



Universidad Carlos Rafael Rodríguez

Facultad de Ciencias Agrarias

**Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero
Agrónomo**

Título

**Evaluación de sustratos y condiciones de cultivo para
la producción semiartesanal del hongo antagonista
Trichoderma harzianum Rifai. cepa A-34.**

Autor: Maribel Pérez Otero

**Tutor: MSc. Ana Rodríguez Hernández
Dr. Leonides Castellanos González**

Cienfuegos, 2013

Hago constar que el presente trabajo fue realizado en la Universidad de Cienfuegos: “Carlos Rafael Rodríguez” como parte de la culminación de los estudios en la especialidad de Ingeniería Agrónoma autorizando a que el mismo sea utilizado por la institución para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos ni publicado sin la aprobación de la Universidad.

Firma del autor.

Los abajo firmantes, certifican que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdos de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura, referido a la temática señalada.

Firma del Tutor.

Firma del Tutor.

Información Científico Técnica.

Nombres, Apellidos y Firma.

Computación.

Nombres, Apellidos y Firma.



PENSAMIENTO



“La agricultura es la única fuente constante, cierta y enteramente pura de riqueza.”

José Martí



AGRADECIMIENTOS

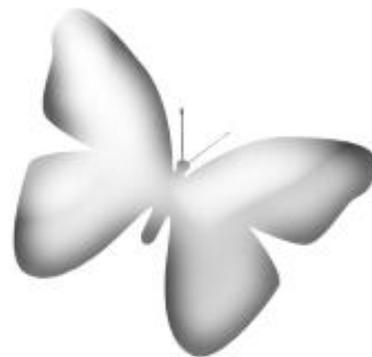
AGRADECIMIENTO

*A mi tutora Ana Rodríguez Hernández quien
pacientemente y detenidamente me ayudó en el
desarrollo de esta tesis de grado.*

*A mi familia, compañeros y amigos que de una forma
u otra me transmitieron ánimo y me apoyaron en esta
realización de tesis.*

*A todos los que pusieron un granito de arena en este
trabajo.*

Muchas Gracias



DEDICATORIA

A mis hijos y mi esposo.

A mis hermanos y familia.

A mi tutora que con su dedicación y paciencia me apoyó para el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y amigos que me han apoyado y alentado durante el desarrollo de este trabajo.



RESUMEN

RESUMEN:

El trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medios Biológicos de Sanidad Vegetal en la Provincial de Cienfuegos en el período comprendido de Enero a Abril del 2013, con el objetivo de evaluar el desarrollo del biopreparado de la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* Rifai en tres sustratos, volúmenes de sustrato y porcentaje de humedad diferentes. Los sustratos evaluados fueron Cáscara de Arroz y Aserrín en mezcla con Melaza al 1% respectivamente y como variante testigo Cabecilla de Arroz 30 % y Aserrín 70 % a una proporción de 500, 700 y 1000 gramos de sustrato por bandeja con porcentajes de humedad del 30, 50 y 70 % la reproducción se realizó de forma artesanal en cultivo estático sobre soporte sólido, para lo cual se utilizó la metodología establecida al efecto. Una vez terminada la producción se evaluó la concentración de esporas por gramo, la viabilidad y el bioensayo donde se demostró la posibilidad del empleo del sustrato Cáscara de Arroz con Melaza al 1% para la reproducción del biopreparado pues no manifestó diferencia con la variante testigo y si con el Aserrín con Melaza al 1% quien solo logró concentraciones de 10^7 en cuanto al porcentaje de humedad quedo demostrado que los mejores valores se lograron al 50 y 70 % mientras que la cantidad de sustrato por bandeja no reflejó diferencia estadística. Los resultados de la viabilidad y el bioensayo demostraron que sus resultados estuvieron en correspondencia con las concentraciones de esporas alcanzadas por el producto.



SUMMARY

SUMMARY

The work was performed at the Center for Research and Development of Plant Biological Media in Cienfuegos Provincial in the period from January to April 2013, with the aim of evaluating bioproduct development of A-34 strain of *Trichoderma harzianum* Rifai on three substrates, substrate volumes and different moisture. The substrates were evaluated and Sawdust Rice Husk mixed with molasses and 1% respectively as witness variant Rice Cabecilla Sawdust 30% and 70% at a rate of 500, 700 and 1000 grams per tray substrate with moisture 30 , 50 and 70% the reproduction is made by hand in static culture on solid support, for which we used the methodology established for this purpose. Once production was assessed spore concentration per gram, the feasibility and the bioassay which showed the possibility of using the substrate with Molasses Rice Husk 1% for the reproduction of biopreparation said no difference because the witness variant and if the Sawdust with Molasses 1% who only managed 107 concentrations in the percentage of moisture was demonstrated that the best values were achieved by 50 and 70% while the amount of substrate per tray not reflect statistical difference. The results of the feasibility and bioassay showed that they were in their correspondence resultados spore concentrations achieved by the product.



ÍNDICE

Contenido

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5

 1.1 Enfermedades de las plantas: 5

 1.2 Antecedentes del control biológico. 6

 1.2.1 Antecedentes en el mundo 6

 1.3 Antecedentes del empleo de *Trichoderma* en el control biológico de enfermedades..... 8

 1.4 Generalidades del género *Trichoderma*. 10

 1.4.1 Clasificación..... 11

 1.4.2 Descripción taxonómica 12

 1.4.3 Biología..... 12

 1.5 *Trichoderma* biocontrolador de hongos fitopatógenos. 13

 1.6 Mecanismos de acción 15

 1.7 Tecnología de reproducción de *Trichoderma* 17

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS 22

 2.1 Determinación de la calidad del bioproducto obtenido con diferentes tipos y volúmenes de sustrato así como porcentaje de humedad a partir de la cepa de *Trichoderma harzianum* A-34. 22

CAPÍTULO III: RESULTADO Y DISCUSIÓN 27

 3. 1 Determinación de la calidad del bioproducto obtenido con diferentes tipos y volúmenes de sustrato así como porcentaje de humedad a partir de la cepa de *Trichoderma harzianum* A-34 27

CONCLUSIONES 40

RECOMENDACIONES 41

BIBLIOGRAFÍA 42

INTRODUCCIÓN.

En el proceso de transformación hacia una agricultura moderna, libre de plaguicidas químicos, jugó un papel importante el desarrollo y aplicación de la biotecnología, a través del uso de microorganismos vivos, para el control biológico de las plagas agrícolas, lo cual adquiere importancia relevante como alternativa al desarrollo de una agricultura sostenible o de bajos insumos, que preserve los recursos naturales y el medio ambiente para las futuras generaciones (Socorro, 2000).

El interés en el control biológico como método de control de enfermedades aumentó en los últimos años y aunque su desarrollo ha sido relativamente lento el potencial que representa para el manejo de las plagas y enfermedades es enorme. La crisis de los sistemas agrícolas convencionales hace que sea un imperativo del momento el desarrollo y aplicación de nuevos métodos y técnicas de manejo de enfermedades. El control biológico da respuesta a muchos de los problemas de la agricultura moderna y es uno de los componentes esenciales de la agricultura sostenible (Pérez, 2004).

Los hongos entomopatógenos y antagonistas constituyen medios altamente efectivos en el control de plagas y la reproducción de estos microorganismos ha sido intentado por diferentes métodos, tanto por tecnologías artesanales como por cultivo sumergido y de fase sólida, con las ventajas e insuficiencias que presenta cada método, en cuanto a la calidad del biomaterial, sus características y estabilidad en el ambiente, requeridas para su uso en la práctica agrícola (Milner, 2000). Entre los métodos de control biológico es importante la utilización de microorganismos antagónicos. En este grupo tiene un lugar cimero las especies de hongos del género *Trichoderma* (Andreu *et al.*, 2007).

En Cuba la producción de bioplaguicidas por métodos artesanales en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) constituyen un importante aporte en los programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) como

una vía para la estrategia de asegurar la producción de alimentos en el Programa Agroalimentario del país , con un uso más racional de productos químicos, además contribuye a reducir importaciones en moneda libremente convertible y al saneamiento ambiental garantizando la preservación de los controles biológicos de las plagas que regulan las poblaciones de estas y la cantidad de tratamientos para su control, con el incremento de la eficiencia económica (Fernández Larrea, 2001).

El proceso de producción de hongos entomopatógenos y antagonistas por el método estático con calidad exige, entre otros factores, la selección de sustratos idóneos para la propagación de microorganismos factibles, a partir de la producción agrícola local, de bajo costo, no comprometida con otros usos y una metodología que garantice la estabilidad y preservación del producto final, que no alteren la propiedades físico-químicas y su interacción con la naturaleza biológica de los microorganismos (Velásquez, 1996).

En Cuba la producción artesanal del biopreparado a base de especies del género *Trichoderma* ha sido difundida por su fácil reproducción y efectividad en la protección de los cultivos contra hongos del suelo (Stefanova,1993). Por otra parte estudios realizados por Pérez (2004) plantea que la producción de biopreparados de diferentes cepas de *Trichoderma* se realiza mediante métodos artesanales, por cultivos líquidos estáticos y sólidos bifásicos. Sobre las tecnologías de producción Vázquez *et al.*, 1997 refieren que la fermentación sólida mejora la calidad final, estabilidad y aumenta el tiempo de almacenamiento del biopreparado.

Por primera vez en Cuba durante las campañas 1994-1995 se emplearon biopreparados, obtenidos por métodos alternativos con materias primas nacionales y parámetros controlados, de cepas promisorias nativas de *Trichoderma* , aplicadas según metodologías y dosis establecidas, en alrededor de 5208.0 ha de cultivo que incluyeron tabaco, hortalizas, granos y ornamentales

entre otros, fundamentalmente en zonas de la provincia de Pinar del Río y Villa Clara (Stefanova, 2007).

