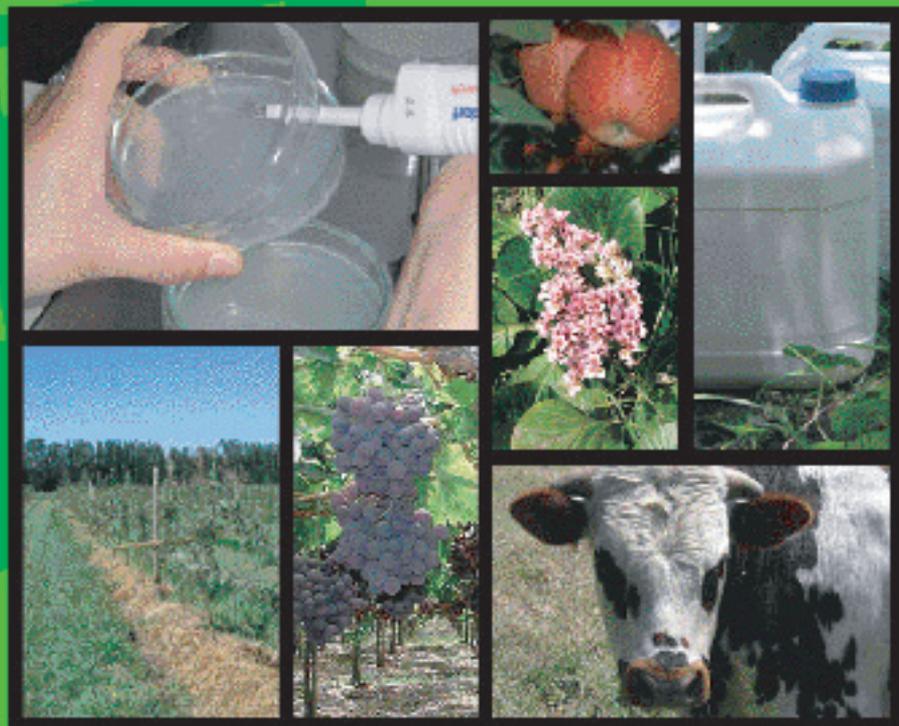


# M A N U A L



## PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN DE **Trichoderma spp.**



Registro Propiedad Intelectual  
Inscripción N° 142372  
I.S.B.N. 956-8363-02-5  
Centro de Educación y Tecnología  
Fundación para la Innovación Agraria

La presente publicación entrega resultados obtenidos en el marco del proyecto "Producción y utilización de Trichoderma SPP. En el control de enfermedades fongosas en sistemas de producción de frutas orgánicas de exportación en la zona central de Chile", desarrollado entre los años 2000 y 2004, con el apoyo financiero de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

Santiago de Chile  
Septiembre de 2004

## Presentación

La presente publicación reúne y sistematiza un conjunto de información técnica desarrollada por el Centro de Educación y Tecnología sobre la producción y uso de *Trichoderma* spp. en el control biológico de *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cactorum* en vid y manzano respectivamente, así como los resultados de mayor relevancia obtenidos en el proyecto “Producción y utilización de *Trichoderma* spp. en el control de enfermedades fungosas en sistemas de producción de fruta orgánica de exportación en la zona central de Chile”, realizado entre los años 2000 y 2004 con el apoyo financiero de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

En el desarrollo del trabajo de campo se contó con el apoyo de las empresas: Viñedos Orgánicos Emiliana S.A.; Frutícola Viconto S.A.; Mira-Ríos S.A. y Huertos Orgánicos de Chile.

Durante la implementación de la iniciativa se definieron los siguientes objetivos: Aislar e identificar cepas nativas de *Trichoderma*; Evaluación de laboratorio de las cepas aisladas; Evaluación de campo en el control de *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cactorum*, en vid y manzano; Formulación de distintas presentaciones de los biocontroladores mejor evaluados.

En el proyecto se lograron aislar 42 cepas con potencial de control, entre las que se destacan algunas por su habilidad para crecer a distintas temperaturas así como por sus positivos índices de control de patógenos.

Las cepas se obtuvieron de los predios de las empresas involucradas en el trabajo de investigación, especialmente en rodales de bosque nativo ubicados en las distintas propiedades.

Las Zonas involucradas corresponden al Valle de Casablanca, Valle del río Tinguiririca, Chimbarongo y la Precordillera de Parral.

El manual que ahora entregamos a productores y técnicos se ha desarrollado en base a la información obtenida durante 4 años de trabajo y en el se entrega una parte de las experiencias generadas por el proyecto, en especial aquellas relativas al aislamiento, producción, evaluación y usos del controlador obtenido.

Como productos finales se logró formular tres presentaciones, una pasta para el control de *P. cactorum* y aplicación en cortes de poda, presentación en polvo y líquida para el control de *B. cinerea* en viña y parronal.

Esperamos finalmente que esta publicación contribuya al desarrollo de la agricultura orgánica y estimule a productores y técnicos a buscar formas armónicas de interacción con la naturaleza, en la búsqueda del desarrollo humano.



## Indice

<b>01</b>	Introducción	pag. 5
<b>02</b>	Características del genero Trichoderma	pag. 6
<b>03</b>	Mecanismos de acción	pag. 7
<b>04</b>	Aplicaciones y resultados del uso de Trichoderma en el control de patógenos de plantas.	pag. 8
<b>05</b>	Aislamientos nativos	pag. 10
<b>06</b>	Pruebas de antagonismo	pag. 12
<b>07</b>	Cepario de conservación	pag. 13
<b>08</b>	Preparación del sustrato y cultivo	pag. 16
<b>09</b>	Producto final	pag. 18
<b>10</b>	Control de calidad de Trichoderma spp	pag. 19
<b>11</b>	Aplicación y tipos de productos finales	pag. 23

# 01 Introducción

En la agricultura convencional moderna, los fungicidas son la principal herramienta empleada para el control de hongos fitopatógenos. El uso continuado de estos productos químicos para el control de estos microorganismos a provocado a través del tiempo el desarrollo de resistencia a los fungicidas utilizados. Por ello, la tendencia actual ha sido racionalizar el uso de fungicidas y desarrollar nuevas alternativas de control a través del uso de agentes de control biológico. Por otra parte, se ha desarrollado a nivel Europeo y Norteamericano un importante mercado que demanda productos hortofrutícolas obtenidos en procesos limpios de producción, generados en sistemas agrícolas que no utilizan pesticidas sintéticos durante el proceso productivo. En este marco, en la actualidad, se han desarrollado biopreparados en base a microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp, que pueden reducir el impacto de los patógenos vegetales. Este hongo antagonista permite el control de patologías fungosas en árboles frutales, forestales y hortalizas, es posible aislarlo localmente y reproducirlo en forma masiva para su aplicación a nivel de campo. El objetivo de este manual es colaborar a la obtención y aplicación correcta del hongo antagonista *Trichoderma* spp.



