

CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma* spp EN EL BIOCONTROL DEL  
HONGO *Leucoagaricus gongylophorus* DE LA HORMIGA ARRIERA (*Atta cephalotes*  
L.) EN EL CULTIVO DE PALMA ACEITERA

BRAYAN GIOVANNY GONZALEZ OCAMPO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA  
SAN JUAN DE PASTO

2018

CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma* spp EN EL BIOCONTROL DEL  
HONGO *Leucoagaricus gongylophorus* DE LA HORMIGA ARRIERA (*Atta cephalotes*  
L.) EN EL CULTIVO DE PALMA ACEITERA.

BRAYAN GIOVANNY GONZALEZ OCAMPO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero  
Agrónomo

Presidente de Tesis

Walter Vladimir Bravo Yandún

Copresidente de Tesis

Javier García Alzate I.A.Ph.D

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA  
SAN JUAN DE PASTO

2018

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado son Responsabilidad de los autores.

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

“La Universidad de Nariño no se hace responsable de las opiniones o resultados obtenidos en el presente trabajo y para su publicación priman las normas sobre el derecho de autor”.

Artículo 13, Acuerdo N. 005 de 2010 emanado del Honorable Consejo Académico

Nota de Aceptación:

Los Directores y los Jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por su autor y lo encuentran satisfactorio.

---

---

---

---

---

---

---

Firma del Presidente de tesis

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

**San Juan de Pasto, noviembre de 2018**

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
CONCLUSIONES.....	26
RECOMENDACIONES .....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

**Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. en el biocontrol del hongo *Leucoagaricus gongylophorus* de la hormiga arriera (*Atta cephalotes* L.) en el cultivo de palma aceitera.<sup>1</sup>**

**Antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of the fungus *Leucoagaricus gongylophorus* of the ant leaf-cutter (*Atta cephalotes* L.) in the cultivation of oil palm.<sup>1</sup>**

Brayan Giovanni Gonzalez Ocampo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trabajo de grado como requisito para obtener el título de Ingeniero Agrónomo

<sup>2</sup> Estudiante del programa de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Nariño, Pasto, Colombia, brayangiovannygonzalez@gmail.com

**RESUMEN**

La investigación se realizó en el laboratorio del CIPAL que pertenece ANCUPA, con el objeto de determinar la capacidad antagónica de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Th1, Th27 y Th30) para el biocontrol de *Leucoagaricus gongylophorus*, el hongo simbionte de la hormiga arriera (*Atta cephalotes* L.). Se asignaron cuatro tratamientos, T0: testigo, T1, T2 y T3 corresponden a enfrentamiento de *L. gongylophorus* con la cepa Th1, Th27 y Th30 de *Trichoderma* spp respectivamente. Se evaluaron las variables de crecimiento radial de *Trichoderma* spp. y de *L. gongylophorus*, porcentaje de inhibición de crecimiento radial, porcentaje de aceleración radial de *Trichoderma* spp. y clasificación de las cepas según la escala de Bell. Se utilizó un diseño completamente al azar con diferente número de repeticiones, siendo un mínimo de tres por tratamiento. Se obtuvo que el crecimiento radial de *L. gongylophorus* se detiene en los tratamientos con enfrentamiento. La cepa Th30 y Th27 tuvieron mayor PICR de *L. gongylophorus* que la cepa Th1. En el porcentaje de aceleración de crecimiento radial de *Trichoderma* spp., las cepas Th27 y Th30 no tienen diferencias estadísticamente significativas entre ellas pero son superiores a la cepa Th1. Las cepas Th27 y Th30 se clasifican en categoría 1 según la escala de Bell

considerándose así cepas altamente antagonistas frente a *L. gongylophorus*, mientras que la cepa Th1 se ubica en la categoría 3 en la misma escala por lo que no se considera altamente antagonista frente al hongo simbiote.

**Palabras clave:** Antagonismo, cepas nativas, *L. gongylophorus*, Palma de aceite, *Trichoderma* spp.

### ABSTRACT

The research was carried out in the CIPAL laboratory belonging to ANCUPA, in order to determine the antagonistic capacity of three native strains of *Trichoderma* spp. (Th1, Th27 and Th30) for the biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant arriera (*Atta cephalotes* L.). Four treatments were assigned, T0: control, T1, T2 and T3 correspond to a confrontation of *L. gongylophorus* with the strain Th1, Th27 and Th30 of *Trichoderma* spp respectively. The radial growth variables of *Trichoderma* spp. and of *L. gongylophorus*, percentage of inhibition of radial growth, percentage of radial acceleration of *Trichoderma* spp. and classification of the strains according to the bell climbing. It is a minimum of three per treatment. The radial growth of *L. gongylophorus* was obtained in the treatments with confrontation. Strain Th30 and Th27 had a higher PICR of *L. gongylophorus* than strain Th1. In the percentage of acceleration of the radial growth of *Trichoderma* spp., Th27 and Th30 strains there are no statistically significant differences between them but they are superior to the Th1 strain. The Th27 and Th30 strains are classified in category 1 according to the scale of the campaign, as well as highly antagonistic strains against *L. gongylophorus*, while the Th1 strain is classified in category 3 on the same scale, so that it is considered so antagonistic against the symbiotic fungus.

**Key words:** Antagonism, *L. gongylophorus*, leaf-cutters ants, Palm oil, *Trichoderma* spp.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha intensificado la expansión del cultivo de palma de aceite para satisfacer las exportaciones de materia prima para fabricar alimentos procesados, cosméticos, detergente y lubricantes (Furumo y Aide, 2017). Los seis principales países productores de palma son: Indonesia, Malasia, Tailandia, Colombia, Nigeria y Ecuador. (Greenpalm, 2016)

Según el Ministerio de Agricultura y ganadería (2017) en el 2017, Ecuador ocupa es el sexto productor en el mundo y el segundo en América con una producción de 577 mil toneladas de aceite crudo, Existen cerca de 257 mil hectáreas sembradas de palma aceitera, de las cuales el 51,41% son fincas de hasta 10 hectáreas, y que el 39,51% de la superficie de palma está ocupada por plantaciones de hasta 50 hectáreas

Muñoz (2014) reporta que en la producción de palma de aceite en Ecuador, se reporta la presencia de numerosas especies de insectos considerados plagas, entre ellas se encuentra la hormiga arriera (*Atta cephalotes* L.). Parte de la complejidad por la que se caracterizan estos insectos sociales deriva del mutualismo bipartita con el basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, el cual es mantenido por las obreras y en retribución, el hongo conformado como un jardín fúngico nutre a la reina y la mayor parte de la colonia con diversas fuentes de carbono acumuladas en una estructura vacuolizada llamada gongylidia (Kooij *et al.*, 2014). Las hormigas cortadoras de hojas tienen una compleja organización social que permite una mayor eficiencia en la obtención del material vegetal que se usa como sustrato y haciendo uso de diferentes enzimas y componentes son capaces de mantener sus jardines en condiciones óptimas para el desarrollo del hongo simbiote (Aylward *et al.*, 2015).

