

## 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,<sup>1</sup> Eduardo Pérez,<sup>1</sup> Sergio Noa,<sup>2</sup> José A. Márquez,<sup>2</sup> Vladimir Andino,<sup>3</sup> Pedro Ruiz,<sup>3</sup> Orietta Fernández-Larrea,<sup>1</sup> Orestes Elósegui<sup>1</sup> y Conrado Cruz<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 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](mailto:afernandez@inisav.cu)

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

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera El Tumbadero Km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana, [maribel@iitabaco.co.cu](mailto:maribel@iitabaco.co.cu)

<sup>4</sup> 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 Espino<sup>1</sup> y Marusia Stefanova<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> 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@pnuma.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 15<sup>th</sup> 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 m<sup>3</sup> 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 m<sup>3</sup> 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 hyphae to pathogen, hyphae 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,<sup>1</sup> Juan Jesús Medina,<sup>1</sup> Luis Miranda,<sup>1</sup> José Manuel López-Aranda<sup>2</sup> y Fernando Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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.