

cuando las cajas se llenaron con el hongo del jardín y las hormigas fueron retiradas; las tapas originales se cambiaron por otras a las que previamente se les habían hecho agujeros de 0.5 mm, para conservar las mismas condiciones que en el experimento anterior. Se pesaron las cajas con la tapa original cada 24 horas (5 repeticiones) y los datos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de rango con signo de Wilcoxon (Statsoft, 1992), el ensayo se realizó dos veces, durante 5 días.

Finalizado el experimento, al día 5, se evaluaron cada uno de los tratamientos macroscópica y microscópicamente, se determinó si los tratamientos presentaban contaminación o si se había presentado traslado del hongo para otra caja; para la evaluación microscópica se tomó una muestra del hongo y se sembró en PDA a un pH 4.5, y se incubó a 26 °C, en oscuridad, luego mediante observaciones al microscopio de luz se identificó el contaminante.

## 2.8 BIOENSAYOS EN HORMIGUEROS DE *Atta cephalotes* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Se evaluó la concentración más alta de *T. lignorum* (T-26)  $10^8$  conidias por mililitro en 4 de los hormigueros establecidos en el laboratorio; dos hormigueros fueron dejados como control, para un total de seis hormigueros. Inicialmente se midió el área de los jardines de los hormigueros y de acuerdo con el área se calculó la cantidad de inóculo que se utilizaría, teniendo en cuenta que para un área de 4 cm<sup>2</sup> se utilizó 1 ml de inóculo de T-26 en los tratamientos del ensayo anterior. Se registró la

actividad de los hormigueros, y se midió el área cada 24 horas.

Para la preparación del inóculo, se utilizaron cultivos de 8 días de *T. lignorum* (T-26), como fue descrito en el experimento anterior, (tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos utilizados en los hormigueros de laboratorio.

Hormiguero N°	Tiempo de establecido (meses)	Cantidad de inóculo adicionado <i>T. lignorum</i> (T-26) $10^8$ conidias/ ml. * *
1	31	30.87 ml
10	29	8.25 ml
21	4	3.12 ml
22	4	5.12 ml
5*	29	-----
23*	4	-----

\* Controles, sin ningún tratamiento.

\*\* Microcultivos, se utilizaron 4 cm<sup>2</sup> de área/1 ml de inóculo, se calculó el área de cada hormiguero.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS COLONIAS DE *Atta cephalotes*.

Durante el trabajo se capturaron 26 hormigueros, sobreviven en el laboratorio seis colonias. La alta mortalidad de los hormigueros posiblemente se debe a problemas derivados del transporte del campo al laboratorio. Uno de los problemas que se presentó con mayor frecuencia fue la captura y transporte de las reinas con mucho material, especialmente tierra y posiblemente las reinas durante el viaje estaban constantemente enterradas como mecanismo de defensa llegando bastante débiles; también se presentó que los hormigueros en muchas ocasiones no pudieron ser transportados de forma inmediata al laboratorio y esto influyó en que las reinas estuvieran muy estresadas y débiles.

Adicionalmente se presentó contaminación con ácaros especialmente de la familia Acaridae reportado por Weber (1972), el cual causó la muerte en uno de los hormigueros.

Dos de los hormigueros fueron utilizados para realizar los aislamientos del hongo, sin embargo en uno de ellos se presentó una contaminación, por lo tanto, se procedió a pasar a la reina a una cámara diferente con algunas

obreras y tomar muestras del hongo para identificar la posible causa de la contaminación.

### 3.2 AISLAMIENTO DEL HONGO DEL JARDÍN DE LA HORMIGA *Atta cephalotes*.

Se realizaron 438 aislamientos durante los meses Marzo a Octubre de 1996, los hongos fueron revisados semanalmente para detectar contaminantes y subcultivar aquellos que no presentaran contaminación muy severa, el tipo de contaminación mas frecuente fue debida a los hongos, 37.44 %, en segundo lugar las bacterias, 24.20 % y contaminación mixta por hongos y bacterias 9.13 %; no se incluyó el tipo de contaminación en las cepas subcultivadas. Se obtuvieron 102 aislamientos puros (figura 2) con los que se trabajaron las pruebas de antagonismo y micoparasitismo. En la figura 3, se observan las estructuras características de los hongos cultivados por las hormigas como son las gongylidias y los estafilos de acuerdo con lo reportado por Fisher y col., (1996); Weber, (1972).

Debido a la frecuente presencia de contaminantes, se decidió identificar los hongos y las bacterias responsables de esta contaminación. Se encontró que la principal causa de contaminación por parte de los hongos fue debida a *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Escovopsis weberi* tal como lo reporta Seifert y col., (1995); la bacteria más frecuentemente aislada fue *Xantomonas maltophilia*, bacilo Gram negativo, la cual se encuentra comúnmente asociada a las plantas, semillas e insectos. Se presume que esta bacteria proviene del material vegetal suministrado a las hormigas.

Otras bacterias aisladas e identificadas fueron obtenidas de los aislamientos de una de las cámaras contaminadas de los hormigueros que estaban siendo utilizados para aislar los hongos. Las bacterias fueron identificadas en la CIB, grupo de Bacteriología, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinobacter baumannii*, *Cryseomonas luteola*, *Alcaligenes xyloxidans* y *Burkholderia cepacia*; los hongos contaminantes igualmente fueron aislados (28 morfotipos), pero aún no se han identificado. Dos reinas llegaron infectadas con un hongo entomopatógeno identificado como *Metarhizium* sp.



Figura 2. Cultivo puro del hongo *Attamyces* sp. Crecido en medio agar dextrosa papa (PDA), pH 4.5, durante 12 semanas.

