



Revista Chapingo. Serie Ciencias
Forestales y del Ambiente

ISSN: 2007-3828

rforest@correo.chapingo.mx

Universidad Autónoma Chapingo
México

Reyes-Figueroa, Omar; Ortiz-García, Carlos F.; Torres-de la Cruz, Magdiel; Lagunes-
Espinoza, Luz del C.; Valdovinos-Ponce, Guadalupe

Trichoderma species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of
Moniliophthora roreri

Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, vol. XXII, núm. 2, 2016, pp.
149-163

Universidad Autónoma Chapingo
Chapingo, México

Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62945379004>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's homepage in redalyc.org

redalyc.org

Scientific Information System

Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal

Non-profit academic project, developed under the open access initiative

Trichoderma species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*

Especies de *Trichoderma* del agroecosistema cacao con potencial de biocontrol sobre *Moniliophthora roreri*

Omar Reyes-Figueroa¹; Carlos F. Ortiz-García¹; Magdiel Torres-de la Cruz^{2*}; Luz del C. Lagunes-Espinoza²; Guadalupe Valdovinos-Ponce⁵.

¹Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Carretera Cárdenas-Huimanguillo km 3.5. C. P. 86500. Cárdenas, Tabasco, México.

²Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5. C. P. 86039. Villahermosa, Tabasco, México.

Email: biomag75@hotmail.com Tel.: 52 + (914)1192428 (*Corresponding author).

³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

Abstract

Frosty pod rot in cacao (*Moniliophthora roreri*) is the main limitation on the production of cacao (*Theobroma cacao*) in Mexico. A sustainable alternative for the control of the disease is the use of the *Trichoderma* mushroom. The objective of this study was to select isolates that are native to *Trichoderma* with the best antagonist and physiological *in vitro* characteristics for the control of *M. roreri*. For this, 50 isolates of *Trichoderma* obtained in the cacao agroecosystem were characterized. Mycelial growth and the production of conidia at 25, 30 and 35 °C were considered the physiological variables. Mycoparasitism, antibiosis and potential antagonism were the antagonist variables. Significant differences ($P = 0.0001$) were found in all evaluated variables. The interval of the optimal temperature for mycelial growth and the production of conidia was 25 to 30 °C. Mycoparasitism varied between 0 and 100 %, and only the isolates of six species showed this characteristic. Antibiosis varied between 6.8 and 55.5 % and potential antagonism varied from 3.4 to 69.0 %. *Trichoderma virens* (TTC017) and *T. harzianum* (TTC090, TTC039, TTC073) showed the best potential *in vitro* biocontrol, so they are promising strains for future investigations on biological control of cacao moniliasis.

Keywords: Frosty pod rot in cacao, biological control, *Theobroma cacao*, Mycoparasitism.

Resumen

La moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*) es la principal limitante parasítica de la producción de cacao (*Theobroma cacao*) en México. Una alternativa sostenible para el control de la enfermedad es el uso del hongo *Trichoderma*. El objetivo del presente estudio fue seleccionar aislamientos nativos de *Trichoderma* con las mejores características antagonistas y fisiológicas *in vitro*, para el control de *M. roreri*. Para ello, se caracterizaron 50 aislamientos de *Trichoderma*, obtenidos del agroecosistema cacao. El crecimiento micelial y la producción de conidios a 25, 30 y 35 °C se consideraron variables fisiológicas. El micoparasitismo, antibiosis y antagonismo potencial fueron las variables antagonistas. Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0001$) en todas las variables evaluadas. El intervalo de temperatura óptima para el crecimiento micelial y producción de conidios fue de 25 a 30 °C. El micoparasitismo varió de 0 a 100 % y solo los aislamientos de seis especies mostraron esta característica. La antibiosis osciló entre 6.8 y 55.5 %, y el antagonismo potencial varió de 3.4 a 69 %. *Trichoderma virens* (TTC017) y *T. harzianum* (TTC090, TTC039, TTC073) mostraron el mejor biocontrol potencial *in vitro*, por lo que son cepas prometedoras para futuras investigaciones sobre control biológico de la moniliasis del cacao.

Palabras clave: Moniliasis del cacao, control biológico, *Theobroma cacao*, micoparasitismo.

Introduction

Moniliophthora roreri (Cif. & Par.) Evans et al. is the causal agent of frosty pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.) (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007). In Mexico, *M. roreri* was reported in 2005, making it the main parasitic limitation on the production of cacao (Phillips-Mora et al., 2006). It has been reported that *M. roreri* may reduce up to 80 % of the production of cacao, causing negative socio-economic and environmental effects (Torres-de la Cruz, Ortiz-García, Téliz-Ortiz, Mora-Aguilera, & Nava-Díaz, 2011).

Cultural practices have been the most commonly used method for the fight against frosty pod rot in cacao (Soberanis et al., 1999). The use of fungicides has been a scarcely used practice, due to the erratic strategies of fungicide evaluations and to the fluctuating price of cacao (Bateman et al., 2005). Programs for the development of resistant genetic material have also been established (Phillips-Mora, Arciniegas-Leal, Mata-Quiros, & Motomajor-Arias, 2012); however, notable progress has not been obtained in the commercial use of clones with resistance to the disease. Krauss and Soberanis (2001) mention that biocontrol offers some potentials in the sustainable handling of the frosty pod rot through the use of antagonists. The authors reported that the species of the *Trichoderma* genus showed control on *M. roreri*.

In the search of biological control agents, one of the basic strategies should be the initial exploration of the natural native enemies (Vázquez, Matienzo, Veitía, & Alfonso, 2008). Based on this reasoning, in the state of Tabasco, Mexico, there are 50 isolates of *Trichoderma* obtained from the *T. cacao* rhizosphere which have been grouped into nine species and may be evaluated for the control of *M. roreri*. Due to this, the objective of this study was to select isolates native to *Trichoderma* with the best *in vitro* antagonist and physiological characteristics for the control of *M. roreri*.

Materials and methods

Trichoderma isolates

Fifty isolates of *Trichoderma* grouped in nine species were characterized in the present work (Table 1). These isolates were obtained from the *T. cacao* rhizosphere as a part of a diversity study of *Trichoderma* in the cacao agroecosystem in the state of Tabasco, Mexico, which were confirmed in kind through morphology and ITS sequences (Torres-de la Cruz et al., 2015). Currently, these isolates are a part of the *Trichoderma* collection of the División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. The *M. roreri* isolate was provided by the Laboratorio de Fitopatología of the Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, previously identified through morphology and ITS

Introducción

Moniliophthora roreri (Cif. & Par.) Evans et al. es el agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.) (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007). En México, *M. roreri* fue reportado en el año 2005 convirtiéndose en la principal limitante parasítica del cultivo de cacao (Phillips-Mora et al., 2006). Se ha reportado que *M. roreri* puede reducir 80 % de la producción de cacao con efectos socioeconómicos y ambientales negativos (Torres-de la Cruz, Ortiz-García, Téliz-Ortiz, Mora-Aguilera, & Nava-Díaz, 2011).

Las prácticas culturales han sido el método más utilizado para el combate de la moniliasis del cacao (MC) (Soberanis et al., 1999). El uso de fungicidas ha sido una práctica poco empleada, debido a las estrategias erráticas de evaluación de fungicidas y al precio fluctuante del cacao (Bateman et al., 2005). También se han establecido programas para el desarrollo de material genético resistente (Phillips-Mora, Arciniegas-Leal, Mata-Quiros, & Motomajor-Arias, 2012); sin embargo, no se han obtenido progresos notables en la utilización comercial de clones con resistencia a la enfermedad. Krauss y Soberanis (2001) mencionan que el biocontrol ofrece potencial en el manejo sostenible de la MC mediante el uso de antagonistas. Los autores reportaron que especies del género *Trichoderma* mostraron control sobre *M. roreri*.

En la búsqueda de agentes de control biológico, una de las estrategias básicas debe ser la exploración inicial de los enemigos naturales nativos (Vázquez, Matienzo, Veitía, & Alfonso, 2008). En este razonamiento, en el estado de Tabasco, México, se tienen 50 aislamientos de *Trichoderma* obtenidos de la rizósfera de *T. cacao* que han sido agrupados en nueve especies y pueden ser evaluados para el control de *M. roreri*. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue seleccionar aislamientos nativos de *Trichoderma* con las mejores características antagónicas y fisiológicas *in vitro*, para el control de *M. roreri*.

Materiales y métodos

Aislamientos de *Trichoderma*

Cincuenta aislamientos de *Trichoderma*, agrupados en nueve especies, fueron caracterizados en el presente trabajo (Cuadro 1). Estos aislamientos se obtuvieron de la rizósfera de *T. cacao* como parte de un estudio de diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México, los cuales fueron confirmados a especie mediante morfología y secuencias ITS (Torres-de la Cruz et al., 2015). Actualmente, estos aislados forman parte de la colección de *Trichoderma* de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de

Table 1. Isolates native to *Trichoderma* evaluated against *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot in cacao in the state of Tabasco, Mexico. Isolates: *T. asperellum* (Samuels, Lieckf & Nirenberg), *T. pleuroticola* (Yu & Park), *T. spirale* (Bissett), *T. harzianum* (Rifai), *T. virens* (Mill, Giddens & Foster) Arx., *T. koningiopsis* (Samuels, Suárez & Evans), *T. longibrachiatum* (Rifai), *T. brevicompactum* (Kraus, Kubicek & Gams) and *T. reesei* (Simmons).

Cuadro 1. Aislamientos nativos de *Trichoderma* evaluados contra *Moniliophthora roreri*, causante de la moniliasis de cacao en el estado de Tabasco, México. Aislamientos: *T. asperellum* (Samuels, Lieckf & Nirenberg), *T. pleuroticola* (Yu & Park), *T. spirale* (Bissett), *T. harzianum* (Rifai), *T. virens* (Mill, Giddens & Foster) Arx., *T. koningiopsis* (Samuels, Suárez & Evans), *T. longibrachiatum* (Rifai), *T. brevicompactum* (Kraus, Kubicek & Gams) y *T. reesei* (Simmons).

Municipality / Municipio	Locality / Localidad	North Latitude / Latitud Norte	West Longitude / Longitud Oeste	Isolate ^z / Aislamiento ^z	Species / Especie	Isolate number / Número de aislamiento	
Paraíso	Ranchería Moctezuma 1	18° 22' 19.3"	93° 13' 42.4"	TTC001	<i>T. asperellum</i>	4	
				TTC002	<i>T. pleuroticola</i>		
				TTC003	<i>T. spirale</i>		
				TTC004	<i>T. spirale</i>		
Cardenas	Ejido Occidente- San Francisco	18° 20' 37.9"	93° 15' 24.5"	TTC007	<i>T. pleuroticola</i>	2	
				TTC008	<i>T. pleuroticola</i>		
	Poblado C-28	18° 01' 46.7"	93° 29' 42.0"	TTC009	<i>T. harzianum</i>	1	
	Ranchería Ocampo	18° 01' 49.3"	93° 21' 29.7"	TTC014	<i>T. virens</i>	3	
				TTC015	<i>T. virens</i>		
				TTC016	<i>T. virens</i>		
Comalcalco	Ranchería Río Seco 1	18° 03' 47.2"	93° 23' 04.4"	TTC017	<i>T. virens</i>	1	
	Ranchería Arena 4	18° 13' 25.4"	93° 23' 31.1"	TTC020	<i>T. koningiopsis</i>	4	
				TTC021	<i>T. virens</i>		
				TTC023	<i>T. asperellum</i>		
			TTC024	<i>T. asperellum</i>			
	Ranchería Gregorio Méndez 1	18° 14' 59.9"	93° 17' 12.7"	TTC026	<i>T. longibrachiatum</i>	3	
				TTC027	<i>T. longibrachiatum</i>		
				TTC028	<i>T. longibrachiatum</i>		
Cunduacán	Ejido José María Pino Suárez	18° 08' 30.1"	93° 17' 29.1"	TTC031	<i>T. virens</i>	2	
				TTC032	<i>T. longibrachiatum</i>		
	Ranchería La Piedra 1	18° 07' 45.2"	93° 11' 52.4"	TTC035	<i>T. asperellum</i>		3
				TTC037	<i>T. harzianum</i>		
Huimanguillo					<i>T. longibrachiatum</i>		
	Ranchería Villa Flores 2	17° 48' 06.6"	93° 24' 16.5"	TTC045	<i>T. brevicompactum</i>	2	
				TTC047	<i>T. brevicompactum</i>		
	Ranchería Paredón 1	17° 44' 59.6"	93° 23' 57.8"	TTC050	<i>T. brevicompactum</i>	2	
				TTC051	<i>T. asperellum</i>		
		Ejido Rafael Martínez	17° 42' 56.8"	93° 23' 45.7"	TTC054	<i>T. spirale</i>	1
Jalpa de Méndez	Ranchería Hermenegildo Galeana 2	18° 10' 33.4"	93° 08' 48.5"	TTC056	<i>T. harzianum</i>	3	
				TTC058	<i>T. virens</i>		
				TTC059	<i>T. virens</i>		
	Ejido Huapacal	18° 11' 48.1"	93° 10' 28.5"	TTC062	<i>T. harzianum</i>	2	
				TTC063	<i>T. koningiopsis</i>		
Centro	Ranchería Plátano y cacao 4	17° 59' 04.2"	93° 10' 07.9"	TTC077	<i>T. harzianum</i>	3	
				TTC081	<i>T. reesei</i>		
				TTC084	<i>T. koningiopsis</i>		
	Ranchería Buena vista 1	17° 56' 59.2"	93° 06' 23.2"	TTC085	<i>T. spirale</i>	2	
				TTC086	<i>T. brevicompactum</i>		
		Ranchería González 4	17° 57' 29.6"	93° 05' 25.7"	TTC090	<i>T. harzianum</i>	2
Tacotalpa				TTC088	<i>T. longibrachiatum</i>		
	Ejido Zunuy y patastal	17° 28' 10.3"	92° 50' 56.7"	TTC093	<i>T. spirale</i>	1	
	Ranchería Puyacatengo 1	17° 39' 37.2"	92° 54' 20.7"	TTC100	<i>T. harzianum</i>	4	
				TTC101	<i>T. longibrachiatum</i>		
				TTC102	<i>T. virens</i>		
				TTC104	<i>T. virens</i>		
Teapa	Ejido Vicente Guerrero	17° 30' 15.7"	92° 54' 02.5"	TTC115	<i>T. harzianum</i>	2	
				TTC113	<i>T. reesei</i>		
		Ranchería Allende	18° 09' 38.1"	93° 02' 00.8"	TTC073	<i>T. harzianum</i>	2
				TTC076	<i>T. harzianum</i>		
	Ejido Allende 2	17° 33' 20.0"	92° 59' 08.7"	TTC109	<i>T. harzianum</i>	1	
					Total	50	

^zThe isolates were identified with the letters TTC (*Trichoderma* Tabasco Cacao) followed by the number of isolates.

^zLos aislamientos se identificaron con las siglas TTC (*Trichoderma* Tabasco Cacao) seguidas del número de aislamiento.

sequences (GenBank access number: GU108605). All isolates were preserved and multiplied in the middle of the Potato Dextrose Agar (PDA) culture.

Mycoparasitism of *Trichoderma* on *M. roreri*

The mycoparasitic ability of the *Trichoderma* isolates on *M. roreri* was evaluated according to the pre-colonized Petri dish method (Evans, Holmes, & Thomas, 2003). A fragment of 5 mm in diameter was obtained from *M. roreri* colonies of 10 days of age and was placed near the edge of a Petri dish with 9 cm in diameter with half PDA. The Petri dishes with an inoculated medium were incubated during 37 days at 25 ± 1 °C in the dark. Subsequently, a 0.5 x 2.5 cm fragment of the *Trichoderma* inoculum, obtained from a 4 day old colony, was planted on the opposite side of the *M. roreri* inoculum. The dishes pre-colonized by *M. roreri* and inoculated with *Trichoderma* were incubated during 15 days under the same conditions indicated for pre-colonization. Five repetitions of the isolate and five of the control treatment were established. The control treatment comprised pre-colonized dishes of *M. roreri* without the inoculation of *Trichoderma*.

After the incubation, 10 samples of 0.5 mm in diameter were extracted initiating the inoculum of *M. roreri* in direction to the inoculum of *Trichoderma*. The samples were planted in Petri dishes with PDA mediums and were incubated at 25 ± 1 °C in the dark. The samples were observed during 7 days in order to detect the presence of the mycoparasite (*Trichoderma*) or phytopathogen (*M. roreri*) and evaluate the percentage of mycoparasitism with the following formula:

$$PP = (CT \times 100) / N$$

where:

PP = Parasitism (%)

CT = Samples with *Trichoderma* growth

N = Number of samples extracted from each replica

Antibiosis of *Trichoderma* on *M. roreri*

The antibiosis of *Trichoderma* isolates on *M. roreri* was evaluated on cultures coupled according to Holmes, Schroers, Thomas, Evans, and Samuels (2004). Antibiosis was calculated by the percentage of radial growth reduction of *M. roreri*. For this, a fragment of 10 day old *M. roreri* of 5 mm in diameter was placed on a Petri dish with PDA medium. The inoculated dishes were incubated in the dark during 7 days at 25 ± 1 °C in order to establish the colony. Subsequently, the colony of *M. roreri* was controlled with the mycoparasite, for which a 5 mm fragment of 4 day old *Trichoderma* was planted on the opposite side of the *M. roreri*. All dishes

Tabasco. El aislamiento de *M. roreri* fue proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, previamente identificado por morfología y secuencia ITS (número de acceso GenBank: GU108605). Todos los aislamientos se conservaron y multiplicaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA).

Micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *M. roreri*

La habilidad micoparasítica de los aislamientos de *Trichoderma* sobre *M. roreri* se evaluó según el método de cajas de Petri precolonizadas (Evans, Holmes, & Thomas, 2003). Un fragmento de 5 mm de diámetro se obtuvo de colonias de *M. roreri* de 10 d de edad y se colocó cerca del borde de una caja de Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA. Las cajas de Petri con medio inoculado se incubaron durante 37 d a 25 ± 1 °C en oscuridad. Posteriormente, un fragmento de inóculo de *Trichoderma* de 0.5 x 2.5 cm, obtenido del borde de una colonia de 4 d de edad, se sembró en el lado opuesto del inóculo de *M. roreri*. Las cajas precolonizadas por *M. roreri* e inoculadas con *Trichoderma* se incubaron durante 15 d bajo las mismas condiciones señaladas para la precolonización. Cinco repeticiones por aislamiento y cinco del tratamiento testigo fueron establecidos. El testigo consistió de cajas precolonizadas por *M. roreri* sin la inoculación de *Trichoderma*.

Después de la incubación, 10 muestras de 0.5 mm de diámetro se extrajeron iniciando del inóculo de *M. roreri* en dirección al inóculo de *Trichoderma*. Las muestras se sembraron en cajas de Petri con medio PDA e incubaron a 25 ± 1 °C bajo oscuridad. Las muestras se observaron durante 7 d para detectar la presencia del micoparásito (*Trichoderma*) o fitopatógeno (*M. roreri*) y evaluar el porcentaje de micoparasitismo con la siguiente fórmula:

$$PP = (CT \times 100) / N$$

donde:

PP = Parasitismo (%)

CT = Muestras con crecimiento de *Trichoderma*

N = Número de muestras extraídas de cada réplica

Antibiosis de *Trichoderma* sobre *M. roreri*

La antibiosis de los aislamientos de *Trichoderma* sobre *M. roreri* se evaluó sobre cultivos pareados de acuerdo con Holmes, Schroers, Thomas, Evans, y Samuels (2004). La antibiosis se calculó por el porcentaje de reducción del crecimiento radial de *M. roreri*. Para ello, un fragmento de 5 mm de diámetro de *M. roreri* de 10 d de edad se colocó en la periferia de una caja de Petri con medio PDA. Las cajas inoculadas se incubaron en

were incubated at 25 ± 1 °C in the dark; five repetitions per isolate and control treatment were established. The control treatment comprised colonies of *M. roreri* without confrontation with *Trichoderma*. The radial growth was recorded daily until one of the isolates had mycelial contact with *M. roreri*. The percentage of mycelial growth inhibition was determined with the Abbott formula (1925):

$$PA = [(CR - CRT) / CR] \times 100$$

where:

PA = Antibiosis (%)

CR = Radial growth of *M. roreri* without *Trichoderma* (mm)

CRT = Radial growth of *M. roreri* in the presence of *Trichoderma* (mm).

Potential antagonism of *Trichoderma* on *M. roreri*

The potential antagonism of the *Trichoderma* isolates on *M. roreri* was obtained through the formula:

$$AP = (MP + PA) / 2$$

where:

MP = Mycoparasitism of isolates of *Trichoderma* on *M. roreri* (%)

PA = Antibiosis of isolates of *Trichoderma* on *M. roreri* (%).

Mycelial growth of *Trichoderma*

Mycelial growth was evaluated according to Dimbi, Maniania, Lux, and Mueke (2004). A fragment of 5 mm in diameter was obtained from the margins of 4 days old *Trichoderma* colonies and was placed in the middle of a Petri dish with a PDA medium. The boxes were incubated at 25, 30 and 35 °C (the three temperatures with ± 1 °C) with a photoperiod of 12 h in the light and 12 h in the dark; five repetitions per isolate and per temperature were established. The rate of mycelial growth was recorded each 12 h; the test was finalized when one of the colonies filled the Petri dish. The measurements of the last record were used in the statistical analysis. Radial growth (r) was transformed into the growth area (A, cm²) with the formula $A = \pi r^2$. The corresponding area to each mm of radial growth was expressed in percentages. Thus, the effect of the temperature on the mycelial growth was evaluated through the inhibition percentage and the increase of the area, when increasing the temperature from 25 to 30 °C and from 25 to 35 °C.

$$\text{inhibition/increase (\%)} = \left(\frac{\text{growth at } 30^\circ\text{C} \times 100}{\text{growth at } 25^\circ\text{C}} \right) - 100$$

$$\text{inhibition/increase (\%)} = \left(\frac{\text{growth at } 35^\circ\text{C} \times 100}{\text{growth at } 25^\circ\text{C}} \right) - 100$$

oscuridad durante 7 d a 25 ± 1 °C, para establecer la colonia. Posteriormente, la colonia de *M. roreri* fue confrontada con el micoparásito, para lo cual, un fragmento de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* de 4 d de edad se sembró en el lado opuesto a *M. roreri*. Todas las cajas se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad, se establecieron cinco repeticiones por aislamiento y testigo. El tratamiento testigo consistió en colonias de *M. roreri* sin confrontación con *Trichoderma*. El crecimiento radial se registró diariamente hasta que uno de los aislamientos tuviera contacto micelial con *M. roreri*. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue determinado por la fórmula de Abbott (1925):

$$PA = [(CR - CRT) / CR] \times 100$$

donde:

PA = Antibiosis (%)

CR = Crecimiento radial de *M. roreri* sin *Trichoderma* (mm)

CRT = Crecimiento radial de *M. roreri* en presencia de *Trichoderma* (mm).

Antagonismo potencial de *Trichoderma* sobre *M. roreri*

El antagonismo potencial de los aislamientos de *Trichoderma* sobre *M. roreri* fue obtenido mediante la fórmula:

$$AP = (MP + PA) / 2$$

donde:

MP = Micoparasitismo de aislamientos de *Trichoderma* sobre *M. roreri* (%)

PA = Antibiosis de aislamiento de *Trichoderma* sobre *M. roreri* (%).

Crecimiento micelial de *Trichoderma*

El crecimiento micelial se evaluó de acuerdo con Dimbi, Maniania, Lux, y Mueke (2004). Un fragmento de 5 mm de diámetro se obtuvo del borde de colonias de *Trichoderma* de 4 d de edad y se colocó en el centro de una caja de Petri con medio PDA. Las cajas se incubaron a 25, 30 y 35 °C (las tres temperaturas con ± 1 °C) con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad; cinco repeticiones por aislamiento y temperatura se establecieron. El radio del crecimiento micelial se registró cada 12 h; la prueba finalizó hasta que una de las colonias llenó la caja de Petri. Las medidas del último registro se utilizaron en el análisis estadístico. El crecimiento radial (r) se transformó en área de crecimiento (A, cm²) con la fórmula $A = \pi r^2$. El área correspondiente a cada mm de crecimiento radial se expresó en porcentaje. Así, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial se evaluó

Production of *Trichoderma* conidia

From the 4 days old *Trichoderma* cultures, a fragment of 5 mm in diameter was planted in Petri dishes with PDA medium. The inoculated fragment was incubated at 25, 30 and 35 °C (the three temperatures with ± 1 °C), with a photoperiod of 12 h in the light and 12 h in the dark during 16 days. Five repetitions per isolate and per temperature were established. The conidia were cultivated from the culture surface and the count was done in a Neubauer chamber (Hausser Scientific, USA). The concentration of conidia·mL⁻¹ was estimated through the following formula:

$$C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd / 80)$$

where:

C = Concentration (conidia·mL⁻¹)

Cc = Average conidia counted in the Neubauer chamber

Fd = Dilution factor.

The effect of the temperature on the production of conidia was evaluated in the same manner as indicated for mycelial growth.

Statistical analysis

The information on mycoparasitism, antibiosis, potential antagonism, mycelial growth and production of conidia were analyzed under a completely random design. Mycoparasitism, antibiosis and potential antagonism consisted of 50 treatments (each one of the evaluated isolates). Mycelial growth and the production of conidia comprised 40 treatments, as the isolates that did not show mycoparasitism and that had the lowest AP values were discarded. Prior to the analysis, the information on mycoparasitism, antibiosis and potential antagonism were transformed to the arc sine of the square root of the proportion, and the information on mycelial growth and production of conidia was transformed to log (x + 1). The information was subjected to an ANOVA and a separation of Tukey means test ($P < 0.05$) through SAS® (Statistical Analysis System [SAS], 1998).

Results and discussion

Mycoparasitism of *Trichoderma* on *M. roreri*

Table 2 presents the percentage of mycoparasitism of the 50 isolates native of *Trichoderma* evaluated on *M. roreri*. The isolates showed significant differences ($P=0.0001$) and the percentage varied between 0 and 100 %. New isolates reached 100 % mycoparasitism at 15 days of incubation and 10 isolates did not show this characteristic. The isolates with mycoparasitism on *M. roreri* belong to the *T. harzianum* (Rifai), *T. virens* (Mill, Giddens & Foster) Arx,

mediante el porcentaje de inhibición e incremento del área, al pasar de 25 a 30 °C y de 25 a 35 °C:

$$\text{inhibición/incremento (\%)} = \left(\frac{\text{crecimiento a } 30^\circ\text{C} \times 100}{\text{crecimiento a } 25^\circ\text{C}} \right) - 100$$

$$\text{inhibición/incremento (\%)} = \left(\frac{\text{crecimiento a } 35^\circ\text{C} \times 100}{\text{crecimiento a } 25^\circ\text{C}} \right) - 100$$

Producción de conidios de *Trichoderma*

A partir de cultivos de *Trichoderma* de 4 d de edad, un fragmento de 5 mm de diámetro se sembró en cajas de Petri con medio PDA. El fragmento inoculado se incubó a 25, 30 y 35 °C (las tres temperaturas con ± 1 °C), con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad durante 16 d. Cinco repeticiones por aislamiento y temperatura fueron establecidas. Los conidios se cosecharon de la superficie del cultivo y el conteo se realizó en una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, USA). La concentración de conidios·mL⁻¹ se estimó mediante la fórmula siguiente:

$$C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd / 80)$$

donde:

C = Concentración (conidios·mL⁻¹)

Cc = Promedio de conidios contados en la cámara de Neubauer

Fd = Factor de dilución.

El efecto de la temperatura sobre la producción de conidios se evaluó de la misma manera a lo indicado en crecimiento micelial.

Análisis estadístico

Los datos de micoparasitismo, antibiosis, antagonismo potencial, crecimiento micelial y producción de conidios se analizaron bajo un diseño completamente al azar. El micoparasitismo, la antibiosis y el antagonismo potencial consistieron de 50 tratamientos (cada uno de los aislamientos evaluados). El crecimiento micelial y la producción de conidios constaron de 40 tratamientos, debido a que se descartaron los aislamientos que no mostraron micoparasitismo y que tuvieron los valores más bajos de AP. Previo al análisis, los datos de micoparasitismo, antibiosis y antagonismo potencial se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, y los datos de crecimiento micelial y producción de conidios se transformaron a log (x+1). Los datos se sometieron a un ANOVA y prueba de separación de medias de Tukey ($P < 0.05$) mediante SAS® (Statistical Analysis System [SAS], 1998).

Resultados y discusión

Micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *M. roreri*

El Cuadro 2 presenta el porcentaje de micoparasitismo de los 50 aislamientos nativos de *Trichoderma*

Table 2. Mycoparasitism of 50 isolates native to *Trichoderma* on *Moniliophthora roreri*.**Cuadro 2. Micoparasitismo de 50 aislamientos nativos de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri*.**

Isolate / Aislamiento	Mycoparasitism (%) / Micoparasitismo (%)	Isolate / Aislamiento	Mycoparasitism (%) / Micoparasitismo (%)
TTC015	100 ± 0 a	TTC050	54 ± 5.4 gh
TCC023	100 ± 0 a	TTC037	54 ± 5.4 gh
TTC017	100 ± 0 a	TTC016	54 ± 5.4 gh
TTC100	100 ± 0 a	TTC045	52 ± 4.4 gh
TTC104	100 ± 0 a	TTC084	42 ± 4.4 hi
TTC058	100 ± 0 a	TTC032	42 ± 4.4 hi
TTC059	100 ± 0 a	TTC031	34 ± 5.4 ij
TTC014	100 ± 0 a	TTC020	30 ± 0 ijk
TTC062	100 ± 0 a	TTC093	26 ± 5.4 jkl
TTC004	96 ± 5.4 ab	TTC035	24 ± 5.4 jkl
TTC047	94 ± 5.4 b	TTC051	22 ± 4.4 jkl
TTC090	92 ± 4.4 b	TTC002	20 ± 0 klm
TTC039	84 ± 5.4 c	TTC001	16 ± 5.4 lm
TTC085	78 ± 4.4 cd	TTC063	16 ± 5.4 lm
TTC115	76 ± 5.4 cde	TTC024	10 ± 0 m
TTC073	74 ± 5.4 cdef	TTC003	0 n
TTC086	74 ± 5.4 cdef	TTC007	0 n
TTC077	66 ± 5.4 defg	TTC008	0 n
TTC056	64 ± 5.4 efg	TTC026	0 n
TTC054	64 ± 5.4 efg	TTC027	0 n
TTC009	62 ± 4.4 fg	TTC028	0 n
TTC076	56 ± 5.4 gh	TTC088	0 n
TTC102	56 ± 5.4 gh	TTC101	0 n
TTC109	56 ± 5.4 gh	TTC081	0 n
TTC021	54 ± 5.4 gh	TTC113	0 n

± Standard deviation of the mean. Identical letters do not show a significant difference according to the Tukey test ($P = 0.0001$).

± Desviación estándar de la media. Letras iguales no muestran diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.0001$).

T. spirale (Bissett), *T. brevicompactum* (Kraus, Kubicek & Gams), *T. koningiopsis* (Samuels, Suárez & Evans) and *T. asperellum* (Samuels, Lieckf & Nirenberg) species. It could be hypothesized that these species produce a matrix of enzymes that allow parasitism of *M. roreri*. In this regard, mycoparasitism of *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* and *T. koningiopsis* isolates on *M. roreri* has been reported by Evans et al. (2003) and Krauss et al. (2006), while mycoparasitism of *T. brevicompactum* and *T. spirale* was documented for the first time. In this study, the parasitism of isolates of one same species varied, which is consistent with Hoyos-Carvajal, Duque, and Orduz (2008), who indicated that isolates of the same species can act in different ways.

The isolates that did not show parasitism on *M. roreri* correspond to *T. pleuroticola* (Yu & Park), *T. longibrachiatum* (Rifai) and *T. reesei* (Simmons). The foregoing coincides with Garcia-Simoes, Tauk-Tornisiolo, Rocha-Niella, and Tapia-Tapia (2012), who evaluated this species

evaluados sobre *M. roreri*. Los aislamientos mostraron diferencias significativas ($P = 0.0001$) y el porcentaje osciló de 0 a 100 %. Nueve aislamientos alcanzaron 100 % de micoparasitismo a los 15 d de incubación y 10 aislamientos no mostraron dicha característica. Los aislamientos con micoparasitismo sobre *M. roreri* pertenecen a las especies *T. harzianum* (Rifai), *T. virens* (Mill, Giddens & Foster) Arx, *T. spirale* (Bissett), *T. brevicompactum* (Kraus, Kubicek & Gams), *T. koningiopsis* (Samuels, Suárez & Evans) y *T. asperellum* (Samuels, Lieckf & Nirenberg). Se puede hipotetizar que estas especies producen una matriz de enzimas que permiten parasitar a *M. roreri*. Al respecto, el micoparasitismo de aislamientos de *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* y *T. koningiopsis* sobre *M. roreri* se ha reportado por Evans et al. (2003) y Krauss et al. (2006); mientras que el micoparasitismo de *T. brevicompactum* y *T. spirale* se documenta por primera vez. En este estudio, el parasitismo de aislamientos de una misma especie fue variable, lo cual concuerda con Hoyos-Carvajal,

Table 3. Antibiosis of 50 native species to *Trichoderma* on *Moniliophthora roreri*.**Cuadro 3. Antibiosis de 50 especies nativas de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri*.**

Isolate / Aislamiento	Antibiosis (%) / Antibiosis (%)	Isolate / Aislamiento	Antibiosis (%) / Antibiosis (%)
TTC051	55.5 ± 4.0 a	TTC016	30.9 ± 3.0 ghijklmno
TTC084	52.8 ± 2.7 ab	TTC026	29.7 ± 4.0 hijklmnop
TTC020	48.9 ± 5.0 abc	TTC058	28.5 ± 3.7 hijklmnopq
TTC002	46.0 ± 3.7 abcd	TTC076	28.5 ± 4.8 ijklmnopq
TTC021	44.3 ± 3.8 bcde	TTC062	27.8 ± 1.5 jklmnopq
TTC024	43.2 ± 4.9 bcdef	TTC109	27.3 ± 7.2 jklmnopq
TTC056	41.2 ± 2.7 cdefg	TTC003	26.6 ± 3.2 klmnopq
TTC077	41.0 ± 4.0 cdefg	TTC113	25.8 ± 4.2mnopq
TTC115	40.5 ± 0.6 cdefg	TTC037	25.1 ± 4.7 mnopqr
TTC063	40.2 ± 5.6 cdefg	TTC054	24.7 ± 3.8 nopqrs
TTC027	38.7 ± 1.2 cdefgh	TTC015	23.0 ± 1.5 opqrst
TTC017	37.9 ± 3.7 defghi	TTC045	21.1 ± 2.0 pqrstu
TTC102	37.5 ± 6.7 defghi	TTC081	20.3 ± 2.6 pqrstuv
TTC085	37.1 ± 2.3 defghij	TTC047	19.9 ± 2.6 qrstuvw
TTC039	36.1 ± 4.0 defghijk	TTC104	19.8 ± 6.3 qrstuvw
TTC035	35.6 ± 5.0 defghijkl	TTC014	16.8 ± 3.7 rstuvw
TTC001	35.3 ± 3.3 efghijkl	TTC031	16.2 ± 2.6 stuvw
TTC004	34.9 ± 1.4 efghijklm	TTC086	16.0 ± 1.4 stuvw
TTC088	34.7 ± 3.9 efghijklm	TTC093	15.9 ± 4.0 tuvw
TTC073	33.9 ± 3.5 efghijklmn	TTC023	15.6 ± 2.9 tuvw
TTC007	33.4 ± 2.9 fghijklmn	TTC059	14.8 ± 3.9 tuvw
TTC028	32.4 ± 2.1 ghijklmno	TTC101	14.5 ± 3.4 uvw
TTC090	32.4 ± 3.7 ghijklmno	TTC008	13.1 ± 4.1 vwx
TTC050	31.7 ± 2.1	TTC032	12.3 ± 1.5 wx
TTC009	31.5 ± 2.6	TTC100	6.8 ± 2.5 x

± Standard deviation of the mean. Identical letters do not show a significant difference according to the Tukey test ($P = 0.0001$).

± Desviación estándar de la media. Letras iguales no muestran diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.0001$).

without finding parasitism on *M. pernicioso* (Stahel) Aime and Phillips-Mora, a species that is related to *M. roreri*. *Trichoderma pleuroticola* has also been reported as a pathogen of edible mushrooms (Sobieralski et al., 2012). The absence of mycoparasitism of these species suggests that *M. roreri* is not in the group of hosts.

Trichoderma antibiosis on *M. roreri*

Table 3 presents the results of the antibiosis test of *Trichoderma* on *M. roreri*. All isolates showed antibiosis with significant differences between them ($P = 0.0001$). The percentage of antibiosis fluctuated from 6.8 to 55.5 %; the highest values (40 to 55.5%) were obtained with some isolates of *T. asperellum* (TCC051 and TCC024) *T. koningiopsis* (TCC084, TCC020 and TCC063), *T. pleuroticola* (TCC002), *T. virens* (TCC021) and *T. harzianum* (TCC056, TCC077 and TCC115). The antibiotic action of the *T. harzianum* isolates has also been described on the mycelial growth of *M. roreri* and *M. pernicioso* (Bailey et al., 2008).

Duque, y Orduz (2008), quienes indican que los aislamientos de una misma especie pueden actuar de diferente manera.

Los aislamientos que no mostraron parasitismo sobre *M. roreri* corresponden a *T. pleuroticola* (Yu & Park), *T. longibrachiatum* (Rifai) y *T. reesei* (Simmons). Lo anterior coincide con Garcia-Simoes, Tauk-Tornisiello, Rocha-Niella, y Tapia-Tapia (2012), quienes evaluaron dichas especies sin encontrar parasitismo sobre *M. pernicioso* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, especie emparentada con *M. roreri*. *Trichoderma pleuroticola* también ha sido reportada como patógeno de hongos comestibles (Sobieralski et al., 2012). La ausencia de micoparasitismo de estas especies sugiere que *M. roreri* no se encuentra en el grupo de hospederos.

Antibiosis de *Trichoderma* sobre *M. roreri*

El Cuadro 3 presenta los resultados de la prueba de antibiosis de *Trichoderma* sobre *M. roreri*. Todos los

Table 4. Potential antagonism of 50 isolates native to *Trichoderma* on *Moniliophthora roreri*.Cuadro 4. Antagonismo potencial de 50 aislamientos nativos de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri*.

Isolate / Aislamiento	Antagonism (%) / Antagonismo (%)	Isolate / Aislamiento	Antagonism (%) / Antagonismo (%)
TTC017	68.8 ± 1.79 a	TTC016	42.2 ± 3.03 hijk
TTC004	65.2 ± 2.59 ab	TTC076	42.2 ± 3.56 hijk
TTC058	64.2 ± 1.92 abc	TTC109	41.6 ± 6.31 hijk
TTC062	64.0 ± 0.71 abc	TTC020	39.6 ± 2.19 ijkl
TTC090	62.2 ± 1.79 abc	TTC037	39.4 ± 3.21 ijkl
TTC015	61.6 ± 0.89 abcd	TTC051	38.6 ± 3.21 jkl
TTC104	60.0 ± 2.74 bcde	TTC045	36.6 ± 2.19 klm
TTC039	59.8 ± 3.90 bcde	TTC002	33.0 ± 1.87 lmn
TTC014	58.8 ± 1.79 bcde	TTC035	29.8 ± 3.96 mno
TTC115	58.2 ± 2.95 bcde	TTC063	28.0 ± 5.05 no
TTC085	57.6 ± 2.79 cde	TTC032	27.0 ± 1.73 nop
TTC059	57.6 ± 1.82 cde	TTC024	26.6 ± 2.50 nop
TCC023	57.6 ± 1.52 cde	TTC001	25.6 ± 2.30 opq
TTC047	57.0 ± 3.16 cde	TTC031	25.0 ± 3.80 opq
TTC073	54.0 ± 2.35 def	TTC093	20.8 ± 3.96 pqr
TTC077	53.4 ± 3.78 ef	TTC027	19.6 ± 0.55 qr
TTC100	53.2 ± 1.30 ef	TTC088	17.2 ± 1.92 rs
TTC056	52.4 ± 2.19 efg	TTC007	16.8 ± 1.48 rs
TTC021	49.2 ± 4.32 fgh	TTC028	16.2 ± 1.00 rs
TTC084	47.4 ± 1.40 fgh	TTC026	15.0 ± 2.00 rst
TTC009	46.8 ± 2.17 fghi	TTC003	13.2 ± 1.64 st
TTC102	46.8 ± 5.17 fghi	TTC113	13.0 ± 2.12 st
TTC086	45.0 ± 3.67 ghij	TTC081	10.0 ± 1.22 tu
TTC054	44.4 ± 3.21 hij	TTC101	7.2 ± 1.48 u
TTC050	42.8 ± 2.17 hijk	TTC008	6.8 ± 1.79 u

± Standard deviation of the mean. Identical letters do not show a significant difference according to the Tukey test ($P = 0.0001$).

± Desviación estándar de la media. Letras iguales no muestran diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.0001$).

The isolates of *T. longibrachiatum*, *T. reesei* and *T. pleuroticola* showed antibiosis on *M. roreri* (Table 3), even though they did not present mycoparasitism (Table 2). The presence of antibiosis without mycoparasitism suggest that the isolates have metabolites with antifungal activity, or that they do not allow the growth of the pathogen, due to the space and nutrient competition mechanisms (García-Simoes et al., 2012).

Potential antagonism of *Trichoderma* on *M. roreri*

Table 4 shows that there were significant differences ($P = 0.0001$) in the potential antagonism of *Trichoderma* on *M. roreri*; the percentage varied between 6.8 and 68.8 %. To evaluate the antagonism potential, such as the sum of mycoparasitism and antibiosis acting synergistically, it was observed that some isolates of *T. virens* (TTC017, TTC058 and TTC015), *T. harzianum* (TTC062 and TTC090) and *T. spirale* (TTC004) showed the highest values, while the lowest percentages were obtained with the isolates

aislamientos mostraron antibiosis con diferencias significativas entre ellos ($P = 0.0001$). El porcentaje de antibiosis fluctuó de 6.8 % a 55.5 %; los valores más altos (40-55.5 %) se obtuvieron con algunos aislamientos de *T. asperellum* (TCC051 y TCC024) *T. koningiopsis* (TCC084, TCC020 y TCC063), *T. pleuroticola* (TCC002), *T. virens* (TCC021) y *T. harzianum* (TCC056, TCC077 y TCC115). La acción antibiótica de los aislamientos de *T. harzianum* también ha sido descrita sobre el crecimiento micelial de *M. roreri* y *M. perniciososa* (Bailey et al., 2008).

Los aislamientos de *T. longibrachiatum*, *T. reesei* y *T. pleuroticola* mostraron antibiosis sobre *M. roreri* (Cuadro 3), aunque no presentaron micoparasitismo (Cuadro 2). La presencia de antibiosis sin micoparasitismo sugiere que los aislamientos poseen metabolitos con actividad antifúngica, o bien que no permiten el crecimiento del patógeno, debido a los mecanismos de competencia por espacio y nutrientes (García-Simoes et al., 2012).

that did not show mycoparasitism. According to Monte (2001), the combination of parasitism and antibiosis could result in significant antagonistic levels.

Mycelial growth of *Trichoderma*

The statistical analysis showed significant differences ($P = 0.0001$) in the mycelial growth of the *Trichoderma* isolates in each temperature that was assessed. The results are presented in Table 5. At 25 °C, mycelial growth varied between 21 and 40 mm. The TTC063 and TTC084 strains of *T. koningiopsis*, and TTC021 and TCC017 of *T. virens* obtained the highest growth at 60 h. At 30 °C, the mycelial growth fluctuated between 18.3 and 40 mm; the TCC021, TCC017, TCC102 and TCC104 strains of *T. virens*, TCC084 of *T. koningiopsis*, and TCC100, TCC073 and TCC090 of *T. harzianum* expressed the highest growth. When going from 25 to 30 °C, 30 out of 40 isolates increased their growth and three maintained it (TTC021, TTC084 and TTC017). Figure 1 shows the graphic comparison of the changes that happened on the mycelial growth of the *Trichoderma* isolates with temperature changes. At 35 °C, mycelial growth fluctuated from 2.1 to 29 mm and the TCC017 strain (*T. virens*) presented the highest growth. At this temperature, all the isolates decreased the mycelial growth with respect to the one obtained at 25 and 30 °C; the inhibition fluctuated from 23 to 99.5 % (Figure 1). All isolates grew in the three increased temperatures; however, the range of favorable temperatures for 82 % of the isolates was 25 to 30 °C. In this regard, Jalil, Norero, and Apablaza (1997) reported that the optimal

Antagonismo potencial de *Trichoderma* sobre *M. roreri*

El Cuadro 4 muestra que hubo diferencias significativas ($P = 0.0001$) en el antagonismo potencial de *Trichoderma* sobre *M. roreri*; el porcentaje osciló de 6.8 a 68.8 %. Al evaluar el antagonismo potencial como la sumatoria de micoparasitismo y antibiosis actuando sinérgicamente, se observó que algunos aislamientos de *T. virens* (TTC017, TTC058 y TTC015), *T. harzianum* (TTC062 y TTC090) y *T. spirale* (TTC004) mostraron los valores más altos, mientras que los porcentajes más bajos se obtuvieron con los aislamientos que no mostraron micoparasitismo. De acuerdo con Monte (2001), la combinación de parasitismo y antibiosis puede resultar en niveles antagónicos importantes.

Crecimiento micelial de *Trichoderma*

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P = 0.0001$) en el crecimiento micelial de los aislamientos de *Trichoderma* en cada temperatura evaluada. Los resultados se presentan en el Cuadro 5. A 25 °C, el crecimiento micelial osciló entre 21 y 40 mm. Las cepas TTC063 y TTC084 de *T. koningiopsis*, y TTC021 y TCC017 de *T. virens* obtuvieron el mayor crecimiento a las 60 h. A 30 °C, el crecimiento micelial fluctuó entre 18.3 y 40 mm; las cepas TCC021, TCC017, TCC102 y TCC104 de *T. virens*, TCC084 de *T. koningiopsis*, y TCC100, TCC073 y TCC090 de *T. harzianum* expresaron el mayor crecimiento. Al pasar de 25 a 30 °C, 30 de 40 aislamientos incrementaron su crecimiento y tres

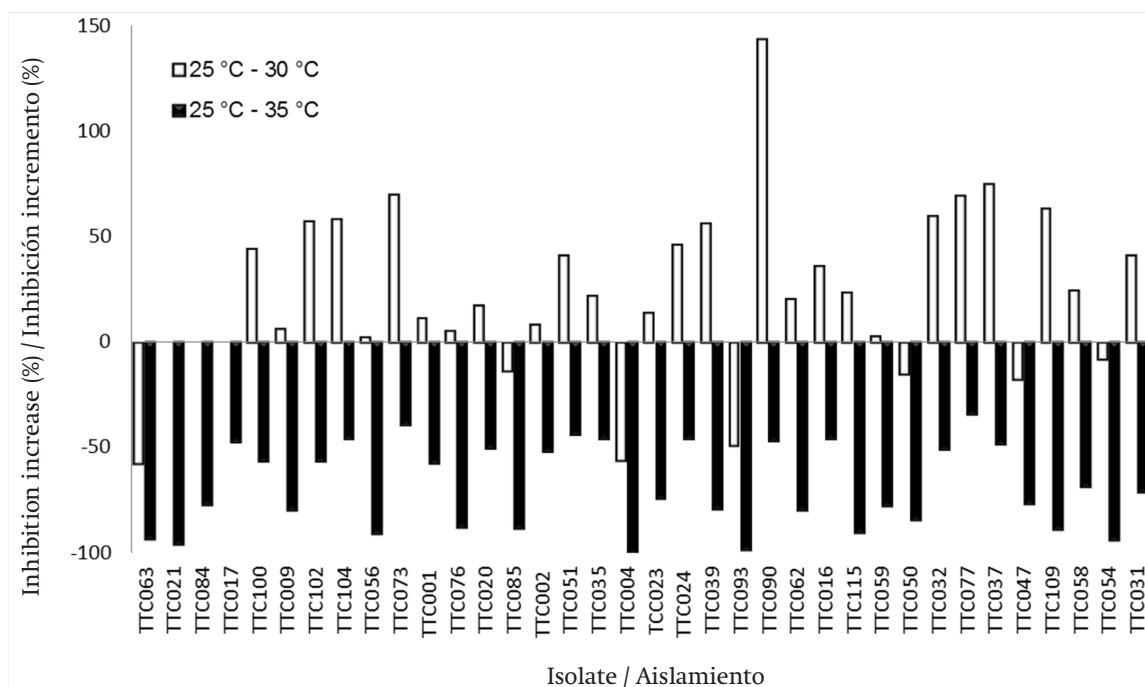


Figure 1. Inhibition changes or increase of mycelial growth of native isolates to *Trichoderma* when surpassing 25 to 30 °C and 25 to 35 °C.

Figura 1. Cambios de inhibición o incremento del crecimiento micelial de los aislamientos nativos de *Trichoderma* al pasar de 25 a 30 °C y de 25 a 35 °C.

Table 5. Mycelial growth of 40 isolates native to *Trichoderma* at 25, 30 and 35 °C.**Cuadro 5. Crecimiento micelial de 40 aislamientos nativos de *Trichoderma* a 25, 30 y 35 °C.**

Isolate / Aislamiento	Mycelial growth (%) / Crecimiento micelial (%)		
	25 °C	30 °C	35 °C
TTC063	40.0 ± 0 a	26.1 ± 0.3 efgh	10.1 ± 0.2 hi
TTC021	40.0 ± 0 a	40.0 ± 0 a	7.9 ± 0.1 jk
TTC084	40.0 ± 0 a	40.0 ± 0 a	19.0 ± 0.7 cd
TTC017	40.0 ± 0 a	40.0 ± 0 a	29.0 ± 1.0 a
TTC100	33.3 ± 1.0 b	40.0 ± 0 a	21.9 ± 0.1 bc
TTC090	32.7 ± 1.0 b	34.0 ± 1.2 b	14.7 ± 0.3 ef
TTC102	31.9 ± 1.4 bc	40.0 ± 0 a	21.0 ± 0.7 bc
TTC104	31.8 ± 1.1 bc	40.0 ± 0 a	23.3 ± 0.1 b
TTC056	31.6 ± 2.2 bcd	32 ± 1.7 bc	9.6 ± 0.1 ij
TTC073	30.7 ± 2.8 bcde	40.0 ± 0 a	23.9 ± 0.5 ab
TTC001	30.5 ± 0.5 bcdef	32.2 ± 0.9 bc	19.9 ± 0.8 bcd
TTC076	30.0 ± 0.1 bcdeg	30.8 ± 2.0 bcd	10.4 ± 0.3 hi
TTC020	29.7 ± 0.5 bcdefgh	32.2 ± 1.4 bc	20.9 ± 0.3 bc
TTC085	29.4 ± 0.6 bcdefghi	27.3 ± 0.6 defg	10.0 ± 0.02 hi
TTC002	29.2 ± 1.8 bcdefghij	30.4 ± 0.5 bcde	20.2 ± 0.5 bcd
TTC051	28.8 ± 1.1 bcdefghij	34.2 ± 0.2 b	21.5 ± 0.9 bc
TTC035	28.6 ± 0.9 bcdefghij	31.6 ± 1.2 bcd	21.0 ± 1.0 bc
TTC004	27.6 ± 3.2 cdefghijk	18.3 ± 1.3 k	2.1 ± 1.0 n
TCC023	27.6 ± 2.0 cdefghijk	29.5 ± 0.6 bcdef	14.0 ± 1.1 efg
TTC024	26.9 ± 1.5 defghijkl	32.5 ± 1.2 bc	19.8 ± 0.9 bcd
TTC039	26.9 ± 0.2 efghijkl	33.6 ± 1.7 b	12.3 ± 0.2 fgh
TTC093	26.0 ± 0.6 fghijkl	18.5 ± 0.7 k	3.2 ± 0.2 m
TTC090	25.6 ± 1.0 ghijklm	40.0 ± 0 a	18.7 ± 1.5 cd
TTC062	25.6 ± 0.7 ghijklm	28.1 ± 0.3 cdefg	11.6 ± 0.4 ghi
TTC016	25.5 ± 1.1 hijklmn	29.7 ± 0.6 bcdef	18.7 ± 0.2 cd
TTC115	25.1 ± 0.5 ijklmn	28.0 ± 1.2 cdefg	7.7 ± 0.2 k
TTC059	24.5 ± 0.6 jklmno	24.9 ± 1.1 ghi	11.6 ± 1.1 ghi
TTC050	24.3 ± 2.2 klmno	22.3 ± 0.4 hij	9.7 ± 0.5 ij
TTC032	24.0 ± 1.3 klmnop	30.3 ± 0.7 bcdef	16.8 ± 1.0 de
TTC077	23.6 ± 0.6 klmnop	30.8 ± 1.5 bcd	19.1 ± 0.5 cd
TTC037	23.2 ± 1.2 lmnop	30.6 ± 0.8 bcd	16.6 ± 0.5 de
TTC047	22.2 ± 2.8 mnop	20.0 ± 2.1 jk	10.6 ± 0.2 hi
TTC109	22.1 ± 0.8 mnop	28.3 ± 1.0 cdefg	7.4 ± 0.3 k
TTC058	22.0 ± 0.7 mnop	24.6 ± 0.1 ghi	12.3 ± 0.1 fgh
TTC054	22.0 ± 1.1 mnop	21.1 ± 3.6 jk	5.5 ± 0.08 l
TTC031	21.8 ± 0.5 nop	25.9 ± 0.1 fghi	11.7 ± 0.9 ghi
TTC086	21.1 ± 1.4 opq	22.3 ± 3.2 ij	10.5 ± 0.7 hi
TTC014	20.9 ± 0.3 opq	23.1 ± 1.0 hij	11.7 ± 0.4 ghi
TTC015	20.6 ± 2.0 pq	22.3 ± 1.3 hij	11.6 ± 0.1 ghi
TTC045	18.6 ± 2.6 q	25.3 ± 3.5 ghi	6.7 ± 0.1 kl

± Standard deviation of the mean. Identical letters do not show a significant difference according to the Tukey test ($P = 0.0001$).± Desviación estándar de la media. Letras iguales no muestran diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.0001$).

temperature for *T. harzianum* is 27 °C. The notable growth of all strains in an interval between 25 and 35 °C suggests the adaptability of the high temperatures where cacao is grown.

Production of *Trichoderma* conidia

The statistical analysis showed significant differences ($P = 0.0001$) in the production of conidia of the *Trichoderma* isolates in each evaluated temperature (Table 6). At 25 °C, the production fluctuated from 1.4×10^7 to 3.1×10^9 conidia·mL⁻¹. The strains with the highest production were TTC063 and TTC051 of the *T. koningiopsis* and *T. asperellum* species, respectively. At 30 °C, the production of conidia varied between 0.05×10^8 and 2.6×10^9 conidia·mL⁻¹; the TTC102 and TTC017 strains of *T. virens*, and TTC115 of *T. harzianum* presented the highest production. At this temperature, 65 % of the isolates increased the production of conidia in relation to the production obtained at 25 °C (Figure 2). At 35 °C, the production of conidia varied between 0 and 3.9×10^8 conidia·mL⁻¹. The TTC084 isolates (*T. koningiopsis*), TTC104 and TTC016 (*T. virens*) showed the highest production. At this temperature, 97.5 % of the isolates decreased the production of conidia, with respect to the obtained conidia at 25 and 30 °C; six isolates showed total inhibition (Figure 2). The inhibition fluctuated from 12.3 to 100 %. Only the TTC104 (*T. virens*) isolate increased the production of conidia, in regards to the values obtained at 25 and 30 °C.

Given that the spores are the active structures of the mushrooms that are the agents for biocontrol, the production of conidia is an important characteristic for the selection of promissory isolates (Vélez-Arango, Estrada-Valencia, González-García, Valderrama-Fonseca, & Bustillo-Pardey, 2001). In this regard, 85 % of the isolates produced conidia in the interval from 25 to 35 °C (Table 6), which could be explained by the tropical origin of the isolates; however, the range of the favorable temperature for production was 25 to 30 °C. The isolates with the most production of conidia in the range of evaluated temperatures were: TTC063 (*T. koningiopsis*); TTC051, TTC001, TTC035 (*T. asperellum*); TTC102 (*T. virens*); and TTC115 (*T. harzianum*), with a superior production of 1×10^9 conidia·mL⁻¹.

Conclusions

The results show that in the cacao agroecosystem, six out of nine existing species of *Trichoderma* present antagonistic capacities on *M. roreri*. According to the data presented in this work, the *Trichoderma* spp. isolates showed an intraspecific variability in regards to parasitism, antibiosis, mycelial growth and sporulation. The rank of favorable temperature for the native isolates of *Trichoderma* was 25 to 30 °C. Based on the evaluated characteristics, the promissory isolates

lo mantuvieron (TTC021, TTC084 y TTC017). La Figura 1 muestra la comparación gráfica de los cambios ocurridos en el crecimiento micelial de los aislamientos de *Trichoderma* ante los cambios de temperatura. A 35 °C, el crecimiento micelial fluctuó de 2.1 a 29 mm y la cepa TTC017 (*T. virens*) presentó el mayor crecimiento. A esta temperatura, todos los aislamientos disminuyeron el crecimiento micelial respecto al obtenido a 25 y 30 °C; la inhibición fluctuó de 23 hasta 99.5 % (Figura 1).

Todos los aislamientos crecieron en las tres temperaturas evaluadas; sin embargo, el rango de temperaturas favorables para 82 % de los aislamientos fue de 25 a 30 °C. Al respecto, Jalil, Norero, y Apablaza (1997) reportaron que la temperatura óptima para *T. harzianum* es de 27 °C. El crecimiento notable de todas las cepas en un intervalo de 25 a 35 °C sugiere adaptabilidad a las temperaturas altas donde el cacao se desarrolla.

Producción de conidios de *Trichoderma*

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P = 0.0001$) en la producción de conidios de los aislamientos de *Trichoderma* en cada temperatura evaluada (Cuadro 6). A 25 °C, la producción fluctuó de 1.4×10^7 a 3.1×10^9 conidios·mL⁻¹. Las cepas con mayor producción fueron TTC063 y TTC051 de las especies *T. koningiopsis* y *T. asperellum*, respectivamente. A 30 °C, la producción de conidios osciló entre 0.05×10^8 y 2.6×10^9 conidios·mL⁻¹; las cepas TTC102 y TTC017 de *T. virens*, y TTC115 de *T. harzianum* presentaron la mayor producción. A esta temperatura, 65 % de los aislamientos incrementaron la producción de conidios con relación a la producción obtenida a 25 °C (Figura 2). A 35 °C, la producción de conidios osciló entre 0 y 3.9×10^8 conidios·mL⁻¹. Los aislamientos TTC084 (*T. koningiopsis*), TTC104 y TTC016 (*T. virens*) mostraron la mayor producción. A esta temperatura, 97.5 % de los aislamientos disminuyeron la producción de conidios, respecto a la obtenida a 25 y 30 °C; seis aislamientos mostraron inhibición total (Figura 2). La inhibición fluctuó de 12.3 hasta 100 %. Solo el aislamiento TTC104 (*T. virens*) incrementó la producción de conidios, respecto a los valores obtenidos a 25 y 30 °C.

Dado que las esporas son las estructuras activas de los hongos agentes de biocontrol, la producción de conidios es una característica importante en la selección de aislamientos promisorios (Vélez-Arango, Estrada-Valencia, González-García, Valderrama-Fonseca, & Bustillo-Pardey, 2001). Al respecto, 85 % de los aislamientos produjeron conidios en el intervalo de 25 a 35 °C (Cuadro 6), lo cual puede ser explicado por el origen tropical de los aislamientos; sin embargo, el rango de temperatura favorable para la producción fue de 25 a 30 °C. Los aislamientos con mayor producción de conidios en el rango de temperaturas evaluadas fueron: TTC063 (*T. koningiopsis*); TTC051,

Table 6. Conidia production of 40 isolates native to *Trichoderma* at 25, 30 and 35 °C.**Cuadro 6. Producción de conidios de 40 aislamientos nativos de *Trichoderma* a 25, 30 y 35 °C.**

Isolate / Aislamiento	Production (conidia·mL ⁻¹) / Producción (conidios·mL ⁻¹)					
	25 °C		30 °C		35 °C	
TTC063	3.1 x 10 ⁹ ± 1.6 x 10 ⁸	a	1.3 x 10 ⁹ ± 3.3 x 10 ⁸	efgh	1.2 x 10 ⁶ ± 2.1 x 10 ⁵	lm
TTC051	2.1 x 10 ⁹ ± 2.4 x 10 ⁸	b	1.1 x 10 ⁹ ± 1.6 x 10 ⁸	fghij	2.7 x 10 ⁶ ± 1.0 x 10 ⁵	I
TTC001	1.9 x 10 ⁹ ± 3.5 x 10 ⁷	bc	1.8 x 10 ⁹ ± 5.4 x 10 ⁷	bc	4.9 x 10 ⁶ ± 1.5 x 10 ⁵	h
TTC035	1.8 x 10 ⁹ ± 1.1 x 10 ⁸	bc	1.2 x 10 ⁹ ± 1.0 x 10 ⁸	efghi	1.3 x 10 ⁷ ± 2.7 x 10 ⁶	g
TTC102	1.8 x 10 ⁹ ± 1.4 x 10 ⁸	bc	2.6 x 10 ⁹ ± 2.4 x 10 ⁸	a	4.2 x 10 ⁷ ± 3.5 x 10 ⁶	e
TTC084	1.6 x 10 ⁹ ± 1.2 x 10 ⁸	bcd	8.9 x 10 ⁸ ± 3.9 x 10 ⁶	ijklm	3.9 x 10 ⁸ ± 2.6 x 10 ⁷	a
TTC002	1.6 x 10 ⁹ ± 2.1 x 10 ⁸	cd	1.3 x 10 ⁹ ± 2.2 x 10 ⁸	efgh	2.1 x 10 ⁶ ± 5.1 x 10 ⁵	Ij
TTC020	1.4 x 10 ⁹ ± 3.6 x 10 ⁷	de	1.2 x 10 ⁹ ± 5.2 x 10 ⁷	efghij	1.7 x 10 ⁶ ± 1.0 x 10 ⁵	jk
TTC015	1.3 x 10 ⁹ ± 2.1 x 10 ⁸	def	1.2 x 10 ⁹ ± 1.1 x 10 ⁸	efghi	2.5 x 10 ⁵ ± 0	pq
TTC073	1.3 x 10 ⁹ ± 2.3 x 10 ⁸	defg	1.1 x 10 ⁹ ± 1.3 x 10 ⁸	fghij	6.4 x 10 ⁶ ± 3.5 x 10 ⁵	h
TTC024	1.3 x 10 ⁹ ± 2.8 x 10 ⁷	defg	1.7 x 10 ⁹ ± 7.4 x 10 ⁷	bcd	1.3 x 10 ⁶ ± 3.0 x 10 ⁵	kl
TTC037	1.2 x 10 ⁹ ± 1.3 x 10 ⁸	efg	1.5 x 10 ⁹ ± 1.4 x 10 ⁸	cdef	8.6 x 10 ⁷ ± 1.7 x 10 ⁶	cd
TTC045	1.1 x 10 ⁹ ± 1.2 x 10 ⁸	efgh	2.8 x 10 ⁸ ± 2.8 x 10 ⁷	opqr	6.6 x 10 ⁷ ± 1.0 x 10 ⁶	d
TTC021	1.0 x 10 ⁹ ± 8.7 x 10 ⁷	fghi	1.7 x 10 ⁸ ± 1.0 x 10 ⁷	qr	1.3 x 10 ⁶ ± 1.7 x 10 ⁵	klm
TTC016	1.0 x 10 ⁹ ± 6.8 x 10 ⁷	fghij	1.4 x 10 ⁹ ± 1.4 x 10 ⁸	defg	1.6 x 10 ⁸ ± 1.5 x 10 ⁷	b
TTC090	1.0 x 10 ⁹ ± 8.9 x 10 ⁷	fghij	1.5 x 10 ⁹ ± 1.9 x 10 ⁸	bcde	1.4 x 10 ⁶ ± 1.9 x 10 ⁵	kl
TTC115	9.9 x 10 ⁸ ± 4.1 x 10 ⁷	ghijk	2.3 x 10 ⁹ ± 6.8 x 10 ⁷	a	1.0 x 10 ⁶ ± 0	m
TTC032	8.4 x 10 ⁸ ± 3.7 x 10 ⁷	hijkl	9.7 x 10 ⁸ ± 8.2 x 10 ⁷	hijkl	7.4 x 10 ⁷ ± 4.4 x 10 ⁶	d
TTC017	8.2 x 10 ⁸ ± 2.7 x 10 ⁷	ijklm	1.9 x 10 ⁹ ± 2.1 x 10 ⁸	b	2.6 x 10 ⁷ ± 3.0 x 10 ⁶	f
TTC109	7.9 x 10 ⁸ ± 2.3 x 10 ⁷	jklmn	1.4 x 10 ⁹ ± 2.7 x 10 ⁷	defg	1.0 x 10 ⁸ ± 2.7 x 10 ⁶	c
TTC058	7.6 x 10 ⁸ ± 4.4 x 10 ⁷	klmn	1.0 x 10 ⁹ ± 1.5 x 10 ⁸	ghijk	2.8 x 10 ⁵ ± 3.7 x 10 ⁴	nop
TCC023	7.2 x 10 ⁸ ± 7.8 x 10 ⁶	lmno	1.3 x 10 ⁹ ± 8.5 x 10 ⁷	efgh	3.5 x 10 ⁵ ± 1.7 x 10 ⁴	n
TTC085	7.1 x 10 ⁸ ± 1.6 x 10 ⁷	lmno	8.1 x 10 ⁸ ± 1.0 x 10 ⁸	jklm	0 ± 0	r
TTC077	6.6 x 10 ⁸ ± 1.5 x 10 ⁷	lmno	1.7 x 10 ⁹ ± 3.4 x 10 ⁸	bcd	4.1 x 10 ⁷ ± 2.7 x 10 ⁶	e
TTC062	6.3 x 10 ⁸ ± 3.6 x 10 ⁷	mno	9.0 x 10 ⁸ ± 1.0 x 10 ⁸	ijklm	2.6 x 10 ⁵ ± 2.3 x 10 ⁴	nopq
TTC039	6.3 x 10 ⁸ ± 2.1 x 10 ⁷	mno	1.5 x 10 ⁹ ± 8.8 x 10 ⁷	cdef	1.4 x 10 ⁷ ± 5.1 x 10 ⁵	g
TTC031	6.3 x 10 ⁸ ± 2.6 x 10 ⁷	mno	7.1 x 10 ⁸ ± 4.1 x 10 ⁷	klmn	2.2 x 10 ⁶ ± 2.1 x 10 ⁵	Ij
TTC014	6.3 x 10 ⁸ ± 1.2 x 10 ⁷	no	1.4 x 10 ⁹ ± 1.1 x 10 ⁸	defg	2.5 x 10 ⁵ ± 1.1 x 10 ⁴	opq
TTC047	6.2 x 10 ⁸ ± 2.3 x 10 ⁷	no	9.0 x 10 ⁸ ± 5.0 x 10 ⁷	ijklm	0	r
TTC086	5.8 x 10 ⁸ ± 2.6 x 10 ⁷	op	8.2 x 10 ⁸ ± 8.0 x 10 ⁷	jklm	2.5 x 10 ⁵ ± 0	pq
TTC009	4.7 x 10 ⁸ ± 3.1 x 10 ⁷	pq	8.0 x 10 ⁸ ± 8.6 x 10 ⁷	jklm	1.3 x 10 ⁷ ± 3.8 x 10 ⁶	g
TTC100	4.7 x 10 ⁸ ± 4.1 x 10 ⁷	pq	1.5 x 10 ⁹ ± 2.6 x 10 ⁸	cdef	1.3 x 10 ⁷ ± 3.4 x 10 ⁶	g
TTC004	4.3 x 10 ⁸ ± 1.9 x 10 ⁶	qr	5.6 x 10 ⁸ ± 2.7 x 10 ⁷	mnop	0	r
TTC059	4.3 x 10 ⁸ ± 2.7 x 10 ⁷	qr	4.1 x 10 ⁸ ± 5.6 x 10 ⁷	nopq	3.4 x 10 ⁵ ± 2.5 x 10 ⁴	no
TTC050	3.6 x 10 ⁸ ± 5.0 x 10 ⁷	r	6.0 x 10 ⁸ ± 1.1 x 10 ⁸	lmno	0	r
TTC054	3.4 x 10 ⁸ ± 2.4 x 10 ⁷	r	3.8 x 10 ⁸ ± 2.3 x 10 ⁷	nopq	0	r
TTC076	3.3 x 10 ⁸ ± 1.4 x 10 ⁷	r	2.0 x 10 ⁸ ± 2.6 x 10 ⁷	pqr	2.7 x 10 ⁵ ± 2.9 x 10 ⁴	nopq
TTC104	1.8 x 10 ⁷ ± 3.7 x 10 ⁶	s	0.05 x 10 ⁸ ± 4.8 x 10 ³	r	1.9 x 10 ⁸ ± 1.7 x 10 ⁷	b
TTC056	1.5 x 10 ⁷ ± 3.5 x 10 ⁶	s	1.1 x 10 ⁸ ± 2.2 x 10 ⁷	qr	2.0 x 10 ⁵ ± 0	q
TTC093	1.4 x 10 ⁷ ± 2.8 x 10 ⁶	s	1.1 x 10 ⁸ ± 1.4 x 10 ⁷	qr	0	r

± Standard deviation of the mean. Identical letters do not show a significant difference according to the Tukey test ($P = 0.0001$).± Desviación estándar de la media. Letras iguales no muestran diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.0001$).

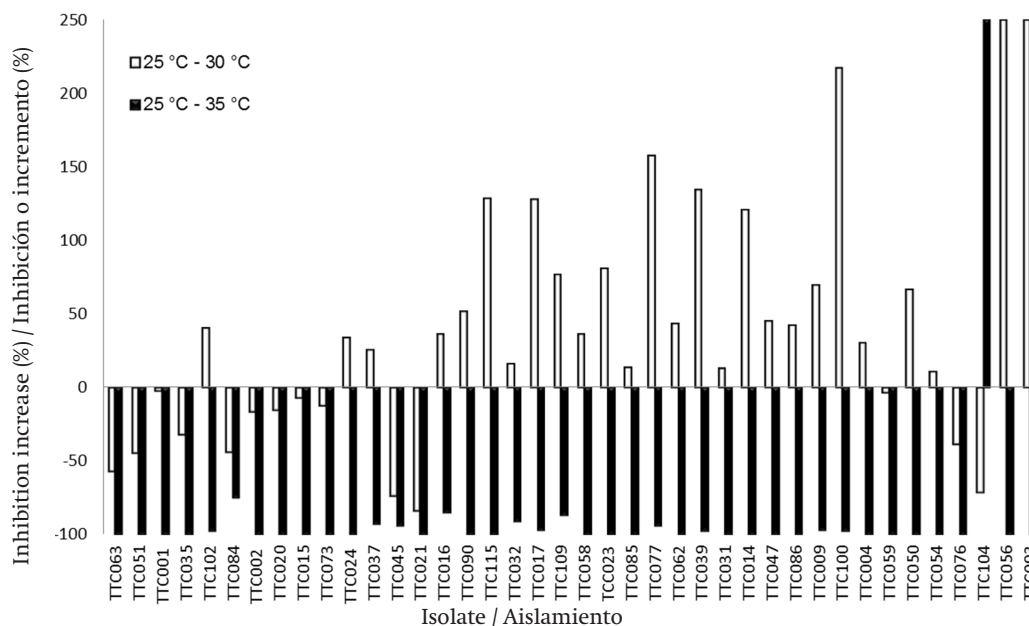


Figure 2. Inhibition changes or increase in the production of isolate conidia native to *Trichoderma* when surpassing 25 to 30 °C and 25 to 35 °C.

Figura 2. Cambios de inhibición o incremento en la producción de conidios de aislamientos nativos de *Trichoderma* al pasar de 25 a 30 °C y de 25 a 35 °C.

for the biological control of *M. roreri* are: TTC017 of *T. virens*, and TTC090, TTC039 and TTC073 of *T. harzianum*. The variability of the isolates in the assessed characteristics demonstrates the importance of *in vitro* characterization and manifests the potential of the native species of *Trichoderma* for the development of bio fungicides on *M. roreri*. Future studies will have to be implemented for the evaluation of the isolates selected under field conditions.

Acknowledgements

This work was financed by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) of the Secretaría de Educación Pública.

TTC001, TTC035 (*T. asperellum*); TTC102 (*T. virens*); y TTC115 (*T. harzianum*), con una producción superior de 1×10^9 conidios·mL⁻¹.

Conclusiones

Los resultados demuestran que, en el agroecosistema cacao, seis de nueve especies existentes de *Trichoderma* presentan capacidad antagónica sobre *M. roreri*. De acuerdo con los datos presentados en este trabajo, los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron variabilidad intraespecífica en cuanto a parasitismo, antibiosis, crecimiento micelial y esporulación. El rango de temperatura favorable para los aislamientos nativos de *Trichoderma* fue de 25 a 30 °C. Con base en las características evaluadas, los aislamientos promisorios para el control biológico de *M. roreri* son: TTC017 de *T. virens*, y TTC090, TTC039 y TTC073 de *T. harzianum*. La variabilidad de los aislamientos en las características evaluadas demuestra la importancia de la caracterización *in vitro*, y manifiesta el potencial de las especies nativas de *Trichoderma* para el desarrollo de biofungicidas sobre *M. roreri*. Futuros estudios deberán implementarse para la evaluación de los aislamientos seleccionados bajo condiciones de campo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública.

End of English version

Fin de la versión en español

References / Referencias

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. doi: 10.1093/jee/18.2.265a
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., ... Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), 24–35. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.01.003
- Bateman, R. P., Hidalgo, E., García, J., Arroyo, C., Ten Hoopen, G. M., Adonijah, V., & Krauss, U. (2005). Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 147(2), 129–138. doi: 10.1111/j.1744-7348.2005.00012.x
- Dimbi, S. N., Maniania, N. K., Lux, S. A., & Mueke, J. M. (2004). Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*, 49(1), 83–94. doi: 10.1023/B:BI CO.0000009397.84153.79
- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2(2), 149–160. doi: 10.1007/s11557-006-0053-4
- García-Simoes, M. L., Tauk-Tornisiello, S. M., Rocha-Niella, G., & Tapia-Tapia, D. M. (2012). Evaluation of *Trichoderma* spp. for the biocontrol of *Moniliophthora perniciosa* Subgroup 1441. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), 18–36. doi: 10.5296/jbls.v3i1.1097
- Holmes, K. A., Schroers, H. J., Thomas, S. E., Evans, H. C., & Samuels, G. J. (2004). Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from Amazon basin in South America. *Mycological Progress*, 3(3), 199–210. doi: 10.1007/s11557-006-0090-z
- Hoyos-Carvajal, L., Duque, G., & Orduz, P. S. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2(1), 76–86. doi: 10.17584/rcch.2008v2i1.1175
- Jalil, R. C., Norero, S. A., & Apablaza, G. (1997). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y de su antagonista *Trichoderma harzianum*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 24(2), 2–4. Obtenido de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CL1999000466>
- Krauss, U., & Soberanis, W. (2001). Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological Control*, 22(2), 149–158. doi: 10.1006/bcon.2001.0956
- Krauss, U., Ten, H. G., Hidalgo, E., Martínez, A., Stirrup, T., Arroyo, C., ... Palacios, M. (2006). The effect of cane molasses amendment biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) of cocoa (*Theobroma cacao*) in Panama. *Biological Control*, 39(1), 232–239. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.06.005
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, 4(1), 1–4. doi: 10.1007/s101230100001
- Phillips, M. W., Coutiño, A., Ortiz, C. F., López, A. P., Hernández, J., & Aime, M. C. (2006). First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology*, 55(4), 584. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01418.x
- Phillips, M. W., & Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod of cocoa: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology*, 97(12), 1644–1647. doi: 10.1094/PHYTO-97-12-1644
- Phillips-Mora, W., Arciniegas-Leal, A., Mata-Quiros, A., & Motomajor-Arias, J. C. (2012). *Catálogo de clones de cacao*. Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Soberanis, W., Ríos, R., Arévalo, E., Zúñiga, L., Cabezas, O., & Krauss, U. (1999). Increased frequency of phytosanitary pod removal in cocoa (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. *Crop Protection*, 18, 677–685. doi: 10.1016/S0261-2194(99)00073-3
- Sobieralski, K., Siwulski, M., Komon, Ż. M., Błaszczyk, L., Górski, R., Spiżewski, T., & Sas, G. I. (2012). Evaluation of the growth of *Trichoderma pleurotum* and *Trichoderma pleuroticola* isolates and their biotic interaction with *Pleurotus* sp. *Journal of Plant Protection Research*, 52, 235–239. doi: 10.2478/v10045-012-0037-0
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (1998). SAS/STAT 6.03 User's guide. Cary, NC, USA: Author.
- Torres-de la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De la Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 947–961. doi: 10.1016/j.rmb.2015.07.012
- Torres-de la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, A., & Nava-Díaz C. (2011). Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri* [Cif y Par.] Evans et al.) of cocoa (*Theobroma cacao*) in Tabasco, Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 93, 31–36. doi: 10.4454/jpp.v93i1.270
- Vázquez, L. L., Matienzo, Y., Veitia, M., & Alfonso, J. (2008). *Conservación y manejo de enemigos naturales de insectos fitófagos en los sistemas agrícolas de Cuba*. Cuba: INISAV.
- Vélez-Arango, P., Estrada-Valencia, M., González-García, M. T., Valderrama-Fonseca, A. M., & Bustillo-Pardey, A. E. (2001). Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas*, 62(1), 38–53. Obtenido de <http://www.sidalc.net/REPDOC/A2113E/A2113E.PDF>