

## SELECCIÓN-CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS

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

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 cafeto 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 promisoría 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 promisoría. 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,<sup>1</sup> Jesús Mena Campos,<sup>1</sup> Yamilka Ramírez Núñez,<sup>1</sup> Gilda Jiménez Montejo,<sup>2</sup> Graciela García Rivero,<sup>2</sup> Marieta Marín Bruzos,<sup>1</sup> Licette León Barreras<sup>1</sup> y Eulogio Pimentel Vázquez<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> 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,<sup>1</sup> Alina García Pérez,<sup>1</sup> Yenía Suárez González<sup>1</sup> y Adys Gómez Montes de Oca<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unidad Científica Tecnológica, Jagüey Grande, del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7a. no. 3005 e/ 30 y 32, Playa, Ciudad de La Habana, micologia@iift.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  $1 \times 10^9$  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  $1 \times 10^9$  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,<sup>1</sup> F. Alfonso,<sup>1</sup> M. J. Rivera<sup>1</sup> y Pilar Villa<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> 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 micobiota 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 inocuos 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,<sup>1</sup> Raúl Rodríguez Guerra,<sup>2</sup> Flora A. Becerra,<sup>2</sup> Juan F. Jiménez Bremont<sup>1</sup> y Sergio Casas Flores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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 antagonic 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,<sup>1</sup> Alexis A. Hernández Mansilla<sup>2</sup> y Aidante Carr Pérez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9½, Ciego de Ávila, pfa\_aliuska@agronomia.unica.cu

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

<sup>3</sup> Instituto 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 Ávila, 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 Gluticid 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,<sup>1</sup> Mayra Heydrich,<sup>1</sup> Yoseph Bigiramana<sup>2</sup> y Mónica Hofte<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> 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 (*Lycopersicum 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 elicitores, 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,<sup>1</sup> C. Mónaco,<sup>1</sup> M. Cisterna,<sup>1</sup> A. Nico<sup>2</sup> y M. Carranza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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 antagónicas 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 antagónicos *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 antagonistic 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,<sup>1</sup> Aliuska Sierra Peña<sup>2</sup> y Aidanet Carr Pérez<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Ciego de Ávila, ahmansilla@meteo.fica.inf.cu; ahmansilla@yahoo.es

<sup>3</sup> 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 bacteria**

The efficacy of PSS strain of *Pseudomonas aeruginosa* and biological product Gluticid 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,<sup>1</sup> Marusia Stefanova<sup>2</sup> y Loreta Larrinaga<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Meteorológico Provincial. Calle Marcial Gómez 401 esq. Estrada, Ciego de Ávila, alexis.hernández@cav.ismet.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.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-born 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.)**

Yaritza Reinoso,<sup>1</sup> Luis Casadesús,<sup>1</sup> Armando García,<sup>2</sup> Jorge Gutiérrez,<sup>1</sup> Ernesto García<sup>1</sup> y Victoria Pazos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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,<sup>1</sup> Bertha Carrera Solís,<sup>1</sup> Orietta Fernández-Larrea Vega<sup>1</sup> y Dania Torres Campos<sup>2</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, asosa@inisav.cu

<sup>2</sup> 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 rolfii*, *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 rolfii*, *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.,<sup>1</sup> V. Martínez,<sup>1</sup> M. Saparrat,<sup>1</sup> C. Bonfiglio<sup>2</sup> y P. A. Balatti<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Síntesis Química SAIC

<sup>3</sup> 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 Polymorphic 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 symbiontically, 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 Tejeda,<sup>1</sup> Janet Rodríguez,<sup>1</sup> Rosa García,<sup>1</sup> Rafael Martínez Viera,<sup>1</sup> Bernardo Dibut, Juan J. Castellanos,<sup>1</sup> Lissett Gutiérrez,<sup>1</sup> Liuba Plana,<sup>1</sup> Yoania Ríos,<sup>1</sup> María E. Simanca,<sup>1</sup> Maricel Ortega,<sup>1</sup> Carlos Lamela,<sup>2</sup> Alberto Martínez,<sup>3</sup> Lázaro Izquierdo,<sup>4</sup> Grisel Croche<sup>1</sup> y Luis Fey<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

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

<sup>3</sup> 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-