La introducción del hongo *Trichoderma spp* en Cienfuegos tuvo lugar en el período comprendido entre 1993-1995 para la lucha biológica de enfermedades del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), pimiento (*Capsicum annuum* L), col de repollo (*Brassica oleracea* L.), col china (*Brassica rapa* L.) y para tratamientos de las semillas. El antagonista se comenzó a producir en método líquido estático empleando como sustrato la melaza que se obtiene como subproducto en la industria azucarera. Posteriormente se empleó el método de reproducción de fermentación sólida empleando sobres de papel inicialmente con inóculo líquido sobre melaza y después con un inóculo sólido de cabecilla de arroz, para este último se utilizó como sustrato de reproducción del bioproducto la cabecilla de arroz mezclada con aserrín o con la paja de arroz. Como tercera tecnología se empleó un método bifásico inóculo sólido – sustrato sólido similar al anteriormente descrito, pero en vez de emplear los sobres de papel se utilizaron cajas metálicas para la reproducción de este antagonista (Irimia, 2011).

A pesar de la experiencia acumulada en la provincia de Cienfuegos en la reproducción de *Trichoderma spp* sobre soporte sólido por método estático en condiciones de Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatogenos, no existen alternativas de otros sustrato, ni estudios de condiciones de cultivo que posibiliten en momentos de carencia de cabecilla de arroz mantener la producción de este biopreparado con la calidad necesaria.

Teniendo en consideración los antecedentes anteriores se formuló el siguiente problema científico:

Problema científico:

La metodología de reproducción del biopreparado a base del hongo antagonista *Trichoderma spp* esta determinado por el empleo de cabecilla de arroz, cuya

disponibilidad no es estable, lo que pone en riesgo su producción y por ende la protección fitosanitaria de los cultivos.

Para dar respuesta al problema científico se enunció la siguiente **hipótesis**:

Si se determinan nuevas fuentes de sustrato y condiciones de cultivo que permitan sustituir recursos deficitarios en el país, manteniendo los parámetros de calidad exigidos para la reproducción de *Trichoderma harzianum* Rifai. se podrá contar con opciones que permitan la sostenibilidad de este tipo de bioproducto.

Para confirmar la hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Evaluar diferentes tipos de sustrato y condiciones de cultivo para la obtención de un bioproducto en bandeja con buena calidad a partir de la cepa de *Trichoderma harzianum* Rifai. A-34.

Objetivos específicos:

- ▶ Determinar la factibilidad de reproducción de *Trichoderma harzianum* cepa A-34, sobre sustrato cáscara de arroz y aserrín en mezcla con melaza 1% respectivamente, manteniendo los parámetros de calidad exigidos a este tipo de bioproducto.
- ▶ Evaluar las condiciones de humedad y volumen de sustrato óptimos según el tipo de producciones.

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Enfermedades de las plantas:

La enfermedad en una planta según Whetzel (1935), consiste en una serie de procesos fisiológicos dañinos, causados por la irritación continua de la planta por un agente primario (patógeno). Posteriormente Andreu *et al.*, (2007), considera el término enfermedad en las plantas como la serie de procesos o respuestas visibles o invisibles de las células y tejidos de la planta a organismos patógenos o a factores ambientales que provocan un cambio adverso en forma, función e integridad de la misma y puede conducir a daños parciales, a la muerte de la planta o de sus partes, implicando un daño en su nivel productivo.

Bernal, (2007) aborda la enfermedad de las plantas como la interacción de diferentes elementos bióticos y abióticos, circundados por un ambiente, sobre un organismo vegetal que genera un disturbio en el funcionamiento normal de la planta y que puede conducir a un colapso en su actividad, y aún más, en su existencia. El hombre ha intervenido de forma contundente y hace de su papel el factor más decisivo y definitorio en las epifitias.

Teniendo en cuenta las pérdidas ocasionadas por las enfermedades y la facilidad con que se diseminan es preciso prevenir su aparición utilizando diferentes métodos de lucha tales como: lucha química, lucha legal, etiológica, mecánica y biológica (De Faz y Fernández de Cosio, 1987).

Castellanos, (2001) plantea que el impacto ambiental del uso irracional de los plaguicidas químicos en los agroecosistemas agrícolas ha motivado la búsqueda de alternativas no químicas en el control de plagas, cobrando gran importancia durante los últimos años la utilización de microorganismos como agentes de biocontrol de los parásitos de las plantas.

La introducción de los medios de control biológico ofrece una alternativa mas favorable e intervienen en la formación de una agricultura ambientalmente segura, socialmente justa y económicamente viable (Vázquez, 2003).

1.2 Antecedentes del control biológico.

1.2.1 Antecedentes en el mundo

El control biológico es un método de protección de plantas que se basa en el empleo de parásitos, depredadores y microorganismos para el control de plagas, enfermedades y malezas. Fernández Larrea, (2001) lo describe como un método silencioso ecológicamente compatible y seguro además de ser diverso, efectivo y tener la posibilidad de formar epizootias en el suelo.

Smith (1919), ofreció por primera vez el concepto de control biológico y desde entonces ha sido muy discutido y aún hoy científicos y académicos, no se han puesto de acuerdo para ofrecer una definición única. De Bach (1964) lo definió como “la acción de parásitos, depredadores y patógenos en el mantenimiento de la densidad poblacional de otro organismo a niveles más bajos que los que podrían ocurrir en su ausencia. Van Driesche y Bellows (1996), lo definen con conceptos similares incluyendo el uso de antagonistas.

La idea de que los insectos podían ser utilizados intencionalmente para suprimir las poblaciones de otros insectos plaga surgió hace miles de años en China, como consecuencia de la observación directa por parte de los agricultores de la acción de hormigas depredadoras. Las colonias de hormigas (*Oecophylla smaragdina* F.) eran trasladadas hasta las plantaciones de naranjo para reducir el número de insectos que se alimentaban del follaje (Van den Bosch y Messengewr, 1973).

El primer traslado intencional de un depredador que recoge la historia del control biológico, fue el envío a Francia, en 1873 por el entomólogo norteamericano Charles Valentín Rilei del ácaro *Tyroglyphus phylloxerae* Riley para el control de la filoxera de la vid *Daktulosphaira vitifolii* plaga nativa de Norte América que fue

introducida accidentalmente en Europa, a principios de siglo (Van den Bosch y Messenger, 1973).

En 1888 se introdujo en California el coccinélido depredador *Rodolia cardinales* Mulsant para el control de *Icerya purchasi* Maskell. El éxito de esta cotorrita australiana fue tal que en poco tiempo la escama algodonosa dejó de ser un problema en este país (Caltagirone y Douth, 1989).

Durante los últimos 25 años, el interés por el control biológico se incrementa grandemente a causa de los serios problemas de resistencia, contaminación ambiental y daños a la salud humana que provoca el uso intensivo de los plaguicidas sintéticos (Nivia, 2003).

1.2.2 Antecedentes en Cuba

Los primeros intentos de manejo de plagas en Cuba utilizando enemigos naturales datan de 1927 y 1930 cuando se introdujo la cotorrita de Australia *Rodolia cardinales* Mulsant, para el control de *Icerya purchasi* Maskell (guagua acanalada de los cítricos). En estos años se comienza a desarrollar un programa para la cría y liberación de la mosca cubana *Lixophaga diatraea* Towns parasitoide endémico de *Diatraea sacharalis*, (bórer de la caña de azúcar), a estos esfuerzos iniciales se les prestó escasa atención con el incremento de los bioplaguicidas químicos (Pérez, 2004).

Vázquez (2003), plantea que una de las vías para reducir el empleo de los plaguicidas químicos, es la introducción de los medios de control biológico, ya que ofrecen una alternativa más favorable e intervienen en la formación de una agricultura ambientalmente segura, socialmente justa y económicamente viable. El desarrollo agrario actual exige la priorización de la sostenibilidad agroecológica y esto se logra disminuyendo la aplicación de plaguicidas químicos e implementando estrategias más saludables como alternativas para el control de plagas donde el uso de bioplaguicidas ofrece una solución viable.

Uno de los aspectos más notables del manejo de plagas en Cuba es el empleo de técnicas biológicas de control. La producción masiva de entomopatógenos y antagonistas permiten disponer de cantidades apreciables de agentes biológicos en la propia localidad agrícola, pues los Centros Reproductores de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) se encuentran distribuidos por todo el país (Castellanos, 2001) .

Entre los entomopatógenos producidos en los CREE se encuentran: *Beauveria bassiana*, *Metharizum anisopliae*, *Verticillium lecanicillium*, *Bacillus thuringiensis* (Pérez, 2004).y entre los antagonistas más estudiados se encuentra el género *Trichoderma spp* siendo este uno de los más promisorios (Ricard, 2002).

Según García *et al.*, (2006) la habilidad antifungica de *Trichoderma spp* fue encontrada desde 1930, y desde entonces se han encaminado estudios y esfuerzos en su uso para el control de enfermedades de las plantas, sin embargo su comercialización es reciente.

En Cuba Fernández Larrea, (2001) expone que entre los microorganismo mas importantes de efecto antagónico se encuentra *Trichoderma spp* para el control de patógenos del suelo y la semilla en cultivos como tomate, pimiento y tabaco.

