² Jozef Drimal³ y Vladimír Farkaš¹

¹ Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská casta 9, 84238, Bratislava

² Institute of Experimental Phytopathology and Entomology, Slovak Academy of Sciences, 90028 Ivánka pri Dunaji

³ BIOMO, s. r. o., Trstínska cesta 3, 91752 Trnava, all Slovakia

El éxito del biocontrol depende en gran parte de la capacidad de los antagonistas de proliferar bajo condiciones del ambiente dado. Por esta razón, el uso de cepas nativas con acción fúngica en biocontrol puede ser ventajoso. Para los propósitos prácticos es necesario seleccionar cepas que antagonicen eficientemente contra patógenos específicos y elaborar los métodos para la producción eficaz de inóculo. El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de biocontrol de *Trichoderma* de varias regiones de Eslovaquia y optimizar las condiciones para la producción de conidios por fermentación sumergida (SF). Se aislaron 66 cepas de *Trichoderma* de diversas localizaciones en Eslovaquia. Se probó la capacidad de los aislados seleccionados de crecer a baja temperatura (10°C) y de suprimir la colonización de la raíz de la remolacha por *P. betae*, vector del virus de la necrosis amarilla de la vena de la remolacha (BNYVV), causante de la rizomania. Las raíces de plántulas de semillero de remolacha que crecían en suelo infestado con BNYVV se analizaron por la prueba serológica de ELISA con anticuerpos monoclonales y policlonales para la presencia de BNYVV, y se comprobaron en microscópico para saber si había ocurrencia de cistosori de *P. betae*. Las pruebas separadas *in vitro* se realizaron en cultivos dobles para comprobar las propiedades antagonistas de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas contra los hongos fitopatógenos más comunes. Las cepas seleccionadas se probaron en ensayos de campo para combatir *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* en papa. Las fermentaciones sumergidas del aislado de *Trichoderma atroviride* se realizaron en erlenmeyers y en un tanque de fermentación agitada de laboratorio de 2,5 L. El medio básico usado fue Czapek-Dox (CzD), que contenía 0,5-1% de la fuente de carbón respectiva. Los parámetros controlados fueron temperatura, pH, velocidad del agitador, oxígeno disuelto y formación de espuma. El fermentador se equipó de un agitador sin cuchilla diseñado especialmente para reducir al mínimo el daño del mycelium. La eficacia de las cepas seleccionadas para suprimir la proliferación del virus de BNYVV varió como promedio entre 21 y 68%. Basado en estas pruebas se seleccionaron las cepas promisorias para la aplicación práctica del biocontrol de la rizomania de la remolacha. En experimentos con papas, la aplicación de *Trichoderma* antes de la siembra disminuyó el porcentaje de tubérculos infestados con *Rhizoctonia* en 50 a 90% y aumentó los rendimientos en 25-34%. En la segunda parte del trabajo se optimizaron las condiciones para la formación de conidios, de un aislado na-

tural de *Trichoderma atroviride* durante cultivo sumergido en erlenmeyers, y en un fermentador con agitación de laboratorio. De los azúcares simples probados, la celobiosa fue el mejor sustrato para la producción de conidios, mientras que la celulosa proveniente de desperdicios de papel molido demostró ser una fuente de carbón compleja, barata y conveniente. La temperatura óptima para la formación de conidios se encontró que estaba entre 24 y 26°C, y el nivel de oxígeno disuelto requerido fue más de 40% de saturación. Después de la ligera disminución inicial durante el primer día después de la inoculación, el pH del medio de cultivo aumentó constantemente a través del período de esporulación. Las tentativas de regular el pH durante la fermentación no mejoraron las producciones de esporas. La formación más intensa de conidios ocurrió entre el segundo y tercer días del crecimiento, la concentración final de esporas fue $2-4 \times 10^8$ conidia/mL y la productividad volumétrica total de conidios fue $4.1-8.2 \times 10^9$ conidia/L/h. Con un procedimiento de discriminación selectiva se encontraron cepas de *Trichoderma* eficientes para combatir enfermedades específicas de planta causadas por hongos fitopatógenos. Se optimizaron las condiciones para la producción de inóculo por cultivo sumergido en un tanque de fermentación agitada.

Selection of natural isolates of *Trichoderma* spp. and submerged production of spores in a stirred-tank fermentor

The success of biocontrol largely depends on the ability of the antagonists to proliferate under conditions of the given environment. For this reason, the application of native fungal strains in biocontrol may be advantageous. For practical purposes is necessary to select strains efficiently antagonizing specific pathogens and to elaborate methods for effective production of inocula. The aim of this work was to select biocontrol strains of *Trichoderma* from various regions of Slovakia and to optimize conditions for the production of conidia by submerged fermentation (SF). From diverse farming locations in Slovakia, 66 *Trichoderma* isolates have been isolated. The ability of the selected isolates to grow at low temperature (10°C) and to suppress the colonization of sugar beet roots with *P. betae*, vector of beet necrosis yellow vein virus (BNYVV) causing rhizomania in sugar beet were tested. The roots of sugar beet seedlings growing in the BNYVV-infested soil were analyzed by serological ELISA test using monoclonal

and polyclonal antibodies for the presence of BNYVV and checked microscopically for the occurrence of cystosori of *P. betae*. Separate in vitro tests were performed in dual cultures to check the antagonizing properties of the selected *Trichoderma* strains against the most common phytopathogenic fungi. Selected strains were tested in field trials to combat *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora infestans* in potatoes. Submerged fermentations of *Trichoderma atroviride* isolate were performed in Erlenmayer flasks and in a 2.5-L laboratory stirred-tank fermentor. The basic medium used was Czapek-Dox (CzD) medium containing 0.5-1% of the respective carbon source. Controlled parameters were temperature, pH, stirrer speed, dissolved oxygen and foam formation. The fermentor was equipped with a blade-less stirrer specially designed to minimize the mycelium damage. The efficacy of the selected strains to suppress proliferation of the BNYVV virus varied on the average between 21 and 68%. On the basis of these tests, candidate strains for practical application in biocontrol of sugar beet rhizomania were selected. In experiments with potatoes, the application of *Trichoderma* before sowing has decreased the percentage of infested tubers with *Rhizoctonia* by 50 to 90% and increased the yields by 25-34%. In the second part of work, conditions for conidiation of a natural isolate of *Trichoderma atroviride* during submerged cultivation in Erlenmeyer flasks and in a laboratory stirred-tank fermentor were optimized. From the simple sugars tested, cellobiose was the best substrate for conidia production while cellulose fines from paper mill waste proved to be a suitable cheap complex carbon source. Optimum temperature for conidiation was found to be between 24 and 26°C, and the required dissolved oxygen level was more than 40% saturation. After initial slight decrease during the 1st day after inoculation, the pH of the culture medium constantly increased throughout the sporulation period. Attempts to regulate the pH during fermentation did not improve the spore yields. The most intense formation of conidia took place between 2nd and 3rd days of growth, the final spore concentration was $2-4 \times 10^8$ conidia/mL and the overall volumetric productivity of conidia was $4.1-8.2 \times 10^9$ conidia/L/h. Through selective screening procedure, efficient *Trichoderma* strains for combating specific plant diseases caused by phytopathogenic fungi were found. Conditions have been optimized for the production of inocula by submerged cultivation in a stirred-tank fermentor.

7. Desarrollo de un fungicida biológico a partir de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana

Rosaima García,¹ Ramón Riera,² Carlos Zambrano³ y Luis Gutiérrez¹

¹ Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida, Venezuela, Aparado Postal 25, teléf.: 0251-2630090, rgcrespo@inia.gov.ve

² Servicio Autónomo de Sanidad Vegetal (SASA). Mérida, Venezuela

³ Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Barquisimeto, Venezuela

Un fungicida biológico basado en el hongo *Trichoderma harzianum* se desarrolló para el control de varias enfermedades fungosas del suelo que afectan cultivos agrícolas en Mérida, Venezuela. La formulación se obtuvo a partir de una cepa aislada de un suelo de tradición ajera proveniente del municipio de Rivas Dávila de este estado, ubicado a 2 200 msnm con temperatura promedio de 18°C. La cepa mostró en laboratorio y campo alta capacidad antagónica contra los hongos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* sp., *Plasmodiophora brassicae* y *Phytohthora* sp., y se lograron reducciones de la incidencia de las enfermedades superiores a 25% en dependencia de ellas y de las condiciones ambientales. Los ensayos de validación con el uso de este antagonista para el manejo de *Rhizoctonia solana* mostraron control de la enfermedad hasta de 98%. El producto se obtuvo mediante fermentación sólida en forma artesanal y formulado en polvo mojable bajo concentración de 2×10^{12} ufc, en un peso total de 150 g con una proporción de 25% de este ingrediente activo y 75% de material inerte, suficiente para aplicarse sobre 1 ha de cultivo, con una pureza de 100% y viabilidad de esporas de 95%. Esta cepa se ha probado con éxito en cultivos tales como papa y otras solanáceas, ajo, crucíferas, leguminosas, plátano, café y tabaco, entre otros, bajo siembras ubicadas en diferentes altitudes, en dependencia de su capacidad, que oscila entre 5 000 a 3 000 msnm, y con mantenimiento de la capacidad antagónica.

Development of a biologic fungicide based on a *Trichoderma harzianum* fungus strain from andine venezuelan region

A biological fungicide from *Trichoderma harzianum* fungus was developed for the control of many soil

fungus diseases that affects agriculture crops in Merida, Venezuela. Formulation was obtained from a strain isolated from a tradition garlic soil of Rivas Davila Municipality in this state, situated to 2200 mosl with average temperature of 18°C). The strain showed a very hard antagonistic against fungi *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Plasmodiophora brassicae* and *Phytohthora* sp. both in laboratory as in field conditions, with reductions of disease incidence greater than 25% depending of them and the environment conditions. Validation tests with the use of this antagonistic for *Rhizoctonia solani* management showed control of this disease up to 98%. The product was obtained by solid fermentation in handmade form and wet dust formulation in concentration of 2×10^{12} ufc, with a total weigh of 150 g in a proportion of 25% of the active ingredient and 75% of inert material; enough to apply one crop hectare; with a purity of 100% and spore viability of 95%. This strain has been proven successfully in crops such as potato and other solanaceous, garlic, crucifers, leguminous, banana, coffee, tobacco; for sowings situated in different altitudes, depending of their capacity which vary from 5 000 to 3 000 mosl and with keeping of antagonistic capacity.

8. Producción de un biofungicida a partir de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS, efectivo en el control de hongos fitopatógenos. Experiencia cubana

Pilar M. Villa,¹ Marusia Stefanova,² Alina Frías,¹ María E. Díaz de Villegas,¹ Julio Martínez,¹ Antonio Bell,¹ Esmérida Torres,¹ Yoel Hernández,¹ Gisela González,¹ Julia Almandoz,² Felipe Rodríguez,² Leónides Castellanos² e Isabel Alfonso³

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana, pilar.villa@icidca.edu.cu

² Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

³ Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) Carretera CAI Martínez Prieto Km 2½, Boyeros, Ciudad de La Habana, CP 19390

La disminución del uso de los fungicidas químicos en la agricultura es una premisa actual a escala mundial en la protección del medio ambiente, por lo que la necesidad de productos biológicos competitivos ha impulsado la investigación dirigida a obtener biofungicidas con

tecnologías de avanzada. En este trabajo se presentan los estudios para la obtención de un biofungicida de naturaleza bioquímica a partir de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS, libre de células bacterianas. La producción se realizó mediante cultivo sumergido en un fermentador de 500 L de capacidad y volumen de trabajo de 250 L, según procedimiento establecido en la Patente Número 2085, Certificado 1079/2002. El bioproducto obtenido se denominó Glutucid, y está constituido por metabolitos del tipo pioverdin II, antimicrobianos de naturaleza fenólica y trazas de ácido salicílico, los cuales fueron aislados por extracción con solventes mediante diferentes técnicas de cromatografía. Sus evaluaciones en condiciones controladas y de campo demostraron una efectividad igual a la obtenida con el fungicida químico mancozeb en el control de los hongos fitopatógenos *Alternaria solana*, *Peronospora tabacina*, *Uromyces phaseoli*, *Pseudoperonospora cubensis* en papa, tomate, tabaco, frijol y cucurbitáceas, y de *Dreschlera spicifera* y *Curvularia* sp. en semillas botánica de la caña de azúcar. El biofungicida Glutucid es el primero de su naturaleza en Cuba, con resultados comparables a los similares a escala internacional, y constituye una alternativa biológica para el control de enfermedades fúngicas foliares en diferentes cultivos.

Production of a biofungicide from *Pseudomonas aeruginosa* strain PSS, effective for the control of phytopathogen fungi. Cuban experience

The diminution of chemical fungicides use in agriculture is an actual premise on world-wide scale to protect environment, because of that the necessity of producing competitive biological products has impelled the investigation directed to obtain biofungicides with outpost technologies. The studies made in order to obtain a biochemical nature biofungicide from *Pseudomonas aeruginosa* strain PSS, free of bacterial cells is presented in this work. The production was made by submerged culture in a fermentor tank of 500 L of capacity and volume of work of 250 L, according to procedure established in Patent Number 2085, Certificate 1079/2002. El bioproducto obtained was denominated Glutucid and is constituted by metabolites of the type pioverdin II, antimicrobials of phenolic nature and traces of salicylic acid, which were isolated by solvents extraction by means of different chromatography techniques. The evaluations in

controlled and field conditions have demonstrated an effectiveness equal to those obtained with chemical fungicide mancozeb in the control of phytopathogen fungi *Alternaria solani*, *Peronospora tabacina*, *Uromyces phaseoli*, *Pseudoperonospora cubensis* in potato, tomato, tobacco, frijol and cucurbits, and *Dreschlera spicifera* and *Curvularia* sp. in botanical seeds of sugar cane. Biofungicide Glutucid is the first of its nature in Cuba, with results comparable to international similar ones and constitutes a biological alternative for the control of foliar fungi diseases in different crops.

9. Alternativas de producción de *Trichoderma* en Cuba

Orietta Fernández-Larrea y Orestes Elósegui

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, oflarrea@inisav.cu; oelosegui@inisav.cu

En Cuba la reproducción artesanal del hongo *Trichoderma harzianum* se realiza en los Centros de Reproducción de Entomófagos Entomopatógenos (CREE) sobre soporte sólido, y también se puede obtener mediante cultivos líquidos agitados, estáticos y bifásicos. A partir del 2004 se produce un producto líquido de *Trichoderma* mediante un proceso fermentativo, en una de las plantas de bioplaguicidas, proceso que se ha escalado hasta un volumen de 500 L. Para alargar el tiempo de almacenamiento de estos preparados se han desarrollado procesos de recobrado que permiten mantener la efectividad de los productos de tres a seis meses, en dependencia de la temperatura de almacenamiento. Los preparados líquidos se preservan mediante la adición de diferentes sustancias como sulfatos y ácidos orgánicos, y se mantienen estables, viables y efectivos a los cuatro meses, almacenados a 12-20°C. Para los que se obtienen sobre sustratos sólidos se utiliza un método de secado simple en cuarto climatizado que permite obtener productos con menos de 12% de humedad, los cuales se mantienen estables hasta cuatro meses a temperatura de 20-25°C, en bolsas de polipropileno dobles y convenientemente selladas. Para el recobrado de los conidios del sustrato seco se han utilizado equipos cosechadores de esporas con los cuales se han obtenido conidias puras a concentración de 10¹¹ conidios/g. Con la utilización de molinos de cuchilla se obtienen conidios viables en más de 95%, los que presentan tamaños de partículas inferiores a 70 micras que se mantienen estables por 4-5 meses cuando se almacenan a temperaturas inferiores a 20°C.

Alternatives of *Trichoderma* production in Cuba

Handmade reproduction of the fungus *Trichoderma harzianum* is realized in Cuba in the Centers for the Reproduction of Entomophagous and Entomopathogens (CREE) by solid-state methods and also be obtained by static and two-phase liquid cultivations. From 2004 year the production has been taking place by means of a liquid fermentative process, a liquid product of *Trichoderma* has been obtained in a Plant of Biopesticides. This process has been scale up to a volume of 500 L. Recovered processes have been developed to increase the storage time of the different types of products, so that allow maintaining products effectiveness for three to six months, in dependence of the storage temperature. The liquid preparations are preserved by means of the addition of different substances like sulfates and organic acids and they stay stable, viable and effective for four months with the use of these substances, stored at 12-20°C. For solid process there is a method of simple drying in acclimatized room that allows obtaining products with less than 12% of humidity, which stay stable up to four months to temperature at 20-25°C in polypropylene double bags and sealed of. Different equipments have used for recovering conidia from dry substrate, and pure conidia has been obtained to concentration of 10¹¹ conidia/g. More than 95% of viable conidia may be obtained using cutting mills, which present particles sizes less than 70 microns and stay stable for 4-5 months when they are stored under temperatures of 20°C or lower.