Sanchez (2009) y Martinez (2015) mencionan que hay reportes de la existencia de hongos micoparasitarios que demuestran mecanismos letales contra una gran diversidad de hongos (siendo muchos de estos fitopatógenos), por lo cual el uso de este control biológico ha sido de gran importancia en la agricultura. Especies antagonistas del género *Trichoderma* spp tienen la capacidad de actuar contra una amplia variedad de patógenos del suelo como (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. y *Sclerotinia* spp.) y el follaje (*Botrytis* spp. y *Peronospora* spp.) Martinez (2015). Además se conoce su capacidad de producir metabolitos, sustancias volátiles y enzimas con actividad antifúngica contra



basidiomicetes, por lo tanto esta investigación tuvo como objeto evaluar la actividad antagónica de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp contra *L. gongylophorus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **LOCALIZACIÓN**

La investigación se realizó en el CIPAL (Centro de Investigación de Palma Aceitera), que pertenece a la Asociación de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA), ubicado en el km 37,5 de la vía Santo Domingo- Quinindé, Cantón La Concordia, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (Ecuador), situado a una altitud de 264 msnm, 0°02'29'' (Latitud Sur), 79°24'54'' (Longitud Occidental), presenta las siguientes condiciones climáticas: temperatura promedio de 24,2°C, 626 horas/luz/año, humedad relativa del 86% y precipitación anual 2881.2 mm.

### **OBTENCIÓN DEL HONGO SIMBIONTE *L. gongylophorus*.**

Se localizó una colonia activa de hormiga arriera, en el cual se realizó una excavación hasta llegar a una de las cámaras de cultivo donde estos insectos reproducen su hongo simbiote con fines alimenticios. Se extrajo cuidadosamente partes del cultivo del hongo, se guardó en un recipiente plástico previamente esterilizados y fue trasladado al laboratorio del CIPAL.

### **AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN**

Para el aislamiento del hongo simbiote se siguió la metodología planteada por Miyashira *et al.*, (2010), en la que bajo condiciones de asepsia, se tomaron fragmentos de micelio colectado y fueron transferidos a cajas Petri que contenían medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y agar rosa de bengala (ARB) esterilizados. Sin embargo, aunque el medio ARB presente características que inhiben el crecimiento bacteriano dado a su contenido de cloranfenicol (Sigma-aldrich, 2013), se agregó sulfato de estreptomina para disminuir la contaminación. Las cajas sembradas se llevaron a incubación a temperatura ambiente (Aproximadamente 24°C) y en oscuridad. Transcurrido 8 días, solamente se observó crecimiento de micelio proveniente de los fragmentos sembrados en cajas Petri que contenían medio de cultivo ARB (Figura 1).

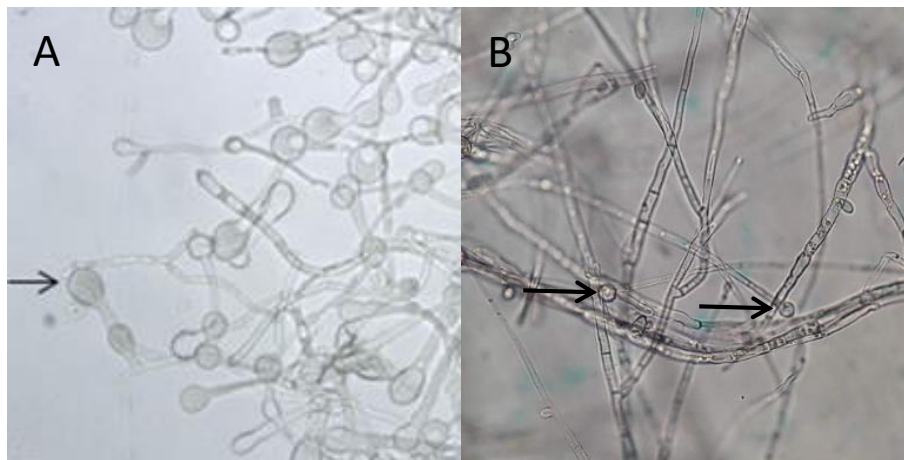


**Figura 1.** Crecimiento micelial de *L. gongylophorus* a partir de los fragmentos sembrados en medio de cultivo ARB.

La purificación del cultivo de *L. gongylophorus* se realizó según al procedimiento realizado por Bich *et al.* (2017) en la que se realiza resiembras de trozos de 5 mm de diámetro del micelio del hongo periódicamente en cajas Petri con el mismo medio de cultivo (ARB) con el fin de disminuir la contaminación y obtener finalmente un cultivo puro. En este estudio fue necesario realizar tres resiembras para obtener un cultivo puro del hongo, en cada resiembra de siguió el siguiente procedimiento: Se tomó fragmentos circulares del micelio del hongo de 5 mm de diámetro usando pipetas Pasteur a manera de sacabocados y se procedió a sembrarlos en el centro de 10 cajas Petri las cuales fueron almacenadas en incubadora a temperatura ambiente (Aproximadamente 24°C) y en oscuridad durante 10 días.

Cuando se obtuvo un cultivo puro del fúngico simbiote, se realizó una caracterización macroscópica describiendo una zona central algodonosa, la aparición de hifas y gotas hialinas en los bordes del cultivo, mismas características que fueron descritas por Lugo *et al.* (2013). Para la caracterización microscópica se realizaron montajes del micelio en placas y se observó con microscopio óptico, donde se determinó la presencia de "gongylidias" en el ápice las hifas de hongo (Figura 2) y además la ausencia de fibula, lo

cual confirmó la identidad hongo simbiote (*L. gongylophorus*) dado que estas son características de esta especie (Miyashira *et al.*, 2010.)



**Figura 2.** A: Micelio de *L. gongylophorus* (Miyashira *et al.*, 2010) B: Micelio del hongo aislado en la presente investigación. Las estructuras globulares ubicadas en el apice de las hifas indicadas con las flechas corresponden a las “gongylidias”.

Una vez confirmada la identidad de *L. gongylophorus* se resembró fragmentos del hongo en 20 cajas con medio de cultivo PDA para medir su crecimiento radial, para lo cual se utilizó una regla graduada y se midió diariamente desde el borde del fragmento hasta donde creció el micelio terminando la medición cuando el micelio llegó al borde de la caja Petri.

#### **Activación de las tres cepas de *Trichoderma* spp.**

En esta investigación se utilizaron tres cepas de *Trichoderma* spp. del banco de germoplasma de ANCUPA denominadas Th1, Th27 y Th30, las cuales son el resultado de una colección de cepas de *Trichoderma* spp. realizado en las principales zonas palmicultoras del Ecuador. Para la activación de las cepas se usó fragmentos de papel inoculados con los respectivos hongos, los cuales se sembraron en 5 cajas Petri con medio de cultivo PDA para cada cepa y se dejaron en incubadora a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) y en oscuridad durante cinco días, tiempo en el cual las cepas cubrieron totalmente el área de la caja Petri y manifestaban abundante esporulación. Posteriormente se resembraron en 8 cajas Petri por cada cepa con el mismo medio de cultivo para realizar la medición de crecimiento radial de la misma manera como se midió *L. gongylophorus*.

## **Prueba de antagonismo**

Se realizó la siembra de *L. gongylophorus* en 125 cajas Petri con medio de cultivo PDA. Se dejó en incubación a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) y en oscuridad. Se realizaron mediciones diarias del crecimiento radial durante los posteriores 17 días usando una regla graduada.

La siembra de las cepas de *Trichoderma* spp. se realizó al día cinco luego de haber sembrado *L. gongylophorus* para garantizar un crecimiento uniforme y limpio de este último.

Se descartó las cajas Petri contaminadas con otros microorganismos, por lo tanto se obtuvieron 53 cajas libres de contaminación y con correcto crecimiento. Se repartieron 14 cajas para cada tratamiento excepto para el testigo al cual solo se le asignó 11 cajas. Se continuó con la medición diaria del crecimiento radial tanto del hongo simbionte como de *Trichoderma* spp. en cada tratamiento durante 12 días más después de la siembra de los antagonistas dado que al cabo de ese tiempo los hongos crecieron hasta el otro extremo de la caja y habían dejado de mostrar cambios.