1.3 Antecedentes del empleo de *Trichoderma* en el control biológico de enfermedades.

El termino control biológico de enfermedades unido al control biológico de plagas de insectos fue descrito por Hward (1916) y Smith (1919) y no fue hasta 1920 que se registra un repentino incremento de las publicaciones haciendo referencia al control de enfermedades mediante la utilización de antagonistas (Cambell, 1989). Al respecto, Cook y Baker (1983), señalan que el control biológico no es más que el resultado de la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un

microorganismo patógeno en estado activo donde actúa uno o más organismos en forma natural o mediante la introducción de antagonistas.

El control biológico no sólo incorpora la introducción de antagonistas en los sistemas de producción, sino que también incluye la manipulación del medio ambiente, manejo de residuos de cosecha y un amplio rango de prácticas culturales (Mukerji, 1988).

En los últimos años varios países han estado produciendo hongos entomopatógenos los cuáles se emplean para controlar diferentes plagas agrícolas de importancia económica. En Mérida Venezuela se desarrolló un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* para el control de varias enfermedades fungosas del suelo, logrando efectividades de control de las enfermedades superior a 40 % (García *et al.*, 2006). Al respecto Menéndez, (2006) en Honduras planteó el uso de *T. harzianum* en varios tipos de hortalizas para proteger el sistema radicular del ataque de hongos patógenos y plagas.

Entre los métodos de control biológico es importante la utilización de microorganismos antagónicos. En este grupo se emplean a gran escala los miembros del género *Trichoderma*, fundamentalmente para combatir hongos del suelo de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Phythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* entre otros (Andreu *et al.*, 2007).

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su inocuidad, facilidad para ser aisladas y cultivadas, crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1990).

Por otra parte Muiño *et al.*, (2006) señala el empleo de *Trichoderma* en Cuba para el control de agentes nocivos del suelo como *Phytophthora*, *Phythium* y *Rhizoctonia* como alternativa para la sustitución del Bromuro de metilo en cultivos protegidos, flores y ornamentales y su combinación con medidas agrotécnicas.

1.4 Generalidades del género *Trichoderma*.

El género *Trichoderma* es un grupo ampliamente utilizado, debido a sus múltiples usos en la agricultura es el fungicida biológico más estudiado y empleado, de igual forma es estimulador del crecimiento en plantas y es utilizado en la degradación de algunos grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente fue descrito por primera vez hace 200 años por los micólogos como un gasteromiceto y solo un siglo después se realizó el análisis de su estructura y características para ser clasificado como género entre los hongos filamentosos, con propiedades y actividades biológicas cada vez más usadas en la agricultura actual. Su habilidad como antagonista fue descubierta hace 50 años y en numerosos artículos técnicos se han descrito sus bondades en el manejo biológico de los cultivos agrícolas (Villegas, 2009).

Se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, principalmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales, son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Harman, 2001). La capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria de la biotecnología.

Según Tronsmo y Hhjelijord (1998) *Trichoderma* spp tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, además produce gran cantidad de enzimas inducibles con la presencia de hongos

fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitat donde los hongos causan enfermedad le permiten ser un eficiente agente de control, de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos.

Trichoderma spp es un hongo hiperparásito y actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y por micoparasitismo, produce además sustancias promotoras del crecimiento de las plantas. Coloniza las semillas y protege a las plántulas en la fase post-emergente de patógenos fúngicos (Stefanova, 2004).

Villegas (2009), al referirse a *Trichoderma* señala que este género está en el ambiente y en suelos preferentemente abundantes en materia orgánica y por su relación con ella está clasificado en el grupo de hongos hipógeos, lignolíticos y depredadores. Es aeróbico y pueden estar en suelos con pH neutro hasta ácido.

Refiere Gaitan, (2007) que el género *Trichoderma* pertenece a las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas por ser los mejores productores de celulosas. Estudios realizados por Vilchez Paz (2010), señalan al hongo *Trichoderma reesei* (viride) como el mejor productor de celulosa extracelular.

1.4.1 Clasificación.

Según Carone (1986) la clasificación del género *Trichoderma* es:

Reino----- Fungi
Subdivisión-----Deuteromycotina
Sub-clase -----Hyphomycetidae
Orden -----Moniliales
Familia-----Moniliaceae
Género-----*Trichoderma*

1.4.2 Descripción taxonómica

El género *Trichoderma* sp, se caracteriza por la presencia de conidofóros ramificados, fialides cortas hinchidas y frecuentemente curvadas, las masas conidiales presentan coloraciones que varían de blanco a verde y por lo regular forman pústulas, sus colonias se caracterizan por ser extensas bajo condiciones controladas (Villegas, 2009).

El género *Trichoderma* esta dividido en cinco secciones según Bissett (1991).

- a) Sección *Trichoderma*
- b) Sección *Pachybasium* (Sacc)
- c) Sección *Longibrachiatum* (Bissett)
- d) Sección *Saturnisporum* (Doi)
- e) Sección *Hypocreanum* (Doi)

1.4.3 Biología

Trichoderma es un hongo habitante natural del suelo agrupa a 33 especies, su presencia se identifica como una mota de color verde, observado al microscopio parece un árbol pequeño, que produce esporas o conidias asexuales, las cuales son similares a semillas, que aseguran la sobrevivencia del hongo en la próxima generación, y la apariencia de mota por ramificaciones llamado micelio, compuesto por hifas, produce en el micelio, unos ensanchamientos, que luego toman forma globosa u ovoide llamadas clamidosporas, bastante tolerantes a condiciones ambientales adversas y son consideradas estructuras de sobrevivencia, ya que pueden perdurar a través del tiempo (Harman, 2003).

Las especies *Trichoderma* para su crecimiento necesitan un alto porcentaje de compuestos de carbono y fuentes de nitrógeno. El carbono y los requerimientos de energía de *Trichoderma* son obtenidos de monosacáridos, disacáridos, polisacáridos complejos, purinas, pirimidinas y aminoácidos (De la Paz, 1997)

Según De la Paz (1997) *Trichoderma* spp. posee la habilidad de producir clamidosporas las cuáles tienen gran importancia para llevar a cabo un control biológico. Este autor plantea que el primer experimento para determinar la producción de metabolitos tóxicos por las especies de *Trichoderma* fue realizado por Weindling 1941, quien demostró la existencia de un metabolito fungicida producido por *Trichoderma lignorum* muy tóxico para *Rhizoctonia solani*.

Dennis y Webster (1971) determinaron que *Trichoderma* produce antibióticos diferentes a Glicetoxin y Viridin, aunque no fueron capaces de demostrar la producción de Glicetoxin por las nuevas especies agregadas de *Trichoderma* producido en fermentadores.

1.4.4 Distribución.

Las especies del género *Trichoderma spp* son mohos verdes cosmopolitas que deben su amplia distribución por estar adaptados a diferentes condiciones ambientales y se han podido encontrar en diversos materiales orgánicos y suelos de varios hábitat. Algunas especies prefieren localidades secas y templadas y otras templadas y húmedas (De la Paz, 1997).

Frecuentemente *Trichoderma spp* se presenta como un colonizador secundario en el material orgánico bien descompuesto de las raíces de varias plantas por lo que es imposible encontrarlos en la corteza descompuesta, especialmente cuando está dañada por otros hongos y sólo algunas veces se encuentra en esclerocios y propágulos de otros hongos (Papavizas, 1985).

1.5 Trichoderma biocontrolador de hongos fitopatógenos.

La necesidad de proteger los cultivos del ataque de los fitopatógenos del suelo y reducir el uso de los plaguicidas químicos hizo que en Cuba, a partir de 1990, se iniciaran investigaciones dirigidas a introducir el biocontrol con microorganismos como una alternativa promisoriosa dentro de las medidas de manejo establecidas en los cultivos. La efectividad de *Trichoderma* como agente de biocontrolador está

demostrada en varias partes del mundo. En las condiciones de Cuba la reducción de la incidencia de varios hongos patógenos de plantas de los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Pythium* sp. que causan problemas de importancia económica, se logró mediante el uso de biopreparados de *Trichoderma* (Stefanova y Sandoval, 1995).

Pérez (1995), comprobó el efecto del biopreparado de *Trichoderma* spp, en semilleros de tabaco, al producir la inhibición del desarrollo de hongos del suelo que producen *damping off*. Este resultado fue corroborado por Fernández (2006), en Pinar del Río, quien consideró que cuando la densidad de inóculo en el suelo de hongos que producen *damping - off* es baja, el biocontrolador aplicado al suelo tienen buena efectividad.

Por otra parte, Santana *et al.*, (2001) estudiaron “*in vitro*” la acción antagónica de *Trichoderma* spp contra *Sclerotium rolfsii* aislado de topinambur (*Helianthus tuberosum* L.), logrando la inhibición del hongo patógeno.

El potencial biocontrolador de *Trichoderma* spp. fue evaluado por González (1996) al enfrentarlo a *Fusarium* spp. aislado de semilla de papa, observando un marcado efecto hiperparásitico de las cepas estudiadas *Trichoderma harzianum* cepa A-34, *Trichoderma* spp. Cepa C-66 y *Trichoderma* spp con una colonización total sobre el hongo patógeno a los 10 días.

Rodríguez *et al.*, (1998), refiere que la aplicación foliar de *Trichoderma harzianum* en el cultivo del pepino frente a *Pseudoperonospora cubensis* (Berk Curtis) Rostovtsev) mildiu velloso y para el mildiu polvoriento *Erysiphe cichoracearum* D.C reduce la incidencia del patógeno en un 35% y 23% respectivamente, además de observar estimulación del crecimiento de las plantas.