## 02 Características del genero Trichoderma

El género Trichoderma es uno de los más estudiados, entre numerosos agentes de control biológico, por sus características de antagonismo en condiciones naturales. El se comporta como hiperparásito frente a diversos patógenos, atacando directamente y produciendo la ruptura del micelio de los hongos productores de enfermedades de las plantas.

Las especies de este género son hongos de vida libre, altamente interactivos en las raíces suelo y ambiente foliar, también se ha descrito en este género una gran capacidad de inactivar exudados originados en las semillas en



germinación, que estimulan el desarrollo de propágulos de hongos patógenos de plantas en el suelo, (Howell, 2002; Harman 2004), su estudio ha estado dirigido a aumentar la densidad del inóculo, mediante prácticas agrícolas o por introducción directa en el suelo (Chet, 1987),

### Trichoderma

**Es un hongo imperfecto perteneciente a la Subdivisión Deuteromycotina: Clase: Deuteromycetes (Aleuxopulus (1979)**

**El género Trichoderma se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, encontrándose en prácticamente todos los suelos y otros hábitats naturales, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica. Trichoderma es un colonizador secundario pudiendo ser aislado de materia orgánica descompuesta, superficie de raíces de plantas, madera en descomposición y en esclerocios o propágulos de otros hongos. (Papavizas, 1985; Howell 2002).**



# 03 Mecanismos de acción

Trichoderma como antagonista, puede tener diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran el micoparasitismo, competencia, antibiosis e inducción de resistencia en las plantas.

## **a) Micoparasitismo**

Este proceso de micoparasitismo sería uno de los principales mecanismos involucrados en el antagonismo de Trichoderma como agente biocontrolador. Este proceso incluiría el crecimiento del antagonista hacia el patógeno, desarrollándose alrededor de éste o formando estructuras similares a ganchos o apresorios en la superficie del hospedero, que le permitirían, penetrar al interior (del patógeno) y por acción de enzimas líticas (quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa) degradar su pared celular (Elad et al, 1993, Garza et al., 1997; Metcalf y Wilson 2001; Brunner et al 2003).

## **b) Competencia**

La competencia por sustrato y nutrientes sería otro

mecanismo que explicaría el efecto antagónico de Trichoderma. Este proceso ocurre cuando dos o más organismos requieren el mismo recurso y el uso de éste por uno, reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia fundamentalmente se produce por recursos esenciales como carbono, nitrógeno, hierro y espacio físico.

Un mecanismo que recientemente ha ganado adherentes es la competencia que se produce a nivel de la rizosfera cuando se aplican cepas de Trichoderma a las semillas, produciéndose un rápido crecimiento en conjunto con el desarrollo radicular de las plantas tratadas, compitiendo entonces a este nivel por nutrientes y espacio (Howell et al 2000; Harman 2000).

## **c) Antibiosis**

La actividad antibiótica de Trichoderma se debería a la secreción de sustancia antibióticas o metabolitos que inhiben la actividad parasítica de los patógenos (Dubos,

1987). Estos metabolitos serían volátiles y no volátiles, del tipo antibióticos como viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide (Lumsden et al 1992). De todas estas micotoxinas la más representativa es Trichodermin que actuaría inhibiendo la actividad ribosomal de los patógenos, por lo tanto su reproducción (Ghisalberti, 1991).

## **d) Inducción de resistencia en las plantas**

Otro mecanismo propuesto para explicar la actividad biocontroladora de especies de Trichoderma, es la inducción de resistencia en las plantas hospederas tratadas con el agente biocontrolador. Este concepto ha sido fundamentado por Yedidia et al 1999 y Yedidia et al 2000, quien demostró que raíces de cucurbitáceas inoculadas con *T. harzianum*, presentan una respuesta defensiva tanto en las raíces como en las hojas de las plantas tratadas, demostraron que las hifas del hongo biocontrolador penetran

la epidermis y corteza superior de la raíz de la cucurbitácea. La planta responde con una marcada actividad de la enzima peroxidasa frecuentemente asociada con la producción de fungitoxinas, un incremento en la actividad quitinasa y la deposición de celulosa en la superficie interna

de la pared celular. Se ha comparado esta relación a la que se establece entre vegetales y micorrizas.

Se han identificado tres tipos de compuesto producidos por cepas de *Trichoderma* que son responsables de inducir resistencia en las plantas, entre ellas se encuentran: proteínas con

función enzimática, homólogos de proteínas, oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular, que son liberados desde el hongo o pared celular de la planta por la actividad de enzimas de *Trichoderma*. (Baker et al 1997; Harman 2004) ■

## 04 Aplicaciones y resultados del uso de *Trichoderma* en el control de patógenos de plantas.

Se han investigado diferentes formas de aplicación de *Trichoderma* sp, tanto a nivel de suelo como en el filoplano (superficie de las hojas), para aumentar sus poblaciones e incrementar su capacidad de control, esto debido principalmente a la naturaleza saprofitica y a la versatilidad nutricional de este antagonista, que lo capacita para crecer sobre los mismos sustratos utilizados por los patógenos.

Numerosos trabajos señalan a distintas especies de *Trichoderma* como importantes agentes de biocontrol de las





enfermedades producidas por un amplio rango de patógenos, entre los cuales están *Armillaria mellea*, *Phytium spp*, *Phytophthora spp*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium spp*. (Chet, 1987; Harman, 2004).