## **Variables evaluadas**

Se evaluaron las siguientes variables: Crecimiento radial de *L. gongylophorus*, crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma* spp., porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC), porcentaje de aceleración de crecimiento (PAC), y clasificación en la escala de cubrimiento del sustrato propuesta por Bell *et al.* (1982).

El crecimiento radial de *L. gongylophorus*. se tomó a partir del primer día posterior a su siembra y el crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma* spp. se empezó a medir un día después de la siembra de ellas que corresponde al sexto día de haber sembrado el hongo simbionte. Ambos microorganismos fueron medidos hasta el día 17 desde la siembra de *L. gongylophorus*. El análisis estadístico se realizó a los días 8 y 17 para ambos hongos dado que el día 8 corresponde al día en que estos hicieron contacto y el día 17 es el día en que se tomó el último dato de crecimiento.

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$PICR = \frac{(R1 - R2)}{R1} * 100$$

R1: Radio de *L. gongylophorus* en el testigo

R2: Radio de *L. gongylophorus* en los tratamientos con enfrentamiento con el biocontrolador.

El porcentaje de aceleración de crecimiento radial de *Trichoderma* spp. fue calculado en base a la siguiente ecuación:

$$PACRT = \frac{R2 - R1}{R2} * 100$$

R1= Crecimiento radial del testigo de *Trichoderma* spp

R2= Crecimiento radial de *Trichoderma* spp frente al simbionte.

La evaluación de la capacidad antagónica se realizó mediante la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) (Tabla 1) de acuerdo a la medida de invasión del medio de cultivo de *Trichoderma* spp y el patógeno (*L. gongylophorus*).

**Tabla 1.** Escala de Bell *et al.* (1982) para la evaluación de la capacidad antagónica, de acuerdo a la medida de la invasión en la superficie de *Trichoderma* spp y el patógeno.

Grado	Capacidad Antagónica
1	<i>Trichoderma</i> spp. creció completamente sobre el patógeno y cubrió totalmente la superficie del medio
2	<i>Trichoderma</i> spp. creció en al menos 2/3 de la superficie del medio
3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cada uno cubrió aproximadamente la mitad de la superficie del medio (mayor de 1/3 y menor de 2/3)
4	El patógeno colonizó al menos dos terceras partes de la superficie del medio y pareció resistir la invasión de <i>Trichoderma</i> spp.
5	El patógeno creció completamente sobre <i>Trichoderma</i> spp. y cubre totalmente la superficie del medio

**Fuente:** Bell *et al.*, (1982)

## Diseño experimental

La prueba de antagonismo de las tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre el hongo *L. gongylophorus* se desarrolló con un diseño completamente al azar (DCA) con desigual número de repeticiones (Tabla 2).

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para las variables en donde existió diferencias significativas entre tratamientos se realizó una prueba de Medias de Tukey al 95%. Debido a que los datos de crecimiento radial de *Trichoderma* spp al día ocho y PACRT no presentaron una distribución normal, fueron sometidos a una transformación con Raíz cuadrada y Log10 respectivamente para su normalización previo al ANDEVA. Para lo anterior se utilizó la versión gratuita del paquete estadístico Infostat.

**Tabla 2.** Descripción de los tratamientos evaluados en la prueba de antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *L. gongylophorus*

Tratamiento	Repeticiones	Biocontrolador	Cepa del controlador
T0	3	-----	-----
T1	5	<i>Trichoderma</i> spp	Th 1
T2	6	<i>Trichoderma</i> spp	Th 27
T3	7	<i>Trichoderma</i> spp	Th 30

*Fuente:* Esta investigación

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento radial de *Leucoagaricus gongylophorus*.

#### Día 8

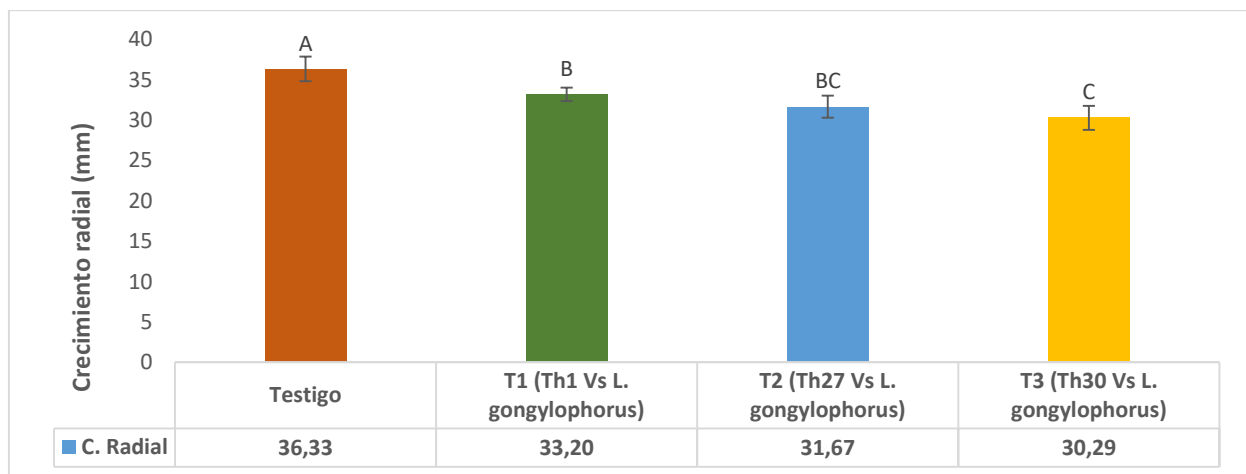
Con respecto a en la variable de crecimiento radial de *L. gongylophorus* al día ocho, se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 3) para los tratamientos de estudio (Figura 3). Los tratamientos T1, T2 y T3 con crecimiento radial de 33,2 mm, 31,67 mm y 30,29 mm respectivamente son diferentes estadísticamente al T0 con un crecimiento radial de 36,33 mm.

**Tabla 3.** Análisis de varianza para la variable crecimiento radial de *L. gongylophorus* al día 8 después de la siembra (mm)

	GL	SC	CM	FC	p-valor
<b>Tratamientos</b>	3	83,58	27,86	15,67**	,000
<b>Error</b>	17	30,23	1,78		
<b>Total</b>	20	113,81			

\*\* : Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )

El crecimiento de *L. gongylophorus* fue inhibido en una etapa temprana del enfrentamiento, donde al día ocho ya se encuentra que en los tratamientos T1, T2 y T3 las cepas de *Trichoderma* spp. ejercieron un control en el crecimiento del hongo simbionte, esto coincide con los resultados de Nascimento *et al.* (2017) en donde determinó la capacidad antagonista de siete cepas de *Trichoderma* spp. frente a *L. gongylophorus* y encontró que todos los aislados del biocontrolador inhibieron totalmente el crecimiento del micelio del hongo simbionte luego del contacto de ambos cuerpos fungosos.



**Figura 3.** Crecimiento radial de *L. gongylophorus* en el día ocho después de la siembra para los tratamientos de estudio. Tratamientos con igual letra no difieren entre sí. (Tukey  $p < 0,05$ )

### Día 17

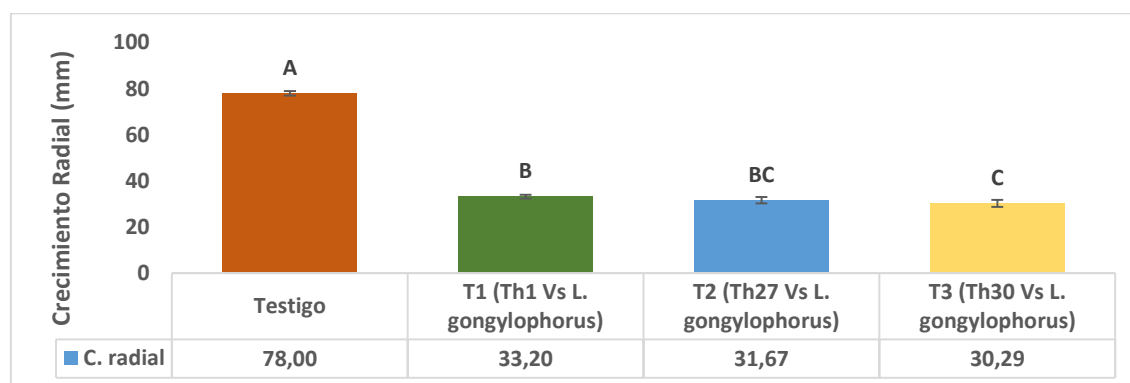
El crecimiento radial de *L. gongylophorus* al día 17 mantuvo diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 4). Los tratamientos T1, T2 y T3 con crecimiento

radial de 33,2 mm, 31,67 mm y 30,29 mm respectivamente difieren estadísticamente al T0 con un crecimiento radial de 78 mm (Figura 4).

**Tabla 4.** Análisis de varianza para la variable crecimiento radial de *L. gongylophorus* al día 17 después de la siembra (mm)

	GL	SC	CM	FC	p-valor
<b>Tratamientos</b>	3	5571,68	1857,23	1145,52**	,000
<b>Error</b>	17	27,56	1,62		
<b>Total</b>	20	5599,24			

\*\* : Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )



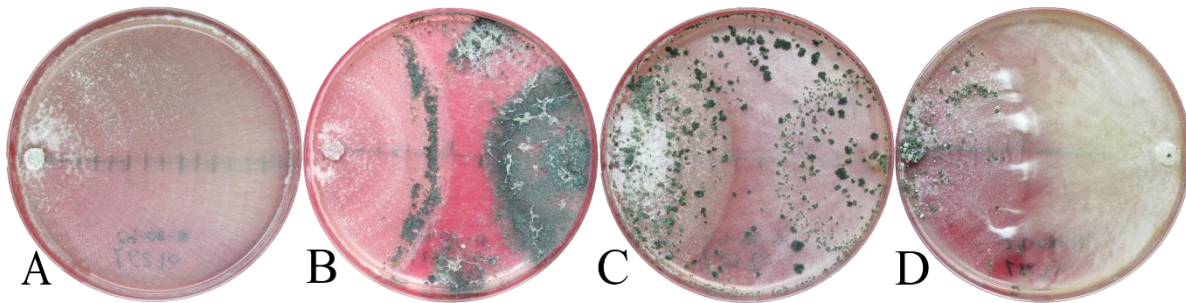
**Figura 4.** Crecimiento radial de *L. gongylophorus* en el día 17 después de la siembra. Tratamientos con igual letra no difieren entre sí (Tukey  $p < 0,05$ )

Este comportamiento se debe principalmente a la competencia que ejerce *Trichoderma* spp. frente a *L. gongylophorus*, ya que como enuncia Hernández *et al.*, (2015) la competencia ocurre antes de que los micelios entren en contacto, ya que *Trichoderma* spp. inicia la formación de una barrera que al consolidarse, impide el crecimiento del fitopatógeno.

A nivel macroscópico se encontró que las cepas Th1, Th27 y Th30 ejercieron un control en el crecimiento de *L. gongylophorus* (Figura 5). Aquí cobra relevancia la capacidad antibiótica que presenta *Trichoderma* spp. la cual fue demostrada por Howell y Stipanovic (1983) quienes describieron un nuevo antibiótico presente en *T. virens* llamado glovirin,

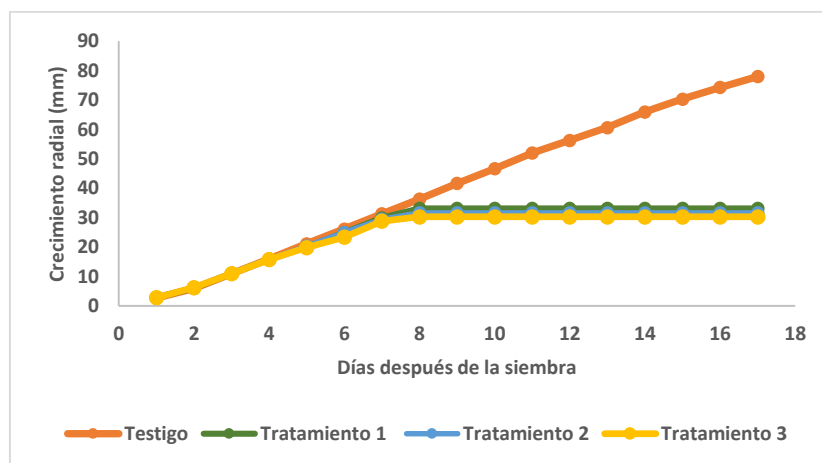


que inhibió el crecimiento de oomicetes como *Pythium ultimum* y *Phytophthora* spp. y también de las bacterias *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas fluorescens*.



**Figura 5.** Prueba de antagonismo de *Trichoderma* spp. (Derecha) frente a *L. gongylophorus* (Izquierda) al día 17. A: Testigo. B: Tratamiento 1 (Th1). C: Tratamiento 2: (Th27). D: Tratamiento 3 (Th30)

El efecto causado por las cepas de *Trichoderma* spp. también se puede apreciar la Figura 6 que representa el crecimiento radial diario de *L. gongylophorus* en los tratamientos de estudio. Se encontró que desde el día ocho, se detuvo totalmente el crecimiento del hongo simbiote en los tratamientos que contienen el enfrentamiento con alguna cepa de *Trichoderma* spp. Por lo tanto en una posible prueba directa en campo, *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de limitar el crecimiento del cultivo del hongo simbiote de la hormiga, dado que el efecto causado por *Trichoderma* spp. como agente antagónico puede ser causa a diferentes mecanismos de acción, competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, entre otros (Infante *et al.*, 2009) además la capacidad de *Trichoderma* spp. es capaz de producir compuestos activos biológicos a consecuencia de su metabolismo secundario, lo cual incluye antibióticos, moléculas de regulación de crecimiento en las plantas, compuestos tóxicos, mutágenos, inmunosupresores, y moléculas con otros efectos biológicos (Gómez *et al.*, 2018).



**Figura 6.** Crecimiento radial diario de *L. gongylophorus* (mm) para los tratamientos T0 (*L. gongylophorus*), T1 (*L. gongylophorus* vs cepa Th1), T2 (*L. gongylophorus* vs cepa Th27), T3 (*L. gongylophorus* vs cepa Th30)

### Crecimiento radial de las tres cepas nativas de *Trichoderma* spp.

#### Día 8

Con respecto al crecimiento radial de *Trichoderma* spp. al día ocho de la siembra de *L. gongylophorus* (que corresponde al día tres de siembra de las cepas de *Trichoderma* spp.), existen diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 5). El tratamiento T3 (Th30) obtuvo el mayor crecimiento radial con 48,29 mm frente a los demás tratamientos, mientras que los tratamientos T1 (Th1) y T2 (Th27) no son estadísticamente diferentes con promedios de 41,4 mm y 40,5 mm respectivamente (Figura 7).

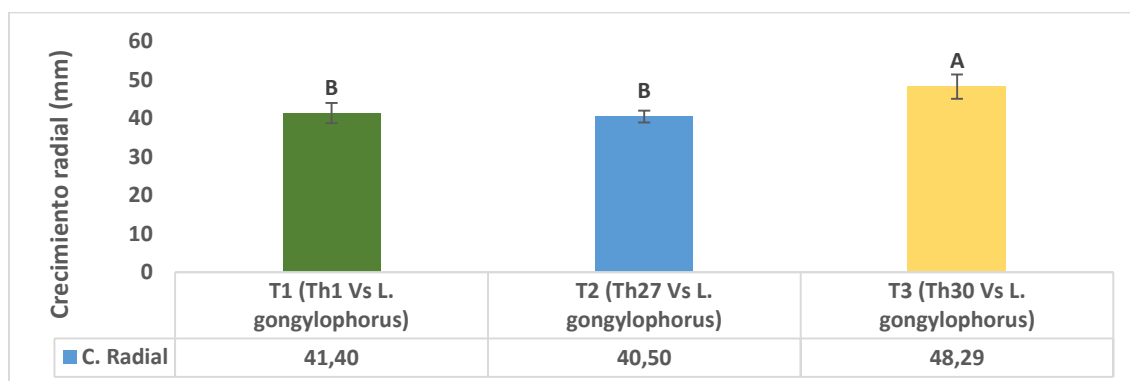
**Tabla 5.** Análisis de varianza para la variable crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma* spp al día 8 después de la siembra (mm)

	GL	SC	CM	FC	p-valor
<b>Tratamientos</b>	2	1,31	,66	18,08**	,000
<b>Error</b>	15	,55	,04		
<b>Total</b>	17	1,86			

\*\* : Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )

La superioridad en el crecimiento radial de la cepa Th30 de *Trichoderma* spp. puede deberse a factores propios de su genética, dado que Muthumeenakshi *et al.*, (1994) encontró

una alta variabilidad intraespecífica el género *Trichoderma* en cuanto a sus características moleculares, y además Hoyos *et al.* (2012) menciona la existencia de una variación genética dentro de dicho género que finalmente puede manifestarse en distinciones morfológicas como velocidad de crecimiento, habilidad de asimilar diferentes tipos de sustratos, y la producción de un amplio rango de sustancias con propiedades antibióticas.



**Figura 7.** Crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma* spp. al día 8 después de la siembra. Tratamientos con igual letra no difieren entre sí (Tukey  $p < 0,05$ )

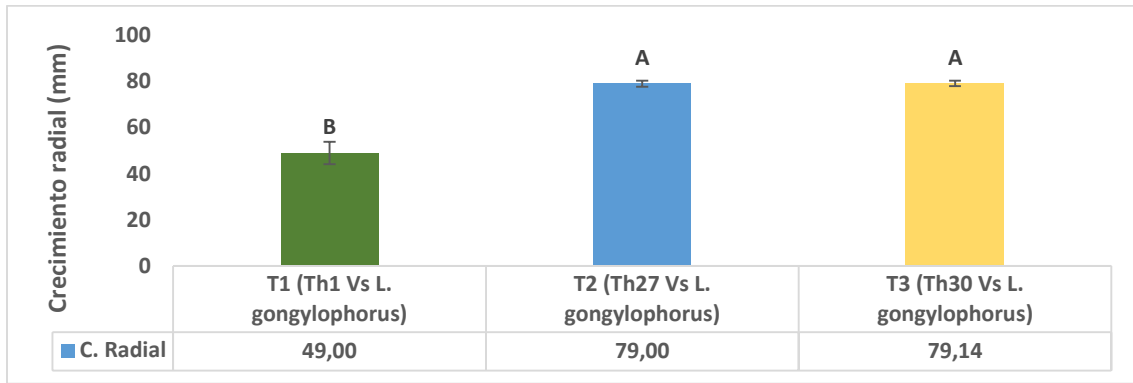
### Día 17

El crecimiento radial de *Trichoderma* spp. al día 17 de la siembra de *L. gongylophorus* (que corresponde al día 12 de siembra de las cepas de *Trichoderma* spp.), existen diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 6). Se obtuvo que, los tratamientos T3 (Th30) y T2 (Th27) no presentaron diferencias estadísticamente significativas con promedios de 79,14 mm y 79 mm respectivamente pero si difieren con el tratamiento T1 (Th1) el cual tiene el menor promedio de crecimiento con 49 mm. (Figura 8)

**Tabla 6.** Análisis de varianza para la variable crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma* spp. al día 17 después de la siembra (mm)

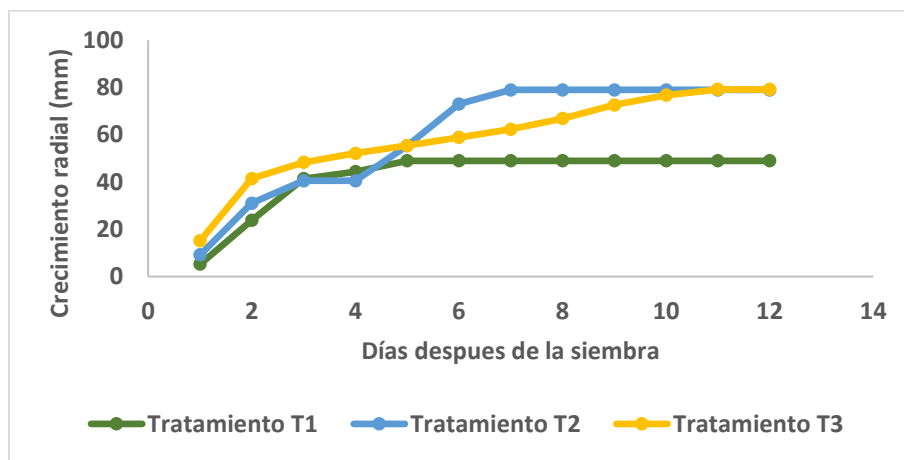
	GL	SC	CM	FC	p-valor
<b>Tratamientos</b>	2	3266,75	1633,38	221,01**	,000
<b>Error</b>	15	110,86	7,39		
<b>Total</b>	17	3377,61			

\*\* : Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )



**Figura 8.** Crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma* spp. al día 17 después de la siembra (mm). Tratamientos con igual letra no difieren entre sí (Tukey  $p < 0,05$ )

En la Figura 9 se tiene la curva de crecimiento diario de cada cepa de *Trichoderma* spp. en la cual se observa que el crecimiento de la cepa Th1 se detuvo. Las diferencias en comportamiento de *Trichoderma* spp. se debe a la existencia de una alta variabilidad genotípica intraespecífica en la especie, a pesar de estar potencialmente limitado a su capacidad de generar variación debido a su reproducción asexual. Dicha variación dentro de una población de la misma especie puede generarse debido a diferentes mecanismos de variabilidad genética como mutación, recombinación (sexual o asexual), flujo de genes en las poblaciones (Checa *et al.*, 2015)



**Figura 9.** Crecimiento radial diario de las tres cepas de *Trichoderma* spp. (mm) para los tratamientos T1 (*L. gongylophorus* vs cepa Th1), T2 (*L. gongylophorus* vs cepa Th27), T3 (*L. gongylophorus* vs cepa Th30)

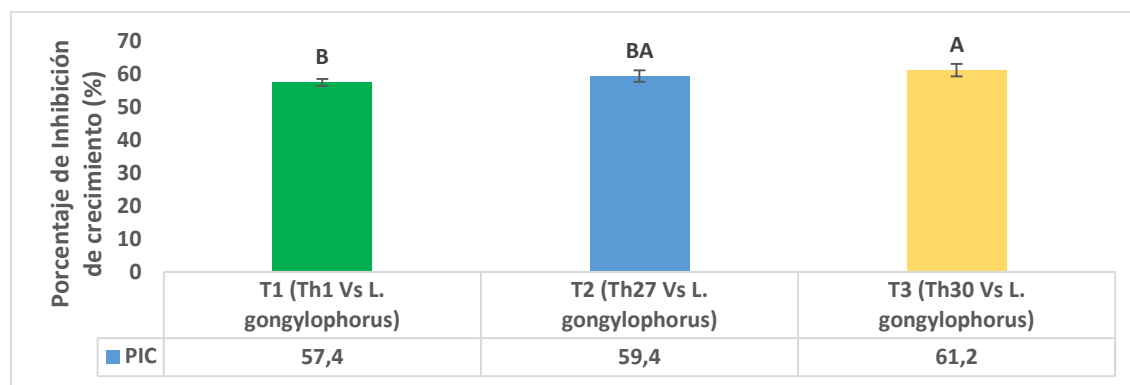
## Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Al evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento se obtuvieron diferencias altamente significativas (Tabla 7). Se encontró que el tratamiento T2 (Th27) con PICR de 59,4% no difiere estadísticamente con el tratamiento T1 (Th1) y T3 (Th30) con un PICR de 57,4% y 61,2% respectivamente, sin embargo los tratamientos T1 y T3 tienen diferencias estadísticas (Figura 10).

**Tabla 7.** Análisis de varianza para la variable de porcentaje de inhibición de crecimiento de las tres cepas de *Trichoderma* spp. al día 17 después de la siembra.

	GL	SC	CM	FC	p-valor
<b>Tratamientos</b>	2	40,81	20,41	7,26 **	,006
<b>Error</b>	15	42,14	2,81		
<b>Total</b>	17	82,96			

\*\* : Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )



**Figura 10.** Porcentaje de inhibición de crecimiento radial para los tratamientos de estudio. Tratamientos con igual letra no difieren entre sí (Tukey  $p < 0,05$ )

La superioridad de PICR de la cepa Th30 de *Trichoderma* spp. sobre *L. gongylophorus* con respecto a la cepa Th1, además de su mayor crecimiento radial al día tres luego de sus siembra con respecto a las demás cepas, indica que posee una mayor competencia por espacio y por ello presenta un mayor PICR. Esta relación entre velocidad de crecimiento con el PICR, fue descrita también en un estudio similar realizado por Duarte *et al.*, (2018)

quien obtuvo que en una prueba de antagonismo de *T. asperellum* contra *Fusarium* spp. las cepas del antagonista que tenían una mayor velocidad de crecimiento radial manifestaban mayores porcentajes de inhibición de crecimiento del patógeno.

Sin embargo, aunque hayan diferencias en el PICR de las cepas de *Trichoderma* spp, todas manifestaron un control sobre el crecimiento del hongo simbionte. Castrillo *et al.* (2016) reportó resultados similares en su prueba de antagonismo de *T. koningiopsis* frente a tres aislados de *L. gongylophorus* en donde obtuvo que el biocontrolador ejerció un PICR entre 58 y 69% frente al hongo simbionte 72 horas después de la siembra del antagonista y además, todos los aislados de *L. gongylophorus* detuvieron totalmente su crecimiento cuando hubo contacto físico entre los dos cuerpos fungosos. De igual manera, Silva *et al.* (2006) hizo ensayos de antagonismo de *T. harzianum*, *Escovopsis weberi* CBS 810.71 y *E. weberi* A088 obteniendo un porcentaje de inhibición de 75, 68 y 67% respectivamente. Por lo tanto se infiere que efectivamente las tres cepas de *Trichoderma* spp. son capaces de inhibir el crecimiento de *L. gongylophorus*.

### Porcentaje de aceleración de crecimiento

Para esta variable se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) (Tabla 8). Los tratamientos T3 (Th30) y T2 (Th27) no mostraron diferencias estadísticas entre sí con promedios de 1,06% y 0,93% respectivamente, y además son superiores al tratamiento T1 (Th1) que tiene un promedio de -61,2% (Tabla 9).

**Tabla 8.** Análisis de varianza para la variable de porcentaje de aceleración de crecimiento de las tres cepas de *Trichoderma* spp. al día 17 después de la siembra (mm)

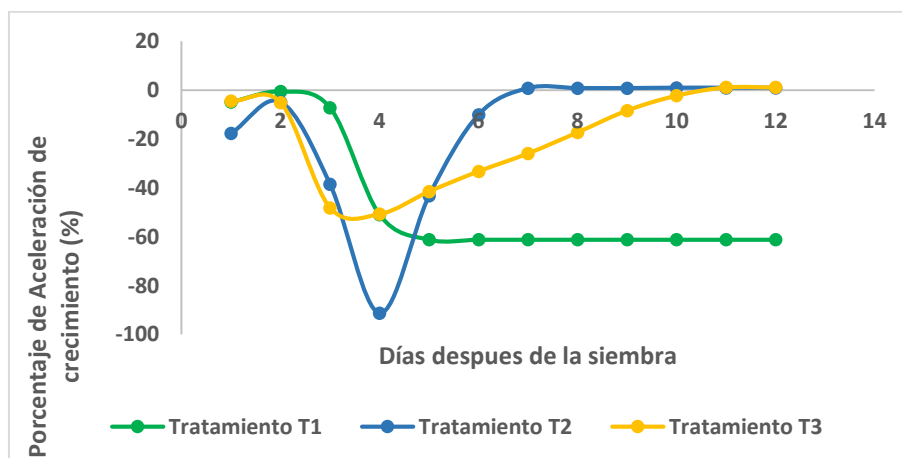
	GL	SC	CM	FC	p-valor
<b>Tratamientos</b>	2	13993,06	6996,53	83,35 **	,006
<b>Error</b>	15	1259,07	83,94		
<b>Total</b>	17	15252,13			

\*\* : Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )

**Tabla 9.** Porcentaje de aceleración de crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma* spp. Tratamientos con igual letra no difieren entre sí (Tukey  $p < 0,05$ )

Tratamientos	Subconjunto (Tukey p>0,05)	
	A	B
T1 (Th1 Vs <i>L. gongylophorus</i> )	-61,2488	
T2 (Th27 Vs <i>L. gongylophorus</i> )		,9280
T3 (Th30 Vs <i>L. gongylophorus</i> )		1,0628

En la Figura 12 se observa la curva de variación de la aceleración de crecimiento de las tres cepas de *Trichoderma* spp. en el enfrentamiento con *L. gongylophorus*. Cabe mencionar que las tres cepas hicieron contacto con el hongo simbiote al tercer día de su siembra (Día 8 de la siembra de *L. gongylophorus*). Se observa una disminución en la aceleración de crecimiento en las tres cepas de *Trichoderma* spp. en el día en que hicieron contacto, a partir de ese momento la cepa Th1 continúa una disminución en su aceleración y esta se mantiene en valores negativos hasta la finalización del enfrentamiento, es decir que posterior a su encuentro con *L. gongylophorus*, la cepa Th 1 desacelera su crecimiento hasta detenerse totalmente. Lo contrario ocurre con la cepa Th27 en la que luego de sufrir una fuerte disminución en su aceleración de crecimiento, esta muestra una rápida aceleración entre los días 4 y 6 para luego mantenerse estable hasta el final de la evaluación. Por otro lado la cepa Th 30 aunque baja su aceleración de crecimiento al día 3, no es de tanta magnitud como las cepas Th1 y Th27 y posterior a esto, entre los días 4 y 11 mantiene una aceleración progresiva hasta llegar al otro extremo de la caja Petri (Figura 12).



**Figura 11.** Porcentaje de aceleración de crecimiento de las tres cepas de *Trichoderma* spp en los tratamientos T1 (*L. gongylophorus* vs cepa Th1), T2 (*L. gongylophorus* vs cepa Th27), T3 (*L. gongylophorus* vs cepa Th30)

Este suceso también fue reportado por Roca *et al.* (2017) en su prueba de antagonismo de cinco cepas de *Trichoderma* spp. frente a *L. gongylophorus* en donde afirma que el hongo simbionte manifiesta una reacción de defensa contra ciertas cepas del antagonista, sin embargo al día cinco del enfrentamiento, la mayoría de los aislados de *Trichoderma* spp. habían superado las defensas y cubrieron totalmente el área de *L. gongylophorus*. Además la variación el porcentaje de aceleración de crecimiento de cada una de las cepas puede variar de acuerdo a su adaptabilidad a las condiciones bióticas y abióticas específicas (Dennis y Webster, 1971)

El hecho de que las cepas Th27 y Th30 de *Trichoderma* spp. continúen su crecimiento luego del contacto con *L. gongylophorus* e incrementen su aceleración, corresponde a su capacidad de micoparasitismo, este proceso ha sido explicado por Chavez (2006) y Antunes, (2015) quienes coinciden en que este evento es complejo que involucra un estímulo químico que indica la dirección de crecimiento, el reconocimiento que se produce por interacciones del lectin-carbohidrato, la adhesión y enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* spp. y el patógeno mediante procesos enzimáticos y actividad lítica que ocurre por la producción extracelular de enzimas líticas principalmente quitinasas, gluconasas y proteasas, las cuales degradan las células del patógeno y ocurre la penetración de las hifas del antagonista. Este mecanismo de antagonismo ha sido evaluado sobre otros hongos, Ojha y Chatterjee (2011) evaluaron el potencial micoparasítico de tres especies de *Trichoderma*, *T. harziaum*, *T. viride* y *T. hamatum*, y obtuvieron que todas las especies de *Trichoderma* eran capaces de producir enzimas líticas B-1,3 glucanasa y quitinasa eficientemente, causando lisis en el micelio del patógeno debido al sobrecrecimiento y penetración del biocontrolador a través de las hifas del patógeno. Howell (2003) también ha evidenciado este proceso de micoparasitismo frente a varias especies del género *Fusarium*, *Sclerotium rolsfii*, entre otros.



## Competencia por sustrato

Las cepas de *Trichoderma* spp. fueron clasificadas siguiendo el método descrito por Bell *et al.*, (1982) de acuerdo a su nivel de competencia por sustrato y antagonismo. Esta escala ha sido ampliamente utilizada en varias investigaciones sobre el antagonismo de *Trichoderma* spp frente a diversos patógenos. (Martínez *et al.*, 2008, Correa *et al.*, 2007, Juniors *et al.*, 2013, ) La clase 1 es cuando *Trichoderma* spp. sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, en esta clasificación se ubica las cepas Th27 y Th30 de los tratamientos T2 y T3 respectivamente, las cuales alcanzaron a cubrir la totalidad del medio, la clase 2 corresponde a la cepa de *Trichoderma* spp. que sobrecrece al menos 2/3 partes de la superficie del medio, en este caso ninguna cepa se ubica en esta clasificación, en la clase 3 tanto *Trichoderma* spp. y *L. gongylophorus* colonizan aproximadamente la mitad de la superficie (mayor a 1/3 y menor a 2/3), en esta clasificación se ubica la cepa Th1 del tratamiento T1, el cual alcanzó un porcentaje promedio de 57,6% (Tabla 10).

**Tabla 10.** Clasificación de las cepas de *Trichoderma* spp. según la escala propuesta por Bell *et al.* (1982).

Tratamiento	Cepa del controlador	Promedio de porcentaje de cubrimiento (%)	Clase
T1	Th1	57,6	III
T2	Th27	100	I
T3	Th30	100	I

Bell *et al.* (1982) considera que una cepa de *Trichoderma* spp. para ser considerada como antagonista debe tener estar en una clasificación  $\leq 2$ , pero no se considera altamente antagonista si la clasificación es  $\geq 3$ . Por lo tanto las cepas Th27 y Th30 si pueden ser consideradas como cepas altamente antagonistas de *L. gongylophorus*, mientras que la cepa Th1 no tiene el mismo potencial como biocontrolador del hongo simbiote.

El uso de estas cepas podría ser efectivo en el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes* L.) ya que como menciona Della *et al.* (2014) la contaminación por hongos micoparásitos en los cultivos del hongo simbiote de la hormiga, es una alternativa interesante como control biológico, en especial en pequeñas colonias del insecto, reduciendo el uso de pesticidas. Lo cual también es apoyado por López y Orduz (2004) quienes probaron los hongos *Metarhizium anisopliae* cepa M-137, *T. viridae* cepa T-26 y una combinación entre los dos en forma de cebos, comparando su efectividad de control con el producto químico Pirimifos Metil aplicado con insufladora encontrando que, la movilización de los cebos al interior de los nidos no tuvo diferencias entre los cebos que se les había inoculado *Trichoderma* spp con los que no se les había aplicado nada y además la mortalidad en los nidos tratados con cebos inoculados con hongos biocontroladores estuvieron por encima del 80%, mientras que el tratamiento con Pirimifos Metil solamente alcanzó la muerte del 60% de los hormigueros.

### **CONCLUSIONES**

Todas las cepas de *Trichoderma* spp. ejercieron un control total en el crecimiento de *L. gongylophorus*, dado que desde el día en que los dos hongos entraron en contacto, el hongo simbiote detuvo totalmente su crecimiento.

Las tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. manifestaron diferentes características en su enfrentamiento frente a *L. gongylophorus*. Las cepas Th27 y Th30 mostraron un micoparasitismo frente al hongo simbiote, llegando a cubrir totalmente el área de la caja Petri, mientras que la cepa Th1 mostró detener su crecimiento luego de haber entrado en contacto con *L. gongylophorus*.

Según la escala de Bell las cepas nativas Th30 y Th27 son altamente antagonistas frente a *L. gongylophorus* y se perfilan como posibles candidatos a ingredientes activos de bioplaguicidas para el control de hormiga arriera.

### **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar estudios donde evalúen las cepas Th27 y Th30 de *Trichoderma* spp en campo donde se determine el momento de aplicación, dosificación, compatibilidad con

agroquímicos y otros agentes biológicos para confirmar la eficacia de estas cepas bajo dichas condiciones en el biocontrol de la hormiga arriera.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, M. (2015). Contribución al estudio del sistema de lipasas de *Trichoderma harzianum*. Instituto hispano luso de investigaciones agrarias. Recuperado de [https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/128420/1/DMG\\_JorgeAntunesML\\_Microbiolog%C3%ADalipasas.pdf](https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/128420/1/DMG_JorgeAntunesML_Microbiolog%C3%ADalipasas.pdf)
- Aylward, F., Khadempour, L., Tremmel, D., McDonald, B. & Nicora, C. (2015). Enrichment and Broad Representation of Plant Biomass-Degrading Enzymes in the Specialized Hyphal Swellings of *Leucoagaricus gongylophorus*, the Fungal Symbiont of Leaf-Cutter Ants. *Plos one*. 10(8) doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134752>
- Bich, G., Castrillo, M., Villalba, L., Zapata P. (2017). Isolation of the symbiotic fungus of *Acromyrmex pubescens* and phylogeny of *Leucoagaricus gongylophorus* from leaf-cutting ants. *Revista Biol Sci*. 24 (4). 851-856p. doi: [10.1016/j.sjbs.2016.05.010]
- Castrillo, M., Bich, G., Zapata, P., Villalba, L. (2016). Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. *Mycosphere* 7(6), 810–819. doi: 10.5943/mycosphere/7/6/12
- Chavez, M. (2006). Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C, Colombia. Recuperado de: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
- Checa, O., Descanse, J., Toro M., Alvarez, S., Salazar, C. (2015). Caracterización molecular de *Trichoderma* spp. en arveja *Pisum sativum* L. *Rev.Cienc.Agr.*32(2):3-12. doi: <https://doi.org/10.22267/rcia>
- Correa, S., Mello, M., Ávila, Z., Minaré, L., Padúa, R., Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* sacc. *Fitosanidad* 11(1): 3-9. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116144001.pdf>

- Della, L., Gandra, L., Guedes, R. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest. Manag. Sci.* 70 (1): 14-23 Recuperado de: doi: 10.1002/ps.3660.
- Dennis, C & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *ScienceDirect* 57 (1). Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5)
- Duarte, Y., Pozo, L., Martinez B. (2018). Antagonismo in vitro de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente aislados de *Fusarium* spp. *Rev. Protección Veg.* 33 (1)
- Greenpalm. (2016). Where is palm oil grown?. Recuperado de <https://greenpalm.org/about-palm-oil/where-is-palm-oil-grown-2>.
- Gómez R., Uresti E., Patrón, E., Islas, O., Flores, M., Riego, A., Saavedra, L., Casas, M. (2018). Histone acetyltransferase TGF-1 regulates *Trichoderma atroviride* secondary metabolism and mycoparasitism. *Plos One.* 13(4). doi: 10.1371/journal.pone.0193872
- Hernández, J., Sánchez, M., Gonzalez, J., Quiroz, J., García, J., Gill, H. (2015). Antibiosis de cepas de *Trichoderma* spp nativas del noreste de México contra el hongo patógeno *Macrophomina phaseolina*. *Braz J Microbiol.* 46 (5): 1093-1101. doi: [ 10.1590 / S1517-838246420120177 ]
- Howell, C. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *ApsJournals.* 87 (1). 4-10. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Howell, C. & Stipanovic, R. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocadium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol* 29: 321-324 doi: <https://doi.org/10.1139/m83-053>
- Hoyos, L. & Bissett J. (2011). Biodiversity of *Trichoderma* in neotropics, the dynamical processes of biodiversity - case studies of evolution and spatial distribution. Tesis de PhD. Doi: 10.5772/23378

- Hoyos, L., Galvis, F., Rodriguez D. (2012). Aislamientos nativos y foráneos de *Trichoderma* para el control de Rizoctoniasis en papa criolla. *Rev. Cienc. Agr.* 29(1): 5-15. Recuperado de: <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/364>
- Furumo, P., Aide M. (2017). Characterizing commercial oil palm expansion in Latin America: land use change and trade. Recuperado de: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/aa5892>
- García, M. (2006). Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8312>
- Infante, D., Marinez, B., Gonzalez, N., Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección vegetal.* 24(1): 14:21 Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002)
- Juniors, E., Torres, P., Milanés, P., Bernal, A., Leiva, M., García, G., Lobato, L., Cañar, L., Sierra, Y., Mena, O. (2013). Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagüeyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. *Centro Agrícola.* 40 (3): 29-36. Recuperado de: <http://132.248.9.34/hevila/Centroagricola/2013/vol40/no3/5.pdf>
- Kooij, P., Rogawska, A., Hoffmann, D., Boomsma, J., Schiott, M. (2014). *Leucoagaricus gongylophorus* uses leaf-cutting antes to vector proteolytic enzymes towards new plant substrate. *The ISME Journal.* doi: 10.1038/ismej.2013.231
- López, E., Orduz, S. (2004). *Metharizium anisoplae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico. *Rev. Colomb. de Biotec.* 4: 71-78. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30093>
- Lugo, M., Crespo, E., Cafaro, M., Jofré, L. (2013). Hongos asociados con dos poblaciones de *Acromyrmex lobicornis* (Formicidae) de San Luis, Argentina. *Bol Soc Argent*

*Bot.* 48 (1): 5-15. Recuperado de:  
<http://www.scielo.org.ar/pdf/bsab/v48n1/v48n1a01.pdf>

Martinez, J. (2015). Integración de prácticas culturales y control biológico para el manejo de *Monilophthora roreri* CIF & PAR. *Rev. Cienc. Agr.* 32(2): 13-25.  
<https://doi.org/10.22267/rcia.153202.9>

Martinez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H., Cruz, A. (2008). Selección de aislados de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. En arroz. *Revista Protección vegetal*. Vol. 23 (2): 118-125  
Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v23n2/rpv09208.pdf>

Ministerio De Comercio Exterior E Inversiones. (2017). Informe sobre el sector palmicultor ecuatoriano. Quito, Ecuador. Recuperado de  
<https://www.comercioexterior.gob.ec/wp-content/uploads/2017/09/informe-palma-esp%C3%B1ol-.pdf>

Miyashira, C., Tanigushi, D., Gugliotta, A., Santos, D. (2010). Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. *Journal of Microbiology*, 41(2): 206-511. doi: 10.1590/S1517-838220100002000035

Muñoz, J. (2014). Detección y manejo de plagas en la producción de palma africana (*Elaeis guineensis*, Jacq.), Sayaxché, Petén. Recuperado de  
<http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2014/06/17/Munoz-Jorge.pdf> Consultado el 29 de octubre 2018

Muthumeenakshi, S., Mills, P., Brown A., Seaby D. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*. 140. 769-777 . doi:10.1099/00221287-140-4-769

Nascimento, M., Sarmiento, R., Rodrigues, G., Oliveira, C., Souza, D. (2017). Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Journal of Basic Microbiology*. 57 (8). 699-704. doi: 10.1002/jobm.201600755.

- Ojha, S., Chatterjee, N. (2011). Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. in biocontrol of fusarial wilt of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44 (8). <https://doi.org/10.1080/03235400903187444>
- Roca, S., Evans, H., George, V., Cardoso, L., Pereira, F., Rocha, F., Barreto, R., Hart, A., Elliot, S. (2017). Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. *The royal society open science* 4(4). doi: 10.1098/rsos.160628.
- Sanchez, M. (2009). Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. Nativos del norte de Tamaulipas. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología genómica. Instituto politécnico nacional. Recuperado de: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/8464>
- Sigma-Aldrich. (2013). Product Information: R1273 Rose Bengal Agar Base.San Luis, Estados Unidos. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/r1273dat.pdf>.
- Silva, A., Rodrigues, A., Bacci, M., Pagnocca, F., Bueno, O. (2006). Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. *Micopathology* 162 (2). 115-119. doi:10.1007/s11046-006-0037-6
- Wuczkowski, M., Druzhinina, I., Gherbawy, Y., Klug, B., Prillinger, H., Kubiccek, C. (2002) .Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiol* 158: 125-133. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1290638>