A partir de la selección *in vitro*, en condiciones controladas y semicontroladas de cepas de *Trichoderma* spp. y la validación de su eficacia a nivel de campo se logró el primer fungicida biológico Trichosav; aplicado inicialmente en el tabaco contra

la pata prieta (*Phytophthora nicotianae*), en el tomate contra el *damping off*, y en el pimiento para el control de *Phytophthora capsici*, debido a su excelente resultado se extendió paulatinamente a otros cultivos (Stefanova, 2006).

Villegas (2009), en experimentos de campos demostró un incremento en la actividad de las especies de *Trichoderma harzianum* como micoparásito, mediante inoculaciones a las semillas obteniendo una disminución de la población de *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium* sp. y *Phythium* sp. en el suelo. También comprobó que la aplicación sobre el suelo en presiembra, siembra y post emergencia temprana, logra disminuir la incidencia de las enfermedades en el cultivo en más del 60%.

Por otra parte Muiño (2006), sugiere la combinación las cepas de *Trichoderma* (A-34, A-53 y T-53) con buen efecto sobre hongos y nemátodos aplicando medidas agrotécnicas, físicas y químicas el cual fue valido en diferentes sitios de producción.

1.6 Mecanismos de acción

Antagonismo:

Para el hongo antagonista *Trichoderma* spp no es fácil determinar con precisión los mecanismos de acción que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agente de control biológico (Fernández Larrea, 2001).

Debe señalarse que los antagonistas fúngicos puedan controlar el desarrollo a través de mecanismos semejantes a los que utilizan las bacterias, completar con mecanismos adicionales de control como el de inducción de resistencia en la planta y tolerancia a estrés, competencia por espacio, secreción de inactivadores

de los sistemas de infección del patógeno y de enzimas que hidrolizan a los componentes de las paredes celulares (Harman, 2004).

Reyes *et al.*, (2006) demostraron la elevada actividad antagónica e hiperparasítica de las cepas A-34 y A-53 de *T. harzianum*, que demostraron buenas potencialidades para el control de *Pyricularia grisea* (Sacc.) y *R. solani* (Kuhn) aislados de arroz.

Antibiosis:

El proceso en el cual el producto o productos metabólicos de un organismo inhibe directamente o mata a otros se conoce como antibiosis Baker, (1990). Generalmente estos organismos son saprofitos y dependen de los recursos de carbono en el suelo. Los antibióticos actúan en áreas no localizadas para mantener la posición en la superficie del sustrato y excluir a los organismos patógenos durante un período de tiempo largo (Cate, 1990).

Según Lorito *et al.*, (1992) *Trichoderma* posee la habilidad de controlar hongos patógenos de las plantas. La presencia de quitina en este biocontrolador juega un papel fundamental, ya que degrada la quitina de la pared celular de los hongos inhibiendo su crecimiento micelial y la germinación de esporas.

Por otra parte Morera (2007), señala que *Trichoderma* es capaz de producir multitud de metabolitos volátiles y no volátiles así como enzimas hidrolíticas, las cuáles tienen marcado carácter fungicida y bactericida. Una sola cepa de *Trichoderma* es capaz de producir varios de estos compuestos antibióticos, hecho que reduce el riesgo de crear resistencia.

Hiperparasitismo

Los términos parasitismo, micoparasitismo, parasitismo directo y parasitismo entre hongos, son usados en referencia al fenómeno de parasitismo de un hongo sobre otro. El hiperparasitismo generado por hongos provoca una serie de daños morfológicos sobre la especie, esta actividad se inicia con la cobertura de las hifas patógenas por el antagonista, posteriormente succionan los nutrientes y concluye

con la lisis de la hifa. Las interacciones hiperparasíticas pueden ser biotróficas y necrotróficas. Los parásitos biotróficos consumen los nutrientes de las células vivas del hospedero vía haustorios, mientras que el parásito necrotrófico se alimenta de las células muertas que son eliminadas a través de la secreción de toxinas y enzimas extracelulares antes de invadirlas. El grado de hiperparasitismo es afectado por cambio en la relación carbono – nitrógeno, temperatura, luz, pH y nutrientes (Morera, 2007). Este autor refiere además que los hongos micoparásitos son capaces de sobrevivir como saprófitos independientes y pueden crecer rápidamente sobre gran variedad de sustratos.

Competencia

Esta constituye un mecanismo de acción antagónico muy importante. Fernández Larrea (2001), lo define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia.

La mayoría de los microorganismos requieren de fuentes de alimentación como hierro, carbono y nitrógeno para poder completar su ciclo biológico. *Trichoderma* tiene la capacidad de aprovechar muy eficientemente los nutrientes que se encuentran en el medio en cantidades limitantes impidiendo que otros hongos tengan acceso a los mismos, la causa más común de muerte de un microorganismo es la inanición, así mismo el rápido desarrollo y colonización del medio por este hongo impide el establecimiento del patógeno (Morera, 2007).

1.7 Tecnología de reproducción de *Trichoderma*

El empleo actual de productos microbiológicos para el control fitosanitario se desarrolla mediante procesos artesanales que incluyen los métodos: líquido-líquido, líquido-sólido y sólido-sólido y los Industriales que comprenden el cultivo sumergido y la fermentación sólida (FES) (Fernández Larrea, 2001).

Garcías (2006), en estudios desarrollados en Venezuela sobre tecnologías de producción de *Trichoderma* refiere que el método líquido estático de forma artesanal acelera la obtención de inóculo del hongo para el proceso productivo. Al respecto Papavizas (1984) señala que mediante la fermentación sólido líquida se obtienen productos con mayor calidad que contienen esporas, micelios, clamidosporas o mezclas de estas estructuras conocidas como unidades formadoras de colonias y en el caso de las fermentaciones líquidas se desarrollan grandes cantidades de biomasa en un período de seis días de incubación.

Stefanova (2008), informa que en Cuba la producción artesanal del biopreparado a base de especies del género *Trichoderma* ha sido difundida por su fácil reproducción y efectividad en la protección de los cultivos contra hongos del suelo. Pérez, (2004) plantea que la producción de biopreparados de diferentes cepas de *Trichoderma* se realizan mediante métodos artesanales, por cultivos líquidos estáticos y sólidos bifásicos. Sobre las tecnologías de producción Vázquez *et al.*, (1997) refieren que la fermentación sólida mejora la calidad final, estabilidad y aumenta el tiempo de almacenamiento del biopreparado.

Por primera vez en Cuba durante las campañas 1994-1995 se emplearon biopreparados, obtenidos por métodos alternativos con materias primas nacionales y en parámetros controlados, de cepas promisorias nativas de *Trichoderma*, aplicadas según metodologías y dosis establecidas, en alrededor de 5208 ha de cultivo que incluyeron tabaco, hortalizas, granos y ornamentales entre otros, fundamentalmente en zonas de la provincia de Pinar del Río y Villa Clara (Stefanova, 2007).

La introducción de *Trichoderma* en Cienfuegos tuvo lugar en el período comprendido de 1993-1995 para el control de enfermedades utilizando la tecnología de producción líquido estático en medio de levadura torula; y posteriormente se varió para el cultivo sólido en sobres de papel empleando cabecilla de arroz 30% y 70% de paja de arroz como soporte, utilizando inicialmente el inóculo líquido con levadura torula y después se empleó como sustrato de este cabecilla de arroz, la cepa más usada fue la A-34. También en

investigaciones realizadas en evaluación de las cepas para el combate de *Sclerotium* en Topinambur las cepas A-61 y A-34 manifestaron efectividades superiores al 60% en tratamiento de semilla y del suelo (Castellanos *et al.*, 2006). En estudios realizados por Fernández Larrea (2006), se comprobó que para la tecnología sobre sustrato sólido el secado en cuarto climatizado permite obtener productos con menos del 12% de humedad, los cuales se mantienen estables hasta 4 meses a temperatura de 20-25°C, señala además que la elaboración de bioproductos con técnicas cada vez más eficientes y la obtención de fermentaciones que aumenten su estabilidad en el campo, están logrando un avance muy rápido de estas producciones; además refiere que para la selección del método de reproducción es importante tener en cuenta no sólo la factibilidad económica sino el mecanismo de acción, ya que en el producto final deben estar presentes las estructuras infestivas y los metabolitos activos de forma estable y con su mayor potencial biológico.

1.8 Sustratos para la reproducción de *Trichoderma* y control de la calidad.

En el mundo se han realizado evaluaciones de diferentes sustratos en la reproducción de *Trichoderma* spp obteniendo buenos resultados utilizando granos de trigo, granos de arena, arroz partido más cabecilla 75% y 25% y portadores inertes como zeolita, caolín y sulfato de calcio, todo esto con el objetivo de conocer el mejor tiempo de cosecha de conidias (Erazo, 2006).

Agamez *et al.*, (2009) en Colombia evaluaron la harina de plátano utilizándolo como sustrato de fácil obtención para la producción de *Trichoderma* spp en medios de cultivo líquido estático, resultando ser viable por su alta producción de conidios, obteniéndose concentración de $1,1 \times 10^9$ con/g.

Los sustratos utilizados en Cuba para la reproducción de *Trichoderma* spp están compuestos por subproductos agrícolas y de la industria azucarera. Si se recobra sobre un soporte adecuado su almacenamiento se puede prolongar 3-4 meses a temperatura ambiente (Stefanova, 2004).

La elección de los sustratos sobre los que se realizará la inoculación, previa esterilización, dependerá de la disponibilidad local y costo de estos así como de las características del aislado a reproducir se han usado cereales como agentes nutritivos (arroz, trigo, cáscara de trigo, cáscara de arroz, maíz etc.) y como agentes inertes de soporte la vermiculita, gránulos de minerales arcillosos, tela, etc. (Elósegui, 2006).