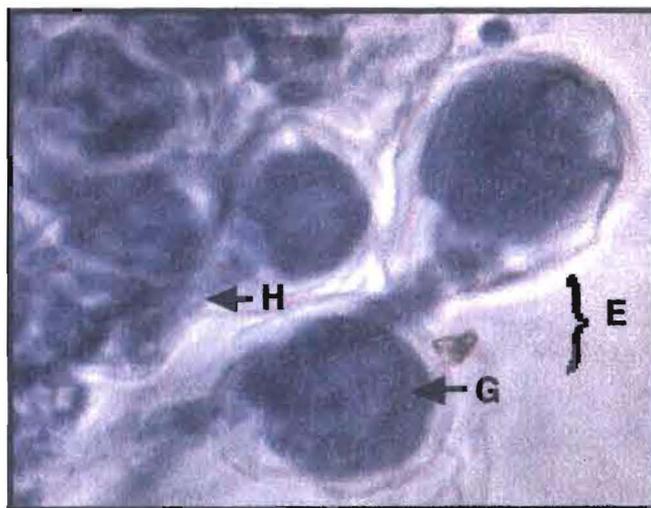


Figura 3. Hongo simbiote cultivado por *Atta cephalotes*. *Attamyces* sp. H, hifas, G, gongylidia, E, estafilos. (100 X).

### 3.3 CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., Y *Attamyces* sp.

En las dos temperaturas estudiadas; la cepa T-28 de *Trichoderma* presentó diferencias estadísticas significativas en su tasa de crecimiento. A los 26 °C la tasa de crecimiento fue menor (2.70 cm), comparada con los demás antagonistas; de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P \leq 0,01$ ) (Statsoft, 1992) la mayor diferencia en el promedio de crecimiento del radio del micelio la presentó con la cepa T-25 que exhibió un crecimiento promedio de 3.93 cm y la menor diferencia con la cepa T-110 con un promedio en la tasa de crecimiento de 3.34 cm (figura 4, tabla 6).

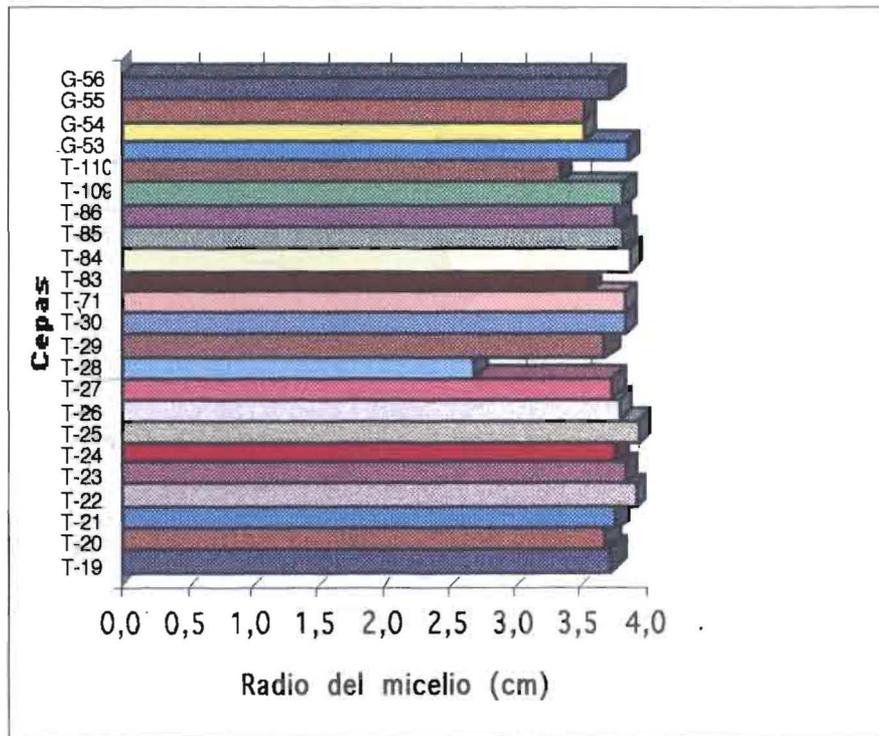


Figura 4. Tasa promedio de Crecimiento del radio del micelio de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. a los 26 °C, 8 días de sembrados en medio PDA, pH 4.5.

Mientras que la tasa de crecimiento a los 18 °C de la cepa T-28 de *Trichoderma* fue mayor (3.86 cm), en comparación con los otros aislamientos de *Trichoderma* y *Gliocladium*; de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P \leq 0,01$ ), la mayor diferencia en el promedio de crecimiento del micelio la presentó con la cepa T-110 de *Trichoderma* que presentó un crecimiento promedio de 2.27 cm y la menor diferencia con la cepa G-53 de *Gliocladium* con un promedio en la tasa de crecimiento de 2.79 cm (figura 5, tabla 6).