Se ha demostrado que *Trichoderma* es capaz de colonizar las flores desplazando al patógeno de su habitual sitio de infección, constituyendo ésta la principal forma de antagonismo contra *B. cinerea*, además produce enzimas capaces de degradar las paredes celulares de este patógeno, (Chet, 1987). Por ello se recomiendan los tratamientos con *Trichoderma* durante etapas tempranas, desde la floración, tanto para vid como frutillas (Dubos et al 1983, Sutton y Perg, 1993)

A partir de evaluaciones de la capacidad inhibitoria de algunos antagonistas, aislados de huertos de manzano, sobre la producción de pseudotecios y ascosporas de *Venturia inaequalis* se realizaron aplicaciones foliares de algunos antagonistas para el control de *V. inaequalis* en otoño, logrando una reducción significativa en la producción de ascosporas, tanto en hojas incubadas a temperatura controlada, como en el huerto. De estos antagonistas, *Trichoderma* redujo un 75,2% la producción de ascosporas, indicándolo como un importante y potencial controlador del inóculo inicial de este patógeno. (Philon et al, 1997; Odile et al (1999)

Aplicaciones de antagonista, directas al suelo o mezcla con sustratos de crecimiento han

logrado un eficiente control para diversos patógenos principalmente los relacionados con la caída de plantas. Tres aislados de *Trichoderma* y *Gliocladium virens*, tolerantes a bajas temperaturas y con actividad antibiótica a *Phytophthora cactorum* (Smith et al, 1998) fueron evaluadas para el control de la pudrición radical y de la corona del manzano en plantas de invernadero. Obteniendo una significativa reducción en el daño de las raíces y un incremento en el peso de las plantas (Smith et al, 1990)

A partir de aislados de 48 cepas de *Trichoderma*, recolectadas en el país, resultaron a nivel de laboratorio, 10 cepas, capaces de inhibir en un rango de 20 a 45% el crecimiento de *Phytophthora cryptogea*, en manza-

nas Granny Smith ( Domínguez, 1994).

Los antagonistas además de ser incorporados al suelo junto con la materia orgánica (compost) o aplicados directamente por aspersión, como en los casos anteriores, también pueden ser inoculados a las semilla, revisitiéndolas con *Trichoderma* como alternativa para introducir el agente al suelo, producir el establecimiento y multiplicación del antagonista en las raicillas y de esta forma reducir el damping-off producido por *R. solani*, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *Fusarium* spp y *Pythium* spp (Chet.

1987; Nelson y Harman, 1997; Smith et al, 1990; Cundom et al 1999).

Campell, 1989 describe el uso de *Trichoderma* para el control de *Verticillium albo-atrum* en tomate, melón y algodón logrando un control de un 60-80% en suelos naturalmente infestados. El antagonista se aplicó en la semilla como en la mezcla de suelo utilizada en el transplante. La misma respuesta se encontró en crisantemos. En ambos casos el mecanismo de acción correspondería a Antibiosis.

Conjuntamente a la acción

supresora de patógenos, numerosos estudios indican a este antagonista, como promotor o estimulador del crecimiento de las plantas. Esto último es producto de su capacidad colonizadora, que permite controlar o eliminar a los patógenos, así como sobrevivir por largos periodos en la rizósfera utilizando los exudados de las superficies radiculares, lo que además les proporciona una protección a ciertos estrés de tipo físicos, determinando un rápido crecimiento de las raíces (Bjorkman 1999, Smith et al, 1990, Venegas, et al. 1996). ■

## 05 Aislamientos nativos.

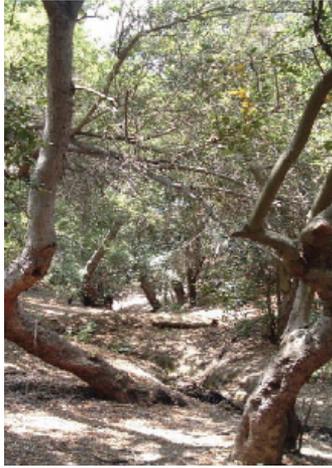
El desarrollo de una tecnología para la producción de un agente de control biológico debe dar énfasis a la obtención de aislamientos nativos, ya que estos presentan un comportamiento que se adecua a las condiciones agroecológicas regionales. Esta búsqueda se organizará en base a recorridos de campo, que permitan la obtención de



Buscar en predios donde el manejo de la nutrición se base en el uso de materia orgánica.



Buscar en ecosistemas con baja intervención humana, como rodales de bosques nativos y regiones apartadas de los campos agrícolas, así como en campos si uso de agroquímicos.



muestras en lugares donde los patógenos de interés se manifiesten con un bajo índice de infección. Como ejemplo de esto es recomendable buscar en ecosistema con baja intervención humana, como quebradas, rodales de bosques nativos y regiones apartadas de los campos agrícolas, así como en zonas rurales que no utilizan agroquímicos y el manejo de la nutrición se base en el uso materia orgánica.

La toma de muestras se puede realizar en mantillo de bosque nativo, corteza vegetal y madera en descomposición. En algunos casos es posible identificar colo-

nias de *Trichoderma* en distintos estados de crecimiento. La toma de muestra se realiza en bolsas de polipropileno, cerrándolas para evitar su desecamiento. El procesamiento de ellas se efectúa, tomando submuestras de 20 a 30 gramos que se distribuyen en placas en cámara húmeda por un período de 7 a 10 días, con observaciones diarias hasta la aparición de colonias de hongos con crecimientos similares a los de *Trichoderma*

Cuando la toma de muestra se realiza a nivel de suelo, estas se extraen entre los 10-30 cm. de profundidad.

La metodología empleada para el aislamiento de *Trichoderma* proveniente de muestras de suelo o de crecimiento de colonias en diferentes sustratos, utiliza la técnica de diluciones seriadas, las que son sembradas en medio selectivo para *Trichoderma* spp (TSM), modificado por Smith et al. (1990) e incubadas a 25°C por una semana.

Para la identificación del género se recomienda utilizar las características culturales y morfológicas de *Trichoderma*



Crecimiento de *Trichoderma* sobre madera.



Diversas cepas nativas aisladas creciendo en medio PDA

creciendo en agar extracto de malta (AM) al 2% (20 g extracto de malta, 20 g agar, 1000 ml de agua destilada estéril), según recomiendan diversos autores.

Las características evaluadas serán el aspecto, bordes, color y velocidad de crecimiento de las colonias, forma y disposición

de las fiálosporas y fiálides. Estas características permitirán identificar el género. Para identificar la especie, se precisa de un taxónomo. Es conveniente solicitar este servicio una vez que se hayan seleccionado los aislamientos más promisorios.

Una vez que se han obtenido

los aislamientos nativos puros, se precisa realizar las pruebas de antagonismo "in vitro", en condiciones semicontroladas y de producción o campo, para la selección de las cepas más promisorias, que finalmente serán las recomendadas a los agricultores. ■

## 06 Pruebas de antagonismo

### a) Cultivo dual

Para esta prueba se recomienda la técnica de cultivo dual. Las colonias aisladas de *Trichoderma* spp., se conservan, hasta la realización del ensayo, en tubos de cultivo, en cuñas de Agar Malta, PDA, Saboraud o Saboraud Dextrosa Agar Extracto de Levadura, al igual que los aislamientos de los hongos fitopatógenos que serán objeto de control. En placas Petri de tamaño estandar (90 x 15 mm), sobre medio de cultivo PDA, se depositan discos de micelio (5 mm) de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. y del fitopatógeno, en posiciones opuestas y equidistantes, de tal modo que queden enfrentados

<b>Clase 1</b>	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
<b>Clase 2</b>	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
<b>Clase 3</b>	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
<b>Clase 4</b>	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
<b>Clase 5</b>	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Tabla 1. Escala de clases de Bell et al. (1982)

uno del fitopatógeno y otro del antagonista. En el testigo se inocula solamente un disco de micelio de cada uno de los aislamientos a probar. El ensayo

se replicará tres veces. A los siete días de incubación a 25°C se evaluará el grado de antagonismo mediante la escala de Bell et al (1982) (tabla 1).



Aislamientos de *Trichoderma* spp. clase 2.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. que estén en la clase 1 ó 2 se consideran altamente antagonistas.



Diferentes aislados de *Trichoderma* Clase 1.

### **b) Efecto de *Trichoderma* spp. sobre la germinación conidial de hongos fitopatógenos**

Para la realización de este ensayo se escogerán los aislamientos de *Trichoderma* spp. que muestren grados de antagonismo 1 a 2, en cultivo dual.

A partir de colonias puras, de siete días, se prepararán suspensiones conidiales a las que se les determina la concentración. El valor de la concentración puede variar de  $2.5 \times 10^4$  para fitopatógenos cuyos conidios tengan un tamaño más grande y del orden de  $2 \times 10^6$  para aquellos de conidios más pequeños al igual que para *Trichoderma*.

Las suspensiones se prepararán con agua destilada estéril y una gota de Tween-80 al 0,5%. La concentración será determinada con cámara de Neubauer. Se prepararán cámaras húmedas (cuatro en cada tratamiento). En cada una se colocarán dos portaobjetos sobre soportes de cristal y en éstos cuatro gotas de la suspensión conidial de *Trichoderma* spp. y del fitopatógeno. En el testigo se colocarán solamente gotas de la suspensión de conidias del fitopatógeno.

Las cámaras húmedas se incubarán durante 24 horas (este tiempo puede variar en dependencia de la velocidad de germinación del fitopatógeno de que se trate). Se contará el número de esporas o conidios germinados del fitopatógeno de

un total de 25 en cada gota, determinándose el porcentaje de germinación.

### **c) Efectividad de *Trichoderma* spp., en condiciones semicontroladas.**

En la realización de estos ensayos, al igual que en los de campo, se utilizarán los aislamientos más promisorios (los que tengan grado de antagonismo 1 ó 2 y los que exhiban el mayor porcentaje de inhibición de germinación de esporas o conidios). Estos ensayos, según el cultivo que se trate, pueden ser conducidos bajo un fondo de infección natural, o se pueden hacer inoculaciones de los fitopatógenos.

### **Patógenos del suelo:**

Para evaluar el control sobre estos patógenos se utilizarán semillas o plantas de cultivos de interés, que son tratadas con una suspensión conidial de *Trichoderma* de concentración conocida, a partir de un cultivo puro. Las que se establecerán en bolsas de polietileno, o macetas que contengan suelo infectado de propiedades físicas, químicas y biológicas conocidas.



Se realizarán aplicaciones por aspersión foliar partir del momento en que se den las condiciones para la aparición de la enfermedad

### **Patógenos foliares:**

Se prepararán suspensiones conidiales de *Trichoderma* spp. de concentración conocida, a partir de un cultivo puro. Se realizarán aplicaciones por aspersión foliar partir del momento en que se den las condiciones para la aparición de la enfermedad, de acuerdo con las condiciones climáticas y la fenología del cultivo. El momento para la primera aplicación es de suma importancia, pues una vez que el patógeno está establecido las posibilidades de éxito son menores, hay que tener en cuenta que en dependencia del cultivo y de la enfermedad se pueden necesitar varias aplicaciones. Es obligatorio montar un testigo, este se asperjará con agua al mismo tiempo que se realice una aplicación en las plantas tratadas con *Trichoderma* spp.

### **d) Efectividad de *Trichoderma* spp., en condiciones de campo.**

Los ensayos o evaluaciones se deben realizar en áreas, donde se presenten frecuentemente epifitias del patógeno que se pretende controlar, cuando se aplica en controlador en el suelo es preciso conocer las características físicas, químicas y biológicas de este, así como las medidas de manejo a las cuales está sometido, como son enmiendas orgánicas o condiciones de riego.

Se debe establecer o conocer el procedimiento seguido para la reproducción del antagonista cultivo estático o con agitación, fase sólida o líquida, sustrato, entre otras, ya que estas condiciones determinan la capacidad de resistencia al desecamiento que tenga el controlador en el ambiente. Por otra parte es fundamental definir con clari-

dad el momento en que han de comenzar las aplicaciones y cual es la recomendación a seguir en la temporada, por ejemplo el número de aplicaciones y bajo que condiciones se aplicarán. Equipo de aplicación. Concentración de la solución final y dosis de aplicación en conidios/ha.

La temperatura, precipitaciones y humedad relativa local han de ser registradas en la estación meteorológica más cercana. ■



Ensayos para evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en manzanos y parronal

# 07 Ceparío de conservación

Entre las técnicas más comunes de conservación se encuentran

- Ceparío en tubo de cultivo
- Ceparío en sílica gel
- Ceparío liofilizado
- Ceparío en Nitrógeno líquido

Todos los aislamientos se mantendrán en un ceparío de conservación, aún aquellos que no tengan un grado de antagonismo alto, pues pudieran servir en el futuro para otros estudios. Una técnica muy efectiva de conservación consiste en separar los conidios del sustrato donde se reprodujo el antagonista y obtener de este modo los conidios puros, los conidios así obtenidos, con un contenido de humedad entre 5-10%, pueden ser almacenados por un tiempo prolongando conservando su viabilidad.

## **a) Ceparío en tubo de cultivo**

Los aislamientos que resulten promisorios una vez realizadas las pruebas de antagonismo se destinarán al ceparío de tra-

bajo. El ceparío de trabajo se mantendrá en tubos de cultivo, en cuñas de PDA, Sabouraud dextrosa agar, Agar malta, cualquier medio rico en nutrientes es suficiente para su mantenimiento.

Para preservar el hongo por un período de tiempo mayor se utilizan medios no inclinados sobre los que se siembra el hongo (7-10 días), posteriormente se cubre con aceite mineral, este método tiene como ventaja que no necesita renovar la cepa con tanta frecuencia como las mantenidas en cuñas de agar, el hongo puede mantener una mayor longevidad y estabilidad aunque el método sea más laborioso.

## **b) Ceparío en sílica gel**

Se introduce sílica gel en tubos con tapa rosca y se esterilizan con calor seco durante 3 horas a 180 °C y luego se enfrían en un baño de hielo durante algunas horas, luego se prepara una suspensión de conidios con 5% de leche descremada, (función crioprotectora), y se le incorpora a los recipientes con sílica



en la proporción de 0,5 ml para 4 gramos de sílica. Se deja reposar por 15 minutos en baño de hielo para finalmente permanecer en un ambiente seco por 15 días. Estos recipientes se pueden conservar a 4 °C. Para la reutilización de las cepas basta tomar unos 4 cristales de sílica y pasarlos por un medio nutritivo adecuado

## **c) Ceparío liofilizado.**

La liofilización es un proceso de secado rápido en frío, bajo presión reducida (vacío). Se prepara una suspensión conidial del hongo que se desea conservar, se puede utilizar como soporte leche en polvo descremada al 11% y como crioprotector glutamato de sodio al 5%. Se coloca en una lio-

filizadora, se cierran al vacío y se almacenan. Para reactivar los bulbos liofilizados se les añade suero fisiológico al 0,9 % o agua con Tween- 80 al 0,1 %.

#### **d) Cepario en Nitrógeno líquido.**

En nitrógeno líquido se alcanzan temperaturas de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lo que permite conservar los

organismos casi de manera indefinida. Se debe utilizar un agente crioprotector par evitar el daño de las conidias durante el proceso de congelamiento y descongelado del antagonista. La mezcla crioprotectora esta compuesta por agua destilada estéril, 10 % de glicerol o 15 % de sulfato de dimetila, en la cual se suspenden las conidias.

Luego de agitar la mezcla (con las conidias) se coloca 1,8 ml de ella en tubos de vidrio borosilicatado, (criotubos), estos son llevados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas para una preadaptación al frío y permitir que el crioprotector penetre y envuelva al microorganismo. Posteriormente son llevados a los recipientes con Nitrógeno líquido. ■

## 08 Preparación del sustrato y cultivo

Entre los sustratos naturales para la producción de inóculo de hongos antagonistas se encuentran granos de trigo, avena, cebada, centeno, arroz, maiz, soya, cabecilla de arroz y salvado de trigo. La fermentación en estado sólido no requiere de procedimientos sofisticados de formulación previo a su uso. Los granos o cualquier otro tipo de material sobre el que sae ha desarrollado el hongo pueden ser secados molidos y aplicados.

Una vez seleccionado el sustrato se determina el contenido óptimo de humedad, si este es muy alto no permite un

crecimiento óptimo del hongo, y como este es un proceso de fermentación estática, el contenido de oxígeno es menor lo que afecta la fermentación.

#### **a) Cultivo en frascos:**

La mayor ventaja de este método, es el mejor control de la contaminación y de la ca-

lidad de los sustratos, los que durante el proceso de autoclaveado no sufren de la gran compactación que ocurre en las bolsas, Se debe disponer de botellas con un diámetro de abertura que facilite el vaciamiento de los sustratos que ya han esporulado.



## **b) Cultivo en bolsas:**

El cultivo en bolsas tiene varias ventajas entre las que están:

- Ocupa menor espacio en autoclave, incubadora y estantes para la incubación durante el proceso de producción.

---

- Mayor volumen de producción en un solo lote, con el consiguiente ahorro de energía eléctrica y humana.

---

- Posibilidad de remover el contenido de la bolsa cada cierto tiempo.

---

- Más económico el proceso productivo.

---

- Manipulación más sencilla en el momento de cosechar el producto.

---

- Si embargo, en nuestra experiencia este método siempre presentó mayor nivel de contaminación, por otra parte la manipulación debe ser muy cuidadosa ya que es muy fácil la ruptura de los envases y la pérdida del contenido.



## **c) Proceso de esterilización.**

Se utiliza calor húmedo en autoclave y es una de las etapas cruciales en la producción masiva. En este proceso se incorporan los sustratos en los envases elegidos, frascos o bolsas, para frascos se ocupan 100 grs. de sustrato y en bolsas 300 grs. la humedad de este debe ser de aproximadamente un 25%. Tanto las bolsas como las botellas deben resistir la temperatura del autoclave. El proceso de autoclaveado se realiza a una presión de 2 atmósferas, por 45 minutos a 121°C

## **d) Inoculación e Incubación**

El lugar donde se realiza la

inoculación de los sustratos, en frascos o en bolsas, debe reunir los requisitos mínimos para esta función y estar totalmente aislado del resto de la instalación. Lo más conveniente es realizar la inoculación en una cámara de flujo laminar.

Para la inoculación se prepara una suspensión de inóculo con una concentración de  $10^8$ - $10^{10}$  conidias /ml. De esta suspensión se emplean aproximadamente 10 ml para inocular cada uno de los frascos o 10 ml por cada 100 grs. de sustrato.

Los frascos o bolsas inoculados y convenientemente rotulados se llevan a la sala de incubación a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días. ■

# 09 **Producto final**

Las bolsas o frascos con el inóculo esporulado se trasladan a una sala donde se realizará la cosecha, y según la formulación que se escoja se realizará el proceso de envasado o se llevará al secado para la posterior separación de los conidios.

## **a) Producto final en polvo.**

En la presentación en polvo, el propio sustrato que se utiliza para la producción masiva será el vehículo portador de los conidios de *Trichoderma* spp. Para

esto se requiere la utilización de un molino que garantice un adecuado tamaño de partículas adecuado (criba de 0,8mm). Pevio al proceso de molienda, el sustrato, granos de cereales, donde ha estado creciendo el hongo será secado en estufa con aire forzado a 60°C por 24 hrs. Alcanzando una humedad de 5-7 %. Una vez obtenido el polvo se envasará en contenedores herméticos con la cantidad adecuada para una superficie determinada, de acuerdo al cultivo donde se

necesite aplicar. Entre las ventajas que tiene esta nueva forma de presentación están:

- Se elimina el inconveniente de pérdida de viabilidad de los conidios debido a la humedad.

- Los conidios del hongo se aplican junto con el sustrato donde estuvo creciendo, lo que garantiza una fuente de nutrientes segura en un ambiente hostil dada la intensidad de la competencia. Para las aplicaciones foliares



En las formulaciones en polvo, se mantiene la viabilidad de los conidios sin formular



Tamices para separación de esporas

esto es muy importante, pues la capacidad para competir es esencial para el establecimiento del antagonista en la filosfera.

■ El período de almacenamiento puede prolongarse por un tiempo superior a los 6 meses, siempre que se conserve en un local con un ambiente fresco y seco.

La ventaja más notable de todas las enumeradas es que en las formulaciones en polvo, se mantiene la viabilidad de los

conidios sin formular. Entre los portadores inertes que pueden ser usados en estas formulaciones están: attapulgita, montmorillonita, kaolinita, diatomita, talco y polvos orgánicos.

Otra forma de obtener el polvo es por medio de la agitación del sustrato seco sobre una batería de tamices a los cuales se les han agregado esferas de cristal, para lo cual se utiliza un ROTAP, en el cual están sobrepuestos los tamices de mayor a menor calibre, ubicándose el sustrato

seco en el primero de ellos y sometidos al vibrado y golpeado de la máquina, durante el tiempo necesario para separar y tamizar las esporas. Posteriormente estas se pueden separar en ambiente limpio y formular con dextrosa anhidra para su envasado al vacío. Estos envases contienen el inóculo suficiente para tratar una hectárea de cultivo y se han llevado a un kilogramo de formulación. ■

## 10 Control de calidad de *Trichoderma spp.*

El control de calidad es una actividad que se debe realizar desde el momento mismo en que se da inicio al proceso de producción masiva

La producción de organismos como agentes de control biológico basados en hongos requiere de un control adecuado de las propiedades biológicas, físicas y químicas que aseguren al agricultor un producto de máxima eficacia en condiciones de campo.

Las pruebas microbiológicas recomendadas son:

■ **Determinación del grado de antagonismo:**

se realizarán pruebas de antagonismo con el organismo objeto de control de acuerdo con las metodologías descritas para estos ensayos.

■ **Determinación de la concentración de conidios:**

esta prueba es de suma impor-

tancia ya que determina la dosificación del controlador biológico obtenido. La concentración de conidios obtenidos por gramo de sustrato no debe ser menor de  $10^9$  conidios en formulaciones sólidas. Es necesario determinar el tiempo en que se produce la mayor concentración de



conidios, ese será el periodo óptimo de incubación, para conocer este se precisa hacer una dinámica de esporulación. Este recuento se efectúa en cámara de Neubauer.

#### ■ **Comprobación de la viabilidad a través de pruebas de germinación conidial:**

deben obtenerse valores entre 85 y 100% de viabilidad. Para el caso de los biopreparados que tengan como destino la aplicación para el control de un patógeno foliar son deseables los valores más altos de viabilidad, dado que el ambiente de la filósfera no es óptimo para la acción del antagonista y mientras mayor sea la viabilidad de los conidios mayores probabilidades de éxito pueden esperarse.

#### ■ **Pureza:**

con esta prueba se determina la proporción del agente de control microbial en relación con los posibles contaminantes. Conocer si existen otros microorganismos como posibles contaminantes es esencial para mejorar el proceso de producción y formulación.

Como se indicó, la viabilidad es una de las pruebas de control de calidad esenciales. Por lo que es necesario conocer cuáles son los factores que pueden afectarla. Entre estos están

#### ■ **Exposición a la luz solar:**

la vida media de los conidios aplicados sobre las hojas expuestas a la radiación solar es de 5-10 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Razón por la cual es muy importante que las aplicaciones se realicen temprano en la mañana o por la tarde.

#### ■ **Contenido de humedad:**

La humedad es un factor determinante en la supervivencia de los conidios. Cuando estos están secos, pueden mantener un nivel de germinación alto durante meses. La viabilidad de los conidios sin secar, aunque estén almacenados a bajas temperaturas se reduce a porcentajes muy bajos. Por el contrario si los conidios se mantienen secos la viabilidad permanece alta durante meses. El polvo puro de conidios sin formular puede almacenarse en recipientes herméticos a 4 °C y mantener una viabilidad alta durante

meses si el contenido de humedad es menor del 10%.

#### ■ **Temperatura:**

La temperatura es un factor que influye significativamente sobre la viabilidad de los conidios. Las temperaturas bajas son más favorables para mantener niveles de viabilidad adecuados en condiciones de almacenamiento.

### **Metodología para la realización de las pruebas de control de calidad**

#### **01 Viabilidad de los conidios**

Para biopreparados obtenidos en medio sólido, utilizando granos de cereales como sustrato para el crecimiento.

■ Preparar slides con medios nutritivos como papa dextrosa agar (PDA), Sabouraud dextrosa agar extracto de levadura (SDAY), Sabouraud. Tratar de que quede una película muy delgada que facilite el conteo de conidios.

■ Preparar cámaras húmedas. Los slides deben colocarse en cámara húmeda, pues la

película del medio de cultivo es tan delgada que puede secarse, además de que los conidios necesitan humedad para germinar.

---

■ Preparar una suspensión conidial de una concentración del orden de  $10^7$  a  $10^8$  y colocar 4 gotas de esta suspensión en cada portaobjetos.

---

■ Incubar a temperatura de 25 más menos 2 °C, en la oscuridad, el período de incubación es de 18-24 horas.

---

■ Para el conteo observar al microscopio con lente de 40x.

■ Los conidios se consideran viables si el largo del tubo germinativo es dos veces el diámetro del conidio. El conteo de un mínimo de 200 es suficiente, si este número se incrementa la prueba se hace más exacta.

---

■ El área de observación puede ser fijada con lactofenol, si no se puede hacer la evaluación a la hora que corresponde, se colocan unas gotas y se pone encima un porta-objetos. Si al lactofenol se adiciona azul algodón o fucsina se mejora la observación.

---

■ Para el conteo se buscará un campo donde se

cuentan 25 conidios en cada gota, y de estos cuantos han germinado. Se cuentan en total 100 conidios en cada portaobjetos y se hacen tres réplicas para un total de 300 conidios.

