

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 Tejeda,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 promisorio 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 bioproducto 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, rgrespo@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; alinafrías2001@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, oelosegui@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 recuperó 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 μ m 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 μ m when operated for 20 min. In contrast, the sieve shaker harvested 23% of total conidia at a final concentration of 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 4.50×10^{10} spores/g. In both latter treatments the spore dust harvested had a particle size lower than 209 μ m. 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 Neměnové,¹ Valéria Šubíková,² Jozef Drimal³ y Vladimír Farkaš¹

¹ Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 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 rizomanía. 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 micelio. 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 rizomanía 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, telef.: 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 antagonista 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 antagonista.

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 Gluticid, 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 Gluticid 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 bioproduct obtained was denominated Gluticid 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 Gluticid 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 10^{11} 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-

tolos 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 Gluticid 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.