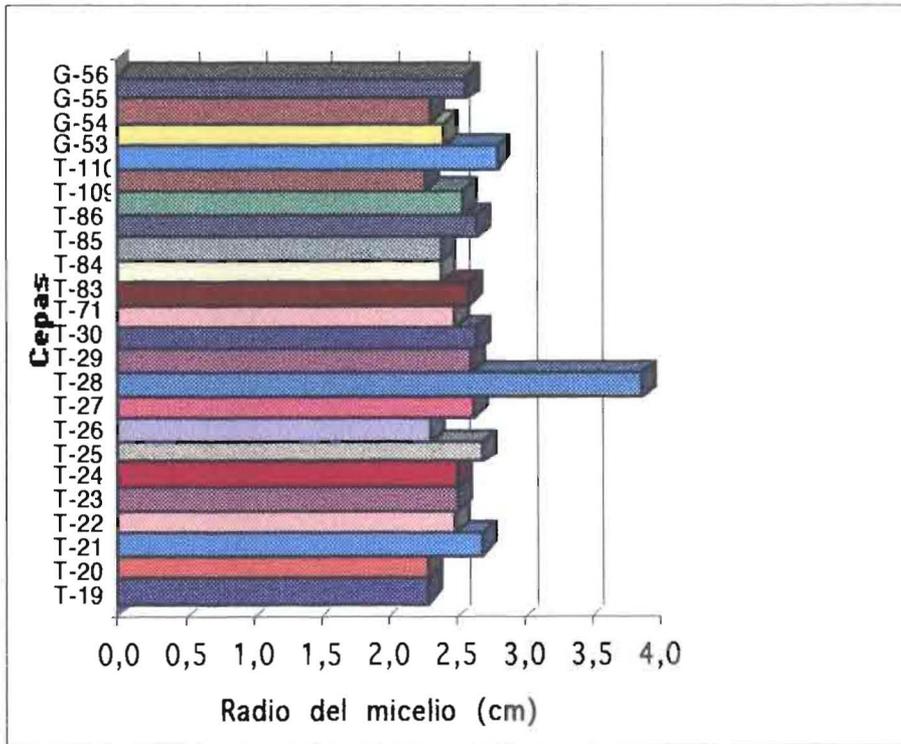


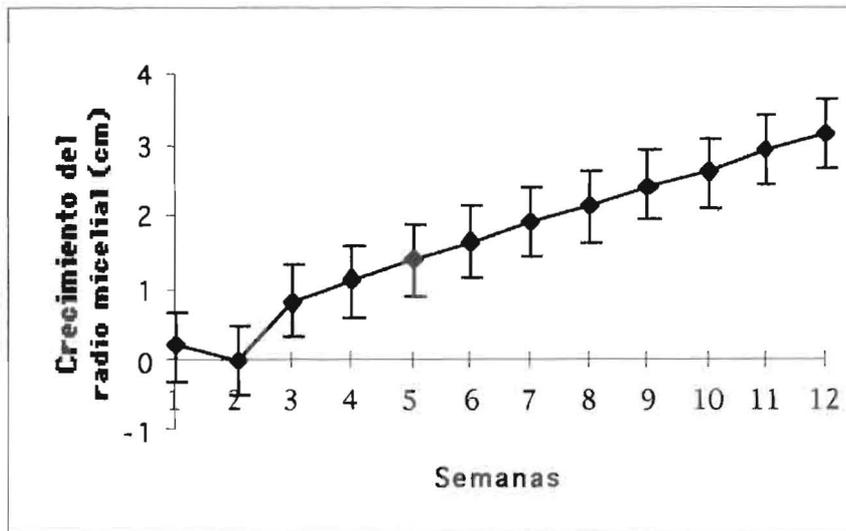
Figura 5. Tasa promedio de Crecimiento del radio del micelio de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. a los 18°C, 8 días de sembrados en medio PDA, pH 4.5.

Tabla 6. Tabla comparativa del promedio en la tasa de crecimiento del radio del micelio de los antagonistas *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. evaluados a dos temperaturas (26 °C y 18 °C).

Cepa	Medidas promedio del radio del micelio (cm)	
	Temperatura 26 °C	Temperatura 18 °C
T-19	3.73	2.28
T-20	3.69	2.29
T-21	3.76	2.67
T-22	3.90	2.48
T-23	3.81	2.51
T-24	3.76	2.50
T-25	3.93	2.68
T-26	3.78	2.30
T-27	3.74	2.62
T-28	2.70	3.86
T-29	3.69	2.60
T-30	3.82	2.63
T-71	3.82	2.48
T-83	3.57	2.58
T-84	3.86	2.38
T-85	3.80	2.38
T-86	3.76	2.64
T-109	3.80	2.54
T-110	3.34	2.27
G-53	3.84	2.79
G-54	3.52	2.39
G-55	3.52	2.29
G-56	3.72	2.55

Duncan ( $P \leq 0,01$ )

Para el hongo simbionte de la hormiga *A. cephalotes*, no se encontró ninguna diferencia significativa en su tasa de crecimiento cuando fue subcultivado varias veces comparado con las muestras que no presentaron ninguna contaminación; en general su crecimiento fue muy lento, con un promedio de 3 a 4 cm durante 12 semanas (figura 6), comparado con los antagonistas cuyo crecimiento fue rápido, alcanzando su máximo crecimiento entre el 3 y 4 día (4.5 cm).



Correlación 0.93,  $P < 0.000$

Figura 6. Curva de crecimiento del hongo simbiote *Attamyces* sp. Los datos corresponden a los promedios de las muestras que no presentaron ninguna contaminación, y a las muestras que fueron subcultivadas 1 y 2 veces.

Las observaciones realizadas de los diferentes aislamientos están resumidas en la tabla 7; el antagonista del que se obtuvo mayor número de conidias por mililitro fue T-71. También se observó presencia de pigmentos en el medio de cultivo en algunos aislamientos.

Tabla 7. Parámetros tomados de los antagonistas *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp.

Aislamientos	Conidias/ml	Producción de pigmento (Temperatura °C)	
		18	26
T-19	37,4 x 10 <sup>7</sup>	Si	No
T-20	12,3 x 10 <sup>7</sup>	No	No
T-21	49,6 x 10 <sup>7</sup>	Si	Si
T-22	31,96 x 10 <sup>7</sup>	Si	No
T-23	42,96 x 10 <sup>7</sup>	No	No
T-24	21,5 x 10 <sup>7</sup>	Si	No
T-25	29,3 x 10 <sup>7</sup>	No	No
T-26	27,24 x 10 <sup>7</sup>	Si	Si
T-27	12,32 x 10 <sup>7</sup>	Si	Si
T-28	9,7 x 10 <sup>7</sup>	No	No
T-29	22,04 x 10 <sup>7</sup>	Si	Si
T-30	25,56 x 10 <sup>7</sup>	Si	Si
T-71	3,2 x 10 <sup>8</sup>	No	No
T-83	30,3 x 10 <sup>7</sup>	No	No
T-84	48,34 x 10 <sup>7</sup>	Si	Si
T-85	29,56 x 10 <sup>7</sup>	Si	No
T-86	15,8 x 10 <sup>6</sup>	No	Si
T-109	16,84 x 10 <sup>6</sup>	Si	No
T-110	36,0 x 10 <sup>6</sup>	No	Si
G-53	24,6 x 10 <sup>6</sup>	Si	No
G-54	10,82 x 10 <sup>7</sup>	No	No
G-55	20,3 x 10 <sup>7</sup>	No	Si
G-56	13,04 x 10 <sup>7</sup>	No	No

### 3.4 EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LOS ANTAGONISTAS *Trichoderma* sp. Y *Gliocladium* sp. CONTRA EL HONGO *Attamyces* sp.

Los datos obtenidos muestran que los aislamientos de *Trichoderma* y *Gliocladium* producen diferentes grados de inhibición en el crecimiento de *Attamyces* sp. El aislamiento T-26 de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) (Statsoft, 1992), presentó diferencia estadística significativa con un mayor porcentaje de inhibición del radio micelial con respecto a los otros

antagonistas (figura 7).

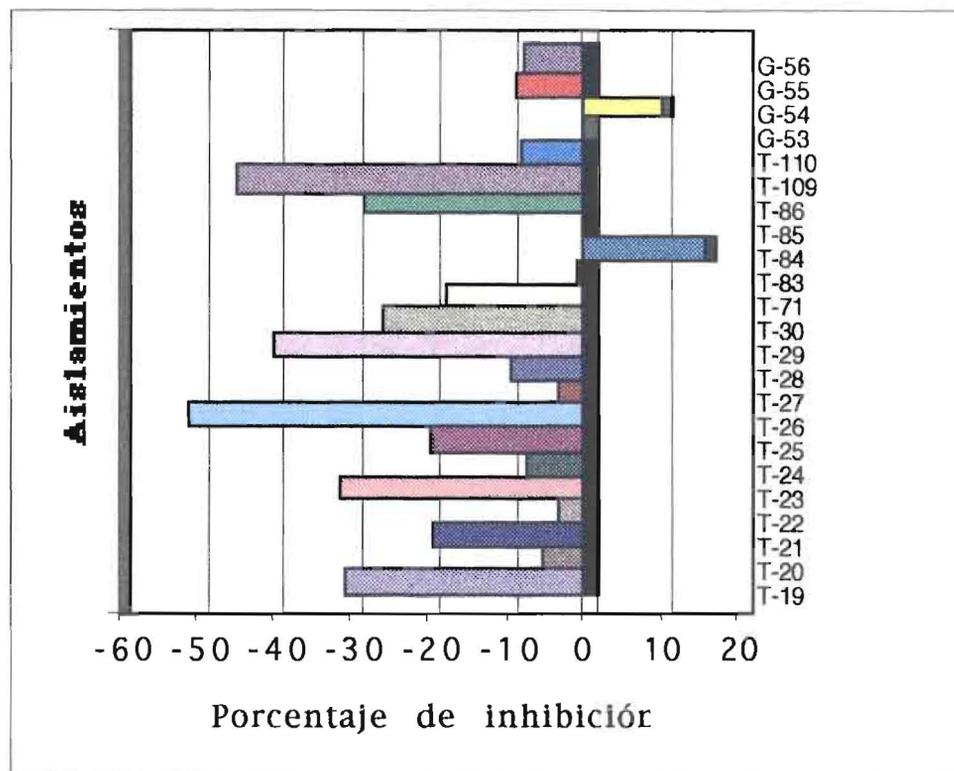


Figura 7. Efecto inhibitorio de los aislamientos de *Trichoderma* (T) y *Gliocladium* (G) sobre el crecimiento del hongo *Attamyces* sp. Los valores negativos indican el porcentaje de inhibición sobre *Attamyces* sp. mientras que los positivos muestran un estímulo en el crecimiento.

El crecimiento de *Attamyces* sp. fue inhibido en un rango entre 1.06 - 9.63 % por los aislamientos de *Gliocladium* (G-55, G-56) y *Trichoderma* (T-20, T-22, T-24, T-27, T-28, T-83, y T-110); los aislamientos de *Trichoderma* (T-21, T-25, T-30, T-71, T-86) inhibieron el hongo en un rango entre 18.12 - 28.35 %, los aislamientos de *Trichoderma* (T-19, T-23, T-29) afectaron la tasa de crecimiento en un rango de 30.95 - 39.89 %, la mayor inhibición del hongo fue obtenida por los aislamientos de *Trichoderma* T-26 en un 51.23 %, y T-109 en un 44.7 % mientras que los aislamientos de *Trichoderma* (T-85) y *Gliocladium* (G-53) no afectaron el crecimiento del hongo simbiote. También se pudo observar que dos aislamientos *Gliocladium* (G-54) y *Trichoderma* (T-84) fueron responsables de una estimulación en el

crecimiento de *Attamyces* sp. (figura 7).

En las evaluaciones de las pruebas de antagonismo, se pudo observar que los hongos antagonistas presentaron un rápido crecimiento, sin embargo el crecimiento a lo largo del radio próximo de la colonia del otro organismo (*Attamyces* o el antagonista), fue influenciado de dos maneras; cuando los cultivos mixtos correspondían a los controles (*Attamyces* : *Attamyces* o T-26 : T-26) el crecimiento del halo interno influenciado (H.I) fue restringido hasta que ambas colonias entraron en contacto, ninguna de las colonias invadió a la otra. Mientras que el crecimiento micelial no influenciado (H.E) presentó un comportamiento normal, figuras (8, 9).



Figura 8. Cultivo mixto del control de *Trichoderma lignorum* (T-26:T-26) (T). 8 días de cultivo. Se observa que el crecimiento micelial influenciado de T-26 (H.I) de ambas colonias entraron en contacto, pero no se observa ningún tipo de invasión y el crecimiento micelial libre de T-26 (H.E) se observa normal.

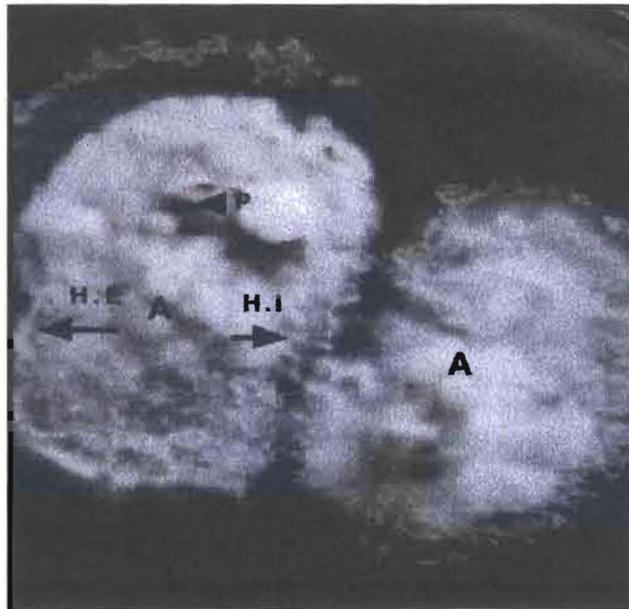


Figura 9. Cultivo mixto del control *Attamyces*: *Attamyces* (A). 4 meses de cultivo. Se observa que el crecimiento micelial influenciado de *Attamyces* sp. (H.I) de ambas colonias entraron en contacto, pero sin ningún tipo de invasión y crecimiento micelial libre de *Attamyces* sp.(H.E) se observa normal. Sobre las colonias se observan algunas zonas con pigmentos (P).

En los cultivos mixtos *Attamyces* : antagonistas el crecimiento micelial interno fue influenciado de diferentes maneras, en algunos casos se presentó colonización total por parte del antagonista hacia *Attamyces* sp. y contacto directo entre los dos micelios, como se observó entre G-55 y *Attamyces* sp. Mientras que con otros aislamientos la inhibición comenzó antes de que se observara contacto físico como fue el caso del aislamiento T-26 y *Attamyces* sp., en el cual se pudo observar la formación de un halo pigmentado alrededor del hongo *Attamyces* sp. figura 10(A), una colonización grado (2) del 50 al 60 % y reducción del crecimiento micelial influenciado de *Attamyces* sp. figura 10(B).



A B  
 Figura 10. Cultivos mixtos del hongo *Attamyces* sp. y *Trichoderma lignorum* (T- 26). A. cultivo mixto de *Attamyces* sp. (A) y *T. lignorum* (T-26) (T), 7 días de cultivo, el micelio influenciado de T-26 (H.I) esta rodeando el de la colonia de *Attamyces* sp. la flecha indica la formación de un halo alrededor de la colonia de *Attamyces* sp. B. cultivo de 8 días de siembra, el micelio interno de T- 26 (H.I) esta colonizando la colonia de *Attamyces* sp.

Los resultados cualitativos de los experimentos sobre el crecimiento micelial se resumen en la tabla 8, donde se muestra que el 56.52 % de los aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. colonizaron el 100 % de los cultivos de *Attamyces* sp. y esporularon sobre él, por lo tanto, fueron catalogados en el grado 4. El 39.13 % de los antagonistas invadieron la colonia de *Attamyces* sp. entre el 50-60 % grado 2 y esporularon normalmente sobre el hongo, solo un hongo T-85 no esporuló sobre el hongo cultivado por la hormiga (grado 3). En ninguna de las evaluaciones se observó colonización del hongo *Attamyces* sp. sobre alguno de los antagonistas.

Tabla 8. Evaluación de la capacidad competitiva *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* (T) y *Gliocladium* (G) con *Attamyces* sp.

Aislamientos <i>Trichoderma</i> <i>Gliocladium</i>	Grado de competencia				
	0	1	2	3	4
T-19			X		
T-20					X
T-21					X
T-22			X		
T-23					X
T-24			X		
T-25					X
T-26			X		
T-27			X		
T-28			X		
T-29			X		
T-30					X
T-71					X
T-83					X
T-84			X		
T-85				X	
T-86					X
T-109			X		
T-110					X
G-53					X
G-54					X
G-55					X
G-56					X

0, Ninguna invasión de la colonia del hongo *Attamyces* sp.

1, Invasión del 25 % de la superficie de la colonia del hongo *Attamyces* sp.

2, Invasión del 50 % de la superficie de la colonia del hongo *Attamyces* sp.

3, Invasión del 100 % de la superficie de la colonia del hongo *Attamyces* sp.

4, Invasión del 100 % de la superficie de la colonia del hongo *Attamyces* sp. y esporulación sobre la colonia del hongo simbiote.

### 3.5 EVALUACIÓN DE MICOPARASITISMO ENTRE *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. SOBRE *Attamyces* sp.

3.5.1 Observaciones al microscopio de luz. El primer cambio visible en el micelio de *Attamyces* sp. por la acción del antagonista T.

*lignorum* (T-19) se observó a las 22 horas de iniciado el experimento *in vitro*, las hifas de *Attamyces* sp. presentaron pérdida de turgencia en la pared celular, mientras que las hifas de T-19 comenzaban a colonizar sus hifas. Sin embargo, la mayoría de las interacciones del micelio de los antagonistas *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. con *Attamyces* sp. fueron claramente visibles después de las 48 horas de montados los ensayos.

De los resultados mostrados en la tabla 9, se desprende que de los 23 aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. evaluados con *Attamyces* sp. veinte aislamientos (T-19, T-20, T-21, T-22, T-23, T-24, T-25, T-27, T-28, T-29, T-30, T-71, T-83, T-84, T-85, T-86, T-109, T-110, G-53, G-56) no presentaron interacciones muy fuertes entre las hifas de los dos hongos, como enrollamiento, penetración o formación de pseudoapresorios con las hifas de *Attamyces* sp., en estos casos se observó un crecimiento masivo y superficial de las hifas de los antagonistas a través de las hifas del hospedero como se observa en la figura 11.



Figura 11. Cultivo mixto de *Gliocladium* sp. (G-55) y *Attamyces* sp. Colonización superficial de las hifas de *Gliocladium* (G), a través de las hifas de *Attamyces* sp. (A), a las 48 horas de sembrados los microcultivos, (40 X).

Esta reacción fue seguida por una pérdida gradual de turgencia en las hifas, vacuolación, granulación del material citoplasmático, lisis de la pared celular y muerte de las células de las hifas de *Attamyces* sp. (figuras 12, 13, 14 y 15). Los resultados obtenidos entre las 48 y 54 horas después del contacto están resumidos en la tabla 9.



Figura 12. Cultivo mixto de *Trichoderma* (T-22) y *Attamyces* sp. Pérdida de turgencia (PT) de las hifas de *Attamyces* sp. (A), a las 48 horas de sembrados los microcultivos, (100 X).



Figura 13. Cultivo mixto de *Trichoderma* (T-21) y *Attamyces* sp. Vacuolación (V) de las hifas de *Attamyces* sp. (A), a las 48 horas de sembrados los microcultivos, (100 X).



Figura 14. Cultivo mixto de *Trichoderma* (T-71) y *Attamyces* sp. Granulación (G) de las hifas de *Attamyces* sp. (A), a las 48 horas de sembrados los microcultivos, (100 X).



Figura 15. Cultivo mixto de *Trichoderma* (T-20) y *Attamyces* sp. Lisis (L) de las hifas de *Attamyces* sp. (A), a las 48 horas de sembrados los microcultivos, (100 X).

Los resultados obtenidos indican que en el 65.2 % de las interacciones examinadas el citoplasma del hospedero comenzó una rápida desorganización después de 48 horas del contacto, con las hifas de los controles. A las 72 horas el 100 % de las muestras de *Attamyces* sp. evaluadas con los aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. ya presentaban alteraciones en el citoplasma, vacuolación y granulación, y a las 96 horas de iniciado el ensayo, las hifas de *Attamyces* sp., se

encontraban completamente desintegradas. Esto se observó con todos los aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. evaluados. En ninguno de los casos se presentó alteración en la pared celular de hifas o el citoplasma de los antagonistas cuando fueron evaluados con ellos mismos como control.

Igualmente, se analizaron las interacciones del micelio de *Attamyces* sp. con *Attamyces* sp. como control y se observó el micelio de *Attamyces* sp. con una apariencia normal durante las primeras 12 horas, sin embargo, después de 24 y 48 horas, algunos de los controles presentaban granulación y el micelio se observaba dañado, aunque esto no se observó en todas las repeticiones. A las 72 horas el micelio de *Attamyces* sp. se encontraba mas débil, se observaba pérdida de turgencia, pero no presentó lisis ni degradación total del micelio como fue observado en los tratamientos con los antagonistas, figuras 16, 17, y 18.

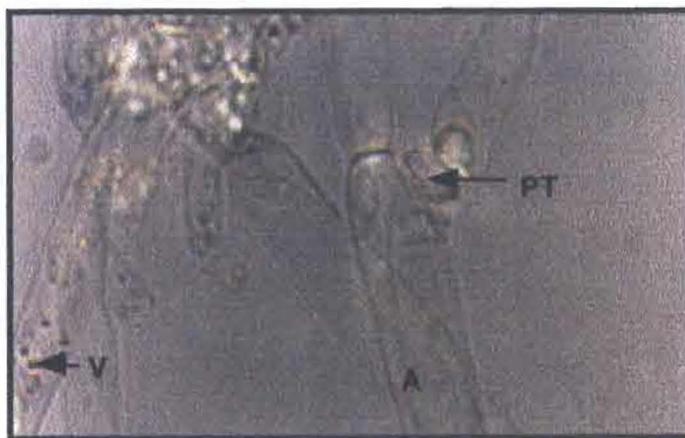


Figura 16. Cultivo mixto de *Attamyces* sp., y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa pérdida de turgencia (PT) y vacuolación (V) de las hifas de *Attamyces* sp. (A) donde indican las flechas, (100 X).

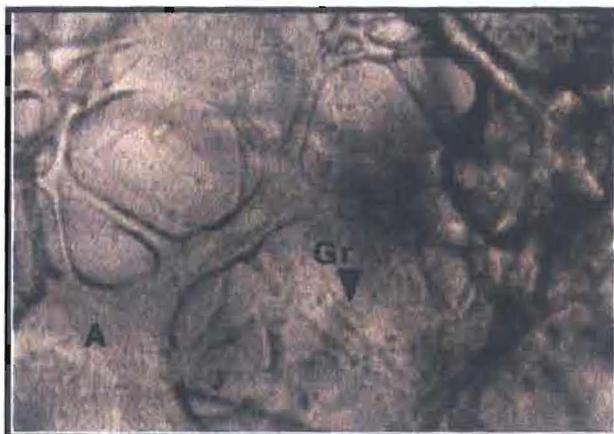


Figura 17. Cultivo mixto de *Attamyces* sp., y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa anastomosis de las hifas de *Attamyces* sp. (A) y granulaci3n (Gr) donde indica la flecha, (40 X).

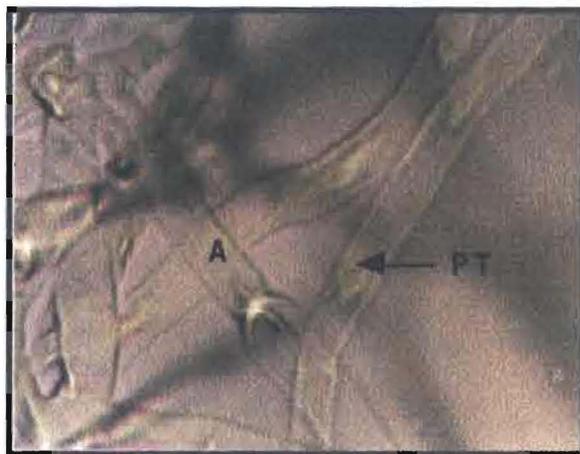


Figura 18. Cultivo mixto de *Attamyces* sp., y *Attamyces* sp. A las 60 horas de sembrados los microcultivos, se observa p3rdida de turgencia (PT) de las hifas de *Attamyces* sp. (A) donde indica la flecha, (100 X).

Otros tipos de resultados tambi3n fueron observados; en la evaluaci3n de dos aislamientos de *Trichoderma* sp. (T-22 y T-25) con *Attamyces* sp. se pudo observar como las hifas del hospedero se vieron afectadas antes de que los hongos antagonistas comenzaran la colonizaci3n durante las primeras 48 horas, mientras que en los aislamientos de *Trichoderma* sp. (T-30, T-86, T-109, T-110) con *Attamyces* sp., en las primeras 48 horas, el

micelio del hospedero no se vió afectado en la conformación de las hifas comparado con el control.

En el caso del aislamiento, *T. lignorum* (T-26) las hifas de este, a las 48 horas después de iniciar el experimento se enrollaron alrededor de las hifas del hospedero, el enrollamiento fue flojo y masivo, como resultado se observó granulación y lisis de la pared celular con pérdida del material citoplasmático, (figura 19). Sin embargo, se observó que en muchas ocasiones, las hifas de *Attamyces* sp. ya presentaban lisis o se encontraban totalmente desintegradas en el momento en que estaban siendo colonizadas (figura 20).

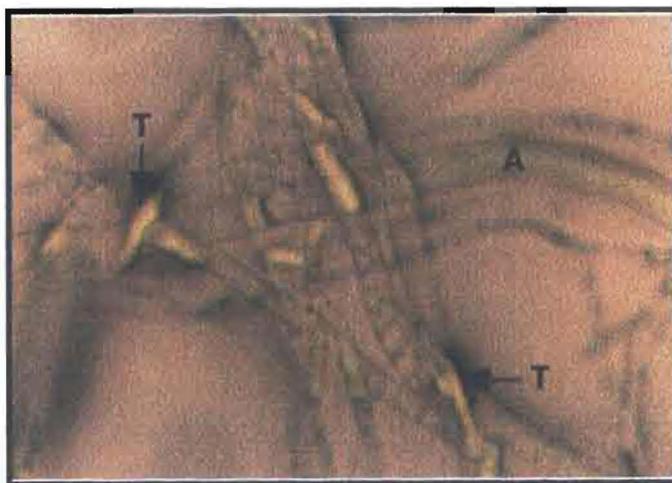


Figura 19. Cultivo mixto de *Trichoderma lignorum* (T-26) y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa enrollamiento flojo y masivo de *T. lignorum* (T-26) (T) sobre las hifas de *Attamyces* sp. (A), (40 X).



Figura 20. Cultivo mixto de *Trichoderma lignorum* (T-26) y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observan las hifas de *T. lignorum* (T-26) (T) sobre las hifas de *Attamyces* sp. (A), las cuales están completamente desintegradas por efecto de la lisis de la pared celular (L), (40 X).

Después de las 48 horas de iniciar el ensayo con *Gliocladium* y *Attamyces*, se observó que en muchos sitios la pared del hospedero esta se encontraba presionada hacia atrás por el micoparásito (G-54) (figura 21) sugiriendo la presencia de mecanismos de presión; como resultado se observó pérdida de turgencia de la pared celular del hospedero, y finalmente a las 72 horas, las hifas de *Attamyces* sp. se encontraban lisadas.



Figura 21. Cultivo mixto de *Gliocladium* (G-54) y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa un efecto mecánico de G-54 sobre la las hifas de *Attamyces* sp. (A), como lo indica la flecha, (100 X).

Después de las 48 horas de contacto, entre las hifas de la cepa G-55 con *Attamyces* sp. se observó que la invasión de las hifas de G-55 se dió por un enrollamiento flojo y masivo; en algunas partes de las hifas se podían observar estructuras cortas globulares semejantes a protrusiones en un estrecho contacto con la pared de las hifas del hospedero (figura 22); también se observó, cómo las hifas de G-55 ejercían una fuerte presión sobre la hifa del hospedero (figura 23), sin embargo, no se pudo confirmar si realmente se da una penetración de la hifa de G-55 dentro de las hifas de *Attamyces* sp. Las hifas del hospedero presentaron pérdida de turgencia, vacuolación y lisis.



Figura 22. Cultivo mixto de *Gliocladium* (G-55) y *Attamyces* sp. A las 72 horas de sembrados los microcultivos, se observa enrollamiento flojo y masivo de G-55 (G) sobre las hifas de *Attamyces* sp. (A), en las hifas de G-55 se forman estructuras globulares denominadas protrusiones, que están en estrecho contacto con las hifas de *Attamyces* sp. (A), como lo indica la flecha, (100 X).



Figura 23. Cultivo mixto de *Gliocladium* (G-55) y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa un estrecho contacto de las hifas de G-55 (G) con las hifas de *Attamyces* sp. (A), como lo indica la flecha, (100 X).

Tabla 9. Características de parasitismo de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. con *Attamyces* sp. entre las 48 y 54 horas del ensayo

Cepa	Crecimiento apreciado de las hifas -Presente -Ausente	Grado de enrollamiento alrededor de la hifa del hospedero -Apretado, -Suelto -Frecuente, -Esporádico- Contacto superficial	Efecto sobre las hifas del hospedero -Pérdida de turgencia -Granulación, -Vacuolación - Presión - Lísis-	Penetración Si/No
T-19	Presente	Contacto superficial	Pérdida de turgencia, vacuolación y lísis	No
T-20	Presente	Contacto superficial	Pérdida de turgencia, granulación y lísis	No
T-21	Presente	Contacto superficial	Pérdida de turgencia, vacuolación y lísis	No
T-22	Ausente		Pérdida de turgencia	No
T-23	Presente	Contacto superficial	Vacuolación, lísis	No
T-24	Presente	Contacto superficial	Vacuolación	No
T-25	Ausente		Pérdida de turgencia, granulación, vacuolación y lísis	No
T-26	Presente	Enrollamiento, suelto y frecuente	Granulación y lísis	No
T-27	Presente	Contacto superficial	Pérdida de turgencia y lísis	No
T-28	Presente	Contacto superficial	Granulación y lísis	No
T-29	Presente	Contacto superficial	Micelio normal	No
T-30	Ausente		Micelio normal	No
T-71	Presente	Contacto superficial	Vacuolación, granulación y lísis	No
T-83	Presente	Contacto superficial	Pérdida de turgencia y lísis	No
T-84	Presente	Contacto superficial	Lísis	No
T-85	Presente	Contacto superficial	Pérdida de turgencia vacuolación y lísis	No
T-86	Ausente		Micelio normal	No
T-109	Ausente		Micelio normal	No
T-110	Ausente		Micelio normal	No
G-53	Presente	Enrollamiento, suelto y frecuente	Pérdida de turgencia y vacuolación	No
G-54	Presente	Presión	Pérdida de turgencia	No
G-55	Presente	Presión, enrollamiento suelto, pseudoapresorios	Pérdida de turgencia, vacuolación y lísis	No
G-56	Presente	Contacto superficial	Granulación y lísis	No

**3.5.2 Observaciones con microscopio electrónico de rastreo.** Las muestras de micelio de *Gliocladium* sp. (G-55) y *Attamyces* sp. tomadas de la zona de interacción de los microcultivos después de 48 horas de contacto, mostraron que las hifas del aislamiento G-55 se enrollaron alrededor de las hifas de *Attamyces* sp. El enrollamiento fue flojo y masivo, (figuras 24 y 26), en algunos casos las hifas del antagonista formaron estructuras cortas globulares, referenciadas como protrusiones las cuales se encontraron en un estrecho contacto con la pared de las hifas de *Attamyces* sp. (figura 25), no obstante, la penetración de estas estructuras no fue observada. En algunos casos se observa pérdida de turgencia en las hifas de *Attamyces* sp. figuras 24 y 26.

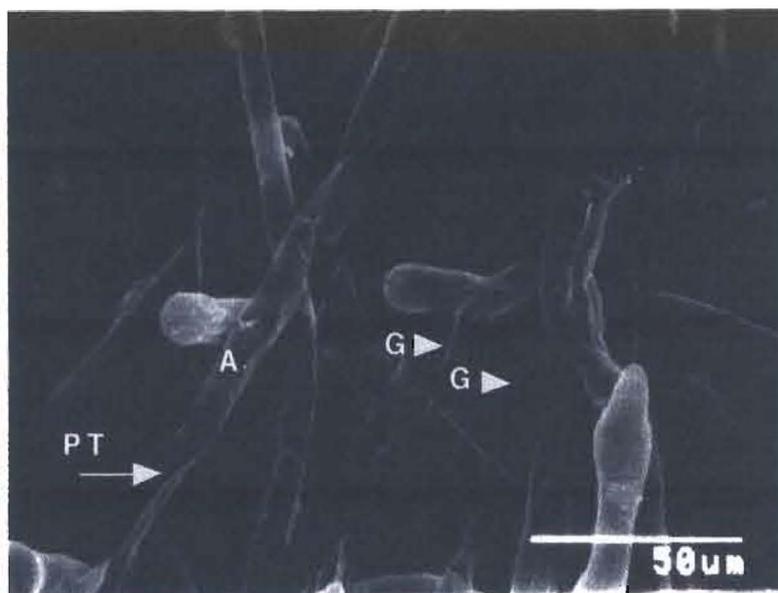


Figura 24. Cultivo mixto de *Gliocladium* (G-55) y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa enrollamiento flojo y masivo de G-55 (G) sobre las hifas de *Attamyces* sp. (A), y pérdida de turgencia (PT) en las hifas de *Attamyces* sp. (A), (1500 X).

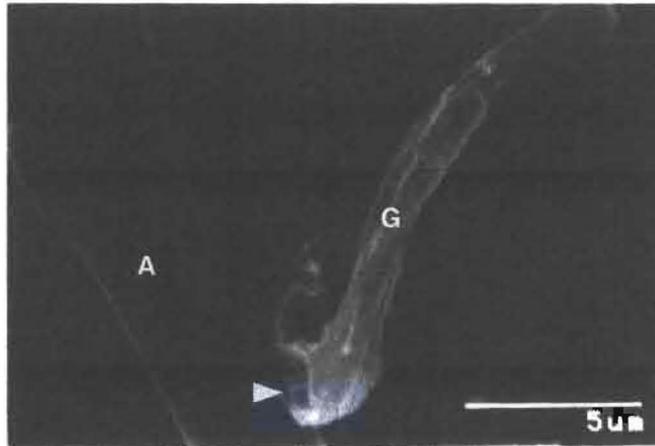


Figura 25. Cultivo mixto de *Gliocladium* sp. (G-55) y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa una estructura globular (flecha) producida por la cepa G-55 (G) sobre las hifas de *Attamyces* sp. (A), (6000 X).

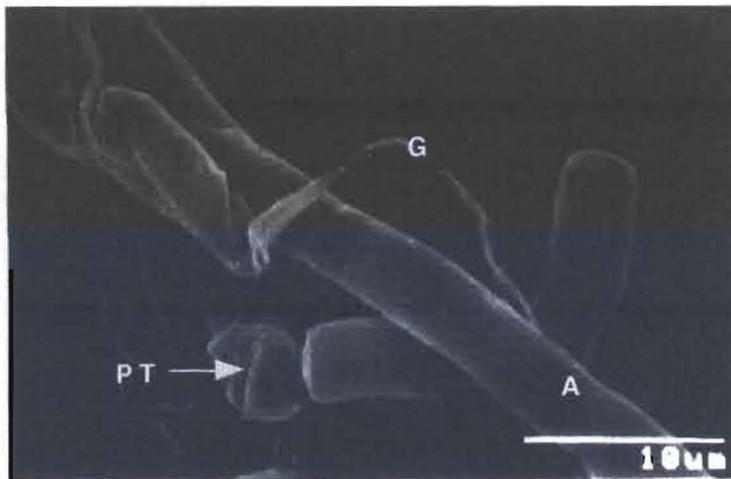


Figura 26. Cultivo mixto de *Gliocladium* sp. (G-55) y *Attamyces* sp. A las 48 horas de sembrados los microcultivos, se observa enrollamiento flojo y masivo de G-55 (G) sobre las hifas de *Attamyces* sp. (A), y pérdida de turgencia (PT) en las hifas de *Attamyces* sp. (A), (3000 X).

Las interacciones entre *T. lignorum* (T-26) y *Attamyces* sp. fueron claramente visibles a las 48 horas de sembrados los microcultivos, las hifas de T-26 comenzaron a entremezclarse con las hifas de *Attamyces* sp., en ambos ensayos con G-55 y T-26 las hifas de los antagonistas se distinguían claramente de *Attamyces* sp. por tener un diámetro mas delgado. Al igual que en la interacción con G-55, la invasión de las hifas de T-26 fue floja y masiva (figuras 27 y 29), sin embargo, se observó como el micelio de