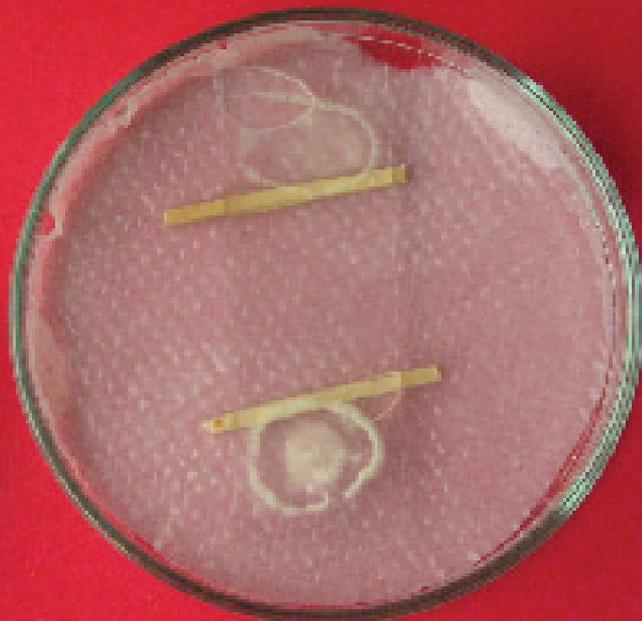
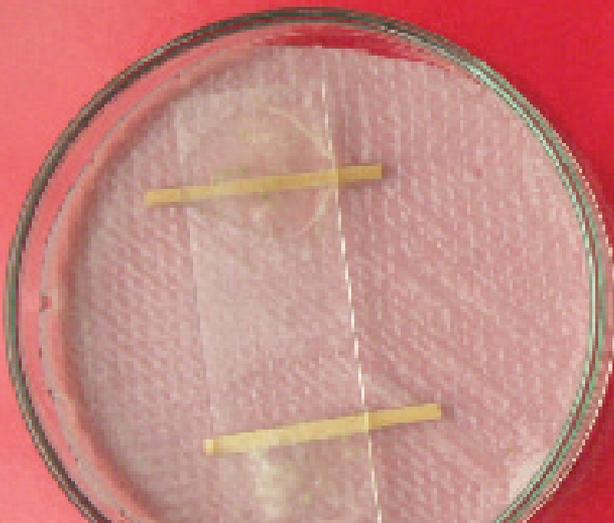
---

■ La viabilidad de los conidios puede estar entre el 85 y el 90 %, aunque lo mas recomendable para las aplicaciones foliares es que sea mayor del 90%.

---

■ La prueba se repite a intervalos de tiempo que pueden estar entre 10, 20, 30, 40 y 50 días. Si se pretende almacenar por más tiempo se debe repetir.

**Slides con medios nutritivos como papa dextrosa agar (PDA), Saboraud dextrosa agar extracto de levadura (SDAY), Saboreaud.**



## 02 Pureza

Esta es una prueba de control de calidad esencial, por eso debe realizarse en diferentes fases del proceso de producción masiva y no sólo al producto final.

- Tubos de cultivo con cepas de conservación y de trabajo o placas Petri (en dependencia de lo que se use). En este caso se efectúa un chequeo visual para detectar tanto posibles contaminantes como conidiación uniforme.

- Cultivos creciendo en PDA en placas Petri o creciendo en avena, en frascos de vidrio o en bolsas y que serán utilizados como cultivos “madre” y de producción masiva, requieren siembra en placas con medio agarizado para búsqueda de contaminantes.

- Secado abierto del sustrato (avena) una vez completada la conidiación. Esto requiere chequeo visual para contaminantes y conidiación uniforme.

- Secado de conidios hasta 5-10% de humedad. No requiere determinación de pureza.

- Control de calidad final. Requiere de siembra en placas Petri en medio agarizado para búsqueda de contaminantes.

- Envasado.

## 03 Determinación de la pureza en producto final

La presencia de otros microorganismos diferentes a Trichoderma se cuantifica preparando una serie de diluciones de 1 en 10 en un rango que va de  $5 \times 10^7$  conidios por mililitro a 50 conidios por mililitro; 0.2 ml de cada dilución

se dispersan en placas de agar Malta (se hacen dos réplicas). Las placas se incuban de 3-4 días a 25 °C, a continuación se cuenta el número de colonias de Trichoderma en toda la placa, donde las colonias aisladas pueden ser distinguidas dada la concentración tan baja de la suspensión original. Los contaminantes que aparecen se cuentan y la proporción entre Trichoderma y estos se expresa como porcentaje. Los niveles de contaminación no deben ser superiores a 0.002%. ■



# 11 Aplicación y tipos de productos finales.

Se han desarrollado dos productos finales, una pasta para aplicar en cortes de poda y para el control de *Phytophthora cactorum* en manzanos y un polvo soluble a partir del que se obtiene una suspensión para utilizar en el control de *Botrytis cinerea* en parronales y viñas

## a) Pastas:

### ■ Pasta para cortes de poda:

Estas pastas se obtienen de la mezcla de *Trichoderma* deshidratado, arcilla, ácido láctico, colorante natural y agua mineralizada.

Las aplicaciones se realizan inmediatamente después de la poda sobre los cortes. Alcanzándose un rendimiento de 1000 plantas por kg de pasta aplicada.

### ■ Pasta control de *Phytophthora cactorum*:

La pasta para control de *Phytophthora cactorum* se aplica en la base de los árboles, esta aplicación se realiza a fines de invierno y al final de la pri-

mavera. Las observaciones y evaluaciones de terreno han demostrado que se produce una detención en el número de

plantas que se infectan anualmente y un mejoramiento en el número y calibre de la fruta obtenida por árbol. ■



Pastas para el control de *P. cactorum*.



Pasta aplicada en la base del árbol.

### **b) Suspensión** **Suspensión de esporas** **a partir de polvo seco:**

La suspensión de esporas a partir de sustrato o de polvo seco formulado se utiliza para el control de Botrytis en parrotales y viñas, esta suspensión presenta una concentración de  $10^{10}$ - $10^{13}$  conidias por ml, y se aplica en dosis de 1 litro por ha. Esta suspensión se diluye en 400-800 litros de agua y se aplica sobre el follaje.



### **Forma de aplicación: Trichoderma en suspensión.**

- Agitar la suspensión de Trichoderma antes de utilizarla.
- Uso preferente en control de B. cinerea
- Dosis a aplicar: 1 litro de suspensión de Trichoderma por ha, diluido en 400-1200 litros de agua. Mezclar con la cantidad de agua necesaria de acuerdo a la especie a tratar y la maquinaria utilizada.
- Época de Aplicación: Aplicaciones básicas en viña: Flor, 4-5mm, Apriete racimo y Precosecha. Otras aplicaciones se realizan de acuerdo a condiciones climáticas.
- La maquinaria debe estar limpia de residuos de funguicidas en caso de que la explotación no sea ecológica.
- Calidad del agua: El agua debe ser limpia y sin desinfectantes.
- Es recomendable aplicar inmediatamente en horas de la tarde, evitar aplicar en horas de máxima radiación solar. Se aconseja no guardar el producto más de una semana porque la viabilidad de las esporas disminuye con el tiempo y su acción a nivel de campo también decrece
- Es adecuado para la germinación de las esporas que se efectúe un riego antes o después de la aplicación de Trichoderma.
- Se puede aplicar después de 3-4 días de una aplicación de azufre.

**Presencia o ausencia de daño por B. cinerea en vitis vinífera var. Chardonay Presencia / ausencia de daño en sistema con aplicación de 5 cepas de Trichoderma y un testigo.18/03/04**

Tratamiento	% racimos con B. cinerea	% Ausencia
T-San Felipe (T. aureoviride)	14	86
T7 (T.harzianum)	12	88
T-CET (T. longibrachiatum)	10	90
(T3)T.harzianum	14	86
T-Álamo (T.harzianum)	16	84
T7- Polvo. (T.harzianum)	6	94
T-CET, Polvo.(T. longibrachiatum)	8	92
Testigo	26	74

En el cuadro anterior se aprecia el efecto de distintas cepas de Trichoderma aisladas y aplicadas en viñas orgánicas.

**Presencia o ausencia de daño por B. cinerea en uva de mesa variedad Red Globe, Predio Los Robles Fecha 01/03/04**

Tratamiento	% Presencia de Daño	% Ausencia de Daño
T- San Felipe (T. aureoviride)	4	98
T-7 (T. harzianum )	2	98
T-CET (T. longibrachiatum)	2	98
T-3 (T. harzianum )	2	98
T-Álamo (T.harzianum)	4	96
Polvo T-3 (T. harzianum )	2	98
Polvo T-CET (T. longibrachiatum)	2	98
Testigo	6	94

**Producción por planta y características de la fruta en distintos tratamientos con pasta de Trichoderma spp. para el control de P. cactorum, en un huerto orgánico comercial de manzana ( Malus pumila)**

Tratamiento	Nº Frutos.	Kg. / Planta	Diámetro promedio	Peso por Fruto gr.
TCET (T. longibrachiatum)	331,00	63,67a	24,92	193,11
Testigo(Sin Trichoderma)	290,44	48,55b	23,73	173,65
T7 (T. harzianum )	300,11	62,42a	24,72	210,96
T-Alamo(T.harzianum)	321,78	61,11a	24,33	191,46

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. P=0,05

En el cuadro anterior se aprecia el efecto de distintas cepas de Trichoderma formuladas en pasta y aplicadas en un huerto de manzanos bajo manejo orgánico, el efecto más importante además de la diferencia entre distintas cepas de Trichoderma spp es el mejoramiento que se produce en el huerto en un plazo de 3 años, en que se redujo drásticamente el reemplazo de plantas enfermas.

## Bibliografía

**Alexopoulos, C.J. 1979.** Introductory mycology. Third Edition. John Wiley and Sons, New York. E.U.A. 632pp

**Bjorkman, Th. 1999.** Proceeding : New England vegetable and berry growers conference and trade show. Sturbridge, MA. P 310-312.

**Beker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S. P. 1997.** Signaling in plant-microbe interactions. Science 276,726-733

**Bell, D.K., Well, H.D. and Markham, C.R. 1982.** In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six plant pathogens. Phytopathology 72: 279-382.

**Brunner, K, et al. 2003.** The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviridae* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. Curr. Genet. 43, 289-295

**Cundom, M.A., Gaiad, S., Castañon, M., Arriola, S. y Coutinho. 1999.** Actividad antagonica in vitro de hongos saprofitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. En: reunión de comunicaciones científicas y tecnológicas, secretaria general de ciencia y técnica, UNNE. actas tomo V pp. 125-128

**Chet I. 1987.** *Trichoderma*- application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In *Innovative approaches to plant disease control* (I. Chet, Ed.), pp. 137-159. Wiley, New York.

**Dominguez, T. 1994.** Evaluación de nuevas cepas de *Trichoderma* spp. Como antagonistas de *Botrytis cinerea* y *Phytophthora* spp. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Chile, Santiago. 37pp.

**Dubos . B. 1987.** Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In: *Innovative approaches to plant disease control* (I. Chet, Ed.), pp. 107-135. Wiley, New York.

**Dubos, B. Roudet, J. Bulit, and Burgarest Y. 1983.** L'utilisation du *Trichoderma harzianum* Raifarai dans la pratique viticole pour lutter contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*

Pres)In : Les antagonismes microbiens, modes d'action et application a lutte biologique contre les maladies des plantes. XXIV e Colloque de la Societe Francaise de Phytopathologie, INRA, Service des Publications, Francia, 289-296pp.

**Elad, Y., Chet, I.,Boyle.P and Henis.Y. 1993** Parasitism of *Trichoderma* spp. On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluoescense micriscopy. Phytopathology 73:85-88

**Garza. G.A., Reeleder, R.D and Paulitz.T. 1997.** Degradation of sclerotinia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus gnats and the biological fungi *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 29(2) :123-129

**Ghisalberti. E.L. and Sivasithamparam. K. 1991.** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 23(11)1011-1020.

**Harman, G.,E.2000.** Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84:379-393.

**Harman, G.E.; Howell .Ch; Viterbo, A; Chet. I. and Lorito. M. 2004.** *Trichoderma* species opportunistic avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology 2:43-56.

**Howell, C.R., Hanson, L., Stipanovic, R. and Puckhaber, L.2000.** Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seeds treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology 90:248-252.

**Howell, C.R., 2002.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant disease 87(1): 4-10.

**Lumsden, R.D., Locke, J., Adkins, S., Walter, J., and Ridout, C. 1992.** Isolation and localization of the antibiotics gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. Phytopathology 82:230-235

**Metcalf, D.D., and Wilson, C.R., 2001.** The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum*

in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathol. 50:249-257.

**Nelson, E.B. and Harman, G.E. 1997.** Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phase of turf diseases by use os spray applications. Plant disease.81:1132-1138.

**Odile, C. Philion, V. Rolland, D. And Bernier, J. 1999.** Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospores production od apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Phytopathology 90:31-37.

**Papavizas, G.C. 1985.** *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23:23-54.

**Philon, V. Carisse, O. and Paulitz, T. 1997.** In vitro evaluation of fungal isolate for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and ascospores of *Venturia inaequalis*. Eur. J.Plant Pathol. 103:441-452

**Smith, V.L.; Wilcox. W.F and Harman, G.E. 1990.** Potential for biological control of *phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Phytopathology 80:880-885.

**Sutton, J.C. and Peng, G. 1993.** Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. Phytopathology 83:615-621.

**Venegas, V, R., Palazuelos, F,P., Hirsch-Reinschagen, B.P.1996.** Aplicación de *Trichoderma* en la protección de almácigos de lechuga *Lactuca sativa*. Memoria Congreso de Agronomía.

**Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999.** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 65:1061-1070.

**Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2000.** Induction and accumulation of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem. 38:863-873.



# MANUAL

## Producción Y Utilización De Trichoderma Spp.



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACIÓN PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA



**CET**  
CENTRO DE  
EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA