

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y FORMULACIÓN DE *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI

Yohana Gato Cárdenas

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, C.P. 11600, ygato@inisav.cu

RESUMEN

La preservación de microorganismos es de gran importancia. De este modo se asegura la viabilidad e integridad morfológica, fisiológica y genética de un cultivo para su utilización en producción, y se mantienen así las características de la cepa original. Actualmente se valoran métodos alternativos que sean eficientes para disminuir los costos de la conservación por largo plazo. En este trabajo se abordan de forma simplificada los métodos de conservación de hongos biocontroladores, sus principales características, ventajas y desventajas de su utilización, los géneros de hongos a ser conservados por estos métodos según diversos autores. Además se hace referencia a la formulación y estabilidad en almacenaje de los bioplaguicidas fúngicos, como un punto importante para obtener el producto final, con énfasis en el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* Rifai.

Palabras claves: *Trichoderma harzianum*, conservación, formulación

ABSTRACT

Preservation of microorganisms is quite remarkable in order to ensure viability and morphologic, physiologic and genetic integrity of strains cultures that let use them in production with the maintenance of their original characteristic. The efficiency of some alternative methods is evaluated currently, to diminish conservation costs. This work approaches, in simplified structure, conservation methods of biocontrol fungi, their main characteristics, advantages and disadvantages of the use, the genus of fungi to be conserved by these methods, according to diverse authors. Moreover, it makes reference to the formulation and stability in storage of fungal biopesticide, as important point to obtain the final product, making emphasis in the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum* Rifai.

Key words: *Trichoderma harzianum*, conservation, formulation

INTRODUCCIÓN

Los hongos poseen características que definen muy bien sus potencialidades como biocontroladores, por su alto poder patogénico y la capacidad de producir epizootias; sin embargo, su producción a escala industrial presenta algunos inconvenientes que han limitado el desarrollo de estos organismos con amplias posibilidades entomopatogénicas y antagonistas, y es precisamente el poder superar estas limitaciones lo que puede hacer posible su empleo a gran escala [Fernández-Larrea, 2006a].

Para el control de enfermedades fúngicas y también para nematodos se encuentran especies del género *Trichoderma*, donde sobresalen *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers., *T. virens* (Miller, Giddens & Foster),

T. pseudokoningii Rifai. Estas cepas han adquirido un valor comercial debido a los resultados efectivos obtenidos durante su aplicación, y a la aparición de nuevas tecnologías para la producción masiva y el desarrollo de bioproductos [Hermosa *et al.*, 2000; Harman, 2000].

T. harzianum es un hongo filamentoso que habita en suelos donde los nutrientes de fácil asimilación son escasos, y es alta la competencia con otros organismos. *T. harzianum* posee una gama extraordinaria de enzimas hidrolíticas y quitinolíticas que le confieren gran capacidad de interactuar de forma parasítica y simbiótica con microorganismos y plantas. Se ha demostrado que existen varios mecanismos de acción antagónica del hongo *Trichoderma* en el control microbiano de

fitopatógenos como la antibiosis, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática), inducción de resistencia, competencia por espacio y nutrientes [Lecuona, 1996; Fernández-Larrea, 2001; Ezziyyani *et al.*, 2004; Lorito, 2006]; de ahí que estas cepas se empleen en la agricultura para el control de enfermedades fúngicas, así como bioestimulantes de plantas y biofertilizantes [Kubicek y Harman, 1998; Harman *et al.*, 2004].

Con el objetivo de obtener productos fúngicos de alta calidad, se hace necesario el mantenimiento y conservación de cultivos fúngicos, lo cual tiene primordial importancia para garantizar las características originales de las cepas de producción, de forma que pueda disponerse en el tiempo de un clon del microorganismo, con su estabilidad genética y fenotípica establecidas [Jenkins y Grzywacz, 2003].

Además, en el proceso de producción de hongos para obtener el producto final con una prolongada vida en estante, es necesaria la formulación con el establecimiento de las condiciones adecuadas de almacenamiento, donde la humedad y la temperatura son parámetros claves para el éxito de un bioplaguicida de origen microbiano [Jenkins y Grzywacz, 2003; Elósegui, 2006a; Fernández-Larrea, 2006a; Alves y Batista, 2007].

Métodos de conservación de hongos biocontroladores

La conservación de los hongos filamentosos varía en dependencia del tipo y el grado de esporulación. La mayoría de los hongos formadores de esporas son liofilizados exitosamente [ATTC, 2001].

Ryan *et al.* (2000) exponen una clave basada en criterios específicos de las especies y de cuestión económica para la conservación de hongos. Los hongos que esporulan asexualmente en el medio de cultivo y no presentan esporas móviles, donde se puede ubicar a los biocontroladores fúngicos entomopatógenos y antagonistas más estudiados, se propone conservarlos por criopreservación, almacenamiento bajo aceite mineral, almacenamiento en agua destilada estéril, subcultivo continuo y liofilización. Si los aislados fúngicos son de importancia económica, estos autores proponen conservarlos por liofilización y criopreservación en nitrógeno líquido, si no, recomiendan los métodos alternativos y la conservación en sílica gel. Los métodos de conservación se pueden clasificar en:

Métodos de elección o a largo plazo: Son los mejores. Se garantiza al máximo la estabilidad genética por

evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Los métodos que pertenecen a este grupo son liofilización y congelación [Jenkins y Grzywacz, 2003].

Se tienen informes sobre la conservación de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin [Rodrigues *et al.*, 1999; Vélez y Estrada, 2003], *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Paecilomyces farinosus* Dicks, *P. fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith y *P. lilacinus* Samson preservados por liofilización y en nitrógeno líquido [Rodrigues *et al.*, 1999].

Congelación (criopreservación): Consiste en el almacenamiento de células a muy bajas temperaturas. En estas condiciones el agua, mayor componente de las células vivientes, pasa de fase líquida a sólida. Las temperaturas utilizadas pueden ser de -20 a -70°C , y temperaturas de nitrógeno (fase de vapor = -140°C ; fase líquida = -196°C). La temperatura de almacenamiento seleccionada depende de las facilidades disponibles; pero las temperaturas más bajas favorecen la viabilidad y la estabilidad genética por un período superior a treinta años [Sly, 1992]. Para asegurar la viabilidad a largo plazo de los cultivos fúngicos se recomienda la congelación y el almacenamiento en nitrógeno a bajas temperaturas. Este último es más aconsejable, pero no precisamente en la fase líquida. La de vapor es una alternativa más práctica, ya que el constante monitoreo del nivel del líquido permite que el material se mantenga por debajo de -130°C , lo que garantiza una mayor estabilidad [ATTC, 2001].

Existen muchos factores que pueden afectar la viabilidad y estabilidad de los cultivos durante el proceso de congelación, como son la edad de las células, la velocidad de congelación-descongelación, la temperatura de almacenamiento y el empleo de agentes crioprotectores. Estos últimos son compuestos químicos de gran afinidad por el agua. Tales sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Entre los crioprotectores más utilizados se encuentran el glicerol, dimetilsulfóxido, leche descremada, inositol, sacarosa, glucosa, lactosa [García y Uruburu, 2001; Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005]. Se pueden conservar por este método ascomycetes mitospóricos, zygomycetes y levaduras [Carmichael, 1962, citado por Nakasone *et al.*, 2004].

Liofilización: La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío [ATCC, 2000].

El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos no solo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación), sino también de las características físico-químicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo y la concentración de los microorganismos [García y Uruburu, 2001]. El medio de preservación contiene altos niveles de suero, proteínas, glutamato monosódico, glucosa, sacarosa o leche descremada [Sly, 1992; Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005].

El proceso es complejo y caro, pues aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado, se necesita al menos de un sistema de vacío [Smith y Onions, 1994], por lo que no se puede aplicar en laboratorios con recursos limitados.

Este procedimiento es un método de elección para muchos hongos que forman esporas, y producen gran número de 10 µm o menos de diámetro. Las largas esporas tienden a colapsar durante el proceso de liofilización, y el daño estructural causado no es reversible por hidratación. Un número significativo de esporas de tamaño adecuado también son dañadas físicamente, y mueren durante el proceso de congelación por la formación de cristales de hielo [Nakasone *et al.*, 2004].

Estudios recientes sobre las técnicas de preservación por largo plazo han evidenciado que estas técnicas no cubren algunos efectos preocupantes sobre la estabilidad genética y las características fenotípicas de algunos de los aislados fúngicos estudiados. Estudios detallados sobre un número de hongos anamórficos han referido que la liofilización y la criopreservación pueden causar polimorfismos moleculares detectables, por lo cual se debe usar más de un método y medios de cultivo apropiados que disminuyan la ocurrencia de polimorfismo en la conservación por estos métodos [Ryan, 1999, citado por Jenkins y Grzywacz, 2003].

Se necesitan hacer cuidadosas consideraciones antes de conservar aislados valiosos a largo plazo. En respuesta a esto, se han desarrollado claves para usarlas en la selección de técnicas de conservación de hongos [Ryan *et al.*, 2000].

Métodos de conservación a corto plazo. Involucran el mantenimiento de cultivos hasta un año [Nakasone *et al.*, 2004].

Subcultivos. Es el método tradicional para la preservación de los microorganismos [Snell, 1991; García y

Uruburu, 2001; Vélez y Estrada, 2003]; pero tiene algunas desventajas, como son la posibilidad de la pérdida de la identificación del microorganismo después de muchas transferencias de nombres o designaciones de los cultivos; el riesgo de contaminación y de cambios genéticos que se incrementa a mayor número de transferencias; la posible inoculación con el microorganismo equivocado cuando se realiza la transferencia de una serie de cepas; el peligro de pérdida del cultivo, sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y no se realizan transferencias periódicas a medios frescos; la posibilidad de que ocurra deshidratación del medio de cultivo. Además, cuando hay muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenamiento [Smith y Onions, 1994; Jenkins y Grzywacz, 2003].

Métodos alternativos. Se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, ya sea por carecer de los equipos necesarios o porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos [García y Uruburu, 2001].

Conservación por suspensión en agua destilada estéril: Es un método muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en los hongos filamentosos, en períodos a veces superiores a cinco años [García y Uruburu, 2001].

Aparentemente el agua suprime cambios morfológicos en muchos hongos [Nakasone *et al.*, 2004]. Es un método simple, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos fúngicos por períodos prolongados, y evita el pleomorfismo y la contaminación con ácaros [Pasarell y McGinnis, 1992; Malik y Hoffmann, 1993]. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia y el poder fermentativo [García y Uruburu, 2001].

Los ascomycetes, incluidas sus formas mitospóricas, sobreviven por 10 años cuando se almacenan a 20°C [Jonson y Martin, 1992, citados por Nakasone *et al.*, 2004]. Se han conservado por este método cepas autóctonas de las especies *Trichoderma* sp., *T. harzianum* y *T. koningii* [Bueno y Gallardo, 1998].

Conservación en capa de aceite mineral: La esencia del método está en cubrir el cultivo bien desarrollado sobre medio nutritivo líquido o agarizado con el aceite mineral no tóxico y estéril, como la parafina o vaselina; también se usa petrolato líquido [Uzunova-Doneva y

Donev, 2004-2005]. Los cultivos pueden mantenerse por varios años, o en casos excepcionales por más de treinta y dos a 15-20°C [Nakasone *et al.*, 2004]. Este método está especialmente recomendado para conservar micelio u hongos no esporulados, donde la congelación puede ser adversa para ellos.

Se recomienda este método en climas tropicales para prevenir la desecación del cultivo e impedir la penetración de ácaros. Es un método fácil de realizar y no requiere de equipos caros. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración [CABI, 1998].

Su mayor desventaja es que el hongo puede continuar su crecimiento, al menos durante los primeros períodos, y así ocurrir que sobrevivan mutantes capaces de crecer bajo las condiciones adversas que implican la conservación [Nakasone *et al.*, 2004].

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* se ha conservado formulado en aceite [Hong *et al.*, 2005], con lo cual se incrementa la tolerancia a las altas temperaturas, la virulencia y se mantiene la viabilidad de los conidios en el tiempo.

Se informa que para hongos entomopatógenos como *Beauveria* y *Metarhizium* spp. la virulencia de los conidios contra insectos es mejor mantenida en aceite que en agua [Bateman *et al.*, 1993; Prior *et al.*, 1988, citados por Hong *et al.*, 2005].

Métodos restringidos. Resulta difícil evaluar detalladamente su confiabilidad. En la mayoría de los casos la información apropiada no está disponible, y en otros restringida a un número limitado de microorganismos. Los cultivos no deben ser preservados solamente por este método sin una investigación previa [Malik y Hoffmann, 1993].

Desecación en sílica gel. El método de sílica gel puede utilizarse para preservar hongos esporulados si no está disponible la conservación por liofilización o almacenamiento en nitrógeno líquido. Los hongos esporulados protegidos con leche descremada, y almacenados sobre sílica gel, se mantienen viables de cuatro a cinco años [Raper, 1984, citado por Nakasone *et al.*, 2004]. En general, la viabilidad depende de la cepa del hongo y del medio sobre el cual crece antes del almacenamiento. La sílica gel no indicadora es la más usada; la indicadora contiene cobre, que es tóxico para los hongos [CABI, 1998].

Una ventaja de la conservación en sílica gel es que previene todo crecimiento fúngico y disminuye el metabolismo por falta de agua. Los mismos autores informan que los hongos como las especies de *Pythium* y *Phytophthora* no sobreviven a este proceso. Además de los anteriores, se han desarrollado métodos prácticos, efectivos e ingeniosos para preservar hongos sobre varios sustratos orgánicos como astillas de madera, granos de cereal, paja, papel de filtro y tejidos de insectos y plantas [Nakasone *et al.*, 2004].

Gato *et al.* (2009) han informado que el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34, perteneciente al cepario de hongos biocontroladores del Inisav, conservado en aceite mineral y agua destilada estéril, se mantiene viable con una adecuada virulencia por un período de 12 meses; sin embargo, esta cepa conservada en sílica gel solamente mantiene su viabilidad por un período de tres meses.

Formulación de hongos

El objetivo de una buena formulación es preparar una combinación de ingredientes de forma tal que el principio activo se mantenga estable durante el almacenamiento y después de la aplicación, efectivo y fácil de aplicar. Entre las formulaciones más usadas en el desarrollo de productos fitosanitarios a base de hongos se encuentran el polvo, granulados, polvos humedecibles, polvos floables secos o gránulos dispersables, materiales microencapsulados, concentraciones emulsionables, floables o suspensiones concentradas [Carballo, 1998; Fragas *et al.*, 2007].

Los materiales utilizados en la formulación no deben tener actividad biológica sobre animales, plantas o insectos benéficos, ni afectar la actividad del hongo; deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con el ingrediente activo, facilitar la aplicación del producto y ser económicamente rentables [Carballo, 1998; Urtubia y France, 2007].

En toda formulación se distinguen tres tipos principales de componentes, los cuales son el principio activo, ya sea conidios, micelio [Urtubia y France, 2007], o clamidosporas en el caso de *Trichoderma* [Fernández-Larrea, 2006b]. El diluyente o vehículo puede ser sólido o líquido, y es un material inerte, y los adyuvantes son materiales inertes, pero tienen función protectora, dispersante y adherente [Kovach *et al.*, 2000].

Formular un hongo consiste en adicionarle determinados compuestos como agentes humectantes, dis-

persantes, reguladores de la viscosidad, protectores de luz UV, atrayentes, tensoactivos, solventes, emulsificantes o gelificantes, y otros aditivos que pueden ser nutrientes o estimulantes. Estos materiales favorecen la longevidad del hongo, mejoran su desempeño en el campo, facilitan su manejo, aplicación, y permiten su almacenamiento en condiciones que disminuyen el costo, con una pérdida mínima de las cualidades del producto [Lecuona, 1996; Batista y Silva, 2005; Urtubia y France, 2007].

Estabilidad de las formulaciones de bioplaguicidas fúngicos

Debido a que el ingrediente activo lo constituyen estructuras infectivas, la selección de los aditivos y el tipo de formulación resulta una cuestión crítica. Un pesticida microbiológico debe resultar estable al menos de seis a 18 meses bajo condiciones normales de almacenamiento para que resulte posible la comercialización [Caraballo, 1998]. Si se va a producir por demanda un tiempo de tres a seis meses, puede ser aceptable [Sanyang *et al.*, 2000; Fernández-Larrea, 2006b].

Actualmente no se han logrado productos para biocontrol formulados de forma estable por más de dos años sobre una base económica racional. La opción tecnológica de concentrar y separar esporas desarrolladas sobre sustratos sólidos se usa cada vez más [Elósegui, 2006b].

La temperatura y humedad relativa son los parámetros más importantes durante el almacenamiento [Jenkins y Grzywzac, 2003; Alves y Batista, 2007; Fragas *et al.*, 2007]. El empacado es esencial, de forma que se garantice una humedad relativa baja del producto y una temperatura de almacenaje menor de 20°C para tener por lo menos un preparado viable de tres a seis meses. Estos dos parámetros son los que más influyen en la viabilidad de los propágulos durante el almacenaje. La refrigeración de las esporas a 5°C y humedades relativas menores del 1% en el producto, tecnológicamente son posibles, pero no económicamente; de ahí que se ajusten estos parámetros, según el costo real para cada productor, de acuerdo con la sobrevivencia lograda a niveles superiores [Elósegui, 2006b].

La biodegradabilidad del producto también está muy influenciada por la humedad y la temperatura, de forma que se debe ajustar un rango permisible de contaminantes que sea tolerable. Además, hay formulaciones que son dañinas en almacenaje a corto o mediano pla-

zo, como es el caso de los aceites vegetales que dañan la pared de la espora y la vuelven no viable en pocas semanas [Jenkins y Grzywzac, 2003; Sanyang *et al.*, 2000].

Se encontró una buena tolerancia a la temperatura en conidios almacenados a una humedad relativa del 4-5%. Este nivel de secado puede dificultar la aplicación práctica en sistemas de baja tecnología o artesanales. Diversos tipos de arcillas se han empleado para incrementar la longevidad en almacenamiento por permitir el secado del conidio [Moore y Higgins, 1997]. Se cuenta con resultados experimentales del almacenamiento de formulados de especies de *Trichoderma* a base de zeolita o caolín a temperaturas de 4 y 30°C con buenos resultados [Küçük y Kivanç, 2005].

Formulación de *Trichoderma*. Situación en Cuba

Existen diferentes formulaciones de los hongos antagonistas, las cuales se usan en dependencia del mecanismo de acción. Se conoce que aproximadamente el 90% de los actuales micoplaguicidas para el control de hongos fitopatógenos está representado por *Trichoderma* a nivel mundial, con más de cincuenta productos en los cinco continentes [Lorito, 2006].

Se encuentran varios productos en el mercado a base de hongos del género *Trichoderma* [Monte, 2001; Ranasingh *et al.*; 2006]. Todas ellas emplean como principio activo las formas reproductoras (conidios y clamidosporas). Las formulaciones de *Trichoderma* son fundamentalmente en forma de polvos humedecibles, polvo seco, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo [Fernández-Larrea, 2006b].

En el caso de *Trichoderma*, a pesar de que se produce en Cuba desde hace más de veinte años, no se cuenta con un producto formulado, por lo que la estabilidad no sobrepasa los seis meses. El tiempo recomendado para el almacenamiento del biopreparado sobre arroz en Cuba era de seis meses a 23-25°C para *Trichoderma* [Fernández-Larrea, 2001].

Diversos autores refieren el uso extensivo en Cuba de *T. harzianum* cepa A-34 y sus formas de producción, con todas sus ventajas como un producto antagonista contra enfermedades de suelo [Fernández *et al.*, 2006; Fernández-Larrea, 2006a; Fernández-Larrea y Elósegui, 2006]. El producto comercial Tricosav 34, desarrollado por el Inisav, ha demostrado ser extensivo contra diversos patógenos fúngicos [Fernández *et al.*, 2006].

Recientemente la cepa A-34 de *T. harzianum* se formuló con diferentes inertes orgánicos como maicena, pol-

vo de arroz, sacarosa, e inorgánicos como zeolita y carbonato de calcio, a los cuales se les analizó la estabilidad en almacenaje a las temperaturas de 5 y 25°C por un período de un año. Los formulados en polvo de arroz y zeolita fueron los que mantuvieron mejores porcentajes de viabilidad y humedad en este período, sin perder capacidad antagonista. Exhibieron además valores de pH y suspensibilidad en los rangos adecuados [Gato *et al.*, 2009].

CONCLUSIONES

- Es más recomendable conservar a *T. harzianum* por liofilización y criopreservación en nitrógeno líquido, aunque puede conservarse por métodos alternativos.
- Este hongo no sobrevive al proceso de desecación en sílica gel.
- *T. harzianum* cepa A-34 se puede almacenar formulado en diferentes inertes orgánicos e inorgánicos, con una estabilidad mantenida por un año.

REFERENCIAS

- Alves, A.; F. Batista: «Entomopatogenic Formulations: A Good Formulation is Basic for a Successful Microbial Insecticide», *Biocología Ciencia & Desenvolvimiento*, España, 2007.
- ATTC: «Preservation and Recovery of Filamentous Fungi», *Technical Bulletin* No. 2, 2000, <http://www.atcc.org/> (consultado el 8 de marzo del 2009).
- Batista L. I.; M. Silva: «Efeito de aditivos sobre a viabilidade e virulência de formulados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil.», *Acta Biológica Leopoldensia* 27(2):67-71, Brasil, 2005.
- Bueno, L.; R. Gallardo: «Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril», *Rev. Iberoam. Micol.* 15:166-168, España, 1998.
- CABI: «Mass Production of Fungal Pathogens for Insect Control», *Insect Pathology Manual*, Section VII. Culture Maintenance. Storage of isolates, Inglaterra, 1998, pp. 10 y 11.
- Caraballo, M.: «Formulación de hongos entomopatógenos», *Manejo Integrado de Plagas* 47:1-4, Costa Rica, 1998.
- Elósegui, O.: «Producción de hongos para el control biológico», Memorias del curso-taller Manejo Agroecológico de Plagas en el Sistema de Producción, 9-11 octubre, Cidisav, Ciudad de La Habana. 2006a, pp. 73-81.
- Elósegui, O.: «Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas», Inisav, La Habana, 2006b, <http://www.inisav.cu/OtrasPub/METODOS%20ARTESANALES%20DE%20PRODUCCIÓN%20DE%20BIOPLAGUICIDAS.pdf>
- Ezziyyani, M.; C. P. Sánchez; A. S. Ahmed; M. E. Requena; M. E. Cyela: «*Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.)», *Anales de Biología* 26:35-45, España, 2004.
- Fernández-Larrea, O.: «Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario», *Manejo Integrado de Plagas* 62:96-100, Costa Rica, 2001.
- Fernández-Larrea, O.: «Los microorganismos en el control biológico. Alternativas de producción en Cuba», Memorias del Curso Interna-
- cional Manejo Agroecológico de Plagas en el Sistema de Producción, Inisav, La Habana, 2006a.
- Fernández-Larrea, O.: *Temas Interesantes acerca del control biológico de plagas*, Instituto Nacional de Plagas Agrícolas, Venezuela, 2006b.
- Fernández-Larrea, O.; O. Elósegui: «Alternativas de producción de *Trichoderma* en Cuba», *Fitosanidad* 10 (2):147, La Habana, 2006.
- Fernández, A.; E. Pérez; S. Noa; J. A. Márquez; V. Andino; P. Ruiz; O. Fernández-Larrea; O. Elósegui; C. Cruz: «Experiencia cubana en la aplicación masiva de *Trichoderma harzianum* en el control de patógenos del suelo en semilleros de tabaco bajo el sistema de bandejas flotantes», I Taller Latinoamericano Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y Otros Antagonistas, La Habana, 28-31 de marzo, 2006.
- Fragas, I.; G. Fleitas; L. Hidalgo: «Formulación de hongos entomopatógenos como control biológico», La Habana, 2007, <http://www.monografias.com/trabajos17/formulacion-de-hongos/formulacion-de-hongos.shtml> (consultado 20 de diciembre del 2008).
- García, M. D.; F. Uruburu: «La conservación de cepas microbianas. Colección Microbiana de Cultivos Tipo (CECT) Universidad de Valencia, España. Temas de la actualidad», 2001, <http://www.uv.es/cect/> (consultado el 20 de diciembre del 2008).
- Gato, Y.; D. Rodríguez; O. Elósegui: «*Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34. Métodos de conservación y evaluación de sus formulados», tesis en opción al título de Licenciado en Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2009.
- Harman, G. E.: «The Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* Strain T-22», *Plant Disease* 84(4):377-393, EE. UU., 2000.
- Harman, G.; C. Howell; A. Viterbo; I. Chet; M. Lorito: «*Trichoderma* Species Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts», *Nature Reviews-Microbiology* 2:46-53, EE. UU., 2004, http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Chet/NR.pdf.
- Hermosa, M. R.; I. Grondona; E. A. Iturriaga; J. M. Díaz-Minguez; C. Castro; E. Monte; I. García-Acha: *Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of Trichoderma spp.*, American Society for Microbiology, España, 2000.
- Hong, T. D.; S. Edgington; R. H. Ellis; M. Aquino; D. Moore: «Saturated Salt Solutions for Humidity Control and the Survival of Dry Powder and Oil Formulations of *Beauveria bassiana* Conidia», *Journal of Invertebrate Pathology* 89:136-143, Holanda, 2005.
- Jenkins, N. E.; D. Grzywacz: «Towards the Standardization of Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents», *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*, CAB International, Wallingford, Inglaterra, 2003.
- Kovach, J.; R. Petzoldt; G. E. Harman: «Use of Honey Bees and Bumble Bees to Disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to Strawberries for *Botrytis* Control», *Biol. Contr.* 18:235-242, Holanda, 2000.
- Kubicek, C. P.; G. E. Harman: *Trichoderma and Gliocladium*, Vols. 1 y 2, Taylor & Francis, Londres, 1998.
- Küçük, Ç.; M. Kivanç: «Effect of Formulation on the Viability of Biocontrol Agent, *Trichoderma harzianum* Conidia», *African Journal of Biotechnology* 4(5):483-486, 2005.
- Lecuona, R. E.: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Ed. R. E. Lecuona, Argentina, 1996.
- Lorito, M.: «The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma*, phytopathogenic Fungi and Plants: Opportunities for Developing Novel Disease Control Methods», Memorias del Taller Latinoamericano Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y Otros Antagonistas, marzo 28-31, La Habana, 2006.
- Malik, K. A.; P. Hoffmann: «Long-Term Preservation of Yeast Culture by Liquid Drying», *J. Microbiol. Biotechnol.* 9:372, Corea, 1993.

Métodos de conservación y formulación de...

- Monte, E.: «Understanding *Trichoderma*: Between Biotechnology y Microbial Ecology», *Int. Microbiology* 4:1-4, España, 2001.
- Moore, D.; P. M. Higgins: «Viability of Stored Conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams y Rozsypal, Produced Under Differing Culture Regimes and Stored with Clays», *Biocontrol Science and Technology* 7:335-343, Inglaterra, 1997.
- Nakasone, K.; S. Peterson; S. Jong: «Preservation and Distribution of Fungal Cultures», *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Academic Press, EE. UU., 2004, pp. 37-47.
- Pasarell, L.; M. R. Mc Ginnis: «Viability of Fungal Culture Maintained at -70°C», *J. Clin. Microbiol.* 30:1000-1004, EE. UU., 1992.
- Ranasingh, N.; A. Saurabh; M. Nedunchezhiyan: «Use of *Trichoderma* in Disease Management», *Orissa Review* LXIII (2-3):68-70, sept.-oct., India, 2006.
- Rodrigues, M.; I. Martins; R. Mello; M. Tirano: «Entomopatogenic Fungal (Hyphomycetes) Collection: Assessment of Conidial Viability», *Pesq. Agropec. Bras.* 34 no. 8, Brasil, 1999, http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0100-204x1999000800023 (consultado el 7 abril del 2009).
- Ryan, M. J.; D. Smith; P. Jeffriesy : «A Decision-Based Key to Determine the Most Appropriate Protocol for the Preservation of Fungi», *World Journal of Microbiology/Biotechnology* 16:183-186, Springer, Holanda, 2000.
- Sanyang, S.; H. F. Van Emden; D. Moore: «Laboratory Shelf-Life of Oil-Formulated Conidia of the Locust y Grasshopper Fungal Pathogen *Metarhizium flavoviridae* Gams & Rozsypal, in Mixtures with the Pyrethroid Insecticide Lambda-Cyhalothrin», *International Journal of Pest Management* 46(3):165-168, Inglaterra, 2000.
- Sly, L.: «Maintenance and Preservation of Microbial Cultures in a Laboratory Culture Collection», *Technical Note* 14:1-16, EE. UU., 1992.
- Smith, D.; A. H. S. Onions: «The Preservation and Maintenance of Living Fungi», *IMI Technical Handbooks* No. 2, CAB International, Wallingford, Inglaterra, 1994.
- Snell, J. J. S.: «General Introduction to Maintenance Methods», *Maintenance of Microorganisms and Cells. A Manual of Laboratory Methods*, Academy Press, Londres, 1991, pp. 21-30.
- Urtubia, I.; A. France: «Formulaciones de hongos entomopatógenos para el control de plagas en la agricultura», 2007, <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR34779.pdf>
- Uzunova-Doneva, T.; T. Donev: «Anabiosis and Conservation of Microorganisms», *Journal of culture collections* 4:17-28, Bulgaria, 2004-2005.
- Vélez, P.; M. Estrada: «Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos», *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, Hoja Técnica 46:97-103, Costa Rica, 2003.