Pérez *et al.*, (1994) plantean que por la alta demanda del sustrato arroz se buscan otras sustancias que permitan sustituirla en parte o totalmente. Entre las alternativas evaluadas está la paja de arroz en pequeñas bolsas de polipropileno en condiciones de laboratorio durante 28 días. Se determinó la concentración y el porcentaje de germinación de estas a diferentes intervalos de tiempo. La concentración se mantuvo entre 8×10^8 y 2×10^9 conidios / g en todas las variantes hasta los 70 días, el porcentaje de germinación fue superior al 90 %. Pérez , (2004) considera que el sustrato más utilizado es la cabecilla de arroz (subproducto generado durante el proceso de grano).

Para la sustitución y ahorro de los sustratos tradicionales como: cabecilla de arroz, harina de maíz, paja de arroz y cáscara de café se realizaron estudios donde se utilizaron en sobres de papel: trigo, cebada o sorgo, todos desechos de la línea de producción de *Trichogramma*, resultando el trigo el soporte más idóneo (Brito, 1996).

En otros países también se ha realizado evaluaciones de diferentes sustratos en la reproducción de *Trichoderma* en Ecuador Castillo, (2001) demostró que en evaluaciones del crecimiento y desarrollo de *Trichoderma aureoviride* TA-1 en una fermentación de estado sólido sobre el sustrato arroz demostró que la mayor producción de conidios fue de 2.74×10^9 con./g correspondiente al nivel mas bajo de humedad (70% y cantidad de sustrato arroz (0.39 g/cm^2) estudiado.

Cuadra. *et al.*, (2005) en México investigaron la producción de *Trichoderma* sobre los sustratos: maíz, arroz –cascarilla de café, polvo de cáscara de café, pulpa de cáscara de café, pulpa de café, bagacillo de caña y cachaza de caña descompuesta, y obtuvieron la concentración mayor del hongo sobre el sustrato

maíz molido y humedecido con título de 1.9×10^9 conidios/gramos y los tratamientos menos eficientes fueron cascarilla de café, pulpa de café y cachaza de caña descompuesta.

Un aspecto importante a considerar en la producción masiva es el control de la calidad que incluye verificación de la pureza, concentración de conidios viabilidad de conidios y virulencia de cada una de las etapas del proceso y el producto final (Pérez, 2006).

Según Fernández Larrea (2001), se considera un biopreparado de buena calidad cuando se cumple lo siguiente: concentración de conidios igual o superior que 10^8 con/ml ó con/g, virulencia mayor de un 65%, viabilidad mayor o igual al 90%, libre de todo tipo de contaminación.

Una producción con un sistema de calidad establecido tiene un control estricto sobre la salida de su producto al poder analizar la calidad en cada punto crítico implicado en la elaboración de este. También se plantea controlar el proceso de forma que se le dé seguimiento a la calidad del producto no terminado, incluido la detección de contaminantes, además de un sistema que controle la calidad del producto final. Esto es muy significativo para el caso de los agentes fúngicos de control ya que para que sean efectivos precisan de que culminen exitosamente un complejo proceso de infección. Comparados con los agroquímicos los sistemas de calidad para la producción de bioplaguicidas microbianos deben ser más exhaustivos y especializados (Elósegui, 2006).

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Determinación de la calidad del bioproducto obtenido con diferentes tipos y volúmenes de sustrato así como porcentaje de humedad a partir de la cepa de *Trichoderma harzianum* A-34.

El ensayo se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo de medios biológicos de Sanidad Vegetal en Cienfuegos , en el período comprendido entre Enero del 2013 a Abril 2013 Se estudió el comportamiento de la cepa *Trichoderma harzianum* A-34, bajo diferentes tipos y volúmenes de sustratos así como porcentajes de humedad, en condiciones de cultivo estático sobre soporte sólido, empleando como sustratos, cáscara de arroz al 100 % en mezcla con melaza al 1%; aserrín 100 % mezclado con melaza al 1 % y empleando como variante testigo la mezcla de aserrín 70% mas cabecilla de arroz 30% que tradicionalmente se emplea en los centros de reproducción de entomopatogenos De acuerdo al tratamiento a evaluar se agregó un volumen de agua potable en mezcla con el 1% de melaza en relación al peso del sustrato hasta lograr 30, 50 y 70% de humedad. En 108 bandejas plásticas se adicionó la cantidad de sustrato a evaluar 500, 700 y 1000 g.

Se empleó un diseño multifactorial completamente aleatorizado con 27 tratamientos distribuidos en tres factores (tres tipos de sustratos, tres cantidades de sustrato y tres niveles de humedad) con 4 réplicas (bandejas), las que constituyeron la unidad experimental.

Los tratamientos se relacionan a continuación:

Tipo de sustrato	Niveles de sustrato (g)	Niveles de humedad (%)
Cáscara de	500	30
	500	40

Tipo de sustrato	Niveles de sustrato (g)	Niveles de humedad (%)
arroz 100 % + Melaza 1 %	500	50
	700	30
	700	40
	700	50
	1000	30
	1000	40
	1000	50
Aserrín de madera 100 % + Melaza 1 %	500	30
	500	40
	500	50
	700	30
	700	40
	700	50
	1000	30
	1000	40
	1000	50
Testigo Cabecilla de arroz 30 % + Cáscara de arroz 70%	500	30
	500	40
	500	50
	700	30
	700	40
	700	50
	1000	30
	1000	40
	1000	50

Para la reproducción del biopreparado se siguieron los siguientes pasos:

Preparación del sustrato: A cada tipo de sustrato en estudio, se le adicionó la cantidad de agua potable necesaria en relación al volumen peso en mezcla con melaza al 1% para lograr los niveles de humedad evaluados (30, 50, 70 %), depositado en bandejas plásticas según los diferentes volúmenes en estudio (500, 700, 1000 gramos); por su parte para la variante testigo se procedió como se describe en la metodología de reproducción de hongos antagonistas (INISAV 2010)

Esterilización: Para ejecutar la esterilización los sustrato se ubicaron en tamboras en la autoclave a 121 °C de temperatura y 1,2 atm durante 40 minutos, posteriormente se extrajeron y se mantuvieron en reposo durante 12 horas procediendo a la inoculación según metodologías orientadas por el (INISAV, 2010).

Preparación de preinóculos: Se utilizaron frascos de cristal de 500 ml, donde se adicionaron 24 g de cabecilla de arroz por cada recipiente y a partir de suspensiones de cultivos puros agarizados de la cepa de *Trichoderma* A-34 obtenidos en la sección de entomopatógeno del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal con sus correspondientes controles de calidad; se procedió a la inoculación para la que se emplearon dos cepas diluidas en 100ml de agua destilada estéril con una concentración 2.6×10^9 ufc/ml , después se inició la incubación en el cuarto de reposo a 25°C durante 5 días, de igual forma se comprobó la calidad del preinoculo para realizar posteriormente la siembra.

Inoculación del sustrato: A partir de los preinóculos se obtuvo el material para inocular el sustrato. La inoculación se realizó en las tamboras empleando la proporción de 10 ml de la suspensión por cada 100 g, posteriormente con movimientos rotatorios se procedió a homogenizar el inóculo, seguidamente se colocó en las bandejas según cantidad de sustrato en estudio

Incubación del biopreparado: Este proceso se realizó en cuarto climatizado a una temperatura de 25 °C donde el microorganismo se mantuvo en reposo hasta que se cosechó a los siete días.

Secado: La producción terminada se esparció sobre una superficie plana en cuarto climatizado a una temperatura de 20° C para extraer la humedad durante 72 horas, se tomaron muestras del producto final de cada réplica por variante y se le realizaron los análisis según la metodología descrita anteriormente para determinar los parámetros de calidad, NC 72-02 MINAGRI, 1993.

Variables de calidad del bioproducto que fueron determinadas:

- **Concentración de conidios/gramo de sustrato:** De la muestra del biopreparado evaluado se tomó un gramo del producto y se realizó una suspensión en 10ml de agua destilada estéril se mantuvo en reposo durante una hora y después se realizaron tres diluciones a las que posteriormente se hizo conteo de conidios en cámara de Neubauer, utilizando microscópico óptico con el objetivo de 40X.
- **Pureza del bioproducto:** Durante todo el proceso de producción se mantuvo una observación visual diaria eliminando el producto contaminado.
- **Virulencia:** Se realizó un enfrentamiento entre las diferentes variantes de sustratos evaluados y el hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc empleando medio agarizado de agar-papa-dextrosa (PDA), en placas Petri de 9 cm , se sembró un disco de 0.5 cm de diámetro de *Trichoderma* spp (cepa A-34) en un extremo y en el otro uno similar con el crecimiento del patógeno. Se midió el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* con una regla graduada al enfrentarse con el patógeno (entre cuatro a seis días), midiendo el solapamiento de la *Trichoderma* en cm.

- **Viabilidad:** Se llevó a cabo mediante siembra en PDA de 0.1 ml de suspensiones conidiales con Tween 80 al 0.01 % preparadas a partir del biopreparado final, a una concentración del orden de 10^8 con/g. Estas se incubaron a 28 C^0 por 24 horas. El conteo de conidios se realizó por replicas y los datos se expresaron en porcentaje de conidias germinados en un microscopio de contraste de fase, a las 24 horas.

Para conocer si existía diferencia entre las diferentes variantes en cuanto a la variable concentración del biopreparado (ufc/g) se realizó un análisis de varianza multifactorial. Se empleó como unidad experimental la bandeja.

Además se realizó un análisis de varianza simple para conocer si había diferencia entre los biopreparados obtenidos por cada tipo de sustrato en cuanto a las variables virulencia y viabilidad. Los datos de porcentajes de la viabilidad de los conidios fueron transformados en $2 \text{ arc sen } \sqrt{p}$.

En todos los casos las medias fueron comparadas por el test de rangos múltiples de Duncan con 5% de probabilidad de error (Lerch, 1977). para lo cual se empleó el paquete estadístico SSPS versión 15 para Windows.

CAPÍTULO III: RESULTADO Y DISCUSIÓN

3. 1 Determinación de la calidad del bioproducto obtenido con diferentes tipos y volúmenes de sustrato así como porcentaje de humedad a partir de la cepa de *Trichoderma harzianum* A-34

Interacción de la concentración entre sustrato -cantidad de sustrato y porcentaje de humedad.

Al analizar la interacción tipo de sustrato, cantidad y porcentaje de humedad la mejor combinación resulto la mezcla de Cáscara de Arroz con melaza al 1% independientemente del volumen analizado y con una humedad entre el 50 y 70 %; seguido estadísticamente por esta misma variante a volumen entre 500 y 1000 gramos con un 30% y 50% de humedad y por la variante empleada como testigo de Cabecilla de arroz 30% y aserrín 70 % en 500 y 1000 gramos y entre 50 y 70 % (Tabla 1).

Los presentes resultados demuestran una buena adaptabilidad de la cepa A- 34 en el proceso productivo para la mezcla de sustrato Cáscara de arroz melaza al 1% para volúmenes entre 500 y 1000 gramos de sustrato con porcentaje de humedad entre 50 y 70 %.

Similares resultados de calidad del producto obtuvo Castillo, (2001) al lograr producciones de conidias de *Trichoderma aureoviride* con la tecnología de fermentación en estado sólido sobre sustrato arroz, alcanzando concentraciones de $2,74 \times 10^9$ con/g con el nivel de humedad del 70%.

Tabla 1: Interacción de la concentración de esporas por gramo sustrato – volumen y humedad del biopreparado. *Trichoderma harzianum* cepa A- 34.

Tipo de sustrato	Volumen gramos	Humedad %	Concentración biopreparado	Significación
Cáscara de arroz + melaza 1%	700	50	7.87×10^9	a
Cáscara de arroz + melaza 1%	500	70	7.87×10^9	a
Cáscara de arroz + melaza 1%	1000	50	6.45×10^9	ab
Cáscara de arroz + melaza 1%	700	70	6.02×10^9	abc
Cáscara de arroz + melaza 1%	1000	30	5.65×10^9	bcd
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	700	50	5.57×10^9	bcd
Cáscara de arroz + melaza 1%	500	30	5.35×10^9	bcde
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	1000	70	4.57×10^9	bcdef
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	500	50	4.50×10^9	bcdef
Cáscara de arroz + melaza 1%	500	50	4.47×10^9	bcdef
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	1000	50	4.35×10^9	cdef
Cáscara de arroz + melaza 1%	1000	70	4.25×10^9	cdef
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	500	70	4.12×10^9	cdef
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	1000	30	3.77×10^9	def
Cáscara de arroz + melaza 1%	700	30	3.75×10^9	def
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	700	70	3.47×10^9	ef
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	700	30	3.30×10^9	f
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín70%	500	30	2.72×10^9	f
Aserrín + Melaza 1%	500	70	3.25×10^7	g
Aserrín + Melaza 1%	700	70	3.00×10^7	g
Aserrín + Melaza 1%	1000	70	2.50×10^7	g
Aserrín + Melaza 1%	700	50	2.50×10^7	g
Aserrín + Melaza 1%	1000	30	2.50×10^7	g
Aserrín + Melaza 1%	1000	50	2.25×10^7	g
Aserrín + Melaza 1%	700	30	2.25×10^7	g

Tipo de sustrato	Volumen gramos	Humedad %	Concentración biopreparado	Significación
Aserrín + Melaza 1%	500	30	2.25×10^7	g
Aserrín + Melaza 1%	500	50	1.50×10^7	g
CV %:	16			
ET*:	0.54			

***Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)*.**

Los resultados obtenidos al evaluar los diferentes sustratos (Tabla 2) demostraron superioridad estadística en la variante Cáscara de arroz + Melaza 1% (5.74×10^9) seguida de Cabecilla de arroz 30% + Aserrín 70% (4.04×10^9), aunque es necesario señalar que desde el punto de vista de la calidad exigido a este tipo de producciones las dos variantes obtuvieron valores aceptados a estos bioproductos no así la variante Aserrín + Melaza 1% cuya concentración de 10^7 no es permitida en este tipo de productos.

Segun Elosegui (2006) la relación carbono (C) - Nitrógeno (N) es esencial, y de este balance en lo fundamental depende el que se logre la formación de los propágulos deseados, para el caso de los hongos, se necesita que la fuente C esté en exceso en el medio y el contenido de N sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso esporulativo, teniendo en cuenta este aspecto; los resultados obtenidos en este estudio pueden estar influenciados por esta relación que en el caso del aserrín cuenta con una proporción del 50% de carbono y un 2 % de nitrógeno mientras que para la cáscara de arroz la proporción es de 40 % de carbono y de 0.47 % de nitrógeno Quicena (2010); como puede apreciarse esto explicaría las bajas concentraciones logradas en la variante Aserrín mas melaza 1%.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sierra, (2006) quien considera el sustrato natural paja de arroz como promisorio para la producción del hongo *Trichoderma* con un bajo nivel de contaminación.

Tabla 2: Concentraciones del biopreparado (ufc/g) para tres sustratos de *Trichoderma* cepa A-34.

Sustratos	Concentración ufc/g	Significación
Cáscara de arroz + Melaza 1%	5.74×10^9	a
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín 70%	4.04×10^9	b
Aserrín + Melaza 1%	2.44×10^7	c
CV %	18.0	
ET*	0.60	

***Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)*.**

Al analizar la concentración del bioproducto (ufc/g) en las variantes con diferentes cantidades de sustrato se observa que este parámetro no evidenció diferencia estadística, alcanzando valores que oscilaron entre 3.23 a 3.34×10^9 a volúmenes de sustrato de 500- 700 y 1000 gramos respectivamente, por lo que no representa una limitante para el desarrollo de la producción: (Tabla 3)

Desde el punto de vista operativo el empleo de 1000 gramos /bandeja aumenta la capacidad productiva a nivel de laboratorio pues como se aprecia no existió diferencia estadística en cuanto a los diferentes valores de sustrato aunque es necesario señalar que para mayor facilidad del trabajo los recipientes deben ser algo mayor.

Tabla 3 Concentraciones del biopreparado (ufc/g) por volumen de sustrato de *Trichoderma* cepa A-34.

Volumen del Sustrato Gramos	Concentración ufc/g	Significación
500	3.23×10^9	NS
700	3.34×10^9	NS
1000	3.23×10^9	NS
CV %	18.0	
ET*	0.60	

Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a los porcentajes de humedad se puede demostrar que las mejores concentraciones de (ufc/ gramos) ocurrieron a 50 y 70 % con valores de 3.69×10^9 y 3.37×10^9 respectivamente, mientras que los menores valores ocurrieron al 30 % de humedad (2.73×10^9) Estos resultados coinciden con lo planteado por Elosegui (2006) cuando refiere que una baja humedad podría inhibir el desarrollo del antagonista. (Tabla 4).

Tabla 4 Concentraciones del biopreparado (ufc/g) según porcentaje de humedad para *Trichoderma* cepa A-34.

Humedad %	Concentración ufc/g	Significación
30	2.73×10^9	b
50	3.69×10^9	a
70	3.37×10^9	a
CV %	18.0	
ET*	0.60	

***Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)*.**

La interacción de los valores de concentración de esporas por gramo entre sustrato y humedad corrobora los resultados antes descritos pues la mejor combinación resulto la mezcla de Cáscara de Arroz mas Melaza al 1% con valores de humedad entre el 50 y 70 % siguiendo en orden estadístico esta misma variante con 30 % de humedad y la de Cabecilla de arroz 30% en mezcla con Aserrín 70% entre 50 y 70 % de humedad. (Tabla 5).

Tabla 5: Interacción de la concentración de esporas por gramo sustrato – humedad del biopreparado. *Trichoderma harzianum* cepa A- 34.

Tipo de sustrato	Humedad %	Concentración biopreparado	Significación
Cáscara de arroz + melaza 1%	70	6.26 x 10 ⁹	a
Cáscara de arroz + melaza 1%	50	6.05 x 10 ⁹	a
Cáscara de arroz + melaza 1%	30	4.91 x 10 ⁹	b
Cabecilla de arroz 30% + Aserrin70%	50	4.80 x 10 ⁹	b
Cabecilla de arroz 30% + Aserrin70%	70	4.05 x 10 ⁹	bc
Cabecilla de arroz 30% + Aserrin70%	30	3.26 x 10 ⁹	c
Aserrín + Melaza 1%	70	2.92 x 10 ⁷	d
Aserrín + Melaza 1%	30	2.33 x 10 ⁷	d
Aserrín + Melaza 1%	50	2.33 x 10 ⁷	d
CV %:	5.5		
ET*:	0.18		

Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)*).