10. Registro de productos biológicos para el control de fitopatógenos y nematodos. Un reto para su producción y uso. Situación en Cuba

Orietta Fernández-Larrea Vega

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, oflarrea@inisav.cu

Hay relativamente poca información acerca de los patrones de seguridad de los microorganismos entomopatógenos y antagonistas, generados por la industria en el propio proceso de desarrollo de los productos y registros. Actualmente es la Agencia para la Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos y la Comunidad Económica Europea quienes establecen los pro-

tolocolos para el registro de estos productos cuyas exigencias, en ocasiones, no pueden alcanzarse por pequeños productores debido el alto costo de los ensayos que se solicitan. Es interesante destacar los esfuerzos realizados en los últimos años para armonizar los protocolos de registros para los bioplaguicidas. En el 2001 se realizó en Benin un Taller Pan Africano sobre Regulaciones para Bioplaguicidas, y como resultado se elaboró un documento denominado Pest Control Products Board (PCPB), que logró armonizar para esta región el registro y regulaciones de uso de los bioplaguicidas. En Cuba se confrontaron varias dificultades. La primera fue que no existían conocimientos sobre el registro de bioplaguicidas ni especialistas en esta disciplina, por tanto no se contaba con un documento regulatorio oficial en la preparación de los expedientes específicos para productos biológicos de uso agrícola. Como segundo problema estaba la no existencia de los laboratorios debidamente validados para realizar las pruebas toxicológicas, y especialmente las ecotoxicológicas, ya que la infraestructura existente solo tenía la posibilidad de evaluar productos farmacéuticos. No estaban, por tanto, definidas las pruebas para cada caso. A partir de la presentación y aprobación del documento Protocolo de Registro para Bioplaguicidas de Origen Microbiano se han presentado varios productos para su registro, entre los cuales se encuentran tres para el control de nematodos. Ellos son Thurisav 25, a partir de una cepa de *Bacillus thuringiensis*; Klamic, un producto que se obtiene a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*, y Hebernem, a partir de una cepa bacteriana de la especie *Tsukamurella paurometabolum*. Entre los productos para el control de fitopatógenos se han solicitado los registros de Tricosav 34 en sus formas líquida y sólida a partir de *Trichoderma harzianum* para el control de hongos de suelo, y el producto Glutacid, que se obtiene de la fermentación de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Todos estos productos demostraron una alta eficacia en condiciones experimentales y en campo, lo que permite al país contar con opciones biológicas para el control de las principales enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas. Se proponen posibles estrategias de acción.

Register of biological products for phytopathogens and nematodes control. A challenge for their production and use. Cuban situation

There are relatively little information about security patterns of entomopathogen and antagonistic

microorganisms, these have been generated by the industry in the own process of development of the products and register. Actually is the EPA (Environmental Protection Agency) from United State and European Economic Community who establish the normative for biopesticides registration, thought little producers often can not reach it because the high cost of required tests. It is interesting to highlight the efforts carried out in last years to harmonize protocols of registrations for biopesticides. A Pan African Work Shop on Regulations for Biopesticides was carried out in Benin in year 2001, and a document denominated Pest Control Products Board (PCPB) was elaborated as a result, which harmonized Register and Regulations of Biopesticides use for this Region. Several difficulties were confronted in Cuba, the first one was that knowledge about biopesticides register did not exist, neither specialists of this discipline, and therefore there is not an official document regulatory for the preparation of the specific files for biological products of agricultural use. The second problem was the no-existence of laboratories properly validated to carry out toxicological and ecotoxicological tests, since the

existent infrastructure only had the possibility to evaluate pharmaceutical products. Tests for each case were not, therefore, defined. Since the presentation and approval of the document Register Protocol for Microbial origin Biopesticides, several products have been presented for their registration, among them are three products for the control of nematodes: Thurisav 25, produced from a special strain of *Bacillus thuringiensis*; Klamic, a product obtained from the fungus *Pochonia chlamydosporia*; and Hebernem, produced from a bacterial strain of the species *Tsukamurella paurometabolum*. Among the products for phytopathogens control it has been requested the register of Tricosav 34, both in liquid and solid forms, which are obtained from *Trichoderma harzianum* for the control of soil fungi; and the product Glutucid that is obtained from the fermentation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain. All these products have demonstrated a high effectiveness under experimental and field conditions, what allows to the country of having biological options for the control of the main diseases that affect agricultural cultivations. Possible action strategies are offered.

APLICACIÓN DE *TRICHODERMA* Y OTROS ANTAGONISTAS

1. Desarrollo, alcances y retos del biocontrol de fitopatógenos en Cuba

Marusia Stefanova

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, mstefanova@inisav.cu

La necesidad de proteger a los cultivos del ataque de los fitopatógenos del suelo y reducir el uso de los plaguicidas químicos hizo que en Cuba, a partir de 1990, se iniciaran investigaciones dirigidas a introducir el biocontrol con microorganismos como una alternativa promisorio dentro de las medidas de manejo establecidas en los cultivos. La selección *in vitro*, en condiciones controladas y semicontroladas de cepas de *Trichoderma* spp., y la validación de su eficacia a nivel de campo, así como el estudio de los parámetros de reproducción del hongo, produjo el primer fungicida biológico denominado Trichosav. Aplicado al inicio en el tabaco contra la pata prieta (*Phytophthora nicotianae*), en el tomate contra el *damping-off*, y en el pimiento para el control de *Phytophthora capsici*, los excelentes resultados impulsaron su extensión paulatina a otros cultivos mediante tratamiento de las semillas y el suelo, bajo procedimientos y dosis establecidos, con una eficacia promedio de más de 80%. En la campaña 1994-1995 se beneficiaron más de 5 000 ha de tabaco, hortalizas, granos, ajo, flores y ornamentales, entre otros. Se avanzó además en la producción artesanal, en los métodos tecnológicos, tales como la fermentación sumergida y sobre fase sólida. La introducción del biocontrol con *Trichoderma* en la agricultura urbana, en la nueva tecnología de producción de plántulas de tabaco para la eliminación del bromuro de metilo y en la tecnología de producción de plántulas hortícolas enraizadas en contenedores, demostró su eficacia a escala tecnológica. La investigación de cepas bacterianas del género *Pseudomonas* hizo posible la obtención, mediante procesos biotecnológicos patentados, del primer biofungicida nombrado Glutucid para el control de fitopatógenos foliares, cuya eficacia contra *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* se comprobó en el tomate en cultivo protegido, y contra patógenos fungosos en el sustrato para el hongo comestible *Pleurotus*. Se obtuvieron marcados avances en el control biológico de los

nematodos con dos nuevos productos terminados: Klamic y HeberNem, con una eficacia técnica en condiciones de campo superior a 75%. Se desarrolló la tecnología de producción de Nemacid en forma de polvo, y un producto en forma de fluido concentrado a partir de una cepa de *Bacillus thuringiensis* en fase de validación. La colaboración e integración científica bajo el Programa Nacional de Lucha Biológica y del Servicio de la Sanidad Vegetal, con su sistema nacional de laboratorios provinciales y estaciones territoriales de protección de plantas, así como la participación entusiasta y creativa del sector agrícola en todas sus formas de producción, contribuyeron decisivamente en la comprobación, validación e implantación del biocontrol. A lo largo de estos quince años ha quedado demostrado que el biocontrol es técnicamente efectivo, económicamente viable y compatible con el medio ambiente. La selección de nuevos microorganismos promisorios, la obtención de productos tecnológicos comerciables, limpios y de fácil aplicación, su validación, registro y acreditación, así como el desarrollo de nuevas tácticas y estrategias para su aplicación, están entre los nuevos retos para los años venideros.

Development, reaches and challenges of phytopathogens biocontrol in Cuba

The necessity to protect crops from the attack of soil phytopathogens and reducing the use of chemical pesticides brought about that scientific researches were initiated to introduce biocontrol with microorganisms in Cuba, from the year 1990, as a promissory decision, taking into account the management measures established in crops. The selection *in vitro* of *Trichoderma* spp. strains, in controlled and semicontrolled conditions, and the validation of its efficacy in field, as well as the survey of fungus reproduction parameters, led to reach Trichosav, the first biological fungicide. First applied in tobacco against *Phytophthora nicotianae*, in tomato against *damping-off*, and for the control of *Phytophthora capsici* in pepper, the excellent results drove to the gradual extension to other crops, by means of seeds and soil of treatments, under procedures and doses, with an average efficacy in a rate of 80%. In 1994-1995

campaign more than 5 000 ha of tobacco, vegetables, grains, garlic, flowers and ornamentals, among others, were benefit. Besides handmade production, there were advances in the technological methods, as well as submerged and on solid phase fermentations. The introduction of biocontrol with *Trichoderma* in the urban agriculture, in the new technology of tobacco seedlings production for the elimination of methyl bromide, and in technology of horticultural seedlings production rooted in containers showed its efficacy in technological scale. The investigation of bacterial strains from the genus *Pseudomonas* made possible the obtain the first biological fungicide Glutucid, by means of registered patent of biotechnological process, to the control of foliar phytopathogens with efficacy against *Alternaria solani* and *Cladosporium fulvum* in protected tomato crops, and against other fungal pathogens, including species such as *Pleurotus*, for the treatment of substratum. Marked advances were obtained in biological control of nematodes with two new finished products: Klamic and HeberNem, with a technical efficacy over 75% in field conditions. A technology for Nematicid production was developed in powder form and a concentrated fluid, from a *Bacillus thuringiensis* strain, which is in validation phase. The scientific contribution and integration under the National Program of Biological Control, and Cuban Service of Plant Health, with its National System of Provincial Laboratories and Plant Protection Territorial Stations, also with the enthusiastic and creative manners of the farmers, in all their ways of production, contributed positively in the prove, validation and implantation of biocontrol. Throughout these 15 years it is showed that biocontrol is technically effective, economically viable and compatible with environment. The selection of new promissory microorganisms, the obtaining of technological marketable, products clean and from easy application, its validation, registry and credential and also the development of new tactics and strategies for its application, are the new challenges for coming years.

2. Situación y progreso del biocontrol de enfermedades foliares del trigo en Argentina

E. Analia Perelló

Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 119, 1900 La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina, teléf.: +54-221-4236758 int. 423, fax.: +54-221-425-2346, fitopato@ceres.agro.unlp.edu.ar

Las manchas foliares del trigo ocasionadas por patógenos necrótrofos constituyen una de las enferme-

dades más destructivas del cultivo en Argentina. Ninguna de las medidas de control empleadas para el combate de esas enfermedades es exitosa por sí sola. El biocontrol con antagonistas microbianos se suma como una estrategia complementaria de bajo impacto ambiental que aún no se ha investigado suficientemente. Durante la última década, el CIDEFI conduce una línea de investigación tendiente a analizar las interacciones entre los principales patógenos foliares del trigo y la microbiota saprobia nativa o introducida al filoplano, con miras a su biocontrol. La primera etapa consistió en la búsqueda y selección de los antagonistas microbianos a partir del filoplano o de microorganismos introducidos con reconocida capacidad de biocontrol (*Trichoderma* spp., *Bacillus* spp.). Las diferentes combinaciones patógeno/antagonista se confrontaron en: a) ensayos en laboratorio (test de cultivos/suspensiones pareadas, inhibición del crecimiento micelial, inhibición de la germinación de esporas, alteraciones morfológicas); b) ensayos bajo condiciones de invernáculo; c) ensayos conducidos en parcelas a campo. Se evaluó la expresión de las enfermedades por el cálculo de la reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad y disminución del AUDPC (área bajo la curva de progreso de la enfermedad) en diferentes cultivares de trigo, estadios fenológicos y momentos y formas de aplicación de los antagonistas (asperjado foliar/pelteado de semillas). Los resultados hasta el presente, si bien son promisorios, indican la necesidad de profundizar las pruebas a campo de forma más integrativa y multidisciplinaria a los efectos de un mejor entendimiento de las condiciones, bajo las cuales los agentes de biocontrol podrían emplearse más productivamente.

Status and progress of biological control of wheat foliar diseases in Argentina

Leaf Spot Diseases of wheat are one of the most destructive diseases of this crop in Argentina. No single control measure is likely to be successful in controlling leaf spotting pathogens and a fully integrated system of disease management is more likely to achieve a long-term solution. Part of such a system could include biological control. The CIDEFI has been conducting an extensive investigation about biological control focusing on these diseases since 1990. A step-wise screening system to select fungi with potential to control these diseases from were initially developed. The effect of the antagonist were tested under different conditions that included laboratory, greenhouse and field assays. Micelial growth inhibition of the pathogens

tested, coiling, vacuolation, granulation and plasmolysis of hyphae were frequently registered. The incidence, severity and the AUDPC were evaluated on different wheat cultivars. *Bacillus* and others spore-forming bacteria revealed interesting possibilities for biocontrol. Several *Trichoderma* spp. tested suppressed the diseases under greenhouse and field conditions suggesting that the protective characteristics may be associated with the ability to compete for nutrients and for occupation of the infection court in the pre-penetration period. New projects recently initiated at CIDEFI aims strategies for consistent biological control implemented under field conditions. In this sense, several strains showed promising are currently being assessed in small scale field trails. The need for more integrative, multidisciplinary research on agricultural systems that will provide a deeper understanding of the conditions under which microbial biocontrol agents might be most productively applied are required.

3. Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Berta L. Muiño,¹ Mercedes Sáenz,¹ Marusia Stefanova,¹ Ángela Porras¹ e Isabel Díaz²

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera La Coloma Km 2½, San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba

Se realizaron estudios de compatibilidad *in vitro* de *Trichoderma* spp. con diferentes plaguicidas químicos de aplicación práctica. También se estudió el efecto de fertilizante inorgánico y los fungicidas zineb, mancozeb y thiram en tratamientos al suelo en presencia del hongo, y en un ensayo de campo se comprobó su permanencia en el suelo bajo tratamientos con plaguicidas químicos recomendados en el cultivo del tabaco. Los plaguicidas oxiclورو de cobre, metalaxyl, dimethomorph, trifluralin, napropamida y dimetoato son compatibles *in vitro* con *Trichoderma* spp. El benomil se considera como tóxico. Los fungicidas zineb, mancozeb y thiram ejercen una toxicidad ligera *in vitro*, aunque en tratamientos al suelo se consideran compatibles, así como el fertilizante inorgánico (5-12-6-2,6). En condiciones de campo *Trichoderma* spp. permanece en suelo por más de cincuenta días bajo el efecto de tratamientos con plaguicidas recomendados en el cultivo del tabaco en la fase de semillero.

Compatibility of *Trichoderma* spp. with some pesticides and fertilizers in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) crop

Compatibility studies of of *Trichoderma* spp. with several pesticides were carried out *in vitro*. The effects of an inorganic fertilizer and fungicides as zineb, mancozeb and thiram were also assessed by mean of soil treatments in areas where the fungus was present, and the permanence of the fungus into the soil was proved in tobacco plots treated with chemical fungicides. Copper oxiclورو, metalaxyl, dimethomorph, trifluralin, napropamida and dimethoate were compatible *in vitro* with *Trichoderma* spp. but benomil was catalogued as toxic. On the other hand the fungicides zineb, mancozeb and thiram showed a light toxicity *in vitro* conditions thought they appeared to be compatible with microorganism. No toxicity was found to the fungus because of the presence of the inorganic fertilizer (5-12-6-2.6). *Trichoderma* spp. lasted in the soil for even more than 50 days under the effect on the commonly used pesticides during the seedling period of tobacco plant.

4. Utilización de *Bacillus subtilis* en formulados líquidos para el incremento del rendimiento en papa (*Solanum tuberosum* L.) en Argentina

J. Cozzi,¹ G. Chiessa,¹ V. Barrera,¹ L. Gasoni,¹ P. Rodríguez² y J. Giacomo Donato²

¹ IMYZA-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CC 25 (1712) Cautelar, provincia de Buenos Aires, Argentina

² NITRAP S.R.L. Ameghino, provincia de Buenos Aires, Argentina

La utilización de microorganismos benéficos para aumentar el rendimiento en cultivos agrícolas es una alternativa interesante que permite reducir la aplicación de fertilizantes químicos. El propósito de este trabajo fue determinar la efectividad de dos concentraciones de formulaciones líquidas, que incluyen un aislamiento de *Bacillus subtilis* para el incremento del rendimiento en el cultivo de papa en Balcarce (Argentina). El aislamiento bacteriano se desarrolló en medio líquido BM y luego se suspendió en un soporte líquido a las concentraciones 1:1 (dosis alta) y 1:5 (dosis baja). Con 1 L de solución de cada concentración se pulverizaron 50 kg de tubérculos de papa semilla, independientemente, y se sembraron de acuerdo con un diseño de bloques al azar. Todos los tratamientos se compararon con un

testigo. En el período de cosecha se evaluó el rendimiento en toneladas por hectárea, y la frecuencia de tubérculos de diámetros de 50, 75 y 90 mm. La pulverización con la dosis baja de la formulación determinó un aumento del rendimiento de 8,7%, en tanto con la dosis alta fue de 9,6%. Los resultados fueron significativamente mayores respecto del testigo. La frecuencia de tubérculos de diámetro superior a 90 mm fue mayor en los tratamientos con la dosis baja, mientras que con la alta no fueron significativamente diferentes del testigo, ni de los tratados con dosis baja.

Use of *Bacillus subtilis* in liquid formulations to increase potato (*Solanum tuberosum* L.) yield in Argentina

The application of beneficial microorganisms to increase yield in agricultural crops is an interesting alternative that contribute to reduce the utilization of chemical fertilizers. The purpose of this work was to determine the effect of two concentrations of liquid formulations including *Bacillus subtilis* on potato yield in Balcarce (Argentina). Bacterial strain were developed on liquid medium BM and then suspended in a liquid support in order to obtain two concentrations: 1:1 (High Dose) and 1:5 (Low Dose). Fifty Kg of potato seeds were treated independently with 1L of each concentration. Tubers were randomly planted according to a block design. Results of every treatment were finally compare with those obtained in the control plots. Yield in Ton/ha, was evaluated at harvest time. The frequency of tubers of 50, 75 y 90 mm sizes was also determined. The application of low dose increased yield in 8.7%, while with the high dose was 9.6%. The results were significantly higher than the control. The frequency of tubers with 90 mm diameter was higher in treatments with low dose of formulation while in treatments with high dose, the results were not significantly different from those obtained in treatments with low dose neither than control plots.

5. Alternativas naturales para el control de *Botrytis cinerea*

S. Larran, C. Mónaco, G. Dal Bello y M. Carranza

Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI). Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Botrytis cinerea Pers. ex Fr., agente causal del moho gris del fruto de tomate, ocasiona grandes pérdidas eco-

nómicas en poscosecha. Para su control, hasta el presente se han utilizado medidas de profilaxis y agroquímicos que causan generación de resistencias y contaminación del ambiente, además de riesgos por residualidad en los productos de consumo. El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de alternativas naturales para el control del citado patógeno, tales como aceite esencial de *Schinus molle* a 50, 100, 200 y 400 ppm; aceite esencial de *Malaleuca alternifolia* (tea tree) entre 400 y 1 000 ppm; un formulado a base de ácidos grasos de origen vegetal (Wassington S.A.) a 1 y 2%, y una cepa de *Trichoderma* sp. aislada de hojas de *Datura ferox*. Los productos se incorporaron al medio de cultivo (DPA) previamente a la siembra del patógeno, *Trichoderma* sp. fue evaluada en cultivos duales antagonista/patógeno. Se realizaron dos mediciones del diámetro de las colonias. Los resultados demostraron un efecto fungistático con la cepa de *Trichoderma*, con el aceite de tea tree en todas las concentraciones evaluadas y con el aceite de *Schinus molle* solo a altas concentraciones; sin embargo, el formulado a base de ácidos grasos vegetales inhibió totalmente al patógeno. Por lo expuesto, puede concluirse que las alternativas naturales evaluadas en el trabajo son promisorias para el control del moho gris del tomate.

Natural alternatives for control of *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. ex Fr., causal agent of mould rot of tomato, produce large economic losses in posharvest fruits. Up to now, most usual methods of control refer to prophylaxis techniques and the use of agrochemical products, with their resultant of residual problems on feed products, the development of fungicide resistance and the possibility of environmental contamination. The purpose of this work was to evaluate the efficacy of natural alternatives such as essential oils of *Schinus molle* at 50, 100, 200 and 400 ppm; essential oils of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) from 400 to 1000 ppm; a formulated of vegetable-origin fatty acids (Wassington S.A.) at 1 and 2% and a strain of *Trichoderma* sp. isolated from *Datura ferox*. The products were added to the culture medium before inoculating it with the pathogen. *Trichoderma* sp. was evaluated in dual cultures antagonist/pathogen. The evaluation of different treatments was carried out measuring growth of the pathogen. The essential oil of *Schinus molle* showed a fungistatic effect against *B. cinerea* at high concentration, while the essential oil of tea tree showed

a fungistatic effect at all concentrations. An important inhibition of the micelial growth of the pathogen was observed In the dual culture *Trichoderma* sp.–*B. cinerea*. Fatty acids formulated produced an effect fungicide to both evaluated concentration. Despite the variable effects obtained, the natural alternatives used in this study should be considered as an option for the control of mould rot of tomato.

6. Eficacia de *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en Cuba

Luis Pérez, Alicia Batles, Julio Fonseca y Virgen Montenegro

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, lperezvicente@sanidadvegetal.cu; lperez@inisav.cu; lperezvicente@hotmail.com

La marchitez por *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) es una de las más importantes enfermedades del plátano. Con el remplazo de los clones Gros Michel y Manzano (Silk, AAB) por clones Cavendish la enfermedad tomó una importancia secundaria. El impacto de la sigatoka negra hizo necesario el remplazo en Cuba de los plátanos resistentes Cavendish (AAB) por clones híbridos de la FHIA y el Burro CEMSA (AAB), lo que provocó una reemergencia de la enfermedad. La eficacia de *Trichoderma harzianum* aislado A-34 se estudió *in vitro* y en parcelas de producción previamente devastados por la enfermedad. El inóculo se reprodujo en erlenmeyers con 20 g de arroz esterilizado y agua 1:1 (p/v), inoculado con 2 mL de conidios de *Foc* provenientes de cultivos puros. La reproducción del antagonista se realizó sobre sustrato sólido compuesto por una mezcla 2:1 (p/p) de residuos de cabecilla de arroz con cáscara de arroz, y bagacillo de caña y agua a 1:1 (p/v). Se llevaron a cabo tratamientos de control en plantaciones comerciales de El Sitio, Palma Soriano. La cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* mostró una inhibición marcada de la frecuencia y la severidad de marchitez por *Fusarium*. En experimentos en tanques de aplicación con el biocontrol una semana antes de la inoculación con *Foc*, se observó un control total del patógeno. Las aplicaciones de 20 g de una formulación de 2×10^9 conidios.mL⁻¹ del biocontrol al momento de la plantación y después de la eliminación de las plantas enfermas brinda un control mayor a 95% en parcelas de Burro CEMSA y FHIA 03, previamente destruidas por la enfermedad en suelos conducibles de plantaciones comerciales.

Efficacy of *Trichoderma harzianum* on the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Cuba

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*) is one of the most important diseases of banana. With the replacement of Gros Michel and Manzano (Silk, AAB) by Cavendish cultivars the disease got a secondary importance. The replacement in Cuba of resistant Cavendish banana and plantains (AAB) by FHIA hybrids and Burro CEMSA (AAB) due to the impact of black leaf streak, lead to the re-emergence of the disease. The efficacy of *Trichoderma harzianum* isolate A-34 was studied on containers and production fields previously devastated by the disease. Inoculum was reproduced in Erlenmeyers with 20 g of sterilized rice and water at 1:1 (v/p), inoculated with 2 ml of *Foc* conidia from pure cultures. The reproduction of the antagonist were carried out on a sterilized solid substrate composed by a mixture 2:1 (w/w) of pulled rice residues with rice husk, sugarcane milled stalks residues and water in 1:1 (v/w) proportion. Treatments of control have been carried out in commercial plantations of El Sitio, Palma Soriano. *Trichoderma harzianum* A-34 showed marked inhibition of *Fusarium* wilt frequency and severity. In experiments in tanks the application of the biocontrol a week before the inoculation with *Foc* gave complete control of the pathogen. The applications of 20 g of a formulation of 2×10^9 conidia.mL⁻¹ of the biocontrol at planting and after removal of diseased plants, brought a control higher than 95% on plots of Burro CEMSA and FHIA 03 previously destroyed by the disease in conductible soils of commercial plantations.

7. Estudios sobre el control biológico del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora* burr. Winsl.) con extracto etérico de aceite de *Thymbra spicata* L.- bio sep 2000-B

Kamal Abo-Elyousr,¹ Wolfgang Zeller² y Oktay Yegen³

¹ Faculty of Agriculture, Department of Plant Pathology, Assiut University. 71256 Assiut, Egipto

² Federal Biological Research Centre, Institute for Biological Control. Darmstadt, Alemania

³ Akdeniz University, Faculty of Agriculture. Plant Protection Department 07070 Antalya, Turquía

Recientemente se han observado diversos aceites etéreos con efectos inhibitorios contra el fuego bacteriano como una alternativa posible al uso de productos químicos. Colegas turcos también probaron el aceite eté-

reo de *Thymbra spicata* en los últimos tiempos con cambios en la susceptibilidad del hospedante. Este aceite etéreo está registrado hoy en Turquía y en Alemania como Bio Zell-2000-B, un compuesto fortalecedor de la planta. En los primeros experimentos de campo en Turquía pudo observarse una reducción significativa de la pudrición de retoños en la variedad de pera Santa María con una eficacia de 64%. En un ensayo en Alemania sobre *Cotoneaster salicifolius*, bajo condiciones artificiales de infección, se pudo confirmar una eficacia de 84% durante la floración. En experimentos en Alemania en las variedades de manzana Idared y Boskoop, bajo condiciones de infección natural y artificial, se observaron reducciones de pérdida de la floración entre 52 y 43%. Se presentan además los primeros resultados del modo de la acción del aceite etéreo.

Studies on biological control of fire blight (*Erwinia amylovora* burr. Winsl.) with the etheric oil of *Thymbra spicata* L. - bio zell 2000-B

As a possible alternative to the use of chemicals against the Fire Blight bacterium, different etheric oils have been observed recently with inhibitory effects against this pathogen. In the last time Turkish colleagues have also been tested the etheric oil of *Thymbra spicata* on changes in host susceptibility. This etheric oil has been registered nowadays in Turkey and in Germany as Bio Zell-2000-B as a plant strengthener compound. In first field experiments in Turkey a significant reduction of shoot blight on the pear cultivar «Santa María» could be observed with an efficacy of 64%. In a trial in Germany on *Cotoneaster salicifolius*, under artificial infection conditions, an efficacy of 84% could be confirmed during blossom time. In experiments in Germany on the apple cultivars Idared and Boskoop under natural and artificial infection conditions a reduction of blossom blight between 52 and 43% was observed. Moreover first results on the mode of action of the etheric oil will be presented.

8. Control biológico del marchitamiento bacteriano de la papa causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) en Etiopía: I. Determinación de biovariedades de *R. solanacearum* en Etiopía

Fikre Lemessa y Wolfgang Zeller

Federal Biological Research Center for Agriculture and Forestry, Institute for Biological Control. Heinrichstr. 243, 64287 Darmstadt, Alemania

Ralstonia solanacearum es un patógeno muy destructivo que causa marchitez en la papa y muchas otras solanáceas en Etiopía. Un aumento en el número de informes indica que el control biológico de la marchitez bacteriana de la papa se podría alcanzar con el uso de microorganismos antagonistas. Para seleccionar los agentes antagonistas eficaces para el biocontrol de las cepas de *R. solanacearum* es necesario caracterizar la población de las cepas patógenas. Para ello se colectaron 62 cepas de plantas enfermas de papa, tomate y pimienta, y tubérculos de papa procedentes de las principales regiones productoras de Etiopía, que se caracterizaron culturalmente y se clasificaron fisiológicamente según esquemas de la clasificación de Hayward, basados en su capacidad de oxidar tres disacáridos (lactosa, maltosa y celobiosa), y tres hexoalcoholes (manitol, sorbitol y dulcitol). Los resultados de este estudio indicaron que todas las cepas de Etiopía producen colonias fluidas e irregulares con centro rojo y periferia blanquecina en medio cloruro de triphenyl tetrazolium (TZC) después de 48 h de incubación, que es típica a *R. solanacearum*. En otro medio ácido –casamino-peptona-glucosa (CPG)– las colonias eran irregulares, fluidas y blancas cremosas, y producen un pigmento marrón después de 48 h. De acuerdo con el esquema de clasificación de Hayward, 19 cepas se agruparon en el biovar I y 43 en el biovar II. Previos estudios hechos en Etiopía registraron solamente la presencia de biovar II de *R. solanacearum*, y del biovar I es este el primer informe de su población en el país.

Biological control of potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) in Ethiopia: I. Determination of *R. solanacearum* biovars from Ethiopia

Ralstonia solanacearum is a very destructive pathogen that causes wilt in potato and many other solanaceae crops in Ethiopia. An increasing number of reports have indicated that biological control of potato bacterial wilt could be achieved using antagonistic microorganisms. In order to select effective antagonistic biocontrol agents for the *R. solanacearum* strains, it is necessary to characterize population of pathogenic strains. Therefore, sixty two strains collected from wilted potato, tomato and pepper plants, and potato tubers from the major potato producing regions of Ethiopia were characterized culturally and classified physiologically according to Hayward's classification scheme, based on their capacity to oxidize three

disaccharides (lactose, maltose and cellobiose) and three hexose alcohols (mannitol, sorbitol and dulcitol). The results of this study indicated that all strains from Ethiopia produce fluidal and irregular colonies with red centre and whitish periphery on triphenyl tetrazolium chloride (TZC) medium after 48 hours of incubation which is typical to *R. solanacearum*. On another medium casamino acids-pepton-glucose (CPG) the colonies were irregular, fluidal, and creamy white and produce a brown pigment after 48 hours. Based on Hayward's classification scheme 19 strains were grouped to biovar I and 43 strains to biovar II. Previous studies from Ethiopia reported the availability of only biovar II of *R. solanacearum* and biovar I this is the first report from Ethiopian *R. solanacearum* population.

9. Elementos básicos para lograr un control efectivo de los hongos del suelo

Ana A. Fernández, Daniesyi Marín, Mercedes Sáenz, Rebeca Ramírez, Marleny González y Elda Ramos

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, afernandez@inisav.cu

Los hongos de suelo constituyen una de las principales causas de mortalidad de las plantas cultivables, para lo cual se han empleado diferentes métodos de control, pero sin éxito en la mayoría de los casos. Por tal motivo se ha recurrido a diferentes alternativas de lucha, entre ellas el control biológico, uno de los métodos más promisorios para disminuir los daños en la agricultura en general. No obstante, existen aspectos que son necesarios tener en cuenta para que el control fitosanitario sea un éxito, entre los que se consideran el tipo de organismo que afecta al cultivo, su forma de vida, la concentración del inóculo en el suelo, los métodos de detección y cuantificación del patógeno en suelo y otro sustrato, así como los métodos alternativos que se utilizan para su control, dentro de ellos el biológico y su efectividad según las condiciones del cultivo en que se aplica. Para realizar el control de varios organismos patógenos de suelo en las condiciones de Cuba se han realizado diversos estudios bajo condiciones de laboratorio y campo, con resultados significativos en especies de *Phytophthora*, *Pythium* y *Phoma*. Para cada una de ellas se demostró que es necesario realizar una prospección de los métodos más idóneos para su detección y cuantificación, así como realizar estudios ecológicos y epidemiológicos que permitan establecer un manejo de las enfermedades, donde se inserte el control biológico

como una de las vías más promisorias para disminuir las afectaciones en el sector agrícola de muchos cultivos de importancia económica.

Basic elements to achieve and effective control of soilborne pathogens

The soilborne pathogens are one of the main causes of crops mortality, in that way different control methods have been used without success in most of the cases. Biological control is one of the most promissory fight alternatives studied for diminishing damages in the agriculture. Nevertheless, there are aspects that are necessary to keep in mind to achieve a successful control as organism type that affects the crop, their life cycle, pathogens concentration in soil, detection methods and pathogens quantification in soil and substrate, as well as alternative methods used for their control, and their effectiveness according to the cultivation conditions on that biological control is applied. Several studies have been carried out to reach the control of soilborne pathogens under laboratory and field conditions, with significant results in species of *Phytophthora*, *Pythium* and *Phoma*. It was demonstrated that it is necessary to do a prospecting of most suitable methods for their detection and quantification for each one of them, as well as to carry out ecological and epidemiological studies that allow to establish a management of the illnesses, where biological control may be inserted as one of the most promissory ways to diminish the affectations in agricultural sector of many economic important crops.

10. Manejo agroecológico del tizón de fuego causado por el hongo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei en el cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.) en sistemas de organopónicos

Carlos A. Ferrer González, Maida Fumero Mollinedo, Beatriz Barranco Martínez y Graciela García Rivero

Laboratorio Provincial Sanidad Vegetal. Ave. Finlay Km 2½, Reparto Puerto Príncipe, Camagüey, Cuba, sanivecm@enet.cu; fumero2005@gmail.com

La necesidad de implementar una metodología de manejo de la enfermedad tizón de fuego del pepino causado por el hongo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei dentro del sistema de la agricultura sostenible, implica la búsqueda del conocimiento de aspectos relacionados con la incidencia, comportamiento y control

que permitan trazar estrategias en la solución de esta problemática. Se realizaron investigaciones para determinar la importancia de *C. cassiicola* en comparación con otros patógenos fúngicos presentes en el cultivo, su comportamiento y control en los organopónicos de la Empresa de Cultivos Varios de Camagüey y en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal durante el período 2001 al 2003. Los ensayos de sensibilidad de *C. cassiicola* frente a diferentes productos fungicidas en condiciones de laboratorio y campo mostraron mejores resultados de inhibición del crecimiento de las colonias y del control de la enfermedad con mancozeb PH 80% y benomyl PH 80% a 5 ppm y 2 kg/ha i.a. El control biológico con *Trichoderma harzianum* R. (cepa A-34) a dosis de 10 kg/ha y del producto natural hidrato de cal a dosis de 5 kg/ha en tratamientos foliares alcanzaron eficacias de 42 y 47% respectivamente, y lograron incrementar los rendimientos en 50%. Todos estos resultados fueron utilizados en la confección de estrategias de control de la enfermedad con vistas a ser incluidos en un esquema de manejo integrado para el control de *C. cassiicola* en el cultivo del pepino.

Agroecologic management of fire blair disease caused by the fungus *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei on cucumber crop (*Cucumis sativus* L.) in organoponic systems

The necessity to implement a management system of cucumber fire blair disease caused by the fungus *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei inside sustainable agriculture, implies the search of knowledge aspects related with the incidence, behaviour and control that allow tracing strategies in the solution of this problem. Investigations to determine the importance of *C. cassiicola* in comparison with other fungi pathogens present in cucumber crop, their behaviour and control in organoponics were carried up in the Empresa de Cultivos Varios from Camagüey and in Plant Health Provincial Laboratory, during the period 2001 to 2003. Sensibility tests of *C. cassiicola* with different fungicides in laboratory and field conditions showed better inhibition results of colonies growth, and disease control with mancozeb PH 80% and benomyl PH 80% at 5 ppm and 2.0 kg/ha ai. Biological control with *Trichoderma harzianum* R. (A-34 strain) in a concentration of 10.0 kg/ha, and the natural product Ca hydrate in dose of 5.0 kg/ha in foliar treatments reached effectiveness of 42 and 47%

respectively, and increased yields in 50%. All these results were used in the elaboration of control strategies for the disease, in order to being included in an Integrated Management scheme for the control of *C. cassiicola* in cucumber cultivation.

11. Evaluación de la aplicación de inóculos de *Trichoderma harzianum* y otras alternativas en la aceleración de la descomposición de la gallinaza en Mérida, Venezuela

María A. Durán, Rosaima García y Yelinda Araújo

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Mérida, Venezuela, rgcrepo@inia.gov.ve

El uso de gallinaza no compostada ha creado problemas fitosanitarios y de salud pública por el incremento de poblaciones de mosca doméstica en áreas agrícolas del estado de Mérida, Venezuela. Una de las alternativas que se percibe para resolver estos problemas es utilizar gallinaza compostada. Con el objeto de acelerar la descomposición de esta materia orgánica se evaluaron diferentes inóculos microbianos en las localidades agrícolas El Valle (1 995 msnm) y San Juan de Lagunillas (1 050 msnm), del estado de Mérida, en Venezuela. Se establecieron dos ensayos de campo bajo diseño en bloques al azar. Para cada compost se utilizaron 30 kg de gallinaza no compostada, más restos de cosechas en proporción 3:1. Los tratamientos evaluados fueron T_0 = testigo sin inóculo, T_1 = inóculos de siete cepas de *Trichoderma* líquida a la concentración de 1×10^9 UFC/mL, T_2 = suspensión de microorganismos efectivos (EM) autóctonos, T_3 = té de compost. Las evaluaciones se realizaron semanalmente, y se tomaron datos de humedad, pH, temperatura, olor y consistencia al tacto. Al inicio y al final del experimento se realizaron análisis químicos. Se encontró que el tratamiento basado en inóculos de siete cepas de *Trichoderma* logró acelerar la descomposición de la gallinaza, y reducir el tiempo en siete días con respecto al testigo. Asimismo la aplicación de microorganismos efectivos y el té de compost puntualmente permitieron acelerar este proceso. Por otro lado, el material compostado presentó altas concentraciones de N, P, K, Ca, Mg y M.O. asimilables por las plantas. La disminución del amoníaco en la gallinaza compostada impidió la atracción de las moscas para ovipositar, y el incremento de la temperatura evitó el mantenimiento de microorganismos fitopatógenos.

Evaluation of *Trichoderma harzianum* inocula application and other alternatives to the acceleration of hen dung decomposition in Mérida, Venezuela

The use of not composted hen dung has created phytosanitary and public health problems for the increase of domestic fly populations in agricultural areas of Merida State in Venezuela. One of the alternatives that are glimpsed to solve these problems is to utilize composted hen dung. In order to accelerate the decomposition of this organic matter, different microbians inoculums were evaluated in agricultural localities El Valle (1995 mosl) and San Juan de Lagunillas (1050 mosl) from Merida State, in Venezuela. Two field tests, in a completely randomized block design were established. Each compost was prepared with 30 kg of not compost hen dung plus harvest remains in proportion 3:1, evaluated treatment were T_0 = control without inoculums, T_1 = seven *Trichoderma* liquid strains at 1×10^9 UFC/mL of concentration, T_2 = native effective microorganism (EM) suspension, T_3 = compost tea. The evaluation was realized weekly, registering data of humidity, pH, temperature, smell and consistence by touching. Chemical analysis was realized at the beginning and in the end of experiment. *Trichoderma* treatments with inoculums of seven strains accelerate hen dung decomposition and reduce time in seven days in comparing with control. In that way application of effective microorganisms and tea compost, punctually permit to accelerate this process. On the other hand, composted material showed high concentrations of N, P, K, Ca, Mg and O.M. assimilable by plants. Ammoniac decrease in composted hen dung avoided fly attraction to put eggs, and temperature increase avoided phytopathogenic microorganism maintenance.

12. Control biológico del tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de campo

Felipe Rodríguez Maza y Marusia Stefanova Nalimova

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no.514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

El tizón temprano causado por *Alternaria solani* es una enfermedad común en el cultivo de la papa en Cuba. Para su control se utilizan diversos fungicidas quími-

cos de contacto y sistémicos, pero recientemente también se han hecho ensayos con microorganismos antagonicos como alternativa no contaminante. En este sentido se estudió la eficacia del producto biológico Glutucid, obtenido en Cuba, contra el tizón temprano de la papa en condiciones de campo. Se utilizó un diseño de bloques al azar y se ensayaron dos dosis del bioproducto, en comparación con el fungicida mancozeb como estándar de producción, y un testigo sin tratamiento. El producto biológico aplicado a la dosis de 3 kg/ha cada siete días logró reducir la incidencia del tizón temprano en 39,18% con respecto al testigo sin tratamiento, y con una efectividad técnica de 48,82%. Esta variante no mostró diferencia significativa respecto al estándar químico de contacto mancozeb (3 kg/ha), y fue seguida en su eficacia por la dosis de 2,5 kg/ha de Glutucid a igual intervalo de aplicación. Se propone continuar el estudio del efecto de la eficacia de este producto biológico en áreas de producción.

Biological control of early blight (*Alternaria Solani*, sorauer) in potato crop in field conditions

Early blight caused by *Alternaria solani* is a common potato disease. Classical control involves the use of both contact and systemic fungicides. However, antagonistic micro organisms have been tested recently as non contaminant alternatives. In that way the efficacy of biological product Glutucid to control potato early blight was assessed in field conditions in a completely randomized block design. The experiment included two doses of the product, the production standard fungicide mancozeb, and a control without any treatment. Biological product, sprayed every seven days at 3 kg/ha, achieved a decrease of disease incidence of 39.18% respect to the control with a technical efficacy of 48.82%; this treatment did not differ significantly to contact chemical standard mancozeb (3 kg/ha), and this efficacy was followed by Glutucid at 2.5 kg/ha used in the same application intervals. It is proposed to continue studying the effect of this bioproduct in production areas.

13. Uso de *Trichoderma* spp. para el mejoramiento del suelo en la agricultura orgánica en Costa Rica

Miguel Obregon Gómez y Xiomara Mata Granados

Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica, Costa Rica, m.obregon@costaricense.cr; x_mata@costaricense.cr

El suelo es un sistema complejo donde ocurre una serie de procesos necesarios que tienen influencia directa sobre la nutrición y sanidad de los cultivos. Desafortunadamente muchas de las prácticas agrícolas han provocado la compactación y generado suelos poco oxigenados, donde la microflora benéfica es poca y el metabolismo de las plantas disminuye drásticamente, ya que la transformación de la energía en la planta también es menor. Estos factores inducen un desarrollo anormal en la planta y susceptibilidad al ataque de patógenos que se encuentran en el suelo como *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia* spp. y aéreos como *Colletotrichum* spp. Experiencias prácticas con agricultores en Costa Rica demuestran que la adición al suelo de abonos orgánicos como vermicompost, bocashi y compost inoculados con *Trichoderma* spp. tienen un efecto positivo en la estructura y en la diversificación microbiana, y promueven la movilización de nutrientes y la supresión de patógenos. En material vegetativo de helecho hoja de cuero (*Rumora adiantiformis*) infestado con *Rosellinia* spp., al utilizar Bocashi (inoculado con *T. asperellum* (*T. harzianum*)) se observó mayor crecimiento en los ápices radiculares y rebrotes nuevos de rizoides en la mayoría de las puntas que inicialmente estaban enfermas. De igual forma la planta mostró mayor número de bastones y frondas de mejor apariencia, a diferencia del testigo, donde hubo pérdida total del material. En hortalizas de hoja como lechuga se ha observado que la adición de Vermicompost y posteriores aplicaciones de *T. viride* inhiben el desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que parasita los esclerocios y aumenta considerablemente los rendimientos; se ha observado en almácigos, que al utilizar compost inoculado con *Trichoderma* se inhibe en 100% el desarrollo de *Botrytis* spp. y *Rhizoctinia solani*, y hay un aumento de algunos nutrientes. Los resultados observados se atribuyen al efecto antagonista de *Trichoderma* sobre patógenos del suelo y aéreos, producción de factores reguladores de crecimiento, la solubilización de algunos micronutrientes, el incremento de la absorción de nutrientes a través del mejor desarrollo radicular y la eliminación de raíces enfermas. En conclusión, los sustratos orgánicos inoculados con *Trichoderma*, además de proveer materia orgánica y mejorar las características estructurales del suelo, facilitan los procesos bioquímicos, promueven la producción de sustancias reguladoras del desarrollo de las plantas e inhiben el desarrollo de enfermedades.

Use of *Trichoderma* spp. for soil microbiology improvement in organic agriculture of Costa Rica

The soil is a complex system where processes have direct influence on crop nutrition and plant health. Unfortunately, most of the agricultural soil management practices compact them producing poor oxygenation, low benefit microorganisms populations and metabolic disorders in plants. Those factors induce abnormal plant development and predisposition to the attack of soil borne plant pathogens as *Sclerotinia cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia* spp. But also, some air borne pathogens as *Colletotrichum* spp. are more aggressive under those conditions. In Costa Rica some practical trails done by farmers have shown that the addition of *Trichoderma* spp. to organic fertilizers like vermicompost, bocashi, and other composts, has a positive effect on the structure and microbial diversity that improves nutrient movement in plants and pathogen suppression. Vegetative material of leather fern (*Rumohra adiantiformis*) infected by *Rosellinia* spp., planted with bocashi amended with *T. asperellum* (*T. harzianum*), showed more tip root growth and new fern rhizomes. Also the plants produced higher number of fiddleheads and high quality fronds. Non-treated material showed a total loss. In some leaf vegetables as lettuce the use of vermicompost followed by *Trichoderma viride* application, inhibited *S. sclerotiorum* development on the crop, in this study sclerotia were infected and plant yields were increased. Compost previously inoculated with *Trichoderma*, inhibited 100% the *Botrytis* and *R. solani* infection, in nurseries, and plant nutrition was improved. The observed results are attributed to the antagonistic effect of *Trichoderma* on soil and airborne pathogens, production of growth regulators, solubilization of some microelements and better mineral absorption with the development of more roots and elimination of diseased roots. As conclusion, the organic substrates inoculated with *Trichoderma* spp., besides the organic matter source, they improve the structural characteristics of soil, promote the biochemical processes, increase the level of growth regulator substances and inhibit plant disease as well.

14. Aplicación de microorganismos antagonistas para la protección de enfermedades en los cultivos: la experiencia de Costa Rica

Miguel Obregón Gómez

Proyecto Alternativas al Bromuro de Metilo. PNUD-MINAE, m.obregon@costarricense.cr

El desarrollo de una agricultura más amigable con el ambiente, la resistencia de los patógenos a los pesticidas químicos y su alto costo ha promovido la búsqueda de agentes microbianos para el control de enfermedades en cultivos comerciales. Universidades, departamentos de investigación de compañías privadas y laboratorios privados trabajan en el desarrollo de productos microbianos para el control de enfermedades en los cultivos. Pequeñas compañías y agricultores privados también aplican microorganismos en unión a este esfuerzo. Los principales microorganismos que se aplican y estudian son los hongos de los géneros *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Lecanicillium*, los hongos nematófagos *Arthrobotrys* y *Paecilomyces*, las bacterias *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacia* y el actinomicete *Streptomyces griseoviride*. Estos microorganismos se usan para el control de enfermedades de suelo y foliares en flores, ornamentales de follaje, piña, banano, melón, fresas, helechos y vegetales como la lechuga, culantro y apio, entre otros. La aplicación de estos microorganismos permitió establecer el enfoque del control integrado de las enfermedades en muchos de los cultivos. Esto resultó en la reducción de pesticidas químicos y en algunos casos como en fresas, un productor discontinuó el uso de fungicidas químicos, sin reducir el rendimiento. Se han desarrollado técnicas novedosas para la aplicación de estos microorganismos, y el interés en su uso se ha incrementado entre los agricultores.

Application of antagonistic microorganisms for crop diseases protection: the Costa Rican experience

The development of an agriculture more friendly with the environment, pathogen resistance to chemical pesticides and the high pesticide cost, have promoted to seek for microbial agents for diseases control in commercial crops. Hence, universities, research departments within private companies, and private laboratories are working in the development of microbial products for crop diseases control. Also, some small companies and private producers are applying microbes and have joined to this effort. The main microorganisms that are applied and studied are the fungi: *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Lecanicillium*, the nematophagus fungi *Arthrobotrys* and *Paecilomyces*, the bacteria, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacia* and the actinomycete *Streptomyces griseoviride*. The antagonistic microorganisms are applied and studied for soil-borne plant and foliage diseases control on flowers,

ornamentals for foliage production, pineapple, bananas, watermelon, strawberries, ferns, and vegetables such as lettuce, coriander, and celery among others. The application of these microorganisms has allowed the implementation of the integrated diseased control approach in many crops. This has resulted in the reduction of chemical pesticides, and in some cases, such as strawberries, one producer discontinued the use of chemical fungicides without reducing yield. Novel techniques have been developed for the application of those microorganisms, and the interest in using them is increasing among growers.

15. Tratamiento fitosanitario con *Trichoderma* sp. para el control de patógenos en la reproducción masiva de plantas ornamentales

Reinel Brito Rodríguez

Centro de Convenciones Bolívar. Carretera de Maleza Km 1½, Santa Clara, Villa Clara, reinelbri@yahoo.es

El auge de la horticultura ornamental gana espacio, indudablemente por la frescura y delicada elegancia que aportan las plantas a cualquier lugar, pero las plagas y enfermedades compiten con su desarrollo y reproducción. En este trabajo se evaluó la efectividad de *Trichoderma* sp. para el control de patógenos del suelo en la producción de seis especies de plantas ornamentales a fin de promover su ornamentación y comercialización. Este trabajo se desarrolló en el área de producción de plantas ornamentales del Centro de Convenciones Bolívar de Santa Clara, donde se apreciaban síntomas de pudrición de la raíz y la base del tallo, así como de tallos, ramas y hojas de las plantas rastrojas que tocaban el suelo, las cuales también se afectaban por la pudrición de color pardo negruzca; al respecto se identificaron *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. y *Sclerotium rolfsii* en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. En el experimento se utilizaron los materiales para la producción de plantas como bolsas, tiestos y estaquilleros, sustrato previamente preparado y esquejes o posturas de plantas. El tratamiento consistió en la aplicación del agente biológico *Trichoderma* sp. de la cepa TS-3 en diferentes variantes, y se tuvieron en cuenta un testigo con sustrato, posturas y esquejes sin aplicación. Se prepararon muestras con sustrato tratado y aplicación del producto durante todo el desarrollo del cultivo. *Trichoderma* resultó efectivo para el control de patógenos, con disminución de la severidad de este tipo de enfermedades de 100% en el caso de las bolsas y tiestos, a los 45 días de haber realizado los

tratamientos. Para producir 300 plantas con el uso de *Trichoderma*, desde el punto de vista fitosanitario solo se gastarían 46.03 pesos. Se concluye que los resultados con este biocontrolador son iguales a la utilización de triazoles, con la ventaja que es económicamente más barato y no contaminante al ambiente.

Phytosanitary treatments with *Trichoderma* sp. for pathogens control in massive reproduction of ornamental plants

The height of ornamental horticulture advances doubtlessly because the freshness and delicate elegance that plants contribute to any place, but plagues and diseases reduce the development and reproduction. The effectiveness of *Trichoderma* sp. for the control of soil pathogens on the production of six ornamental plants species was evaluated in this work, in order to promote their commercialization. The work was developed in the production area of ornamental plants in Bolivar Convention Center of Santa Clara, where symptoms of foot and root rot, also stems, branches and leaves of repent plants were observed, these were affected too by brown-blackish rot; in that way were identified *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. and *Sclerotium rolfsii* in soil in Plant Health Provincial Laboratory. Materials for plants productions as bags, pots and supporting stakes, substratum previously prepared and stem cuttings or seedlings were used in the experiment. Treatment consisted in the application of biological agent *Trichoderma* sp. strain TS-3 in different variants and controls without treatment. Samples with treated substratum and product applications were prepared throughout the development of the experiment. *Trichoderma* was effective for control of pathogens, with 100% of severity diminution in this type of diseases for the case of bags and pots, after 45 days to have realized treatments. In order to produce 300 plants with the use of *Trichoderma* only 46.03 pesos would be spent. As a conclusion results with this biocontrol are equal to the use of Triazols, with the advantage that is economically cheaper and no polluting to environment.

16. Uso del *Rhizotrich* en la protección de semillas de frijol

Antonia M. Hernández Valdés, Génova E. Martín Triana y Marleny Alemán Carrazana

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera de Malezas Km 2½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 50100, lpssvc@eimavc.co.cu

El frijol constituye uno de los alimentos que más consume el pueblo cubano. Se cultiva con facilidad debido a las condiciones favorables del suelo y el clima. La presencia de patógenos en la semilla es de importancia para determinar la calidad para su comercialización. Muchos autores refieren que los hongos del género *Trichoderma* son altamente efectivos en la lucha contra patógenos del suelo, y su uso en la peletización de la semilla reduce la mortalidad en postemergencia. Por otra parte, la utilización del *Rhizobium phaseoli* para permitir la fertilización nitrogenada del cultivo es una alternativa que actualmente realiza la agricultura cubana. De 1995 al 2005, en el Laboratorio de Bacteriología del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Villa Clara, se estudió el efecto combinado de los microorganismos *Rhizobium phaseoli* y *Trichoderma viride* en la peletización de las semillas de frijol. El trabajo contó con una primera etapa de ensayos de compatibilidad en laboratorio, otra de pruebas de campo y una tercera de generalización en la producción del Rhizotrich, nuevo producto biológico para la protección de las semillas de frijol. Este biopreparado se ha utilizado por productores independientes, Cooperativas de Producción Agropecuarias (CPA) y Cooperativas de Créditos y Servicios (CCS), en los que se comprobó que estos dos microorganismos en conjunto refuerzan la acción protectora e inhiben el desarrollo de hongos patógenos del suelo, lo que disminuye la mortalidad y se estimula la germinación y el rápido crecimiento de la planta. Se propone la dosis que ha de aplicarse, así como la forma de utilización del biopreparado.

Use of *Rhizotrich* for protection of bean seeds

Bean constitutes a food of more consumption by Cubans where it is cultivated with facility due to the favorable conditions of soil and climate. The presence of pathogens in seed is important to determine its quality for commercialization. Many authors refer that fungi of genus *Trichoderma* are highly effective in the fight against soil pathogens and its use in seed-pellet elaboration reduces post-emergent mortality. On the other hand the use of *Rhizobium phaseoli* to allow nitrogen fertilization of cultivation is an alternative utilized in Cuba at present. The combined effect of microorganisms *Rhizobium phaseoli* and *Trichoderma viride* on pellet formation of bean seeds was studied in Bacteriology Laboratory of Plant Health Provincial Laboratory of Villa Clara during years 1995 to 2005. The work was developed with a first stage of

compatibility tests in laboratory, a second one of field tests, and a third of generalization in *Rhizotrich* production, a new biological product for the protection of bean seeds. This bioproduct has been used by independent producers, Cooperative of Agricultural Production (CPA) and Cooperatives of Credits and Services (CCS), where were verified that the union of these two microorganism reinforce protective action, inhibit the development of soil pathogenic fungi, which reduce mortality and stimulate germination and rapid growth of plants. Application dose and the way to use bioproduct are proposed.

17. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus* en el rendimiento de lechuga orgánica

Joel Méndez

Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. Carretera a Danlí Km 30, Honduras, jmendez@zamorano.edu

El uso de *T. harzianum* y *P. lilacinus* en varios tipos de hortalizas incrementa la absorción de nutrientes a través del mejoramiento y desarrollo radicular, promueve la disponibilidad de nutrientes necesarios para la planta y protege el sistema radicular del ataque de hongos patógenos y plagas. Se evaluó la aplicación de estos hongos en la siembra y el trasplante de lechuga orgánica para determinar el sistema de manejo con mayor rendimiento, mejor calidad de lechuga y el más rentable a menor costo. Los tratamientos fueron *Trichoderma* en siembra-*Paecilomyces* en trasplante y viceversa, *Trichoderma* en siembra-*Trichoderma* en trasplante, *Paecilomyces* en siembra-*Paecilomyces* en trasplante, *Trichoderma* + *Paecilomyces* en siembra-*Trichoderma* + *Paecilomyces* en trasplante, y el testigo, al cual no se aplicó nada. Los productos se incorporaron manualmente al medio en bandejas de germinación en la fase de siembra, y a los 19 días después de la siembra se realizó el trasplante. Se cosechó a los 37 y 41 días después del trasplante. Los mejores tratamientos fueron las combinaciones de *Trichoderma* en siembra-*Paecilomyces* en trasplante, *Paecilomyces* en siembra-*Trichoderma* en trasplante y *Paecilomyces* en siembra-*Paecilomyces* en trasplante, que tuvieron más lechugas cosechadas, lechugas comerciales y mayor peso de lechugas cosechadas y comerciales, respectivamente. No

se obtuvo diferencia significativa en la longitud de la raíz, pero hubo mayor rendimiento de peso de lechuga comercial en los tratamientos con mayor número de nódulos por planta. Estos fueron *Trichoderma* en siembra-*Paecilomyces* en trasplante y *Paecilomyces* en siembra-*Trichoderma* en trasplante. El tratamiento más rentable fue la aplicación de *Trichoderma* en siembra-*Paecilomyces* en trasplante, con una tasa de retorno marginal de 42 y una relación beneficio costo de 0,20.

Effect of *Trichoderma harzianum* and *Paecilomyces lilacinus* application on organic lettuce yield

The use of *T. harzianum* y *P. lilacinus* in several types of vegetables increases nutrients absorption through root improvement and development, it promotes disposability of necessary nutrients for plants and protects root system to the attacks of pathogenic fungi and plagues. The application of these fungi at sowing and transplant in organic lettuce was evaluated, in order to determine the management system with superior yield, best quality of lettuce and most profitable with lower cost. Treatments were: *Trichoderma* at sowing-*Paecilomyces* at transplant and viceversa, *Trichoderma* at sowing-*Trichoderma* at transplant, *Paecilomyces* at sowing-*Paecilomyces* at transplant, *Trichoderma*+*Paecilomyces* at sowing-*Trichoderma*+*Paecilomyces* at transplant and the control without application. Products were incorporated to substrate in germination trays manually at sowing, transplanted was realized 19 days later and lettuce harvest was carried out 37 and 41 days after transplanting. Best treatments were the combinations of *Trichoderma* at sowing-*Paecilomyces* at transplant, *Paecilomyces* at sowing-*Trichoderma* at transplant and *Paecilomyces* at sowing-*Paecilomyces* at transplant which produced more harvested lettuces, commercial lettuces and greater weight of harvested and commercial lettuces, respectively. No significant difference in root length was observed, but there was greater commercial lettuce weight in treatments with greater number of nodules for plants, these were *Trichoderma* at sowing-*Paecilomyces* at transplant and *Paecilomyces* at sowing-*Trichoderma* at transplant with a rate of marginal return of 42 and a relation benefit cost of 0.20.

CONTROL BIOLÓGICO DE NEMATODOS CON MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS

1. *Trichoderma*, alternativa para el control biológico de nematodos dentro de una agricultura sostenible

Juan M. Pérez Draguiche,¹ Carlos Pérez Navarro,⁴ Oneida Acosta,² Hortensia Gandarilla,² Alina Pérez,² Rubén C. Rodríguez,² Mercedes Basterrechea,² Emilio Fernández,³ Marusia Stefanova,³ Nerelys Robaina,¹ Noris Olivares,² Teresa Santana,² Marilú González,² José Lluvides,¹ Luz J. Devesa,² Estela Gutiérrez¹ y Carlos Andreu⁴

¹ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera de Malezas Km 2½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 50100. lpsvvc@eimavc.co.cu

² Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana

³ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. By 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

⁴ Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). Universidad Central Martha Abreu. Carretera a Camajuani Km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

Varios autores coinciden al afirmar que el hongo antagonista *Trichoderma* spp. es un biorregulador efectivo contra nematodos del género *Meloidogyne*, donde se pone de manifiesto la acción de sus toxinas e hifas. Este comportamiento se estudió por siete años con la utilización de cepas de *T. harzianum* y *T. viride*, el cual se inició en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Villa Clara, donde se evaluó la acción del hongo sobre la eclosión de huevos y la población de nematodos en suelo inoculado e infestado, en comparación con el efecto de otros productos de acción nematocida, y se concluyó con la extensión a varias provincias en organopónicos, plantaciones de café y viveros de ornamentales. Se comprobó que el biopreparado reduce la eclosión de huevos y la movilidad de larvas a concentraciones mayores de 10^8 conidios.g⁻¹ y que la efectividad técnica de las aplicaciones alcanza valores elevados, con dosis mayores de 10^{13} conidios.ha⁻¹, cuando las poblaciones del parásito no exceden de grado 3. El tratamiento con *Trichoderma* dio lugar a un follaje más exuberante en plantas de tomate que el testigo estándar, y fue más eficaz, aunque no significativamente,

lo que pudiera atribuirse al efecto estimulador del crecimiento del hongo. La eficacia del hongo en el suelo se incrementa a medida que se establece. Los resultados de la generalización se correspondieron con los experimentales, y se observaron respuestas similares en las diferentes cepas empleadas. Se obtuvo un buen comportamiento de los indicadores de eficiencia económica, ya que se lograron incrementos de los rendimientos que generaron importantes ganancias en cultivos de pepino y habichuela, entre otros.

Trichoderma, an alternative for nematodes biocontrol in sustainable agriculture

As some authors have affirmed antagonist fungus *Trichoderma* spp. is an effective biorregulator against *Meloidogyne* sp nematodes, where the action of its toxins and hyphae is revealed. This behavior was studied using *T. harzianum* and *T. viride* strains during seven years, it began at Villa Clara Plant Health Laboratory in Cuba, where the fungus action on the eggs eclosion and nematode population in inoculated and infected soil was evaluated, comparing with the effect of other products of nematocidal action, and it concluded with the extension to different provinces in organoponic areas, coffee plantations and ornamental nurseries. Bioproduct reduced eggs' eclosion and larvae movements at concentrations higher than 10^8 conidia.g⁻¹ and technical effectiveness of the applications reached high values, with doses over 10^{13} conidia.ha⁻¹, when parasite populations do not exceed grade 3. Treatment with *Trichoderma* spp. promoted more exuberant foliage in tomato plants that the standard and was more efficient but, not significantly, what could be attributed to growing stimulated effect of fungus. Fungus efficacy in soil increases as it establishes in there. The generalization results corresponded to experimental ones and similar responses were observed with different strains employed. A good behavior of economic efficiency indicators was obtained since increased yields were achieved, which generated important profits in cucumber and kidney bean, and others crops.

2. *Bacillus thuringiensis*: un agente de biocontrol efectivo para *Meloidogyne incognita* en Cuba

María E. Márquez,¹ Emilio Fernández,¹ Jorge Ibarra,² Orietta Fernández-Larrea¹ y Rubén Rodríguez³

¹ Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzadas del IPN. Km 9.6 del Libramiento Norte Carretera Irapuato, León, Apartado Postal 629, México

³ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Central Km 111, Gelpis, Matanzas, Cuba

Pocos son los productos bionematicidas que se comercializan a nivel mundial, y la mayoría de los que se han desarrollado son de origen fúngico. En el presente trabajo se demuestra la eficiencia de un producto de *B. thuringiensis* en forma de fluido concentrado efectivo contra *M. incognita*, al provocar efectos tóxicos estables sobre la eclosión de los huevos del nematodo. El trabajo llevó una primera etapa de selección y evaluación de cepas *in vitro* de *B. thuringiensis*. Los estudios de caracterización molecular de la cepa seleccionada refieren un patrón de proteínas y plásmidos diferentes en relación con las cepas que se emplean para el control de lepidópteros y ácaros, así como la morfología de los cristales parasporales. El tratamiento bajo condiciones semicontroladas por el método de planta indicadora mostró una disminución significativa de la formación de nódulos con respecto al testigo no tratado. Se observó que la actividad nematocida estuvo dada por toxinas intracelulares y extracelulares. La efectividad del bionematicida se comprobó en cuatro casas de cultivo con índices de infestación inicial entre 3 y 3,5, donde se evaluó el momento y la dosis de aplicación sobre suelo ferralítico rojo en el cultivo de tomate. Los resultados en condiciones de producción muestran que la aplicación del producto es económicamente rentable y disminuye el costo unitario de producción, lo que hace considerarlo como una alternativa promisoriosa de uso para la agricultura cubana.

Bacillus thuringiensis: an effective biocontrol agent against *Meloidogyne incognita* in Cuba

There are few bionematicidal products available in the world market and most of them have been formulated with fungal agents as active ingredients. The efficacy of a *Bacillus thuringiensis* aqueous concentrate product against *M. incognita* is demonstrated in this paper because its stable toxic effects on nematode eggs

eclosion. An initial phase of *B. thuringiensis* strains selection an evaluation *in vitro* was realized. The molecular characterization studies of selected strain exhibited a differing both protein and plasmid patterns distinguishable of those exhibited for the control of lepidoptera and mites, including the morphology of parasporal crystals. The treatment of nematode infested soils with *B. thuringiensis* applied under semi-controlled environment showed a significant decrease in relation to gall formation when compared with the non treated control. Nematicidel activity was due to extracellular and intracellular toxins. Product effectiveness was proved in four protected crop systems for tomato production on red ferralytic soil with initial infestation levels ranging 3.0 and 3.5, where both application dose and timing were assessed. The results under production conditions showed that product application is economically sustainable and decrease the unit production cost which arises as a promising alternative for integrated nematode management systems in Cuban agriculture.

3. Evaluación de la efectividad de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Meloidogyne incognita* en condiciones de producción en casas de cultivo

Marisel León Sánchez,¹ Rubén C. Rodríguez Barrera,¹ Juan C. Castellanos,¹ María E. Márquez,² Yeny Tápanes Cabrera,¹ Juan C. Camacho¹ y Jesús Pedroso³

¹ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Central Km 111, Gelpis, Matanzas, Cuba

² Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

³ Empresa de Cultivos Varios Mocha, Matanzas, Cuba

El tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) se considera una de las hortalizas más susceptibles a los daños por nematodos. Estos varían desde la disminución de los rendimientos hasta la pérdida total del cultivo, ya sea en semilleros o en plantación. Estimados mundiales de finales de la década pasada indicaron un promedio de 20,9% de pérdidas. Se realizaron experimentos con el objetivo de demostrar la efectividad de algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Meloidogyne incognita* y evaluar en condiciones de producción la efectividad biológica de cepas prometedoras. El experimento se ejecutó en cuatro Casas de Cultivo de la UBPC Mocha, sobre suelo ferralítico rojo (arcilla Matanzas) en la variedad Aro 84-84, con sistema de riego por goteo de Netafín. Se determinó el nivel de infestación inicial y se

realizaron tres aplicaciones de la cepa 25 de *B. thuringiensis*. Se confirmó que esta cepa es efectiva para el control de *M. incognita*, y que la dosis de 30 L/ha presenta diferencias significativas con el resto de los tratamientos en rendimiento, efectividad en la reducción del nivel de infestación, en el costo unitario (pesos/t), en ganancia (pesos/ha) y en la rentabilidad. Se apreció que cuando no se realiza el control del nematodo, las pérdidas oscilan alrededor de 4 000 pesos/ha en un ciclo del cultivo.

Evaluation of *Bacillus thuringiensis* effectiveness for the control of *Meloidogyne incognita* in production conditions of culture houses

Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) is considered one of the vegetables most sensible to damages caused by nematodes, which varies from a decrease of the yield to total loss of the crop both in seed plots and plantation; world values from the end of the last decade indicated a loss average of 20.9%. The effectiveness of some *Bacillus thuringiensis* strains for the control of *Meloidogyne incognita* was studied in order to evaluate the biological effectiveness of promising strains, in production conditions. The experiment was realized in four culture houses of UBPC Mocha of Matanzas, on Red ferralitic soil sowed with the variety Aro 84-84, with drip irrigation system Netafin. The initial infected level was determined and three applications of strain 25 of *Bacillus thuringiensis* were realized. It was confirmed that this strain was effective for the control of *M. incognita* and a dose of 30 liters per ha presents relevant differences with the rest of the treatments in yield, effectiveness in the decrement of the infestation level, in the unit cost (pesos/ton), in profit (pesos/ha) and profitability. It was arrived to the conclusion that when nematode control is not made, losses are about 4 000 pesos/ha in a crop cycle.

4. Ensayos con las bacterias entomopatógenas *Xenorhabduas poinarii* y *Photorhabdus luminescens* para el control biológico de *Meloidogyne incognita*

Yirina Valdés, Antonio A. Lovaina, Hannah Dupla y Mercedes Escobar

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. By 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

Estudios realizados por varios investigadores han demostrado que las bacterias simbiotas de nematodos entomopatógenos tienen la capacidad de producir di-

versos metabolitos con actividad antibiótica, antifúngica, insecticida y nematocida, entre otras, que les confieren importancia para la agricultura. La actividad nematocida estimula especialmente a los investigadores a estudiar las posibilidades de insertar estas bacterias simbiotas entre las alternativas para el manejo integrado de nematodos. En este trabajo se evaluó el efecto de *Xenorhabdus poinarii* y *Photorhabdus luminescens* sobre el nematodo de agallas *Meloidogyne incognita*. Cada especie de bacteria se cultivó en caldo triptona-soya-levadura, y mediante centrifugación se eliminaron las células de los cultivos. Los sobrenadantes se inocularon en bolsas de suelo infestado por *M. incognita* grado 3 y sembradas con plántulas de pepino para determinar su efecto sobre el agallamiento causado por este nematodo. Además se evaluó la actividad nematocida de los metabolitos sobre masas de huevos y juveniles del segundo estadio de *M. incognita* en condiciones *in vitro*. *P. luminescens* y *X. poinarii* liberaron metabolitos al medio de cultivo que previnieron el agallamiento en las plantas de pepino, que también resultaron tóxicos para el 100% de las larvas de *Meloidogyne* e inhibieron totalmente la eclosión de las ootecas, las cuales se observaron necróticas y granuladas.

Assays with entomopathogen bacteria *Xenorhabduas poinarii* and *Photorhabdus luminescens* for biological control of *Meloidogyne incognita*

Studies made by several scientists have demonstrated that symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes are able to produce metabolites with antibiotic, antifungal, insecticide and nematocidal effect, and many others properties with great importance for agriculture. Nematocidal activity specially stimulates investigators for studying possibilities to insert these bacteria as alternative for integrated nematodes management. The effect of *Xenorhabdus poinarii* and *Photorhabdus luminescens* over *Meloidogyne incognita* galls nematode was evaluated in this work. Each bacteria species was cultivated in triptone-soy-yeast liquid medium and cells were eliminated from cultures by centrifugation. Supernatants were used to inoculate soil infected by *M. incognita* of level 3 contained in bags, which were sowed with cucumber plants to determine its action over the galling caused by nematodes. Nematocidal activity of metabolites over *M. incognita* egg masses and second state juvenile *in vitro* conditions was evaluated too. *P. luminescens* and *X. poinarii* released metabolites into culture medium that prevent galling

in cucumbers plants. These metabolites also result toxic for 100% of *Meloidogyne* larvae and inhibited completely oothecae eclosion, which were observed necrotic and granulated.

5. Uso del bionematicida HeberNem en los cultivos protegidos

Jesús Mena,¹ Eulogio Pimentel,¹ Armando T. Hernández,¹ Licette León,¹ Yamilka Ramírez,¹ Idania Wong,¹ Marieta Marín,¹ Juan D. Mencho,² Manuel Hernández,³ Antonio del Castillo,⁴ Ileana Sánchez,¹ Manuel Expósito,¹ Gilda Jiménez,⁵ Mario Fleitas,² Graciela García,⁶ Nemecio González,¹ Jesús Zamora,¹ Eladio Zalazar,¹ Vladimir Olivera,¹ Gustavo Rodríguez,¹ Bárbaro Álvarez,¹ Hubert Dandie,¹ María del C. Sánchez,¹ Rafael Pimentel,¹ Carlos Pérez,¹ Oscar Compte,¹ Madelyn Sardiñas,¹ Lidiana Martínez,¹ Alaín Moreira,¹ Diasmarys Salinas,¹ Carmen García,¹ Roberto Basalto,¹ Carlos Borroto¹ y Luis Herrera¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. P.O.Box 387, CP 70100, Camagüey, Cuba, jesus.mena@cigb.edu.cu

² Universidad de Camagüey, Cuba

³ Grupo Empresarial Frutícola, Cuba

⁴ Instituto de Suelos, Camagüey, Cuba

⁵ Instituto Superior Pedagógico José Martí, Cuba

⁶ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey, Cuba

HeberNem es un bionematicida formulado en una suspensión líquida de un microorganismo antagonista de nematodos y de varios hongos. Para obtener este producto se desarrollaron metodologías de trabajo *in vitro*, que permitieron estudiar 158 cepas de bacterias. De estas se seleccionó la identificada como *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924, por ser la más eficiente en el biocontrol de nematodos (entre ellos *Meloidogyne incognita*), por su bajo nivel de riesgo ambiental y por sus posibilidades de escalado productivo. El mecanismo de acción de esta cepa se debe a las quitinasas y el sulfuro de hidrógeno que produce de manera simultánea. Con el uso de HeberNem se logró una eficiencia técnica superior a 75% en el control de fitonematodos en 30 ha de tomate, melón, pepino y pimiento en los cultivos protegidos. Para obtener buenos resultados con HeberNem los suelos deben contener al menos 3% de materia orgánica disponible y 12% de materia orgánica total, además de no presentar residuos de productos químicos que pudieran afectar las poblaciones de la bacteria y por tanto su acción sobre los nematodos. Los estudios de las interacciones de HeberNem con otros microorganismos de biocontrol, biofertilizantes y con plaguicidas químicos, muestran resultados favorables al igual que las 18 pruebas toxicológicas y eco-

toxicológicas, que lo ubican como un producto no tóxico y protector del medio ambiente. Actualmente se incluye a HeberNem en un manejo integrado, con el objetivo de sustituir los tratamientos con productos químicos nocivos tales como bromuro de metilo, Basamid y Agrocellone.

The use of bionematicide HerberNem in protected crops

HerberNem is a bionematicide formulated in a liquid suspension from an antagonist microorganism of nematodes and some other fungi. Work methodologies *in vitro* were developed to obtain this product which allowed to test 158 bacteria strains, from these *Tsukamurella paurometabola* strain C-924 was chosen because it was the most efficient in biological control of nematodes (among them *Meloidogyne incognita*), its low level of environmental risky and its scaling-up possibilities. The action mechanism of this strain is due to chitinases and hydrogen sulfide that produces in simultaneous way. A technical efficiency higher than 75% in phytonematode control has been developed using HeberNem in 30 ha of tomato, watermelon, cucumber and pepper protected cultivations. To obtain the right results using HeberNem, soils must contain at least 3% of available organic matter and 12% of total organic matter; besides soils should be out of chemical residues which could affect populations of this bacteria and therefore its action on nematode. Researches in HerberNem interaction with other biocontrol and biofertilizer microorganisms and chemical pesticides show favorable results, like the 18 toxicological tests that locate HerberNem as a nontoxic and protective environment agent. HeberNem is included in an integrated management at the moment, with the purpose to substitute treatments with harmful chemical products such as methyl bromide, Basamid and Agrocellone.

6. Klami C: bionematicida para el control de nematodos formadores de agallas en sistemas de producción de hortalizas

Leopoldo Hidalgo,¹ Ana Puertas,² Belkis Peteira,¹ Nivian Montes de Oca,¹ Jersys Arévalo,¹ Miguel A. Hernández,¹ Mayra Rodríguez¹ y Brian Kerry³

¹ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de las Lajas, Apdo. 10, La Habana

² Universidad de Granma. Apdo. 21, Bayamo, Granma, Cuba

³ Nematode Interaction Unit, Rothamsted Research, Harpenden, Herts AL5 2JQ, Inglaterra

Pochonia chlamydosporia es un hongo con gran variabilidad genética, y sus aislamientos individuales requieren de una rigurosa selección como potenciales agentes de control biológico. La cepa IMI SD187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* redujo significativamente en Cuba las infestaciones por nematodos en sistemas de producción de vegetales. Esta se ha reproducido en un proceso bifásico, y se ha implementado una guía de buenas prácticas que permite la evaluación del sistema de control de la calidad diseñado para *P. chlamydosporia*. La consistencia del producto KlamiC obtenido a partir de la cepa IMI SD187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* se demostró a través de los datos colectados en la producción de 18 lotes, durante tres años en la Planta Piloto del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. El producto alcanza un promedio de 91% de germinación de clamidosporas, una concentración de $2,2 \times 10^7$ clamidosporas.g⁻¹ de producto y 75% de parasitismo en huevos. KlamiC puede aplicarse a una concentración de 5 000 clamidosporas.g⁻¹ de suelo. Es esencial que se aplique antes de la plantación de un cultivo que permita el crecimiento del hongo en la rizosfera, aunque el hongo es capaz de establecerse en suelo a partir de una aplicación simple anual, y se mantiene activo sobre un sistema de rotación apropiado. En un ciclo de cultivos que incluyó (I aplicación) tomate-tomate-colhabichuela (II aplicación) tomate-tomate, durante 24 meses, la infección de los huevos de nematodos formadores de agallas se incrementó desde 30% en el cultivo inicial hasta 80% en el cultivo final, y el número de J2 en suelo se redujo en más de 90% en el suelo tratado. La PCR en tiempo real se utilizó para monitorear y cuantificar el hongo después de su aplicación, y se corroboró la permanencia activa del hongo en el suelo. Las pruebas toxicológicas y ecotoxicológicas se realizaron según los requerimientos de EPA, y se demostró la seguridad del uso del producto. Se continúan estudios dirigidos a mejorar la formulación del producto final y la disminución de las dosis de aplicación. Este trabajo fue financiado por DFID (Inglaterra) y el proyecto MiCoSPA de la Comunidad Europea (ICA-2001-10185).

Klami C: bionematicide for the control of root-knot nematodes on vegetable production system

Pochonia chlamydosporia is a fungus of great genetic variability and individual isolates require careful selection for their potential as biological control agents.

Strain IMI SD187 of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* significantly reduced nematode infestations in production systems of vegetable in Cuba. It has grown in a biphasic process and it has made a Good Practice Guide that led the evaluation of the quality control system designed for *P. chlamydosporia*. The consistency of the product KlamiC, obtained from strain IMI SD 187 of *P. chlamydosporia* var. *catenulate*, was demonstrated by the data collected in the production of 18 batches, during three years, in Pilot Plant at CENSA. The obtained product have a chlamydospore germination average of 91%, a concentration of 2.2×10^7 chlamydospores.g⁻¹ of product and 75% of eggs parasitism. KlamiC may be applied at 5000 chlamydospore per g of soil. It is essential to apply it before crop plantation in order to permit the fungus growth in the rhizosphere though it is able to establish in soil from a single application in a year, and in appropriate crop rotations system it remained active. In one cropping cycle that includes (I application) tomato-tomato-cabbage-bean (II application) tomato-tomato during 24 month, the infection of root-knot nematodes eggs increased from 30% in the initial crop to more than 80% in final crop, and the numbers of J2 in soil decreased more than 90% in treated soil. Real time of PCR was used to monitor and quantify the fungus after the application, and their active presence in soil was corroborated. Toxicology and ecotoxicological tests for the fungus have been completed according to EPA standards and the security of the product was demonstrated. More researches in order to improve the product formulation and to reduce rates of fungus application are in progress. This work has been financed by DFID (UK) and the project MiCoSPA of European Community (ICA-2001-10185).

7. Evaluación biológica del Nemacid en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la CPA 17 de Mayo de la provincia de La Habana

Eulalia Gómez Santiesteban, Yoandry Rodríguez Romero, Rosa M. Álvarez Fíntela, Yusmila Guevara Verdecia, Teresa Lemes Rodríguez, Joel Hernández Barrios y A. N. San Juan Rodríguez

Dirección de Productos Biológicos (ICIDCA, CUBA-10). Pablo Noriega, Quivicán, La Habana, cuba10@enet.cu

Aun cuando en Cuba no se cuenta con amplios registros acerca de pérdidas estimadas provocadas por nematodos en los sistemas de cultivos protegidos (SCP), numerosos productores manifiestan que uno de los

principales problemas fitosanitarios presentes en esta tecnología lo constituye la incidencia de los nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.), el cual causa pérdidas de 40% de la cosecha en tomate. En consideración a lo planteado y las dificultades para controlar esta plaga, se hace necesario dirigir los esfuerzos a la producción y utilización de controladores de nematodos de origen biológico. La Dirección de Productos Biológicos (CUBA-10) ha desarrollado la tecnología de producción del Nemacid, producto en polvo constituido principalmente por proteasas alcalinas, obtenido a partir de los efluentes de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*, mediante evaporación y secado en presencia de sulfato de amonio. El producto se ha evaluado con resultados satisfactorios en cultivos de remolacha, pepino y tomate, en organopónicos y casas de cultivos en la provincia de La Habana. En el presente trabajo se muestran los resultados de la evaluación biológica de este producto en sus pruebas de extensión, en casas de cultivos protegidos en la Cooperativa de Producción Agraria 17 de Mayo, del municipio de Quivicán, en el cultivo de tomate, variedad Aro. Se alcanzó una efectividad de 100% después de cuatro aplicaciones a la dosis de 15 kg/ha, y un óptimo desarrollo vegetativo del cultivo en cuanto a la floración y crecimiento y cantidad de frutos.

Biological evaluation of Nemacid in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in CPA 17 de Mayo of Havana province

Although there are not records about the estimated losses due to nematodes in greenhouses (Protected Crops Systems) in Cuba, many farmers have expressed that the main phytosanitary problem in those systems is associated with root gall nematodes (*Meloidogyne* spp.) which causes about 40% of losses in tomato. For this reason and the difficulties to control this pest is necessary the production and utilization of biological nematicides. The Biological Products Division (CUBA 10) have developed a technology for the production of a bionematicide Nemacid, which is mainly composed by alkaline proteases and was obtained from the efluentes of submerged fermentation culture of the fungus *Verticillium lecanii*, through evaporation and dried in presence of ammonium sulphate. The product has been evaluated in tomato, beet and cucumber with very good results in Havana provinces. Results of the biological

evaluation of this product in extensive phase, on tomato Aro in greenhouses of CPA 17 de Mayo, in Quivicán are shown in the present work. An effectiveness of 100% was obtained after four applications of the product, using a dose of 15 kg/ha, and it was reached an optimal vegetative development, according flowering and growth and quantity of fruits.

8. Consideraciones sobre los agentes de control biológico de nematodos

Emilio Fernández González

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, efernandez@inisav.cu

La utilización de microorganismos para el control de plagas agrícolas ha encontrado grandes posibilidades, dadas las coyunturas actuales del incremento en el interés sobre la seguridad ambiental y la inocuidad de los alimentos. Los hongos y bacterias que cohabitan en los mismos ambientes que los nematodos fitoparásitos son potencialmente capaces de regularlos, y mantener un determinado equilibrio ecológico, no obstante aun su utilización no haber tenido todo el éxito deseado. Esta situación puede deberse a diferentes causas como un bajo nivel de antagonismo entre el nematodo y el agente de control biológico (acb), la elevada especificidad de algunos acb y el alto nivel reproductivo de algunas especies de nematodos. Aunque se ha estudiado un gran número de especies de hongos y bacterias, solo unos pocos han llegado a demostrar sus potencialidades a nivel de campo como son los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma harzianum* y *Arthrobotrys oligospora*, y las bacterias *Pasteuria penetrans*, *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* y recientemente *Tsukamurella paurometabola*. No obstante, el bionematicida Pl plus (a base de *P. lilacinus*), producido como formulación sólida de alto título, lidera el mercado mundial. La utilización armónica de los agentes de control biológico de nematodos dentro de sistemas de manejo integrado permite la protección de varios cultivos susceptibles, de importancia económica en distintos países. El ejemplo de Cuba, que ha empleado de forma masiva tanto hongos como bacterias en los sistemas de manejo integrado en banano, cafeto, tabaco y hortalizas, entre otros, constituye una prueba de su factibilidad, aunque se requiere del continuo perfeccionamiento de estas tecnologías.

Considerations about biological control agents of nematodes

The use of micro organisms to control agricultural pests has found many possibilities considering the present increase of the interest on environmental security and the innocuousness of foods. Fungus and bacteria that cohabit in the same environments with nematodes are able to regulate them and establish a specific ecological balance, nevertheless its use has not had all the desired success. This situation may be caused by several reasons as a low antagonism level between nematodes and biological control agent (bca), high specificity of some (bca) and high reproductive level of some nematodes species. Although a great number of fungus and bacterium have been studied only a few has demonstrated their potential in field, those are *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma harziarum*, *Arthrotrichy oligospora* fungi and bacterias *Pasteuria penetrans*, *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* and recently *Tsukamurella paurometabola*. However, bionematicide PI plus (produced from *P. lilacinus* as a solid formulation of high concentration) is the leader in world market. The harmonic utilization of biocontrol agents of nematodes in integrated management system has let the protection of several sensible crops of economic importance for different countries. Cuban example that has used both fungus and bacteria in massive way, in banana, coffee, tobacco and vegetables, among others crops in the integrated management system, constitutes a signal of its feasibility, even though it requires a systematic improvement of these technologies.

9. *Pasteuria* spp.: una realidad promisoría en Cuba para el control de los nematodos del género *Meloidogyne*

Hortensia Gandarilla¹ y Mei-Li Hunt²

¹ Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, nematologia@sanidadvegetal.cu

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de La Habana. Ave. 25 no. 23011 e/ 230 y 234, La Coronela, Playa, Ciudad de La Habana, CP 13600

Las bacterias del género *Pasteuria* son agentes de control biológico con perspectivas reconocidas a nivel mundial, fundamentalmente contra nematodos del género *Meloidogyne*. Su efectividad como biorregulador se ha discutido, pero la mayoría de los informes al respecto confirman su eficacia. Son parásitos obligados, lo que dificulta su reproducción masiva; no obstante existen

formulaciones patentadas para su uso. Esta bacteria está registrada en 11 municipios de las provincias habaneras y parasitan 15 especies de nematodos. Se ha logrado reproducir sobre diferentes especies de plantas y obtener polvos con endosporas viables por maceración de raíces infectadas secas. Esta bacteria también puede multiplicarse a nivel de campo con el empleo de prácticas culturales como son la reincorporación de raíces secas de plantas infectadas con *Meloidogyne* y *Pasteuria*. Su detección y aislamiento en todo el país puede ser un recurso importante para incluir en las estrategias de control natural y ecológico de fitonematodos, fundamentalmente en áreas controladas como semilleros, casas de cultivo, viveros y huertos, entre otros.

Pasteuria spp.: a promissory reality for control of *Meloidogyne* nematodes in Cuba

Bacteria species of genus *Pasteuria* are biological control agents with recognized perspectives worldwide, mainly against *Meloidogyne* nematodes. Their effectiveness as bioregulators has been discussed; but most of reports confirm it. They are obliged parasites, which make difficult their massive reproduction. Nevertheless, there are formulations patented for their use. This bacterium has been found in 11 municipalities of Habana provinces as parasites of 15 nematodes species, and it could be reproduced on different plant species to obtain dust with feasible endospores by macerating dry infected roots. The bacterium can also be incremented in the field using cultural practices like reincorporating in soil of dry roots infected with *Meloidogyne* and *Pasteuria*. Their detection and isolation all over the country can be an important resource to include in natural and ecological management strategies of plant parasites nematodes mainly in controlled areas like seedbeds, greenhouses, nurseries and vegetable gardens.

10. Efecto de *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudomonas cepacia*, *Trichoderma* spp. y *Lecanicillium* spp. en el control de *Radopholus similis* en plantas *in vitro* de banano (*Musa AAA*) cultivadas en macetas

Randall Vargas y Mario Araya

Dirección de Investigaciones, CORBANA S.A. Apdo. 390-7210, Guápiles, Costa Rica, rvargas@corbana.co.cr

La aplicación de nematicidas no fumigantes en las plantaciones bananeras afronta problemas de contamina-

ción, biodegradación y altos costos. El uso de hongos y bacterias con este fin es una opción efectiva en otros cultivos que merece su evaluación para el control de *Radopholus similis* en banano. En cuatro experimentos con plantas *in vitro* de banano cultivadas en macetas de 1,8 L con suelo esterilizado o sin esterilizar se comparó el efecto de *P. lilacinus*, *P. cepacia*, *Trichoderma* spp. y *Lecanicillium* spp., solos o en mezcla para el control de *R. similis*. En cada maceta se sembró una planta, y a los 22 días (dds) se inocularon 500 individuos de *R. similis*. En todos los experimentos se incluyó un testigo con y otro sin *R. similis*, y se comparó con 50 mg L⁻¹ de Vydate 24% SL. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño irrestricto al azar y se utilizaron de 12 a 20 repeticiones. *P. lilacinus* fue igualmente efectivo al Vydate en reducir el número de *R. similis* por 100 g de raíces y difirió del testigo con nematodos y sin aplicación (P = 0,0018). Vydate presentó el menor número de *R. similis* por 100 g raíces (P < 0,0001). En suelo esterilizado, al comparar la aplicación individual de los hongos con el testigo con nematodos y sin aplicación, solo *P. lilacinus* redujo el número de *R. similis* cuando se aplicó a los 0 y 18 dds (P = 0,0454). Cuando se mezclaron *P. lilacinus*, *Trichoderma* spp. y *Lecanicillium* spp., y se aplicó a los 0 y 18 dds; 0, 18 y 67 dds o solo a los 67 dds, se redujo el número de *R. similis* respecto al testigo con nematodos y sin aplicación (P < 0,0006). En suelo sin esterilizar hubo una disminución en el número de *R. similis* cuando se mezclaron *P. lilacinus*, *Trichoderma* spp. y *Lecanicillium* spp. aplicado a los 67 dds (P = 0,0129). Se ha observado que los agentes de control biológico tienen potencial, especialmente para prevenir la infección de *R. similis*. Esta alternativa debería evaluarse en áreas nuevas de banano o en áreas de renovación, con plantas *in vitro* enriquecidas periódicamente con agentes de control en las fases de vivero, invernadero y campo.

Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Pseudomonas cepacia*, *Trichoderma* spp. and *Lecanicillium* spp. for the control of *Radopholus similis* in banana (*Musa AAA*) *in vitro* plants grown in pot conditions

Non fumigant nematicide applications for nematode control in banana plantations confront pollution, biodegradation and high costs problems. The use of fungi and bacteria is an effective option in other crops that merits to be evaluated for *Radopholus similis* con-

trol in banana. The effect of *P. lilacinus*, *P. cepacia*, *Trichoderma* spp. and *Lecanicillium* spp. alone or in mixture was evaluated for *R. similis* control through four experiments using banana *in vitro* plants cultivated in 1.8 L pots filled with sterilized or non sterilized soil. One *in vitro* plant was planted in each pot and 22 days later (dap) were inoculated with 500 *R. similis* individuals. Untreated controls with and without *R. similis* were included in all the experiments and compared with 50 mg.L⁻¹ of Vydate 24% SL. Treatments were distributed in a complete randomized design using 12 to 20 repetitions. *P. lilacinus* was equally effective as Vydate in reducing *R. similis* number per 100 g of roots, differing from the untreated control with nematodes and without application (P = 0.0018). Vydate showed the lowest number of *R. similis* per 100 g of roots (P < 0.0001). When the individual application of the fungi was compared with the untreated control with nematodes in sterilized soil, only *P. lilacinus* reduced the number of *R. similis* per 100 g of roots when was applied 0 and 18 dap (P = 0.0454). When a mixture of *P. lilacinus*, *Trichoderma* spp. and *Lecanicillium* spp. was applied 0 and 18 dap; 0, 18 and 67 dap or only 67 dap, the number of *R. similis* decreased with respect to the untreated control with nematodes (P < 0,0006). In non-sterilize soil, the number of *R. similis* decreased with the mixture of *P. lilacinus*, *Trichoderma* spp. and *Lecanicillium* spp. applied 67 dap (P = 0.0129). It has been observed that biological control agents have special potential to prevent *R. similis* infection. This option should be evaluate in new planting and replanting areas using *in vitro* plants enriched periodically with control agents in green house, nursery and field conditions.

11. Efectos de la aplicación de *Paecilomyces lilacinus* para el control de *Meloidogyne* spp. en pepino (*Cucumis sativus* L.)

D. Romero y R. Trabanino

Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. Carretera Danlí Km 30, Honduras, jmendez@zamorano.edu

El género *Meloidogyne* incluye las especies más importantes de fitonematodos en la agricultura. Causa nódulos característicos en las raíces; su infestación se manifiesta en reducción del crecimiento, amarillamiento y deficiencias nutricionales en las plantas, que se traducen en rendimiento bajo y mala calidad en los frutos. *Paecilomyces lilacinus* es un hongo del suelo con potencial para el control biológico de nematodos pa-

rasíticos de plantas. Es parásito de huevos y hembras de nematodos, y ha demostrado la capacidad de regular las poblaciones de nematodos a niveles no dañinos al cultivo. Los objetivos del presente estudio fueron determinar los efectos de la aplicación de este hongo para el control de *Meloidogyne* spp. en pepino (*Cucumis sativus* L.), determinar la etapa de aplicación que maximiza los rendimientos, identificar el tratamiento con mayor retorno económico y comparar la efectividad de *P. lilacinus* con oxamyl. Los tratamientos consistieron en la aplicación de *P. lilacinus* en siembra, al transplante, en siembra-transplante, a los 10 días del transplante, siembra y 10 días del transplante, transplante y 10 días después, el testigo químico con oxamyl y el testigo absoluto que no recibió ninguna aplicación. Para el crecimiento de las plántulas se usó el medio Sunshine Mix, al cual se incorporó *P. lilacinus* manualmente en la siembra, mientras que las aplicaciones en el campo de *P. lilacinus* y de oxamyl fueron al pie de la planta con una bomba de mochila. A los 11 días de la siembra las plántulas fueron transplantadas; se cosechó a los 38 días después del transplante y duró 18 días con un intervalo de dos días entre cosechas. El tratamiento con oxamyl y las aplicaciones de *P. lilacinus* en siembra/transplante, siembra/10 días del transplante, transplante/10 días del transplante y al transplante tuvieron la mayor cantidad de frutos comerciales por hectárea. El mayor peso de frutos comerciales se obtuvo con aplicación de oxamyl y el tratamiento *P. lilacinus* en siembra/transplante. La menor cantidad de nódulos por raíz se obtuvo con la aplicación de oxamyl, *P. lilacinus* en siembra/transplante, siembra/10 días del transplante y al transplante por 10 días del transplante; con este último también se obtuvo mayor longitud de raíces en comparación con el testigo absoluto y con la aplicación de *P. lilacinus* a los 10 días del transplante. Con oxamyl se controló 86% de *Meloidogyne*, y las aplicaciones de *P. lilacinus* que tuvo mejor control fue en siembra y transplante (74%). El tratamiento con oxamyl fue el más rentable, con una relación de beneficio-costo de 0,42, seguido por la aplicación de *P. lilacinus* en siembra y transplante, cuya relación beneficio-costo fue 0,40.

Effects of *Paecilomyces lilacinus* application for the control of *Meloidogyne* spp. in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Meloidogyne genus includes the most important species of phytonematodes in agriculture. It causes

characteristic knots in roots which reduce plant growth; produce yellowing and nutritional deficiencies in plants, all these symptoms bring about low yield and bad quality in fruits. *Paecilomyces lilacinus* is soil fungus with potential for biological control of plants parasitic nematodes, it may parasites eggs and females of nematodes and it has demonstrated the capacity to regulate nematodes populations to no harmful levels for crops. The objectives of this research were to determine the effects of the application of this fungi for the control of *Meloidogyne* spp. in cucumber (*Cucumis sativus* L.), to determine the application period that maximizes yields, to identify the treatment with greater economic return and to compare the effectiveness of *P. lilacinus* with oxamyl. Treatments were the application of *P. lilacinus* at sowing, at transplant, at sowing/transplant, at 10 days after transplanting, at sowing and 10 days after transplanting, at transplant and 10 days later, a chemical control with oxamyl and absolute control without any application. To the growth of seedling was used the middle Sunshine Mix, to which *P. lilacinus* was manually incorporated in sowing, meanwhile *P. lilacinus* and oxamyl applications in field were realized to the soil under plants with a knapsack sprayer. Transplanting was after 11 days of sowing and fruits were harvested after 38 days of transplanted, It lasted 18 days with an interval of two days between harvests. The treatment with oxamil and the applications of *P. lilacinus* in sowing-transplant, sowing-10 days of transplant, transplant-10 days of the transplant and to transplant had the greatest amount of commercial fruits by hectare; the greatest weight of commercial fruits was obtained with the application of oxamyl and the treatment with *P. lilacinus* in sowing-transplant. The lower amount of nodules/roots was obtained with the application of oxamil and *P. lilacinus* treatment in sowing-transplant, sowing-10 days of the transplant and to transplant-10 days of the transplant; this last one also obtained greater roots length comparing with the absolute control and with the application of *P. lilacinus* at 10 days after transplant. With oxamil could be controlled 86% of *Meloidogyne* spp. and the applications of *P. lilacinus* with best nematode control were in sowing and transplant (74%). Treatment with oxamil was the most profitable with a benefit relation cost of 0.42, followed with the application of *P. lilacinus* in sowing and transplant whose relation benefit cost was 0.40.

12. Efectividad de *Trichoderma harzianum*, cepa A-34, en el control del nematodo *Rotylenchulus reniformis* en el cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Mayra I. Méndez Ramos y Ángel Polanco Aballe

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Prolongación de Carbó 40, Alturas de Perera y calle Holguín, Holguín, Cuba

El experimento se desarrolló en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Holguín y en tres organopónicos de la ciudad durante el período comprendido entre agosto de 1998 y marzo de 1999, cuando se produjeron ataques severos del nematodo *Rotylenchulus reniformis*. En las pruebas realizadas en el laboratorio, el hongo *Trichoderma harzianum* cepa A-34 redujo notablemente la eclosión en las masas de huevos y causó alteraciones en una gran cantidad de larvas. En dos de los organopónicos se aplicó la suspensión, a partir de biopreparado sólido, con una concentración de 1×10^9 conidios/g, a la dosis de 40 L/ha y una suspensión final de 400 L/ha. En el tercero no se realizaron tratamientos. La población de nematodos en el sustrato fue considerablemente inferior en los canteros tratados en comparación con canteros testigo. Las medidas del peso, porte y diámetro de las plantas tratadas fueron significativamente más elevadas que las cultivadas en el organopónico, donde no se aplicó el hongo biorregulador. La efectividad de *T. harzianum* se hizo evidente también en el valor de la producción obtenida, la cual fue más del doble en los organopónicos tratados, así como en el de otros indicadores considerados en el análisis económico. Aunque existen antecedentes del uso de especies de *Trichoderma* para el control de nematodos, esta es la primera información que se tiene referente a *R. reniformis*.

Effectiveness of *Trichoderma harzianum* strain A-34 on the control of *Rotylenchulus reniformis* in lettuce (*Lactuca sativa* L.)

The effect of *Trichoderma harzianum* on *Rotylenchulus reniformis* was evaluated in Provincial Laboratory of Plant Health of Holguín and three organoponics cultivation units of the city, between August 1998 and March 1999, when it was present severe attacks of nematode. *Trichoderma harzianum* fungus strain A-34 notably reduced egg mass eclosion and caused alterations to a great quantity of larvae in laboratory tests. Two units were chosen to be treated with a suspension, obtained from a solid bioproduct, of

1×10^9 conidios/g at a dose of 40 L/ha in a final suspension of 400 L/ha; the other one was without treatment as a control. Nematodes populations were remarkably lower in treated beds than those in control ones. Weight, size and diameter of treated plants were significantly higher than non applied ones. The efficacy of *T. harzianum* could be appreciated too by the value of yield, which was two times higher in the treated units, and in the values of others indicators considered in the economic analysis. Though there are preceding records about the use of *Trichoderma* species for nematode control, this is the first about *R. reniformis*.

13. Método de control de nematodos con *Trichoderma harzianum* en casas de cultivo

Mayra I. Méndez Ramos y Ángel G. Polanco Aballe

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Prolongación de Carbó 40, Alturas de Perera y calle Holguín, Holguín, Cuba

En casas de cultivo de tomate del Frente Remigio Marrero-Rafael Freyre se ensayó, desde 1999 hasta el 2003, un método de control de nematodos formadores de agallas, *Meloidogyne* spp., en sustrato altamente infestado que producían severos daños a las siembras y mermas considerables de los rendimientos. El procedimiento consistió en la aplicación de *Trichoderma harzianum*, cepa A-34, a una dosis de 8 kg/ha, en diferentes fases del cultivo como son los cepellones mezclados con el sustrato, en la casa de plántulas, en el momento del trasplante y a los 15 días. Los resultados al final del ciclo del cultivo mostraron un notable decrecimiento de las poblaciones de nematodos al reducirse los índices de infestación, de grados 3 y 4 de una escala de 5, hasta el grado 1. La efectividad de los tratamientos se pudo apreciar también en los rendimientos, que de 0,56 t/casa al inicio, alcanzaron 1,73 t/casa después de las aplicaciones de *Trichoderma*. El procedimiento hizo innecesario el uso de biocidas como bromuro de metilo y Basamid, que se adquieren a elevados precios en el mercado internacional y resultan altamente nocivos para la salud y el medio ambiente. En los últimos años el procedimiento se ha extendido a todas las casas de la unidad de producción, y los índices de infestación no superan el grado 1.

Nematode control method with *Trichoderma harzianum* in cultivation houses

A method for the control of galls nematodes *Meloidogyne* spp. by the use of *Trichoderma harzianum*, strain

A-34, was evaluated in the production center Remigio Marrero-Rafael Freyre of Holguin province, from 1999 to 2003, in cultivation houses of tomato with high levels of nematode populations, which produced severe damages to sowings and considerable decreases of yields. The fungus was applied at a dose of 8 kg/ha mixed with the substrate in the phase of floating trays, mixed with the soil of the nurseries, at transplanting and 15 days after it. As a result, population of nematodes decreased drastically from degrees 3-4 to 1, in a maxim scale of 5. Treatments effectiveness could also be appreciated in yield which rose from 0.56 t/house at the beginning to 1.73 t/house after the applications of *Trichoderma*. The procedure made unnecessary to use biocides like methyl bromide and Basamid which are expensive in the international market and both are highly injurious for the health and environment.

14. Evaluación de la efectividad de *Trichoderma harzianum* en el control de *Meloidogyne incognita* en la agricultura urbana de la provincia de Matanzas, Cuba

Rubén C. Rodríguez Barrera, Odalys Corbea Suárez, Reynaldo Barroso y Esther M. Cardoso González

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Central Km 111, Gelpis, Matanzas, Cuba

A partir de la contracción de las fuentes de insumos agropecuarios se han realizado múltiples esfuerzos en dirección a un cambio tecnológico en la agricultura. En este sentido se han implementado alternativas agrotecnológicas ahorradoras de insumos artificiales y de importación, como es el movimiento de agricultura orgánica. La provincia de Matanzas posee actualmente más de cincuenta organopónicos atendidos por Empresas de Cultivos Varios con el objetivo de abastecer de hortalizas frescas a la población de las ciudades, y existe una cantidad similar perteneciente a autoconsumos de diferentes organismos. *Meloidogyne* se considera el género de nematodos de mayor importancia económica en el cultivo de las hortalizas, ya que tiene una distribución cosmopolita y ataca la mayoría de ellas. En Cuba es el género de nematodos más distribuido, y sin lugar a dudas el de mayor importancia en los cultivos hortícolas. Este trabajo tuvo como objetivo generalizar en la provincia la utilización del biopreparado de

Trichoderma harzianum para el control de nematodos. La evaluación se desarrolló en cinco canteros del organopónico de Pueblo Nuevo, un huerto familiar y en tres sectores del Área de Tapado del CETA. Se utilizó la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum*, en aplicación directa al suelo previo a la siembra con una dosis única de 25 g del biopreparado por metro cuadrado. Se apreció que la efectividad de los tratamientos oscila entre 52 y 82% de control del índice de ataque en el sistema radical del cultivo, con lo que se demuestra la factibilidad de su utilización en el control de esta especie de nematodo.

Effectiveness evaluation of *Trichoderma harzianum* for the control of *Meloidogyne incognita* in the urban agriculture of Matanzas province, Cuba

From the reduction of agricultural inputs sources, multiple efforts have been made towards a technological change in agriculture; in this sense agro-technological alternatives for saving artificial and imported inputs have been implemented, like organic agriculture movement. Matanzas province has more than 50 organoponics supported by Varied Crops Enterprise with the objective of supply fresh vegetables to cities population, and also exist a similar quantity which belong to self-consumptions of different institutions. *Meloidogyne* spp. is considered nematodes genus of greater economic importance in vegetables culture, since it has a cosmopolitan distribution and it attacks most of them. It is the most distributed nematodes genus and without doubt the greatest in importance in vegetable crops. The objective of this work was to generalize the use of a bioprepared of *Trichoderma harzianum* for nematode control in the province. The evaluation was developed in five plant beds from the organoponic of Pueblo Nuevo, a familiar orchard and in three sectors of the Covered Area of CETA, being used *Trichoderma harzianum* strain A-34, in direct application to the soil previous to sowing with a unique dosis of 25 g of the bioprepared by square meter. It was observed that the treatment effectiveness varied between 52 and 82% in the control of attack index in the root crop system, so it demonstrated the feasibility of *Trichoderma* for the control of this kind of nematode.

ANTAGONISTAS ALTERNATIVOS AL BROMURO DE METILO

1. Experiencia cubana en la aplicación masiva de *Trichoderma harzianum* en el control de patógenos del suelo en semilleros de tabaco (*Nicotiana tabacum* Lin.) bajo el sistema de bandejas flotantes

Ana A. Fernández,¹ Eduardo Pérez,¹ Sergio Noa,² José A. Márquez,² Vladimir Andino,³ Pedro Ruiz,³ Orietta Fernández-Larrea,¹ Orestes Elósegui¹ y Conrado Cruz⁴

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, afernandez@inisav.cu

² Dirección Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera La Coloma Km 2½, San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba

³ Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera El Tumbadero Km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana, maribel@iitabaco.co.cu

⁴ Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ayuntamiento 231, e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana

Para sustituir el uso de bromuro de metilo en la desinfección de los suelos destinados a la producción de semilleros de tabaco se implementó la tecnología de producción de plantas mediante el uso de bandejas flotantes con sustrato orgánico y la incorporación de *Trichoderma harzianum* (A-34). Durante el funcionamiento de la nueva tecnología se observaron daños provocados por hongos del suelo, que causaron grandes afectaciones en la mayoría de los semilleros en bandejas flotantes de las provincias de Pinar del Río y de La Habana. Para contrarrestarlas se desarrolló un trabajo con las provincias involucradas a fin de determinar su origen. En los análisis realizados al sustrato y a plantas enfermas se determinó la presencia de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp como el principal causante de estos daños, aunque también se detectaron otros hongos del suelo, pero en menor frecuencia. Se realizaron estudios relacionados con la patología y se valoraron alternativas de control para el manejo de la enfermedad. También se determinó la participación de los agricultores y otros factores en el empleo masivo del biocontrol. Se evaluó la efectividad del biopreparado de *Trichoderma* en comparación con otras sustancias

activas y se determinaron los parámetros óptimos para el desarrollo de *P. aphanidermatum* en este sistema de cultivo, además de elaborar una metodología de manejo de la enfermedad que se aplicó en las áreas de producción con resultados satisfactorios, lo que condujo a la disminución paulatina de los daños. Los resultados se deben a la participación de investigadores del INISAV, el IIT y laboratorios provinciales, con la cooperación de las entidades provinciales de la agricultura tabacalera y los productores involucrados en la eliminación del bromuro de metilo en el sector tabacalero en Cuba.

Cuban experience in mass application of *Trichoderma harzianum* for soil borne pathogens control in tobacco (*Nicotiana tabacum* Lin.) seedlings with floating tray system

The technology of plants production by the use of floating trays, with organic substrate and the incorporation of *Trichoderma harzianum* (A-34) was implemented in order to replace the use of methyl bromide to disinfect soils destined to the production of tobacco seedlings. Damages caused by soil fungi were observed during the operation of the new technology in most of the seed plots in floating trays of the provinces of Pinar del Rio and La Habana; to counteract them a research work was develop in these provinces in order to determine the origin of damages. In the analysis made to the substrate and affected plants the presence of *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp was determined as the main cause of these damages, although other soil fungi were detected also but in smaller frequency. Related studies to the pathology were made and control alternatives for managing the disease were valued. Farmers participation and other factors in massive use of biocontrol were also determined. *Trichoderma* formulation effectiveness in comparison with other active substances was evaluated, optimal parameters for the development of *P. aphanidermatum* were determined in this crop system and a management methodology of the disease was elaborated, this was applied in production areas with satisfactory results

and lead to the gradual diminution of damages. Results were possible to the participation of researchers of INISAV, IIT and Provincial Laboratories, with the cooperation of tobacco agriculture provincial organizations and the producers involved in the elimination of methyl bromide in Cuban tobacco sector.

2. Colonización por *Trichoderma harzianum* de diferentes sustratos para el sistema de cepellón en el cultivo del tabaco

Maribel Espino¹ y Marusia Stefanova²

¹ Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera El Tumbadero Km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana, maribel@iitabaco.co.cu

² Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, mstefanova@inisav.edu.cu

La producción de plántulas de tabaco mediante el sistema de cepellón sugirió el estudio de la colonización de los sustratos por *Trichoderma harzianum*, la que se emplea para el control de hongos fitopatógenos de suelo en semilleros tradicionales. Se estudiaron combinaciones de zeolita, cachaza, suelo, turba y paja de arroz, y se realizaron muestreos periódicos, así como siembras en medios de cultivo para detectar colonias de *Trichoderma*. Se comprobó que el hongo antagonístico crece y coloniza los sustratos durante la fase de germinación de la semilla. El porcentaje más alto de colonias correspondió a la variante que contiene paja de arroz, seguida por la cachaza, las cuales son recomendadas como sustratos para la producción artesanal masiva del producto biológico. El hongo permaneció viable durante toda la fase de semillero y protegió el cultivo contra las infecciones producidas por *Phytophthora nicotianae* entre 60 y 100%; tuvo además un efecto favorable sobre el desarrollo fisiológico de las plantas, y en todos los casos se lograron valores superiores de peso seco y fresco del tallo y las hojas, así como del largo de la raíz respecto al testigo sin tratamiento. Estos resultados se corroboraron en condiciones de producción. La colonización en los sistemas de cepellones permite trasladar el hongo antagonístico establecido con la postura hacia áreas de plantación.

Colonization of different substrates by *Trichoderma harzianum* for soilless floating tray technology in tobacco crop

Substrate colonization by *Trichoderma harzianum* was studied in tobacco seedlings production using soilless

floating tray technology. This fungus is used for soilborne pathogens control in traditional seedbeds. Combinations of zeolite, sloth, soil, peat and rice bark were studied with periodic samplings and assays in culture media in order to detect *Trichoderma* colonies. It was proved that the antagonist fungus grows and colonizes the substrate during the germination phase of the seed. The highest percent of colonies corresponded to the variant containing rice bark, followed by the sloth one, which are both recommended as substrate for the mass handmade production of it. The fungus remained viable during the whole phase of seedbed and it protected the crop against the infections produced by *Phytophthora nicotianae* between 60 to 100%; it also had a favourable effect on plants development, obtaining in every case higher values of dry and fresh weight of stalks and leaves, as well as root length, respect to control. These results were corroborated in field conditions. Substrate colonization in soilless floating tray technology permits the transportation of stabilised antagonist fungus in seedling to the plantation.

3. Estrategias para la eliminación del bromuro de metilo en América Latina y el Caribe, y sus alternativas

José de Mesa

Oficial del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

Oficina Regional para América Latina y el Caribe, Boulevard de los Virreyes, 145, Col. Lomas de Virreyes, 11000 México DF, México, jose.demesa@pnnuma.org

Se ofrece una panorámica del consumo actual de cada uno de los 33 países que componen la región de América Latina y el Caribe, además de una descripción detallada de algunos otros casos y países de la región, con énfasis al problema de las fresas de Sudamérica (Argentina y Chile) y el del melón de Centroamérica (Honduras y Guatemala). A través de revisión pormenorizada, de los otros países consumidores se pudo apreciar que República Dominicana está en una fase de completa eliminación, mientras que el Caribe está enfrentando problemas, en particular con el uso de bromuro de metilo para los campos de golf. Se enfatiza que casi todos los países han ratificado la enmienda de Copenhague donde se incluye la eliminación del uso de bromuro de metilo, y se informó que los países de la región que no han logrado congelar los niveles requeridos de consumo en el 2002 son Guatemala, Honduras y Uruguay. Tales países han reportado adecuadamente

sus grados de consumo a la Secretaría de Ozono, y han diseñado un plan de retorno al cumplimiento que fue aprobado desde la XV Reunión de las Partes del Protocolo de Montreal. Referente a los acuerdos de eliminación temprana, bajo el contexto del Fondo Multilateral se presentó una visión general de la situación actual. Esta incluyó a países como Argentina, Bolivia, Costa Rica, Chile, Ecuador, Guatemala, Honduras, República Dominicana y Uruguay. Durante este año México, Cuba y Brasil acordarán nuevos compromisos. La ponencia introdujo al análisis de los factores restrictivos e impulsivos en el proceso de adopción de las alternativas biológicas al uso de bromuro de metilo.

Methyl bromide phase-out strategies in Latin America, the Caribbean and its alternatives

A panoramic of present consumption of each one of 33 countries that compose Latin America and Caribbean regions is offered, in addition to a detailed description of some other cases and countries of the region, emphasizing the problem of strawberries in South America (Argentina and Chile) and melon from Centro America (Honduras and Guatemala). Through out a detailed revision of other consumer countries, it was possible to appreciate that Dominican Republic is in a complete elimination phase, while the Caribbean region is facing problems, especially with the use of Methyl Bromide for golf fields. It is emphasized that almost all the countries have ratified Copenhagen Amendment, where it is included the elimination of Methyl Bromide use in the countries of the region, that have not managed to congeal the required consumption levels of Methyl Bromide in 2002, they are Guatemala, Honduras and Uruguay. These countries have reported their degrees of consumption to the Ozone Secretariat suitably, and they have designed a return plan to the fulfillment, that was approved from 15th Meeting of Montreal Protocol Parts. Referring to early elimination agreements, under the context of Multilateral Fond, a general vision of the present situation was presented. This event included countries like Argentina, Bolivia, Costa Rica, Chile, Ecuador, Guatemala, Honduras, Dominican Republic and Uruguay. During this year Mexico, Cuba and Brazil will decide new obligations. The speech introduced to this analysis of restrictive and impulsive factors in the adoption process of biological alternatives to use Methyl Bromide.

4. Uso de *Trichoderma* como alternativa al bromuro de metilo en los cultivos protegidos, flores y ornamentales en Cuba

Berta Lina Muiño, Eleazar Botta, Eduardo Pérez, Davis Moreno y Emilio Fernández

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, bertam@inisav.cu

La producción de hortalizas en sistemas de cultivos protegidos ha tenido un desarrollo vertiginoso en Cuba, tanto para el consumo de vegetales frescos durante todo el año como para la exportación. Por otra parte, las producciones de flores y ornamentales representan una fuente importante de obtención de divisas. En estos cultivos inciden con marcada frecuencia agentes nocivos del suelo como los nematodos del género *Meloidogyne*, hongos de los géneros *Fusarium*, *Phytophthora*, *Phytium*, *Rhizoctonia*, etc., y en menor grado insectos, ácaros y malezas. Para su control se utilizó tradicionalmente el bromuro de metilo; sin embargo, a partir del 2002 se desarrollaron acciones para la eliminación de este contaminante del ambiente mediante un proyecto financiado por el PNUD, de acuerdo con los compromisos de Cuba con el Protocolo de Montreal y el desarrollo en el país de diferentes alternativas. A través de métodos participativos, donde el productor interactúa activamente en el proceso de adopción, se diseñó un modelo general de manejo integrado en el cual se combina armónicamente el uso de cepas nativas de *Trichoderma* (A34, A53 y TS3) con efecto sobre hongos y nematodos, con medidas agrotécnicas, físicas y químicas, que fue validado en diferentes sitios de producción. En el trienio 2003-2005 se aplicó un promedio general de 64,29; 15,96 y 9,71 ha, respectivamente, en cultivos protegidos de las provincias de Pinar del Río, La Habana, Cienfuegos y Holguín, y se trataron entre 1 580 y 1 850 m³ de sustratos para flores y ornamentales, con una disminución importante de los niveles de infestación, y por ende la reducción del uso del biocida.

Use of *Trichoderma* as alternative to methyl bromide in protected crops, flowers and ornamentals in Cuba

Vegetable production in protected culture systems has had a vertiginous development in Cuba, both for fresh vegetable consumption throughout the year, and to export. Flowers and ornamentals productions represent an important profit in the international market, but

soil borne pathogens like nematodes of *Meloidogyne* genus, fungi of genus *Fusarium*, *Phytophthora*, *Phytium*, *Rhizoctonia* and others, and insects, mites and weeds, in smaller degree, affect these crops with a marked frequency. Methyl bromide was used traditionally to control them; nevertheless from the year 2002 were developed actions for the elimination of this environment contaminant, as a result of a project financed by PNUD, considering Cuba engagements with Montreal Protocol and the development of different national alternatives. A general model of integrated management with participative methods was designed, in which the producer interacts actively with the adoption process, combining the use of native *Trichoderma* strains (A34, A53 and TS3) with an effect on fungi and nematodes, with agrotechnical, physical and chemical measures, this model was validated in different production farms. A general average of 64.29, 5.96 and 9.71 ha was applied respectively from 2003 to 2005, in protected cultures in Pinar del Río, Habana, Cienfuegos and Holguín provinces, and 1 580 to 1 850 m³ of substrates for flowers and ornamentals were applied too, with an important decrease of infestation levels and therefore a reduction in the use of the biocide.

5. Efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* frente a aislamientos de *Rhizoctonia solani* obtenidos en semilleros de tabaco con tecnología de bandejas flotantes

Marleny González García, Elda Ramos Ramos, Ana Fernández Morales y Rebeca Ramírez Ochoa

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, mgonzalez@inisav.cu

Se estudió el efecto antagonista y el tipo de hiperparasitismo que producen dos cepas de *Trichoderma harzianum* (A-34 y A-53) y una de *Trichoderma viride* (TS-3) sobre seis aislamientos de *Rhizoctonia solani* (Rsp4, RtA, Rs8, Rs10, Rs9, Rsp2) obtenidos de plantas de tabaco en semilleros por la tecnología de bandejas flotantes. Se utilizó el método de cultivo dual en placas Petri. Se comprobó que la cepa A-34 de *T. harzianum* fue capaz de controlar el crecimiento de todos los aislados de *R. solani*, debido a que al cuarto día de evaluación el antagonista había cubierto aproximadamente el 50% de las placas y al séptimo día el 100%. Con las cepas A-53 y TS-3 se observó un resultado similar para todos los aislados de *R. solana*, excepto para Rsp4 y RtA sobre los cuales no ejerció un hiperparasitismo

efectivo, pues al séptimo día del experimento las cepas de *R. solani* tenían ocupada más del 80% de las placas. El estudio microscópico, por su parte, reveló la capacidad hiperparasítica de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Las características del hiperparasitismo observados fueron la adherencia de las hifas del antagonista a las del patógeno, enrollamiento de las hifas, alteraciones citoplasmáticas con presencia de vacuolas y granulaciones, así como fragmentación de las hifas a nivel del septo.

Antagonist effect of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Rhizoctonia solani* isolates obtained from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings with technology of floating trays

The antagonistic effect and the kind of hyperparasitism produced by two strains of *Trichoderma harzianum* (A-34 and A-53) and one of *Trichoderma viride* (TS-3) against six isolations of *Rhizoctonia solani* (Rsp4, RtA, Rs8, Rs10, Rs9, Rsp2), obtained from tobacco seedlings with technology of floating trays was studied. Dual culture method in Petri dishes was used. Strain A-34 of *T. harzianum* was controlled the growth of all the isolates of *R. solani*, the antagonist had covered almost 50% of the plates to the fourth day of evaluation, and 100% to the seventh day. Similar results were observed with strains A-53 and TS-3 for all the isolates of *R. solani* except for Rsp4 and RtA on which it did not have an effective hyperparasitism because strains of *R. solani* had covered more than 80% of the plates to the seventh day of the experiment. Microscopic study revealed the hyperparasitism ability of *Trichoderma* spp. isolations. Hyperparasitism characteristics were the adherence of the antagonist hyphas to pathogen, hyphas rolling, vacuolization and granulation of cytoplasm and hypha fragmentation at septum.

6. Influencia de distintos tratamientos de desinfección de suelos en la población nativa de *Trichoderma* en campos de producción de frutos de fresa en el suroeste de Andalucía (España)

Berta de los Santos,¹ Juan Jesús Medina,¹ Luis Miranda,¹ José Manuel López-Aranda² y Fernando Romero¹

¹ Centro de Investigación y Formación Agraria Las Torres-Tomejil, IFAPA-CICE Junta de Andalucía, Apdo. de Correos Oficial, Alcalá del Río 41200, Sevilla, España, bertas.garcia.ext@juntadeandalucia.es

² Centro de Investigación y Formación Agraria Churriana, IFAPA-CICE. Junta de Andalucía, 29140, Churriana, Málaga, España

Los ensayos de campo recogidos en este trabajo son parte del proyecto nacional INIA titulado «Optimización y nuevos desarrollos en las alternativas al bromuro de metilo, fresas y viveros». Durante dos años se probaron varios tratamientos de desinfección de suelo en dos fincas productoras de fruto de fresa en la provincia de Huelva (suroeste de España), donde se localiza más del 90% de la superficie destinada a este cultivo en el país. Debido al uso continuado de bromuro de metilo los suelos de Huelva contienen un bajo nivel de patógenos, a pesar de lo cual las producciones son más altas en los suelos desinfectados, en los que se incrementan las poblaciones nativas de *Trichoderma*. Estas especies se caracterizan por su capacidad en el control de enfermedades de plantas, pero además afectan de forma positiva su crecimiento. El objetivo de este trabajo fue el estudio de los cambios en la población nativa de *Trichoderma* después de diferentes tratamientos de fumigación. La influencia de estos tratamientos en la población de suelo se determinó mediante aislamientos en medios de cultivo selectivos. En las muestras analizadas no se detectaron hongos patógenos de fresa, pero la población de *Trichoderma* se incrementó después de los tratamientos. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos y también al compararlos con el control. Las mayores poblaciones de *Trichoderma* se encontraron en suelos tratados con bromuro de metilo y cloropicrina. Existen, por tanto, tratamientos al suelo capaces de incrementar las poblaciones de hongos beneficiosos para este cultivo, como es el caso del bromuro de metilo.

Influence of various soil disinfection treatments on wild *Trichoderma* population in strawberry fruit production fields of sw Andalucía (Spain)

Field and laboratory assays reported in this paper are parts of the national INIA project «Optimization and new develops in the alternatives to methyl bromide (MB), strawberries and seedlings». Several soil fumigation treatments were proved over two years on strawberry crop, in two different production fields in the province of Huelva (southwestern Spain), where more than 90% of the strawberry production in Spain is situated. Because of repeated applications of MB and other fumigants Huelva soils have low levels of pathogens in spite of this, crop yield and wild *Trichoderma* population are higher in disinfected soils. These species of *Trichoderma* are characterised for their ability to control plant diseases and they also could affect plant growth positively. The aim of this work was to study of wild *Trichoderma* population changes after different fumigation treatments. The influence of these treatments on *Trichoderma* soil population was determined by isolates in culture media. No strawberry pathogens were detected but *Trichoderma* soil populations increased after treatments, with significant differences between treatments and also compared to the control. The largest *Trichoderma* populations were observed in soils treated with ethyl bromide and chloropicrin. Therefore some soil treatments may increase benefit fungi populations for strawberry cultivation, so it is the case of methyl bromide.