Figura 1 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Cepa A-34 sobre sustrato Cabecilla de Arroz 30% y Aserrín 70 %



Figura 2 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Cepa A-34 sobre sustrato Cáscara de arroz mas Melaza 1%

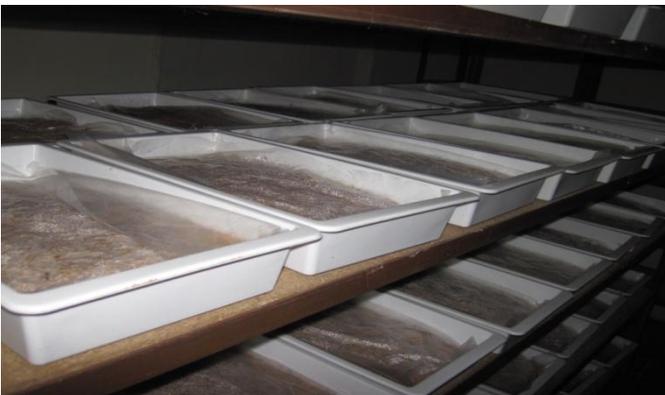


Figura 3 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Cepa A-34 sobre sustrato Aserrín mas Melaza 1%

El análisis visual de la pureza del bioproducto al final del proceso (Tabla 6) manifiesto que para el sustrato aserrín en mezcla con melaza 1 % fue donde se

presentaron niveles de contaminación por bacterias, debido principalmente a poco y lento desarrollo de la *Trichoderma* spp sobre este sustrato lo cual propicio el incremento de agentes contaminantes.

La presencia de contaminantes no puede verse como algo casual sino como algo inherente al propio proceso productivo como han planteado Elosegui *et al.*, (2005), quienes además señalan en particular que la calidad del sustrato y de la esterilización juegan un papel importante en la carga de contaminantes del bioproducto de *Trichoderma* al final del proceso productivo.

Como es lógico cuando un microorganismo no encuentra condiciones idóneas para su crecimiento y desarrollo, no evidencia su potencial, en particular cuando existe un medio rico, que permite que sea utilizado en otros microorganismos lo que está en correspondencia con lo planteado por Elosegui *et al.*, (2005) quienes comprobaron que para condiciones similares de humedad y esterilización el mayor riesgo de contaminaciones del bioproducto de *Trichoderma* ocurrió en la variante que incluía aserrín en la mezcla de sustrato.

Tabla 6 Pureza del bioproducto obtenido por cada variante

Tipo sustrato	Niveles sustrato (g)	Niveles de humedad (%)	Pureza visual (%)	Pureza al microscopio (%)	Presencia o No de Contaminantes
Cáscara de arroz + melaza 1%	500	30	100	100	No contaminado
	500	50	100	100	No contaminado
	500	70	100	100	No contaminado
	700	30	100	100	No contaminado
	700	50	100	100	No contaminado
	700	70	100	100	No contaminado
	1000	30	100	100	No contaminado
	1000	50	100	100	No contaminado
	1000	70	100	100	No contaminado
Aserrín + melaza 1%	500	30	100	100	No contaminado
	500	50	100	85	Bacteria
	500	70	100	80	Bacteria
	700	30	100	85	Bacteria
	700	50	100	90	Bacteria
	700	70	100	85	Bacteria
	1000	30	100	90	Bacteria
	100	50	100	85	Bacteria
	1000	70	100	80	Bacteria
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín 70 %	500	30	100	100	No contaminado
	500	50	100	100	No contaminado
	500	70	100	100	No contaminado
	700	30	100	100	No contaminado
	700	50	100	100	No contaminado
	700	70	100	100	No contaminado
	1000	30	100	100	No contaminado
	100	50	100	100	No contaminado
	1000	70	100	100	No contaminado

Interacción de la viabilidad con el sustrato -cantidad de sustrato y porcentaje de humedad.

En el análisis de la interacción de viabilidad con el sustrato -cantidad de sustrato y porcentaje de humedad quedo demostrado que las variantes Cáscara de arroz en mezcla con aserrín al 1 % y la testigo a base de cabecilla de arroz 30% mas aserrín 70% no manifestaron diferencia estadística en cuanto a los valores independientemente del volumen de sustrato y porcentaje de humedad lo que demuestra que no se afecta el poder germinativo de la conidia al emplear este sustrato a base de Cáscara de arroz en mezcla con aserrín al 1 %, no resultando asi para la variante Aserrín mas Melaza al 1%. (Tabla 7).

Tabla 7 Interacción de la viabilidad según sustrato – volumen y humedad del biopreparado. *Trichoderma harzianum* cepa A- 34.

Tipo de sustrato	Volumen gramos	Hum edad %	Viabilidad %	Signifi cación
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	500	30	98.3	a
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	700	30	98.1	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	700	50	97.6	a
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	1000	30	97.7	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	700	70	97.6	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	1000	50	97.6	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	500	70	97.3	a
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	1000	50	967.1	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	1000	30	97.0	a
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	500	50	96.8	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	700	30	96.8	a
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	700	70	96.8	a
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	500	70	96.8	a

Tipo de sustrato	Volumen gramos	Hum edad %	Viabilidad %	Signifi cación
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	700	50	96.8	a
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	1000	70	96.5	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	500	50	96.3	a
Cáscara de arroz + Melaza 1%	1000	70	96.1	a
Aserrín + Melaza 1%	1000	30	84.0	b
Aserrín + Melaza 1%	700	50	84.0	b
Aserrín + Melaza 1%	1000	50	83.0	b
Aserrín + Melaza 1%	500	70	83.0	b
Aserrín + Melaza 1%	1000	70	83.0	b
Aserrín + Melaza 1%	700	70	83.0	b
Aserrín + Melaza 1%	500	30	82.0	b
Aserrín + Melaza 1%	700	30	82.0	b
Aserrín + Melaza 1%	500	50	82.0	b
CV %:	6.2			
ET*:	0.49			

***Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)*.**

Al determinar la viabilidad del bioproducto al microscopio los resultados arrojados no manifestaron diferencia estadística en el análisis de varianza para las variantes Cáscara de arroz + Melaza 1% (97.1 %) y Cabecilla de arroz 30% + Aserrín 70% (97.2 %) y si entre ellas y el Aserrín + Melaza 1% (83.0%) Tabla 8) Esto resulta lógico si se tiene en cuenta que la viabilidad es una característica intrínseca de las conidias cosechadas y que varios autores se refieren a la alta capacidad de viabilidad de los conidias de las diferentes especies y cepas del género *Trichoderma* como Sandoval *et al.* (1998).

Tabla 8. Viabilidad del biopreparado (%) para tres sustratos de *Trichoderma* cepa A-34.

Sustratos	Viabilidad %	Significación
Cáscara de arroz + Melaza 1%	97.1	a
Cabecilla de arroz 30% + Aserrín 70%	97.2	a
Aserrín + Melaza 1%	83.0	b
CV %	0.6	
ET*	0.01	

Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)*).

Los sustratos Cáscara de Arroz + Melaza 1% y Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70 % resultaron hiperparasíticos, esporulando sobre el hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc. sin manifestar diferencia estadística entre ellos, no así el sustrato Aserrín mas Melaza 1% que resulto inferior, presentando diferencia estadística con los antes mencionados (Tabla 9).

Al analizar los resultados de virulencia pudo comprobarse un rápido crecimiento del antagonista *Trichoderma* en los sustratos que evidencian mayores valores, el cual inhibió el crecimiento del hongo patógeno, avanzando sobre la colonia de este, e hiperparasitándolo (Figura 4). Los resultados alcanzados indican que la virulencia del bioproducto no va a depender de las condiciones bajo las cuales se realizó el proceso de producción en cuanto a cantidad de sustrato y porcentajes de humedad, sino que depende de la cantidad de conidias y capacidad intrínseca de cada cepa de producir hiperparasitismo sobre un organismo determinado.



Figura 4. Colonización de la mayor parte de la placa por *Trichoderma* A-34 e inhibición el hongo patógeno y crecimiento sobre éste con el sustrato Cáscara de Arroz más Melaza 1%.

Tabla 9: Virulencia del biopreparado para tres tipos de sustrato

Tipo de Sustrato	Hiperparasitismo Crecimiento de la colonia (cm)	Significación
Cáscara de Arroz + Melaza 1%	1.98	a
Aserrín + Melaza 1%	0.45	b
Cabecilla de arroz 30 % + Aserrín 70%	1.90	a
CV %	6.0	
ET*	0.12	

Medias con letras desiguales difieren para $p < 0.05$ según test de Duncan (Lerch, 1977)).

CONCLUSIONES

1. Los mayores valores de concentración de ufc/g y porcentaje de viabilidad se obtuvieron en la variante Cáscara de arroz más melaza 1%, seguida de la variante testigo.
2. El bioproducto *Trichoderma* spp no presento diferencia cuando se trabajo a volúmenes de 500, 700 y 1000g/ bandeja.
3. Los mejores concentraciones de ufc/g y de viabilidad se obtuvieron a 50 y 70 % de humedad.
4. Los sustratos Cáscara de arroz mas melaza al 1% y La variante testigo cabecilla de arroz 30% y aserrín al 70 % alcanzaron un 100% de pureza mientras que la variante Aserrín mas melaza 1% presento diferentes niveles de contaminación, causadas por bacterias.

RECOMENDACIONES

1. Introducir el sustrato Cáscara de arroz mas Melaza 1% como alternativa para la producción de *Trichoderma* spp
2. Emplear en la producción del biopreparado volúmenes de sustrato de 700 gramos y 50 % de humedad.
3. Evaluar esta alternativa en otras cepas de *Trichoderma* spp.

BIBLIOGRAFÍA

1935, W. (1935). Concepto enfermedad daño y enfermedad.

A. Tronsmo, L. G. H. (1998). Biological control with *Trichoderma* species. p. 11-124.

B. Muiño, E. B., E. Pérez, D. Moreno, E. Fernández. (2006). Uso de *Trichoderma* como alternativa al bromuro de metilo en los cultivos protegidos, . *Fitosanidad* 10 p. 179-180.

Bach, P. D. (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. London.

Bernal, M. E. (2007). Reflexiones sobre el concepto de enfermedad. La praxis de su manejo en plantas. *Revista Luna Azul*, p. 1-5.

Bissett, J. A. (1991). Revision of the genus *Trichoderma* II. .

Brito, R. R. (1996). Sustitución de sustratos para la reproducción de *Trichoderma* spp. Paper presented at the Resúmenes V Jornada Científico Técnica de Sanidad Vegetal.

C. A. Baker, J. M. S. H. (1990). Commercial production and formation of microbial agents.

C.M. Andreu , J. R. G. (2007). *La Sanidad Vegetal en la Agricultura Sostenible*. UCLV.

Campbell, R. (1989). *Biological control of microbial pathogens*. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britann.

Castellanos, L. (2001). Prospección de microorganismos de interés agrícolas y ambiental en la provincia Cienfuegos. Unpublished manuscript.

Castillo, D. M. (2001). Evaluación del crecimiento y desarrollo de *Trichoderma aureoviride* TAT-1 en una fermentación de estado sólido sobre el sustrato arroz.

- D. M. Gaitan, L. P. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en el cultivo de crisantemo (*Dendrathera grandiflora*). . Unpublished Trabajo de grado Puntifina Universidad Javeriana.
- E. Agamez, J. B., L. Oviedo. (2009). Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* sp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. Universidad de Córdoba, Montería., Montería, Colombia.
- Erazo, N. (2006). Evaluación de la curva de crecimiento y producción de *Trichoderma* spp. Paper presented at the Comportamiento frente a Fungicidas y hongos fitopatógenos.
- F. Rodríguez, M. S. y. U. G. (1998). Efecto del biopreparado de *Trichoderma harzianum* (Rifai) contra *Pseudoperonospora cubensis* (Berk Curt) Rostow y *Erysiphe cichoraceanum* D.C en pepino (*Cucumis sativus* L.) Fitosanidad, 2 p.41- 43.
- Fernandez, A. D. F. y. C. (1990). Principios de Protección de Plantas. Cuba: Editorial Científico-Técnica.
- Fernández-Larrea, O. (2001). Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas. Unpublished manuscript, La Habana.
- G. C. Papavizas , D. P. R., K. K. Kim. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Phytopathology* p. 23 - 54.
- G. C. Papavizas , D. P. R., K. K. Kim. (1990). Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. *Can J Microbiol*, p. 484-489.
- G. C. Papavizas, M. T. D., J. A. Lewis and J. Beagle Distaino. (1984). Fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology*, 74, p.1171 – 1175.
- G.Lerch. (1977). La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. La Habana: Editorial Científico Técnico.

- Garq., K. G. M. y. K. L. (1988). Biocontrol of plant disease (Vol. 1).
- González, M. (1996). Efecto antagónico de diferentes cepas de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* spp aislado de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.). Paper presented at the V Jornada Científico Técnica de Sanidad Vegetal.
- Harman, E. G. (Ed.). (2003). *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales).. .
- I. Rodríguez, Y. P. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. VITAE, . Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- I. Sandoval, M. L., D. García, I. Mendoza. (1995). *Trichoderma harzianum* (cepa A-34). Un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento. Boletín Técnico No 3. p. 7-14. Boletín Técnico 3, p. 7-14.
- INISAV. (2010). Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para uso en el sistema de producción agrícola del MINAG. Unpublished manuscript, La Habana
- Irimia, H. I. (2011). Niveles de humedad, cepa y cantidad de sustrato arroz entero para la producción de *Trichoderma* spp. . Unpublished Tesis presentada en opción del título académico de Master en Agricultura Sostenible CETAS. , Universidad Carlos Rafael Rodríguez. Cienfuegos.
- L. Castellanos, M. G. (2006). Prospección, aislamiento y clasificación de microorganismos degradadores de materia orgánica en la Provincia Cienfuegos. Unpublished manuscript, Cienfuegos.
- L. De Paz, M. M. (1997). *Trichoderma* sp agente biocontrolador de hongos fitopatógenos. Unpublished Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de México.

- L. E. Caltagirone, R. L. D. (1989). The history of vedali. beetle importation to California and impact on the development of biological control. *Annual Review of Entomology* 34, p. 1-16.
- L. L. Vázquez, A. C. (. 1997.). Desarrollo del control biológico de plagas en la agricultura cubana.
- L. L. Vázquez, I. P. (2003). Enfoque actual de la generación y transferencias de tecnologías de manejo de plagas para pequeños y medianos agricultores. . Paper presented at the Manejo Integrado de plagas en la Producción Agraria Sostenible. Curso –Taller para agricultores y extensionistas. CID-INISAV. La Habana, Cuba. p. 5-19.
- Larrea, O. F. (2006). Alternativas de producción de Trichoderma en Cuba. Paper presented at the Taller Latinoamericano. Biocontrol de fitopatógenos con Trichoderma y otros antagonistas
- M. Lorito, G. H., A. Di Prieto and C. Hayes. . (1992). Extracelular chitinolytic enzyme produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. *Phytopathology* 82 p. 1077.
- M. Stefanova, I. S., M. L. Martínez , M. L. , I. Heredia, D. Aviosa, R. Arevalo. . Control de hongos fitopatógenos del suelo en semilleros de tabaco con *Trichoderma harzianum*. *Fitosanidad*, p. 35-38.
- M. Stefanova, I. S., M. L. Martínez , M. L. , I. Heredia, D. Aviosa, R. Arevalo. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. En el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Boletín Técnico* p. 22.
- Menéndez, J. (2006). Taller Latinoamericano Paper presented at the Biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* y otros antagonistas.
- MINAGRI. (1993). Norma Cubana Biopreparados de entomopatógenos. Métodos de ensayo. *Biotecnología Agrícola*. Cuba.
- Morera, J. (2007). Producto biológico a base de *Trichoderma* spp. Valencia, España.

- Nakas, J. C. R. a. J. P. (1999). Interrelations h.p of mylanase induction and celllaseminduction of *Trichoderma Longibrachiatium*.
- Nivia, E. (2003). Mujeres y plaguicidas.Una mirada a la situación actual, tendencias y riesgos de los plaguicidas.Unpublished manuscript, Santiago de Chile, Chile.
- O. Elósegui, O. F. L., A. Carr. (2005). Influencia de la carga microbiana contaminante inicial del sustrato en la calidad final de biopreparados de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. . *Biotecnología Agrícola*, 9, p. 51-55.
- O. Elósegui, O. F. L., A. Carr. (2006). Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas.Unpublished manuscript, La Habana.
- Paz Vilches, L. L. (2010). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. .
- Pérez, C. A. (1995). Sustitución de las tres primeras aplicaciones de fungicidas en semilleros de tabaco por el hongo *Trichoderma spp*. Paper presented at the III Encuentro Nacional Científico-Técnico de bioplaguicidas y III Expo-CREE. Memorias. .
- Perez, N. (2004). Manejo Ecológico de plagas. la Habana: Universidad Agraria de la Habana.
- Quicena, V. D. (2010). Alternativas tecnológicas para el uso d ela cascarilla d e arroz como combustible. . Universidad autónoma de Occidente.
- R. Cuadra, A. F., M. Perales, E. Pedrosa , X. Cruz, L. Soto, Ma. Zayas (2005). Producción de bioplaguicidas confeccionados con productos o subproductos agrícolas de Huasteca Hidalguense de México. *Rev. Protección vegetal*, 20, p.110-113.
- R. G. Van Driesche, T. S. B. (1996). Parasitoids and Predators of Artropods and Molluscs.

- R. Garcia, R. R., R. C. Zambrano, L. Gutiérrez. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región Andina Venezolana. Unpublished manuscript.
- R. J. Cate, P. E. D. (1990). Biological control of pest and diseases: Integrating a diverse heritage. New York.
- R. T. Reyes , G. C. R., Z. D. Pupo, P. L. Alarcón y C. Y. Limonta de La Habana del 28 - 31 p. . (2006). Efectividad in Vitro de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). En memorias cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Paper presented at the En memorias del taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. .
- R. Van den Bosch, P. S. (1973). Biological Control. Intext Educational
- R. Van den Bosch, P. S. M. (1973). Biological Control. New Cork, A U.S.
- Ricard, T. (2002). Development of Biofungicides. Biotech International p. 8-11.
- Sandoval, M. S. y I. (1995). Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. en el control de hongos fitopatógenos del suelo. Boletín Técnico
- Stefanova, M. (2006). Desarrollo, Alcances y retos del biocontrol de fitopatógenos en Cuba. . Biblioteca virtual del CETAS.
- Stefanova, M. (2007). Introducción y eficiencia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp en Cuba. Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal, 11, no, 3. p. 175-179.
- Stefanova, M. (2008). Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. Como antagonista de hongos fitopatógenos. . p.1-6.

- Stefanova, M. (2009). Produccion y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos.
- T. Santana, L. C., M. Lorenzo. (2001). Acción antagónica que ejercen diferentes cepas de *Trichoderma* spp contra *Sclerotium rolfsii* aislada de Topinambur (*Helianthus tuberosum* L.). III Encuentro Nacional Científico Técnico de Bioplaguicidas. Paper presented at the III Encuentro Nacional Científico Técnico de Bioplaguicidas.
- Villegas, M. A. (2009). *Trichoderma*. Características generales y su potencial biológico en la Agricultura Sostenible. [http, //www.orius biotecnología com/site/index. php](http://www.orius biotecnología com/site/index. php).
- Webster, L. D. a. J. (1971). Antagonistc properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction.