



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS**

**CAPTURA, ACTIVIDAD BIOLÓGICA E  
IDENTIFICACION DE VOLÁTILES DE LA  
INTERACCIÓN *Trichoderma asperellum* - *Sclerotium rolfsii*.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN**

**MANEJO AGROECOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES**

**PRESENTA**

**ARELY RUIZ ROSALES**



**YAUTEPEC, MORELOS, DICIEMBRE DE 2011**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, siendo las 14:00 horas del día 4 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis titulada:

"Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* – *Sclerotium rolfsii*"

Presentada por el alumno:

Ruíz Rosales Arely  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	3	0	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

M. EN C. LETICIA BRAVO LUNA

DRA. NORMA REYNA ROBLEDO QUINTOS

DR. ROBERTO MONTES BELMONT

DR. ÁNGEL RENÉ ARZUFFI BARRERA

DRA. GABRIELA SEPÚLVEDA JIMÉNEZ

DRA. KALINA BERMÚDEZ TORRES

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. ANTONIO RUPERTO JIMÉNEZ APARICIO





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

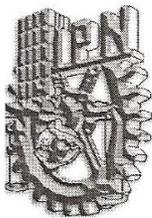
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Yauatepec, Mor. siendo el día 02 del mes de diciembre del año 2011, la que suscribe Arely Ruiz Rosales alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades, con número de registro B091308, adscrita al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la M. en C. Leticia Bravo Luna y la Dra. Norma Reyna Robledo Quintos y cede los derechos del trabajo intitulado "Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* – *Sclerotium rolfsii*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo, sin el permiso expreso de la autora y/o directoras del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6.0, Calle CeProBi No.8, Col. San Isidro, C.P. 62731 Yauatepec, Morelos, México, Fax: (01) (55) 57296000 ext. 82512 ó 01-7353941896, e-mail: [ceprobi@ipn.mx](mailto:ceprobi@ipn.mx) (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Ing. Arely Ruiz Rosales



## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis “Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* – *Sclerotium rolfsii*”, es responsabilidad de la M. en C. Leticia Bravo Luna, la Dra. Norma Reyna Robledo Quintos e Ing. Arely Ruiz Rosales y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos a 02 de Diciembre del 2011

ATENTAMENTE

M. en C. Leticia Bravo Luna  
Nombre y firma de directora de tesis

Dra. Norma Reyna Robledo Quintos  
Nombre y firma de directora de tesis

Ing. Arely Ruiz Rosales  
Alumna

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Interacciones Planta-Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la M. en C. Leticia Bravo Luna y la Dra. Norma Reyna Robledo Quintos; así como el Laboratorio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de CONACYT (becario 36154) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN. La investigación fue realizada con el financiamiento otorgado a los proyectos de la SIP (20111155), CONACYT (36154).

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CEPROBI, esta institución de calidad, que me brindó todo el apoyo durante mi estancia.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de la Maestría.

Agradezco a mi Directora de tesis, la M. en C. Leticia Bravo Luna, por sus conocimientos invaluable que me brindó para llevar a cabo esta investigación y sobre todo por su gran paciencia para esperar a que este trabajo pudiera llegar a su fin.

Agradezco a la Dra. Norma Reyna Robledo Quintos, también Directora de tesis por su gran apoyo en la parte de GC-DSM y aportaciones a este trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado, el Dr. Ángel René Arzuffi Barrera, Dr. Roberto Montes Belmont, Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez y a la Dra. Kalina Bermúdez Torres, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan.

Agradezco a mis compañeros y amigos de mil batallas de la MAPE, Tepole, Ivonne, Kathia, Adriana, Olga y Jesús que fueron parte de una gran experiencia.

## DEDICATORIA

### ***A Dios.***

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

### ***A mi madre.***

*Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero sobretodo, por su amor.*

### ***A mi padre.***

*Por los ejemplos de perseverancia, constancia y humanidad que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.*

### ***A mis hermanos***

*Marlon y Oscar por que a pesar de la distancia siempre han estado conmigo.*

*A los grandes amores de mi vida que siempre estuvieron y estarán conmigo. LOS AMO POR SIEMPRE.*

*A Letos por ser una hermana para mí, gracias por ser la persona y ser humano que eres T. Q. M.*

*A mis dos grandes amigos y compañeros, a quienes amo mucho Marco y Nancy.*

*Y a mis fieles e incondicionales amigos: Milo, Solo y No<sup>+</sup>*

## CONTENIDO

	PÁGINA
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	i
<b>INDICE DE CUADROS</b>	ii
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 <i>Trichoderma</i> spp.	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Taxonomía y morfología	3
2.1.3 Proceso de localización y control del patógeno	5
2.1.4 Mecanismos de acción	5
2.1.4.1 Competencia	6
2.1.4.2 Parasitismo (Micoparasitismo)	6
2.1.4.3 Antibiosis	10
2.1.4.3.1 Metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> spp.	10
2.1.4.3.2 Antibiosis con compuestos no volátiles	11
2.1.4.3.3 Antibiosis con compuestos volátiles	12
2.2 <i>Sclerotium rolfii</i> Sacc.	14
2.2.1 Generalidades	14
2.2.2 Taxonomía y morfología	15
2.2.3 Organismos antagónicos	16
2.2.4 Control químico	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>4. OBJETIVOS</b>	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
5.1 Propagación de <i>Sclerotium rolfii</i>	21

5.2 Propagación de <i>Trichoderma asperellum</i>	21
5.3 Dispositivo de captura de compuestos volátiles durante la interacción <i>Trichoderma asperellum</i> - <i>Sclerotium rolfsii</i>	22
5.4 Interacción <i>T. asperellum</i> - <i>S. rolfsii</i>	23
5.4.1 Determinación de los días de mayor inhibición del crecimiento micelial de <i>S. rolfsii</i> durante la interacción	24
5.4.2 Extracción de compuestos volátiles en los días de mayor inhibición del crecimiento micelial de <i>S. rolfsii</i>	24
5.5 Pruebas biológicas	25
5.6 Identificación de compuestos volátiles	26
5.7 Análisis estadístico	26
<b>6. RESULTADOS</b>	28
6.1 Determinación de los días de mayor actividad antifúngica en las interacciones de <i>T. asperellum</i> – <i>S. rolfsii</i>	28
6.2 Efecto de la interacción <i>T. asperellum</i> – <i>S. rolfsii</i> de los días 9, 12 y 15 sobre el comportamiento de <i>T. asperellum</i> y <i>S. rolfsii</i>	31
6.3 Pruebas biológicas	33
6.4 Identificación de compuestos volátiles del día 9 con actividad biológica	37
<b>7. DISCUSIÓN</b>	41
<b>8. CONCLUSIONES</b>	48
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	49
<b>10. LITERATURA CITADA</b>	50
<b>11. ANEXO</b>	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.- Dispositivo elaborado para la captura de compuestos volátiles de la interacción <i>Trichoderma asperellum</i> - <i>Sclerotium rolfsii</i> .	23
Figura 2. Crecimiento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> por efecto de los compuestos volátiles de <i>Trichoderma asperellum</i> .	29
Figura 3. Producción de esclerocios de <i>Sclerotium rolfsii</i> por efecto de los compuestos volátiles de <i>Trichoderma asperellum</i> .	29
Figura 4.- Cromatograma de compuestos volátiles identificados (extraídos con diclorometano) de la interacción de <i>Trichoderma asperellum</i> en presencia y en ausencia de <i>Sclerotium rolfsii</i> ..	40

## INDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Clasificación de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre fitopatógenos de acuerdo a Bell y Markham (1982) y modificado por Ruiz (2010).	9
Cuadro 2.- Producción de esporas de <i>Trichoderma asperellum</i> en presencia y ausencia de <i>Sclerotium rolfsii</i> .	30
Cuadro 3.- Efecto de la interacción <i>T. asperellum</i> - <i>S. rolfsii</i> sobre la esporulación de <i>T. asperellum</i> y crecimiento y formación de esclerocios de <i>S. rolfsii</i> del día 9.	32
Cuadro 4.- Efecto de la interacción <i>T. asperellum</i> - <i>S. rolfsii</i> sobre la esporulación de <i>T. asperellum</i> y crecimiento y formación de esclerocios de <i>S. rolfsii</i> del día 12.	32
Cuadro 5.- Efecto de la interacción <i>T. asperellum</i> - <i>S. rolfsii</i> sobre la esporulación de <i>T. asperellum</i> y crecimiento y formación de esclerocios de <i>S. rolfsii</i> del día 15.	32
Cuadro 6. Efecto de compuestos volátiles obtenidos con metanol de la interacción de <i>T. asperellum</i> - <i>S. rolfsii</i> de los días 9, 12 y 15 sobre el desarrollo de <i>S. rolfsii</i> .	34
Cuadro 7. Efecto de compuestos volátiles obtenidos con diclorometano de la interacción de <i>T. asperellum</i> - <i>S. rolfsii</i> de los días 9, 12 y 15 sobre el desarrollo de <i>S. rolfsii</i> .	35

Cuadro 8. Efecto de compuestos volátiles obtenidos con hexano de la interacción de <i>T. asperellum</i> - <i>S. rolfsii</i> de los días 9, 12 y 15 sobre el desarrollo de <i>S. rolfsii</i> .	36
Cuadro 9. Compuestos volátiles identificados (extraídos con metanol, diclorometano y hexano) en la interacción de <i>T. asperellum</i> en presencia y ausencia de <i>S. rolfsii</i> del día 9.	38
Cuadro 10. Área bajo la curva de los compuestos volátiles producidos por <i>T. asperellum</i> en presencia y ausencia de <i>S. rolfsii</i> .	39

## RESUMEN

*Trichoderma asperellum* presenta mecanismos de acción de micoparasitismo y antibiosis con compuestos no volátiles, para competir por espacio y nutrientes, pero se desconoce si produce compuestos volátiles (CV) que presenten actividad antifúngica sobre *Sclerotium rolfsii*. Los objetivos de este trabajo fueron: a) capturar los CV producidos durante la interacción de *T. asperellum*-*S. rolfsii*, b) determinar el efecto de CV generados en la interacción *T. asperellum*-*S. rolfsii*, sobre la producción de esporas de *Trichoderma* y sobre el crecimiento micelial, producción y viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii*, c) determinar el efecto de los CV extraídos con metanol, diclorometano y hexano en el crecimiento micelial, producción y viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii* y d) identificar los CV mayoritarios con actividad antifúngica por CG-DSM. Se diseñó un dispositivo para la interacción de los dos hongos y para la captura de CV. La actividad biológica de los CV sobre *S. rolfsii* se determinó por la técnica de Ojika (2008) y la identificación de los CV se determinó por GC-DMS. Los días de menor crecimiento micelial y producción de esclerocios de *S. rolfsii* en la interacción estuvieron entre 9 y 21; aunque los esclerocios tuvieron 100% de viabilidad. En estos días se observó la mayor producción de esporas de *T. asperellum*, siendo en presencia de *S. rolfsii* significativamente mayor que en su ausencia. Los CV extraídos con metanol, diclorometano y hexano del día 9 inhibieron el crecimiento micelial y producción de esclerocios de *S. rolfsii*, considerándose la actividad biológica como fungistática. Se identificaron los CV: 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, tolueno, etilbenceno, p-xileno, m-xileno,  $\alpha$ -pineno, 3-etil-ciclopentanona, fenol y fenil etil alcohol, los cuales fueron más abundantes en presencia de *S. rolfsii*. Solo los compuestos 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, tolueno y fenol, han sido reportados en otras especies de *Trichoderma*.

## ABSTRACT

*Trichoderma asperellum* presents mechanisms of action of mycoparasitism and antibiosis nonvolatile compounds to compete for space and nutrients, but whether produced volatiles (CV) showing antifungal activity of *Sclerotium rolfsii*. The objectives were: a) capture the volatile compounds during the interaction *T. asperellum*-*S. rolfsii*, b) determine the effect of volatile compounds generated in the interaction *T. asperellum*-*S. rolfsii*, on production of spores of *Trichoderma* and mycelial growth, production and viability of sclerotia of *S. rolfsii*, c) determine the effect of volatile compounds extracted with methanol, dichloromethane and hexane in the mycelial growth, production and viability of sclerotia of *S. rolfsii* d) identify by GC-MS, the major volatile compounds with antifungal activity. Was designed a device for the interaction of the two fungi and capture CV. Biological activity of volatile compounds on *S. rolfsii* was determined by the technique of Ojika (2008) and identification of volatile compounds were determined by GC-MS. The days of lower mycelial growth and production of sclerotia of *S. rolfsii* in the interaction were between 9 and 21, although the sclerotia had 100% viability. These days observed the increased production of spores of *T. asperellum*, being in the presence of *S. rolfsii* significantly higher than in its absence. The CV extracted with methanol, dichloromethane and hexane on 9 inhibited the mycelial growth and production of sclerotia of *S. rolfsii*, considering the fungistatic activity. Volatile compounds were identified: 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, toluene, ethylbenzene, p-xylene, m-xylene,  $\alpha$ -pinene, 3-ethyl-cyclopentanone, phenol and phenyl ethyl alcohol, which were more abundant in the presence of *S. rolfsii*. Only the compounds 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, toluene and phenol, have been reported.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de fungicidas químicos, su efecto en el medio ambiente y el detrimento en la salud de los productores y consumidores, han contribuido a la búsqueda de alternativas como la utilización de microorganismos antagonistas (Harman y Kubicek, 1998); algunos de ellos registrados como productos comerciales, elaborados principalmente con bacterias y hongos. Uno de los géneros más estudiados en el control biológico es *Trichoderma*. Este hongo se puede encontrar en todo el mundo (Schuster y Schmoll, 2010), es un hongo oportunista, avirulento a plantas, un buen colonizador de su hábitat y compite con muchos hongos fitopatógenos. Los productos a base de *Trichoderma* spp. son los antagonistas más estudiados y comercialmente vendidos como bioplaguicidas, biofertilizantes y como enmiendas de suelo (Harman *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2004). Las especies más estudiadas en este campo son *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum* (Benitez *et al.*, 2004).

De acuerdo a Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), los metabolitos secundarios que produce *Trichoderma* son clasificados en tres categorías: a) peptaiboles, b) antibióticos polares y c) antibióticos volátiles. Los antibióticos volátiles son compuestos de bajo peso molecular y no polares que se liberan en una alta concentración en el suelo con efecto sobre la comunidad microbiana a larga distancia; por el contrario, un efecto a corta distancia (cerca de las hifas del hospedero), puede estar dado por antibióticos polares y por peptaiboles (Lorito *et al.*, 1996).

La toxicidad de los volátiles está relacionada con la capacidad hidrofóbica de adsorberse dentro de las membranas celulares, formando una capa hidrorepelente sobre la pared celular, que impide la absorción de agua por la célula del hongo patógeno (Scarselletti y

Faull, 1994). La función y efectos de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* y su posible sinergismo con otros compuestos no han sido elucidados por completo (Howell, 1998; Serrano-Carreón *et al.*, 1993; Claydon *et al.*, 1987).

En este trabajo se abordaron algunos aspectos sobre la producción y actividad de los compuestos volátiles de *T. asperellum* sobre *Sclerotium rolfii* que es un hongo de importancia agrícola debido a que tiene una amplia variedad de hospederos (alrededor de 500 especies de plantas), a su capacidad de desarrollo como saprófito y a su crecimiento prolífico, ya que los esclerocios se producen en grandes cantidades y pueden sobrevivir por muchos años en el suelo en condiciones adversas (Punja, 1996). Para el control de este patógeno se utilizan productos químicos, se realizan prácticas culturales y la combinación de los dos, aunque no son del todo satisfactorios (Montes-Belmont *et al.*, 2003; Khattabi *et al.*, 2001; Agrios, 1999; Ramírez *et al.*, 1998, Elad *et al.*, 1983).

*Trichoderma* mediante parasitismo y antibióticos no volátiles, inhibe la viabilidad y producción de esclerocios así como el crecimiento micelial de *S. rolfii* (Ruiz, 2010; Pérez-Moreno *et al.*, 2005; Artigues y Davet, 1984; Punja *et al.*, 1984). Sin embargo, se desconoce si los compuestos volátiles de *T. asperellum* presentan actividad biológica sobre *S. rolfii*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Trichoderma* spp.

#### 2.1.1 Generalidades

*Trichoderma* (Telemorfo *Hypocrea*) es la etapa asexual de este hongo y es como se encuentra en el suelo de todas las zonas climáticas, es un invasor oportunista secundario, de fácil crecimiento, produce gran cantidad de esporas, una fuente de enzimas degradadoras de pared celular (celulasas, quitinasas, glucanasas, etc.) y es importante productor de antibióticos. Numerosas cepas de este género son “competidores de la rizósfera” y son capaces de degradar compuestos de hidrocarburos, clorofenólicos, polisacáridos y xenobióticos utilizados como plaguicidas en la agricultura (Harman *et al.*, 2004; Harman y Kubicek, 1998). Los principales mecanismos de biocontrol que *Trichoderma* utiliza en confrontación directa con los fitopatógenos son micoparasitismo (Howell, 2003; Harman y Kubicek, 1998; Papavizas, 1985) y antibiosis (Howell, 1998; Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998).

*Trichoderma* controla principalmente hongos fitopatógenos del suelo como *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*, así como también *Alternaria* y *Botrytis*, considerados como hongos aéreos (Ruiz, 2010; Guigón-López y González-González, 2004; Hjeljord *et al.*, 2001).

#### 2.1.2 Taxonomía y morfología

Considerando las aportaciones de Rossman *et al.* (1999) la clasificación taxonómica del género *Trichoderma*, podría ser de la siguiente manera:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Euascomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Especie: *Trichoderma asperellum* Samuels.

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, después se torna a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa (Rifai, 1969). El micelio es delgado en su mayoría y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados y se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregulares de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios (2.5 a 3.0  $\mu\text{m}$ ) que son de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Harman, 2003).

Además de los conidióforos, las esporas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio. La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova *et*

*al.*, 1999). No obstante, las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30° C); debido a lo anterior se dice, que *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Díaz, 1994).

### **2.1.3 Proceso de localización y control del patógeno**

El primer evento denominado reconocimiento está influenciado por la interacción de carbohidrato - lectina, que provee las bases para la interacción específica y es el detonante de una cascada de eventos que eventualmente se dirigen hacia la destrucción del hospedero. Entre *Trichoderma* spp. y *S. rolfsii*, las lectinas participan en el reconocimiento e interacción, y las  $\beta$ -1-3-glucanasas son necesarias para la aglutinación (Inbar y Chet, 1997).

### **2.1.4 Mecanismos de acción**

En *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre los principales están la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa sobre el hospedero (Lorenzo, 2001). Otros autores sugieren mecanismos que incluyen además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores del crecimiento micelial (Haram *et al.*, 1996; Zimand *et al.*, 1996).

*Trichoderma* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta; entre estos se pueden mencionar: a) los que inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta para inducir la resistencia (Harman *et al.*, 2004),

b) la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos, c) la desactivación de enzimas de los patógenos durante el proceso de infección y d) la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Esto contribuye a que la planta tenga un ambiente favorable para su desarrollo radical, lo que aumenta su tolerancia al estrés (Harman, 2003).

La diversidad de mecanismos empleados permite que sean colonizadores exitosos en sus hábitats, lo cual se refleja en la utilización eficiente de sustratos y en la liberación de metabolitos secundarios y enzimas, capaces de hacer frente a diversos entornos, desde el rico y diverso bosque tropical húmedo y estéril bioreactor o matraz en agitación (Schuster y Schmoll, 2010).

#### **2.1.4.1 Competencia**

La competencia se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes, luz); la competencia se dará siempre y cuando la utilización del requerimiento por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo y por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Hjeljord y Tronsomo, 1998; Ahmad y Baker, 1987).

#### **2.1.4.2 Parasitismo (Micoparasitismo)**

El parasitismo se define como una simbiosis antagónica entre organismos y consiste en la utilización del organismo como alimento por su antagonista (Chet, 1990). No

obstante, existen aspectos que no están totalmente esclarecidos ya que es un proceso complejo, por esta razón su estudio se ha dividido en cuatro etapas (Chet y Benhamou, 1998), las cuales son:

**A) Reconocimiento.-** Se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular y su ambiente extracelular, ellas reconocen por lo menos dos sitios en carbohidratos, por lo que aglutinan células y precipitan gluco conjugados (Hernández-Cruz *et al.*, 2005). En *Rhizoctonia solani* Kühn y *S. rolfsii* se encontraron evidencias directas, de que las lectinas están involucradas en el micoparasitismo (Pérez, 2004; Chet e Inbar, 1994).

**B) Crecimiento quimiotrófico:** El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico (Chet, 1990). En la etapa de localización del hospedante, *Trichoderma* puede detectarlo a distancia gracias a algunos estímulos de las hifas (gradiente de excretas químicas) que crecen en dirección al patógeno como respuesta (Elad y Chet, 1983).

**C) Adhesión y enrollamiento:** Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de estas, todo esto está mediado por procesos enzimáticos (Pérez, 2004). Según Elad y Chet (1983), la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

**D) Actividad lítica:** En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista

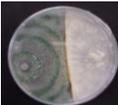
(Haram *et al.*, 1996). En los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante. Las especies de *Trichoderma* tienen un elevado potencial parasítico, con una actividad metabólica muy particular, que les permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas (Sandoval y Lopez, 2002). Desde el punto de vista práctico las enzimas se toman en cuenta como criterio en la selección de aislamientos (Elad *et al.*, 1983).

El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, por ejemplo los organismos benéficos biotróficos mantienen una relación de equilibrio con el hospedero, tienen una variedad restringida de hospederos y producen estructuras especializadas para absorber los nutrientes de la célula viva hospedera (Inbar e Chet, 1997; Manocha, 1991). En el caso de organismos benéficos necrotróficos o destructivos, se les atribuye la producción de antibióticos, toxinas y enzimas hidrolíticas en cantidades que causan la muerte o destrucción de uno o más componentes del hospedero, por ejemplo *Trichoderma* (Manocha, 1991).

Bell y Markham (1982), propusieron una escala de antagonismo que indirectamente muestra el parasitismo en una confrontación *in vitro* de *Trichoderma* sobre fitopatógenos (Cuadro 1). De acuerdo a esta escala se ha reportado la actividad de *Trichoderma asperellum* cepa Tc74 (antagonista utilizado en este trabajo) sobre *S. rolfsii* (12 aislamientos), *Fusarium* spp. (8 aislamientos), *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp. y *Colletotrichum* sp. donde *T. asperellum* creció completamente sobre los fitopatógenos en la mayoría de los casos (clase 1) (Ramírez, 2011; Marini, 2010; Ortega, 2010; Ruíz, 2010).

En otro estudio se observó que *T. viride* 117 inhibió completamente el crecimiento micelial de *S. rolfsii*, mientras que *T. harzianum* 74 y *Trichoderma* sp. disminuyeron el crecimiento micelial, estos resultados se confirmaron mediante microscopía electrónica, donde se observó que las tres especies de *Trichoderma* paralizaron la hifa de *S. rolfsii* por contacto directo, formando enrollamientos y ganchos en las ramificaciones, en el caso de *T. harzianum* 74, produjo además un material fibrilar en mayor concentración que *T. viride* 117 (Roberti *et al.*, 1996).

Cuadro 1. Clasificación de antagonismo de *Trichoderma* sobre fitopatógenos de acuerdo a Bell y Markham (1982) y modificado por Ruiz (2010).

Clase		Descripción
1		<i>Trichoderma</i> crecido completamente sobre el fitopatógeno.
2		<i>Trichoderma</i> crecido sobre el fitopatógeno menos de 2/3 partes.
3		<i>Trichoderma</i> y fitopatógeno crecidos ambos a la mitad de la superficie del medio y ninguno de los organismos parece dominar al otro.
4		Fitopatógeno crecido menos de 2/3 partes de la superficie del medio y parece resistir la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5		Fitopatógeno crecido sobre <i>Trichoderma</i> menos de 2/3 partes.
6		Fitopatógeno crecido completamente sobre <i>Trichoderma</i>

### **2.1.4.3 Antibiosis.**

La antibiosis es la inhibición del desarrollo o muerte de un organismo por un producto metabolizado por otro organismo. Esto ocurre durante las interacciones *Trichoderma*-hongo involucrando enzimas líticas extracelulares, antibióticos y difusión de compuestos de bajo peso molecular producidos por *Trichoderma* que inhibe el crecimiento de otro microorganismo (Schirmböck *et al.*, 1994). Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos tanto volátiles como no volátiles que impiden la colonización de microorganismos (Vey *et al.*, 2001; Howell, 1993).

#### **2.1.4.3.1 Metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp.**

El término “metabolito secundario” incluye un grupo heterogéneo de compuestos naturales de diferente composición química, posiblemente relacionados con funciones de sobrevivencia del organismo, tales como competencia contra otros micro y macroorganismos, simbiosis, transporte de metal, diferenciación, etc. (Demain y Fang, 2000). Los hongos antagonistas con el fin de sobrevivir y competir por un nicho ecológico, no solo utiliza sus enzimas, sino que utiliza compuestos químicos derivados de su metabolismo secundario (Schuster y Schmoll, 2010).

*Trichoderma* produce gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991) entre estos, los antibióticos, los cuales son productos naturales capaces de inhibir el crecimiento microbial. La producción de antibióticos es a menudo correlacionado con la habilidad de biocontrol; se ha demostrado que la aplicación directa de compuestos

antibióticos tiene similar efecto sobre el patógeno hospedero, que cuando se utiliza el organismo correspondiente.

La producción de metabolitos secundarios por *Trichoderma* spp. depende de la cepa; de acuerdo a Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), estos fueron clasificados en tres categorías:

a) Peptaiboles, los cuales son oligopéptidos lineales de 12 a 22 aminoácidos ricos en ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Rebuffat *et al.*, 1989; Le Doan *et al.*, 1986) como las trichorzianinas.

b) Antibióticos polares como ácido heptelídico y ácido koníngico, gliotoxina, gliovirina, viridiol y viridina.

c) Antibióticos volátiles por ejemplo 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP), 6-pent-1-enil- $\alpha$ -pirona, koninginina A, cloroformo, 5-metil-2-etilfuran y muchos de los derivados de isocianidos, las cuales pertenecen a las pironas.

Las estructuras químicas de antibióticos de *Trichoderma*, sugieren dos mecanismos de acción diferentes: antibiosis con compuestos no volátiles y antibiosis con compuestos volátiles.

#### **2.1.4.3.2 Antibiosis con compuestos no volátiles**

La antibiosis con compuestos no volátiles (compuestos polares y peptaiboles) tienen efecto a corta distancia, actuando cerca de la hifa del hospedero (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991). Lorito *et al.* (1996) demostraron que los peptaiboles inhibieron la actividad de  $\beta$ -glucano sintetasa (cuya función es la reconstrucción de la pared celular) en el hongo hospedero, facilitando así la acción destructiva de  $\beta$ -

glucanasas; en cambio actuaron sinérgicamente con las  $\beta$ -glucanasas de *T. harzianum*. El sinergismo existente entre enzimas y antibióticos polares está estrechamente relacionado a su mecanismo de acción (Fogliano *et al.*, 2002; Lorito *et al.*, 1996; Schirmböck *et al.*, 1994). Aunque la función y efectos de los peptaiboles no es clara, el modo de acción de otros metabolitos secundarios de *Trichoderma* (por ejemplo pironas) y su posible sinergismo con otros compuestos no han sido elucidados (Howell, 1998; Serrano-Carreón *et al.*, 1993; Claydon *et al.*, 1987).

Una técnica práctica para determinar la antibiosis de *Trichoderma* es mediante la técnica de papel celofán reportada por Dennis y Webster (1971a), la cual se ha utilizado como uno de los criterios para la selección de antagonistas, en el caso de *T. asperellum* Tc74 se reportó que inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* (84.6%), *Pestalotia* sp. (71.3%), *Alternaria* sp. (82%) y *Colletotrichum* sp. (78%) que fueron aislados de *Cupressus macrocarpa*, efecto similar se observó en *Fusarium* sp. (78%) y *Curvularia* sp. (72%) aislados de cormos de gladiolo (Marini, 2010), mientras que en *Fusarium* spp. aislados de jitomate la inhibición fue entre 33.1 a 61.8% (Ortega, 2010).

#### **2.1.4.3.3 Antibiosis con compuestos volátiles**

La antibiosis con compuestos volátiles (compuestos de bajo peso molecular y no polares) se producen en una alta concentración en el ambiente del suelo, con un rango de influencia relativamente larga sobre la comunidad microbiana (Lorito *et al.*, 1996; Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991).

La toxicidad de los volátiles está relacionada con la capacidad hidrofóbica de adsorberse dentro de las membranas celulares, formando una capa hidrófoba sobre la pared

celular, que impide la absorción de agua por la célula del hongo (Scarselletti y Faull, 1994). La función y efectos de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* y su posible sinergismo con otros compuestos no han sido elucidados por completo (Howell, 1998; Serrano-Carreón *et al.*, 1993; Claydon *et al.*, 1987).

El primer estudio sobre compuestos volátiles fue con *T. viride* donde se identificaron la 6PAP (Collins y Halim, 1972; Prapulla *et al.*, 1992) y la 6-pent-1-eni1- $\alpha$ -pirona (Moss *et al.*, 1975).

En *T. harzianum* se identificó la 6PAP (Claydon *et al.*, 1987; Hanssen y Urbasch, 1990; Merlier *et al.*, 1984), 6-pent-1-eni1- $\alpha$ -pirona (Claydon *et al.*, 1987), koninginina A, koninginina B (Almassi *et al.*, 1991), koninginina D (Dunlop *et al.*, 1989); koninginina E, seco-koninginina e hidroxí koninginina B (Ghisalberti y Rowland, 1993).

En el caso de *T. koningii* los compuestos volátiles identificados son 6PAP (Simon *et al.*, 1988; Hanssen y Urbasch, 1990; Cutler *et al.*, 1986; Benoni *et al.*, 1990), koninginina A (Cutler *et al.*, 1989), koninginina B (Cutler *et al.*, 1991), koninginina C (Parker *et al.*, 1995a) y koninginina E (Parker *et al.*, 1995b).

En *T. atroviride* se identificaron 25 compuestos volátiles como cloroformo, 5-metil-2-etilfuran, tolueno, 1,2-dicloroetano, 2-metil-1-propanol n-C<sub>12</sub>, limoneno, 2-metil-1-butanol, 2-pentil furan, C<sub>3</sub>-benceno, 3-metil-beten-1-ol, 6-metil-2-heptanona, 3-octanona, 3-octanol, 1-octen-3-ol, 2-butanona, 2-decanona, lilo1, 2-(2-etoxi-etoxi) etanol, tert.butil-p-metoxibenceno, sesquiterpeno, 5-etileno-dihidro-5-metil-2-furanona, benzotiazol, lilo3, di-n-etilftalato, diterpeno (Nemcovic *et al.*, 2008).

En *Trichoderma* spp. 6PAP (Kikuchi *et al.*, 1974; Hill *et al.*, 1995), Masoilactona, 8-decenolactona (Hill *et al.*, 1995). Por otro lado Dal Bello *et al.* (1997) reportaron que *Trichoderma hamatum* crecido en agar dextrosa y papa liberó compuestos volátiles como bióxido de carbono, etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentanol.

De todos los compuestos reportados se tiene referencia que el compuesto 6PAP aislado de *T. harzianum* y *T. koningii* inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn (Dennis y Webster, 1971a).

## **2.2 *Sclerotium rolfsii* Sacc.**

### **2.2.1 Generalidades**

Es el agente causal de la enfermedad conocida como tizón sureño, produce amarillamientos en las hojas inferiores, hundimientos, ablandamientos y decoloraciones de la corteza debajo de la línea del suelo. Con el avance de la enfermedad se da el marchitamiento de hojas y ramas superiores hasta que la planta muere. La formación de esclerocios aparecen generalmente en grandes cantidades, en la base de los tallos de las plantas afectadas (Alonso-Reyes *et al.*, 2002). Para el desarrollo de esta enfermedad requiere temperaturas de 15 a 21° C y alta humedad relativa (Tlapal, 2008; Ferreira y Boley, 1992).

Se sabe que *S. rolfsii* es un hongo de importancia agrícola, debido a que tiene un amplio rango de hospederos (alrededor de 500 especies de plantas), a su capacidad de desarrollo como saprófito y a su crecimiento prolífico, ya que los esclerocios se producen en grandes cantidades y pueden sobrevivir por muchos años en el suelo en condiciones adversas (Punja, 1996). En México se ha encontrado en diversos cultivos

como cebolla, manzano, frijol, jitomate, entre otros (Ortega, 2010; Hernández-Jiménez *et al.*, 2004), aunque en México *S. rolfsii* no tiene importancia agrícola en el cultivo de jitomate en otras partes del mundo se ha reportado como un fitopatógeno, siendo incluso en este cultivo donde se describió por primera vez (McCarter, 1991).

### 2.2.2 Taxonomía y morfología

La clasificación taxonómica de *Sclerotium rolfsii*, de acuerdo a Noyd (2000) y Ulloa y Herrera (1994) es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Deuteromycota.

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Mycelia Sterilia (Noyd, 2000)

Género: *Sclerotium* (Ulloa y Herrera, 1994).

Especie: *Sclerotium rolfsii* Saccardo.

La fase sexual de *S. rolfsii* es conocida como *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu y Kimbrough; algunos sinónimos de esta fase son *Corticium rolfsii* (Curzi) y *Pellicularia rolfsii* (West). Se caracteriza porque su micelio es blanco en forma abanicada y abundante, no forma esporas; pero produce numerosos esclerocios de color café oscuro (Agrios, 1999).

Las hifas pueden ser de dos tipos: los principales que son grandes en comparación con otros hongos por que presentan de 5 a 9 micrones de diámetro, tienen paredes delgadas, son hialinas y tienen conexiones en forma de gancho a nivel de las septas, características que permite identificar esta especie (Barnett y Barry, 1987). Las otras

hifas consideradas como alimentadoras, son las que llevan a cabo la penetración en los tejidos de las plantas. El micelio al crecer forma rizomorfos expandiéndose en forma abanicada observándose de color blanco. Los rizomorfos se entrecruzan y comienzan a formar los esclerocios esféricos, aperlados que se tornan color café oscuro cuando maduran. Los esclerocios llegan a medir hasta 10 mm de diámetro; pero por lo general se encuentran en rangos de 0.5 a 2.0 mm de diámetro (Singh y Dwivedi, 1991).

### **2.2.3 Organismos antagónicos**

Varios microorganismos incluyendo bacterias, hongos, hongos micorrízicos y actinomicetes, inhiben el crecimiento de *S. rolf sii* (Punja, 1985) como por ejemplo *Verticillium* spp., *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*, *Penicillium* spp. y *Gliocladium virens* (Fernández-Larrea, 2001; Ferreira y Boley, 1992; Pineda y Díaz, 1981; Díaz y Castro, 1977).

En el caso de *Penicillium notatum* es un hongo que presenta actividad hiperparasítica sobre *S. rolf sii*. En campo inhibió la germinación de esclerocios por invasión y maceración, así como la inhibición del crecimiento saprofítico y en la producción de esclerocios, además no interfirió en la germinación y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* (var. Tacarigua) (Pineda y Díaz, 1981). Con el hongo *Taralomyces flavus*, Madi *et al*, (1997) determinaron que una cepa resistente a benomil sobreprodujo enzimas extracelulares (quitinasa, beta-1,3 glucanasa y celulasa) que degradaron la pared celular de *S. rolf sii*.

### **2.2.4 Control químico**

El control de *S. rolf sii* ha sido difícil, por la producción de esclerocios que sobreviven en el suelo por muchos años. Los fumigantes tales como el bromuro de metilo y metam-

sodio, vorlex (mezcla de metil isotiocianato, dicloropropano y otros clorinatos) fueron de los primeros que se utilizaron para el control efectivo de *S. rolfsii* (Jenkins y Averde, 1986; Punja, 1985; Jenkins, 1985); sin embargo, por el efecto nocivo al ambiente se ha venido prohibiendo su uso, como es el caso de bromuro de metilo que se prohibió después del año 2002, por su efecto nocivo a la capa de ozono.

Existen en el mercado fungicidas que inhiben la germinación de esclerocios, el crecimiento micelial o formación de esclerocios, entre ellos el PCNB (pentacloronitrobenzeno), *in vitro* se demostró que fue muy efectivo en la reducción del número de esclerocios (Punja *et al.*, 1982); en campo se utilizó en el control de *S. rolfsii* en cacahuete desde los años 1940's (Shem *et al.*; 1998). Por su parte Jenkins y Averde (1986), reportaron que la aplicación de PCNB de 11.2 a 22.4 kg i.a./ha redujo la incidencia de tizón sureño en zanahoria; sin embargo, Pineda y Díaz (1981) reportaron un efecto fungistático con el mismo fungicida en la superficie del suelo, pero debajo de ésta provocó un crecimiento micelial vigoroso y abundante formación de esclerocios.

Otros fungicidas que reducen el número de esclerocios de *S. rolfsii in vitro* son vitavax, terraclor, captan, tiram, cloroneb, carboxin y trifeniltin hidróxido (TPTH) (Punja *et al.*, 1982).

En campo, el dicloronitroanilina es efectivo en el cultivo de cacahuete (Diomande y Beute, 1977); en el cultivo de iris los fungicidas benodanil, flutolanil y quintosano controlaron a *S. rolfsii* entre el 98 a 100% e incrementaron el número y calidad de flores, mientras que para lilies el benodanil, flutolanil, microbutanil, diniconazol, quitosano y quitosano mas benomil incrementaron el número de plantas y flores sanas;

en ambos cultivos el uso de todos los fungicidas incrementaron el número de bulbos sanos (Chastagner *et al.*, 1990).

Ramírez *et al.* (1998), en cultivo de tomate bajo invernadero encontraron que la combinación de vinclozolín, clorotalonil, humus líquido y humus de lombrices fue efectivo para controlar *S. rolfsii* (91.56%) y en forma individual vinclozolín fue el mejor fungicida.

El uso de algunos de estos fungicidas puede afectar las poblaciones saprófitas y actinomicetos antagonistas de fitopatógenos, como es el caso de PCNB que además se considera como un fungicida que ejerce una presión selectiva favorable para hongos del género *Fusarium* y *Pythium* (Pineda y Díaz, 1981). El efecto de la aplicación de fungicidas puede variar, dependiendo de la estación del año y del cultivo (Punja, 1985).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El género *Trichoderma* ha recibido mayor atención como biocontrolador, por sus diversos mecanismos de acción, que permiten disminuir los daños en plantas ocasionados por fitopatógenos y estos efectos en algunos casos igualan o superan el efecto de los fungicidas químicos sintéticos. La antibiosis es uno de sus mecanismos de acción en el que se encuentran involucrados compuestos volátiles y no volátiles; sin embargo son pocos los compuestos volátiles identificados y en su mayoría se desconoce su actividad biológica sobre fitopatógenos. Los compuestos volátiles reportados hasta el momento han sido identificados de *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. viride*, pero no hay reportes para la especie *T. asperellum*, por lo que tampoco se conoce el efecto de los compuestos volátiles producidos en una interacción con un patógeno como lo es *S. rolfsii*, causante de enfermedades en cultivos de importancia agrícola. *T. asperellum* Tc74, modelo de estudio de este trabajo se ha caracterizado por presentar mecanismos de acción como micoparasitismo, promotor de desarrollo de plantas, enraizador, inductor de mecanismos de resistencia y antibiosis con compuestos no volátiles; sin embargo se desconoce si presenta antibiosis con compuestos volátiles, por lo que el conocer y caracterizar cada modo de acción permitirá seleccionar cepas de *Trichoderma* con diferentes mecanismos de acción y por lo tanto con potencial biofungicida.

## 4.- OBJETIVOS

### Objetivo general

Capturar, evaluar la actividad biológica e identificar los compuestos volátiles producidos durante la interacción *Trichoderma asperellum-Sclerotium rolfsii*.

### Objetivos específicos:

- Capturar los compuestos volátiles producidos durante la interacción de *T. asperellum-S. rolfsii*.
- Determinar el efecto de compuestos volátiles generados en la interacción *T. asperellum-S. rolfsii*, sobre la producción de esporas de *T. asperellum* y sobre el crecimiento micelial, producción y viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii*.
- Determinar el efecto de los compuestos volátiles extraídos con metanol, diclorometano y hexano en el crecimiento micelial, producción y viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii*.
- Identificar los compuestos volátiles mayoritarios con actividad antifúngica por CG-DSM.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Propagación de *Sclerotium rolfii*

*S. rolfii* cepa 12, fue proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología del CEPROBI, considerada con alta tasa de crecimiento y agresiva, además de ser patógeno potencial en el cultivo de la cebolla en la región Oriente de Morelos (Ruiz 2010; Flores-Moctezuma *et al*, 2008; Montes-Belmont *et al*, 2003). Se propagó en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA), el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (39 g/L), se esterilizó a 121° C durante 15 min y se vació en cajas Petri (100 x 15 mm). En el medio sólido se sembró en el centro de la caja un disco de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial de *S. rolfii* y se incubó a temperatura del laboratorio (27° C ± 3). Para los bioensayos se utilizaron colonias de 7 días de crecimiento.

### 5.2 Propagación de *Trichoderma asperellum*

La cepa de *Trichoderma asperellum* Tc74 fue proporcionada por el Dr. César Guigón López del Centro de Investigación para los Recursos Naturales, Chihuahua. La propagación de *Trichoderma* se realizó de acuerdo al método de Ruiz (2010). El trigo entero se remojó durante 12 h, posteriormente se escurrió hasta obtener una humedad en el grano alrededor del 65 %, para lo cual se pesaron 250 g y se pasaron a través un medidor de humedad de grano (Marca Seedburo Equipment Company, modelo 700) cada 10 min, hasta obtener la humedad deseable. El trigo (200 g) se colocó en bolsas de polipapel (25 x 35 cm) para su esterilización a 121° C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión por 40 min; al término, se almacenaron inmediatamente a 4° C durante 24 h para después volver a esterilizar. Una vez que llegó a la temperatura del laboratorio (27° C ± 3) se inoculó con

2 mL de una suspensión de *T. asperellum* de  $1 \times 10^7$  esporas/mL, por medio de una jeringa estéril. Las bolsas se incubaron a temperatura del laboratorio ( $27^\circ \text{C} \pm 3$ ) durante 20 días y posteriormente se almacenaron a  $4^\circ \text{C}$  hasta su uso.

### **5.3 Dispositivo de captura de compuestos volátiles durante la interacción *Trichoderma asperellum* - *Sclerotium rolfsii*.**

Se elaboró un dispositivo que consistió en matraces de Erlenmeyer de 125 mL, a los cuales se les colocó una oliva a 3.5 cm de distancia de la boquilla; los matraces se unieron por las boquillas y se sellaron con plástico adherible. En el matraz inferior se conectó una manguera esterilizable de PVC grado médico (Marca AQUA MEDIC) de 0.9 cm de diámetro y se le introdujo 7 cm de carbón activado para limpiar el aire de olores. Esta manguera se conectó a un flujómetro (Marca Cole Parmer, modelo # PMR1-010295,) para regular la entrada de flujo de aire; en el matraz superior se conectó otra manguera PVC grado médico y en la salida de ésta se conectó una pipeta Pasteur con el polímero Súper Q (SQ) (Marca SUPELCO) para capturar los compuestos volátiles que fueron arrastrados de la atmósfera interior de los matraces conteniendo a *T. asperellum* y *S. rolfsii*, con un flujo de aire de 1100 mL/min (Figura 1).

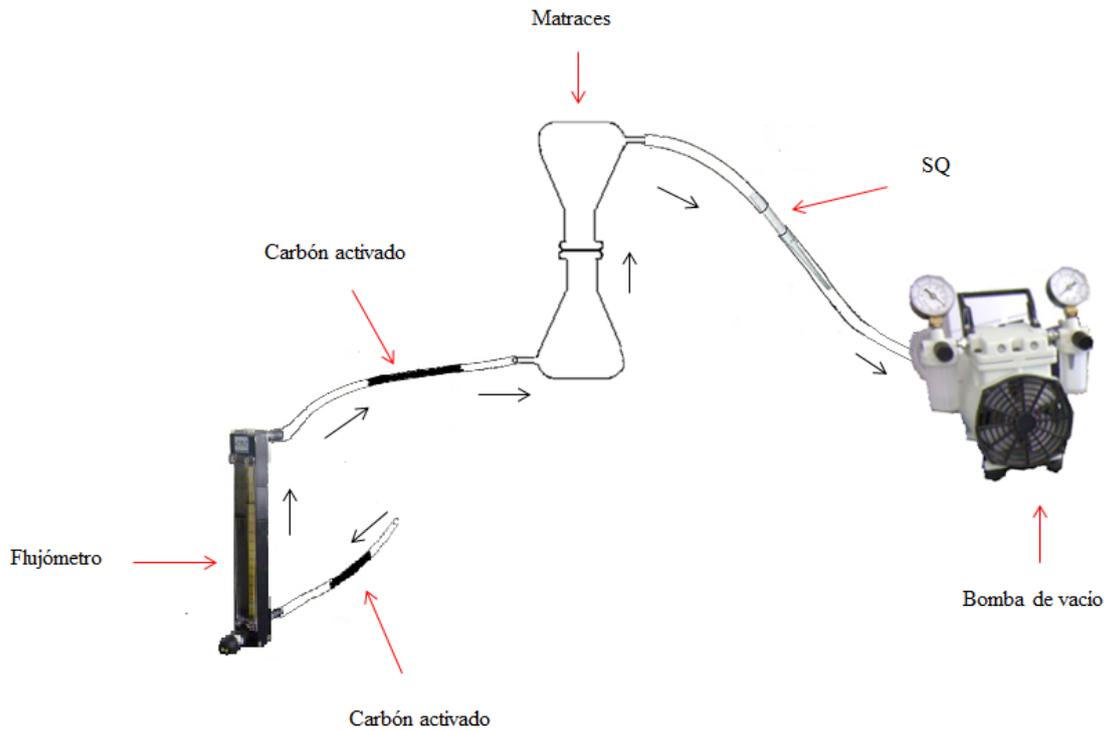


Figura 1.- Dispositivo elaborado para la captura de compuestos volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* - *Sclerotium rolfsii*. —> Dirección del flujo de aire

#### 5.4 Interacción *T. asperellum* - *S. rolfsii*

La interacción se realizó en el dispositivo antes descrito. Para *S. rolfsii* se preparó 15 mL de medio PDA en uno de los matraces, una vez que se esterilizó y solidificó se sembró un disco de 5 mm de diámetro de medio PDA con micelio de *S. rolfsii* y se dejó incubar 24 h antes de confrontarlo con *T. asperellum*. Para *Trichoderma*, en otro matraz del mismo volumen se colocó 20 g de trigo entero preparado por el método de Ruiz (2010). Una vez esterilizado se inoculó 0.5 mL de una suspensión de  $1.3 \times 10^7$  esporas/mL de *T. asperellum* y se incubó a temperatura del laboratorio ( $27^\circ \text{C} \pm 3$ ). Para realizar las interacciones, ambos matraces se unieron por las boquillas, quedando *T. asperellum* en la parte inferior y *S. rolfsii* en la parte superior y se sellaron con plástico adherible.

#### **5.4.1 Determinación de los días de mayor inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii* durante la interacción.**

Las interacciones de *T. asperellum* en presencia de *S. rolfsii* se realizaron como se describió anteriormente, a los 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 días de incubación de *T. asperellum*; así como también se colocó a *T. asperellum* en ausencia del patógeno bajo las mismas condiciones. Los testigos para cada día consistieron en trigo + *S. rolfsii*-PDA (Testigo 1). Cuando el testigo cubrió la superficie del medio, se tomaron imágenes del crecimiento micelial y se analizaron con el programa Image J (versión 8) para determinar el área de crecimiento micelial. Posteriormente se abrió el dispositivo y se incubó a temperatura del laboratorio ( $27^{\circ}\text{C} \pm 3$ ) durante 9 días para evaluar producción y viabilidad de esclerocios. Las variables de respuesta para *S. rolfsii* fueron: crecimiento micelial ( $\text{cm}^2$ ), producción (número) y viabilidad de esclerocios (%), mientras que para *T. asperellum* número de esporas/g trigo en presencia y ausencia del patógeno. Se utilizaron 6 repeticiones para cada tratamiento.

#### **5.4.2 Extracción de compuestos volátiles en los días de mayor inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii***

Para la captura de compuestos volátiles se estableció la interacción de *T. asperellum* en presencia de *S. rolfsii*, así como *T. asperellum* en ausencia del patógeno. Para este bioensayo además del testigo 1, se agregó el testigo 2 (Trigo + PDA). El bioensayo concluyó cuando el testigo 1 cubrió la superficie del medio, se tomaron imágenes del crecimiento micelial y se analizaron con el programa image J para determinar el área de crecimiento. Las variables a medir fueron crecimiento micelial ( $\text{cm}^2$ ), producción (número) y viabilidad de esclerocios (%) para el patógeno y producción de esporas para

el caso del antagonista (número de esporas/g trigo en presencia y ausencia del patógeno). Se utilizaron 6 repeticiones para cada tratamiento.

La captura de los compuestos volátiles se realizó durante 2 h (con flujo constante de aire) con una columna que contenía SQ (0.25 g); para cada repetición se utilizó una columna diferente. Al término de la captura, la columna se eluyó con 1mL de un solvente (grado HPLC) y se colocó en un vial ámbar. Los solventes empleados fueron hexano (baja polaridad), diclorometano (mediana polaridad) y metanol (alta polaridad), para la captura de compuestos volátiles de diferente polaridad. Este bioensayo se estableció para cada día y para cada solvente. Los compuestos volátiles obtenidos con cada solvente se reconcentraron con corriente de nitrógeno hasta un volumen de 125  $\mu$ L y se almacenaron a una temperatura de  $-17^{\circ}$  C para su posterior uso e identificación.

### **5.5 Pruebas biológicas**

Los viales con los compuestos volátiles se sacaron del congelador y se dejaron a temperatura ambiente para aplicarlos en los bioensayos. Las pruebas biológicas se realizaron por el método de Ojika (2008) que consistió de cajas Petri (100 x 15 mm) con medio de cultivo PDA; a 2 cm del centro de la caja se colocó un disco de 5 mm de diámetro de medio con micelio de *S. rolfsii* y en el extremo opuesto se colocó un papel de celulosa (Whatman No. 2) del mismo diámetro, con 5  $\mu$ L de los compuestos volátiles correspondientes, las cajas se sellaron con parafilm. Para estos bioensayos se incrementaron otros dos testigos: el testigo 3 (Solvente 5  $\mu$ L) y testigo 4 (PDA sin solvente). Las variables de respuesta fueron: crecimiento micelial ( $\text{cm}^2$ ), producción (número) y viabilidad de esclerocios (%). Se utilizaron 18 repeticiones.

## 5.6 Identificación de compuestos volátiles

En función de las pruebas biológicas se eligieron los compuestos volátiles del día de mayor inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii*. Los compuestos volátiles se identificaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (CG/DSM) (HP 6890/5973), equipado con una columna HP 5MS (30 m, diámetro internode 250  $\mu\text{m}$  y espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Agilent, EUA). La temperatura inicial del horno fue de 40° C, durante 4 min, posteriormente se incrementó 10° C/min hasta 130° C, durante 2 min, después se incrementó hasta 240° C en la cual se mantuvo 1 min. Se utilizó como gas acarreador helio a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250° C y la del auxiliar de 250° C. El inyector se trabajó en modo splitless. El DSM se trabajó con ionización electrónica (70 EV, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 35 a 550 UMA, provisto de una biblioteca espectral (NIST 98 y Wiley 275). La identificación de los compuestos se llevó a cabo considerando los tiempos de retención, la evaluación de los espectros de masas y la comparación con la biblioteca espectral; así como también se determinó el área bajo la curva para cada compuesto identificado.

## 5.7 Análisis estadístico

Para analizar los datos obtenidos en los bioensayos de la interacción de *T. asperellum* - *S. rolfsii* en diferentes días de incubación de *Trichoderma* se realizó un Anova de todos los testigos no habiendo diferencias significativas, por lo que se tomó los datos de un solo testigo. Para el caso de crecimiento micelial se realizó un Kruskal-Wallis y una comparación de medias de Tukey, para la producción de esclerocios se aplicó un Anova de una vía y para la producción de esporas de *Trichoderma* en presencia y ausencia del

patógeno se realizó un Anova de dos vías, ambos con una separación de medias de Tukey.

En el bioensayo de la actividad antifúngica de los compuestos volátiles de la interacción con mayor actividad se realizaron pruebas de t.

Los datos de la actividad biológica de los compuestos volátiles sobre *S. rolfsii*, se analizaron con un Anova de una vía y una comparación de medias de Tukey.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Determinación de los días de mayor actividad antifúngica en las interacciones de *T. asperellum* - *S. rolfsii*.

El crecimiento micelial de *S. rolfsii* del día 6 al día 24 fue significativamente menor que el testigo (31 cm<sup>2</sup>), siendo los días 9 al 21 donde el crecimiento fue completamente inhibido por efecto de los compuestos volátiles de *T. asperellum* (Figura 2). Este efecto se observó mientras el dispositivo estuvo cerrado. Dos días después de que se abrió el dispositivo, *S. rolfsii* continuó el crecimiento e inició la producción de esclerocios. Después de nueve días de incubación, la producción de esclerocios del día 9 al 21 (66 a 89 esclerocios) fue menor en comparación al testigo (367 esclerocios) (Figura 3). La viabilidad de los esclerocios producidos en todas las interacciones y los del testigo fueron del 100 %.

En cuanto la producción de esporas de *T. asperellum* en ausencia de *S. rolfsii* no hubo diferencias significativas entre los días de interacción, excepto en el día 3 donde la producción de esporas fue menor ( $0.30 \times 10^7$  esporas/mL); sin embargo, *T. asperellum* en presencia del patógeno incrementó la producción de esporas en los días 9 al 21, no habiendo diferencias significativas entre ellos ( $2.1$  a  $2.3 \times 10^7$  esporas/mL) y la menor producción se presentó en los días 3, 6 y 24 ( $0.8$  a  $1.1 \times 10^7$  esporas/mL).

En la comparación de *T. asperellum* en presencia y ausencia del patógeno solo en los días 6 y 24 no presentaron diferencias significativas, siendo los días 9 al 21 donde las diferencias fueron mayores con una producción de  $1.3$  a  $2.3 \times 10^7$  esporas/mL (Cuadro 2). Como resultado de lo anterior, se seleccionaron los días 9, 12 y 15 para realizar las confrontaciones nuevamente y realizar la extracción de los compuestos volátiles.

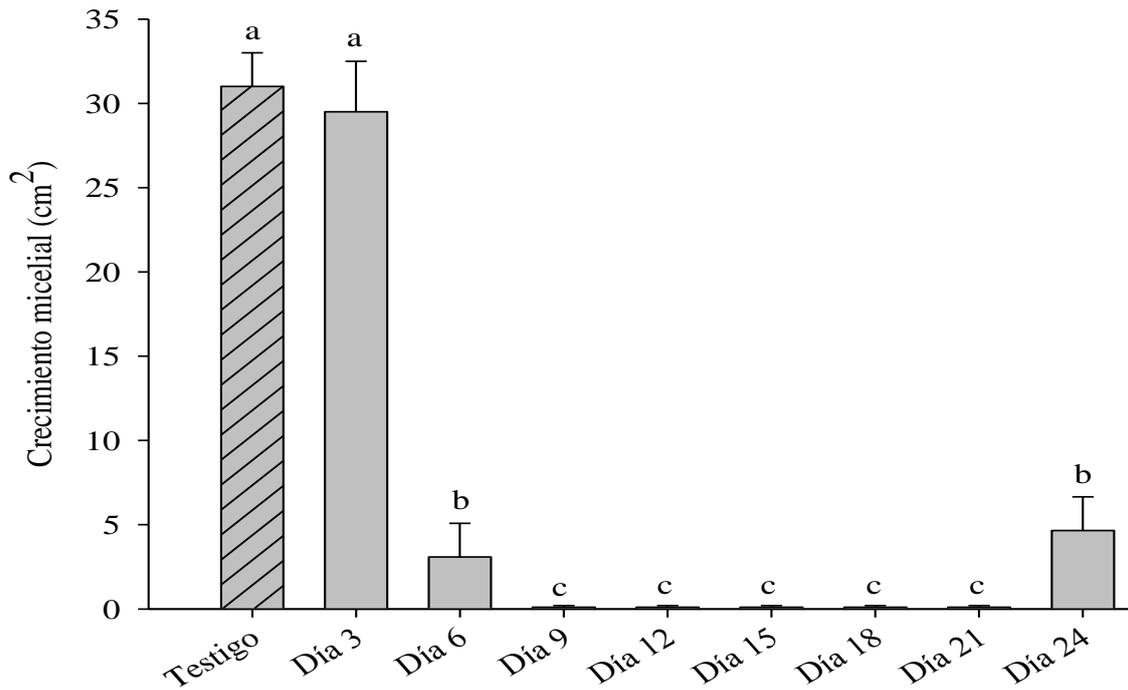


Figura 2. Crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* por efecto de los compuestos volátiles de *Trichoderma asperellum*. Se muestran medianas  $\pm$  intervalo de confianza, letras diferentes indican diferencias estadísticas entre grupos. Kruskal-Wallis H= 52.24, n= 6, p= 0.001/(Tukey).

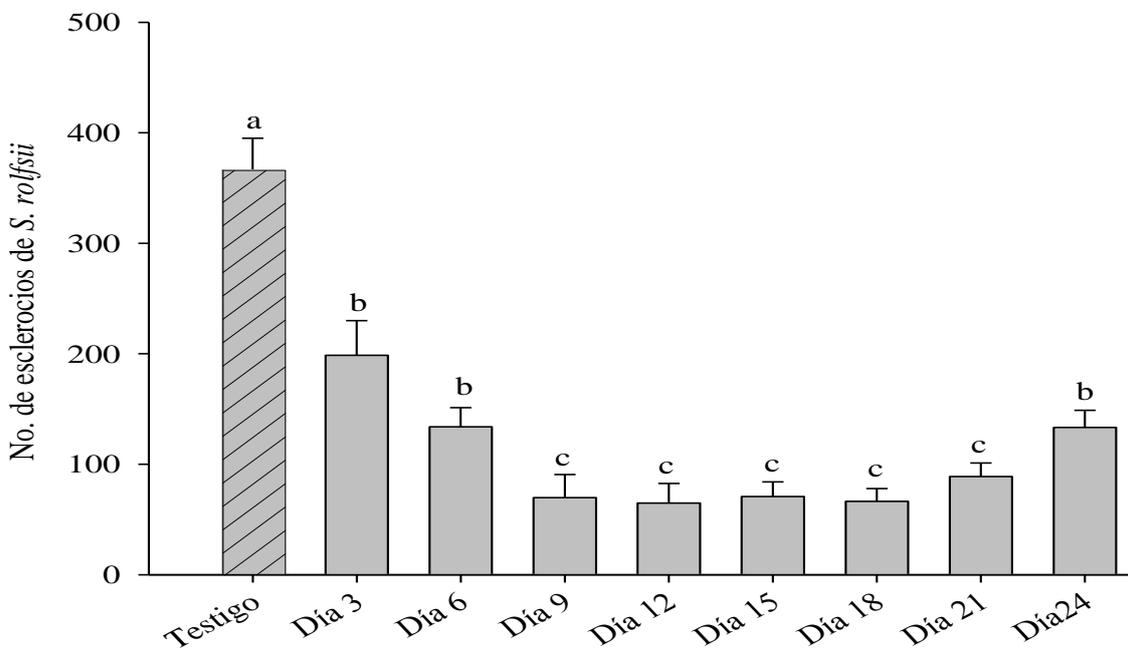


Figura 3. Producción de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* por efecto de los compuestos volátiles de *Trichoderma asperellum*. Se muestran medias  $\pm$  error estándar, letras diferentes indican diferencias estadísticas Anova, F= 24.82, n=6, p= 0.001/(Tukey).

Cuadro 2.- Producción de esporas de *Trichoderma asperellum* en presencia y ausencia de *Sclerotium rolfsii*.

Tiempo de incubación	Ausencia	Presencia
Día 3	0.305 ± 0.0613* c A	0.897 ± 0.0549 b B
Día 6	0.963 ± 0.0855 ab A	1.128 ± 0.0976 b A
Día 9	1.333 ± 0.0919 a A	2.317 ± 0.0946 a B
Día 12	1.367 ± 0.0715 a A	2.195 ± 0.0998 a B
Día 15	1.365 ± 0.116 a A	2.132 ± 0.146 a B
Día 18	1.517 ± 0.0703 a A	2.232 ± 0.0726 a B
Día 21	1.415 ± 0.115 a A	2.145 ± 0.101 a B
Día 24	1.013 ± 0.0470 ab A	1.178 ± 0.245 b A

\*Media ± error estándar (n=6). Letras diferentes en minúsculas en columnas indican diferencia estadísticas entre tiempo de incubación. Letras diferentes en mayúsculas en hileras indican diferencias estadísticas entre ausencia y presencia del patógeno.

## **6.2 Efecto de la interacción *T. asperellum* - *S. rolfsii* de los días 9, 12 y 15 sobre el comportamiento de *T. asperellum* y *S. rolfsii***

Los resultados mostraron, que la producción de esporas de *T. asperellum* se incrementó significativamente ( $p=0.001$ ) cuando estuvo presente el patógeno y conforme avanzó la incubación de *T. asperellum*, por lo cual se confirma lo observado anteriormente. Con respecto a *S. rolfsii*, el crecimiento micelial de fue significativamente menor por efecto de los compuestos volátiles de *T. asperellum* en comparación con el testigo, este efecto fue similar en las tres evaluaciones (día 9, 12 y 15), así mismo la cantidad de esclerocios fue significativamente menor en presencia de *T. asperellum* en comparación del testigo; la cantidad de esclerocios varió en las tres interacciones, siendo menor en la interacción del día 12 (Cuadro 3, 4 y 5).

Cuadro 3.- Efecto de la interacción *T. asperellum* - *S. rolfsii* sobre la esporulación de *T. asperellum* y crecimiento y formación de esclerocios de *S. rolfsii* del día 9.

Tratamientos	<i>T. asperellum</i>	<i>S. rolfsii</i>	
	No. de esporas (x 10 <sup>7</sup> )/g trigo	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios
T1= <i>Trichoderma</i> -trigo+ <i>S. rolfsii</i> -PDA	2.28 ±0.17b	0.10 ± 0.0 a	83.2 ± 7.63a
T2= <i>Trichoderma</i> -trigo+PDA	1.68± 0.18a		
Testigo 1= Trigo+ <i>S. rolfsii</i> -PDA		32.4 ± 0.11 b	252 ± 25.8b

\*Media ± error estándar (n=6). Letras diferentes en columnas indican diferencias estadísticas, t=10.88, p=0.001; t=-178.79, p=0.001; t=5.07, p=0.001.

Cuadro 4.- Efecto de la interacción *T. asperellum* – *S. rolfsii* sobre la esporulación de *T. asperellum* y crecimiento y formación de esclerocios de *S. rolfsii* del día 12.

Tratamientos	<i>T. asperellum</i>	<i>S. rolfsii</i>	
	No. de esporas (x 10 <sup>7</sup> )/g trigo	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios
T1= <i>Trichoderma</i> -trigo+ <i>S. rolfsii</i> -PDA	3.67± 0.11b	0.10±0.0a	63.3±9.11a
T2= <i>Trichoderma</i> -trigo+PDA	1.75± 0.14a		
Testigo 1= Trigo+ <i>S. rolfsii</i> -PDA		32.37±0.18b	165±17.9b

\*Media ± error estándar (n=6). Letras diferentes en columnas indican diferencias estadísticas, t=10.88, p=0.001; t=-178.79, p=0.001; t=5.07, p=0.001.

Cuadro 5.- Efecto de la interacción *T. asperellum* - *S. rolfsii* sobre la esporulación de *T. asperellum* y crecimiento y formación de esclerocios de *S. rolfsii* del día 15.

Tratamientos	<i>Trichoderma</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	
	No. de esporas (x 10 <sup>7</sup> )/g trigo	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios
T1= <i>Trichoderma</i> -trigo+ <i>S. rolfsii</i> -PDA	3.35 ±0.05b	0.10±0.0a	86.22±7.92a
T2= <i>Trichoderma</i> -trigo+PDA	2.20 ±0.02a		
Testigo 1= Trigo+ <i>S. rolfsii</i> -PDA		32.38±0.28b	287±19.08b

\*Media ± error estándar (n=6). Letras diferentes en columnas indican diferencias estadísticas. t=-12.117, p=0.001; t=-112.79, p=0.001; t=-9.75, p=0.001.

### 6.3 Pruebas biológicas

En las pruebas biológicas se observó que los compuestos volátiles obtenidos de la interacción de *T. asperellum* en presencia de *S. rolfsii* inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *S. rolfsii*, en comparación del efecto de los compuestos volátiles obtenidos de *T. asperellum* en ausencia del patógeno. Este efecto se observó en los tres días de incubación (9, 12 y 15) así como también en los tres solventes utilizados en la extracción (metanol, diclorometano y hexano). El crecimiento micelial de *S. rolfsii* fue menor por el efecto de los compuestos volátiles obtenidos con diclorometano del día 9; sin embargo para el día 15 el menor crecimiento fue por efecto de los compuestos volátiles obtenidos con metanol (3.3 cm<sup>2</sup>) (Cuadros 6, 7, 8).

Con respecto a la producción de esclerocios de *S. rolfsii* no se observaron diferencias significativas por efecto de los compuestos volátiles obtenidos por la interacción de *T. asperellum* en presencia y ausencia de *S. rolfsii* en los tres días de incubación y en los tres solventes utilizados. El número de esclerocios fue menor por efecto de los compuestos volátiles obtenidos con metanol (12.7 a 317 esclerocios) en comparación con los obtenidos con diclorometano (19 a 346 esclerocios) y hexano (18 a 354 esclerocios); el número de esclerocios fue mayor conforme aumentó los días de incubación y conforme bajó la polaridad de los solventes empleados.

Los testigos que se utilizaron para estos bioensayos mostraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos pero no entre ellos, lo que aseguró que los solventes utilizados para la extracción de los compuestos volátiles no tuvieron efecto sobre el crecimiento micelial ni en la producción de esclerocios de *S. rolfsii* en los tres días de incubación (Cuadros 6, 7, 8). De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron los compuestos volátiles obtenidos con los tres solventes del día 9 para la identificación.

Cuadro 6. Efecto de compuestos volátiles obtenidos con metanol de la interacción de *T. asperellum* - *S. rolfsii* de los días 9, 12 y 15 sobre el desarrollo de *S. rolfsii*.

Tratamientos (extractos)	<i>S. rolfsii</i>					
	Día 9		Día 12		Día 15	
	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios
T1=CV de <i>Trichoderma</i> +trigo+ <i>S. rolfsii</i> +PDA	3.3±0.13 c*	12.7±1.70 b	4.0±0.26 c*	12.9±2.60 b	3.3±0.10 c*	39±8.18 b
T2=CV de <i>Trichoderma</i> +trigo+PDA	6.9±0.22 b	18.2±1.4 b	6.84±.16 b	28.7±8.54 b	6.2±0.15 b	68±14.7 b
Testigo 1= CV de trigo+PDA+ <i>S. rolfsii</i>	11.3±0.25 a	128±10.8 a	11.2±0.29 a	138±12.2 a	11.6±0.20 a	304±11 a
Testigo 2= CV de trigo+PDA	12.2±0.25 a	127±8.93 a	11.4±0.27 a	194±1.98 a	11.8±0.38 a	286±22.0a
Testigo 3= Solvente metanol	10.9±0.33 a	131±16.18 a	11.4±0.43 a	159±16.3 a	11.6 ±0.59 a	316±7.3a
Testigo 4= PDA	12.0±0.28 a	129±10.24 a	10.9±0.39 a	250±14.9 a	12.3±0.63 a	317±14 a

\*Medias ± error estándar (n=18). Letras diferentes en columnas indican diferencias estadísticas. Anova/Tukey (p= 0.01). F=255.5, F=109.4; F=133.5, F=72.9; F=222.6, F=88.8

Cuadro 7. Efecto de compuestos volátiles obtenidos con diclorometano de la interacción de *T. asperellum* - *S. rolfsii* de los días 9, 12 y 15 sobre el desarrollo de *S. rolfsii*.

Tratamientos (extractos)	<i>S. rolfsii</i>					
	Día 9		Día 12		Día 15	
	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios
T1=CV de <i>Trichoderma</i> +trigo+ <i>S. rolfsii</i> +PDA	2.2±.13 c*	19±1.92 b	4.15±0.15 c*	29±5.2 b	4.72±.12 c*	73.±6.6 b
T2=CV de <i>Trichoderma</i> +trigo+PDA	6.6±0.1 b	22±2.36 b	6.66±0.14 b	53±8.62 b	6.1±0.2 b	102±3.7 b
Testigo 1= CV de trigo+PDA+ <i>S. rolfsii</i>	11.5±0.30 a	117±2.76 a	11.0±0.27 a	279±6.79 a	12.5±0.57 a	346±5.1 a
Testigo 2= CV de trigo+PDA	11.5±0.50 a	121±3.11 a	10.8±0.17 a	296±18.5 a	13.7±0.48 a	319±16 a
Testigo 3= Solvente diclorometano	11.8±0.55 a	124±2.82 a	11.3±0.21 a	273±12.6 a	12.2±0.31 a	338±17 a
Testigo 4= PDA	11.0±0.22 a	133±3.95 a	11.1±0.27 a	278±10.5 a	12.4±0.15 a	341±14 a

\*Media ± error estándar (n=18). Letras diferentes en columnas indican diferencias estadísticas. Anova/Tukey (p=0.01). F=316.1, F=146.5; F=268.8, F=177.5; F=216.2, F=103.

Cuadro 8. Efecto de compuestos volátiles obtenidos con hexano de la interacción de *T. asperellum* - *S. rolfsii* de los días 9, 12 y 15 sobre el desarrollo de *S. rolfsii*.

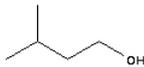
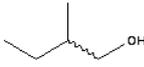
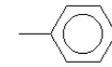
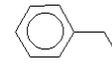
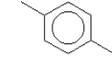
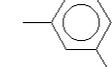
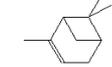
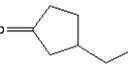
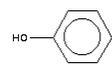
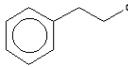
Tratamientos (extractos)	<i>S. rolfsii</i>					
	Día 9		Día 12		Día 15	
	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	No. de esclerocios
T1=CV de <i>Trichoderma</i> +trigo+ <i>S. rolfsii</i> +PDA	2.9±0.10 c*	18±1.56 b	5.1±0.18 c*	18±2.72 b	3.5±0.14 c*	38±5.9 b
T2=CV de <i>Trichoderma</i> +trigo+PDA	6.8±0.2 b	24±2.68 b	7.4±0.20 b	39±5.94 b	6.3±0.13 b	71±10.4 b
Testigo 1= CV de trigo+PDA+ <i>S. rolfsii</i>	12.5±0.71 a	124±3.75 a	10.5±0.26 a	195±26.5 a	12.5±0.87 a	345±19 a
Testigo 2= CV de trigo+PDA	11.8±0.53 a	118±2.79 a	11.2±0.37 a	237±16.3 a	11.4±0.35 a	354±12 a
Testigo 3= Solvente hexano	12.9±0.42 a	116±1.75 a	11.4±0.35 a	181±30.1a	11.5±0.37 a	352±12 a
Testigo 4= PDA	11.6±0.21 a	121±2.36 a	12.0±0.54 a	243±10.0 a	10.7±0.13 a	320±13 a

\*Media ± error estándar (n=18). Letras diferentes en columnas indican diferencias estadísticas. Anova/Tukey (p=0.05). F=216.3, F=405.9; F=106.7, F=77.2; F=151.4, F=38.7.

#### 6.4 Identificación de compuestos volátiles del día 9 con actividad biológica

En los compuestos volátiles obtenidos del día 9, se identificaron 10 compuestos: cuatro alcoholes (2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, fenol y fenil etil alcohol), una cetona (3-etil-ciclopentanona), cuatro aromáticos (tolueno, etilbenceno, p-xileno y m-xileno) y un terpeno ( $\alpha$ -pineno) (Cuadro 9). Los espectros de masa de cada compuesto se encuentran en el Anexo. Estos compuestos se encontraron en la extracción con metanol, diclorometano y hexano, así como en los compuestos volátiles obtenidos de la interacción de *T. asperellum* en presencia de *S. rolfsii* y en ausencia de éste; sin embargo, los compuestos volátiles donde estuvieron *Trichoderma* y *S. rolfsii* fueron más abundantes, que en donde solo estuvo *Trichoderma* (Cuadro10) (Figura 4). De los compuestos identificados, p-xileno fue el compuesto que más se incrementó en la interacción *T. asperellum* en presencia de *S. rolfsii* (13.3 veces más), le siguió etilbenceno (8.2 veces más), fenil etil alcohol (7.4), tolueno (7.3) y el resto de los compuestos se incrementaron entre 1 a 2.7 veces más (Cuadro10) (Figura 4).

Cuadro 9. Compuestos volátiles identificados (extraídos con metanol, diclorometano y hexano) en la interacción de *T. asperellum* en presencia y ausencia de *S. rolfsii* del día 9.

Nombre	Peso molecular	Formula molecular	No. CAS	TR	Estructura química
3-Metil-1-butanol	88.1482	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123513	3.52	
2-Metil-1-butanol	88.1482	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	137326	3.61	
Tolueno	92.1384	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	108883	4.24	
Etilbenceno	106.08	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	100-41-4	6.59	
p-Xileno	106.08	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106-42-3	6.78	
m-Xileno	106.08	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	108383	7.32	
α-Pineno	136.2340	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	80568	8.23	
3-Etil-ciclopentanona	112.09	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	10264558	8.74	
Fenol	94.04	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	108952	9.21	
Fenil etil alcohol	122.07	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	60128	11.59	

TR= Tiempo de retención; No. CAS=Número de identificación química

Cuadro 10. Área bajo la curva de los compuestos volátiles producidos por *T. asperellum* en presencia y ausencia de *S. rolfsii*.

Nombre	ABC en ausencia de <i>S. rolfsii</i>	ABC en presencia de <i>S. rolfsii</i>	Incremento de CV en presencia de <i>S. rolfsii</i> (No. de veces)
3-Metil-1-butanol	9238504	25675647	2.7
2-Metil-1-butanol	5157570	12847103	2.5
Tolueno	1893545	13928891	7.3
Etilbenceno	1493714	12364033	8.2
p-Xileno	1893089	25281117	13.3
m-Xileno	1804662	2996502	1.6
$\alpha$ -Pino	1394942	2036221	1.4
3-Etil-ciclopentanona	117398	2818865	2.5
Fenol	1356482	2574601	1.9
Fenil etil alcohol	196779	8838012	7.4

ABC= Área bajo la curva

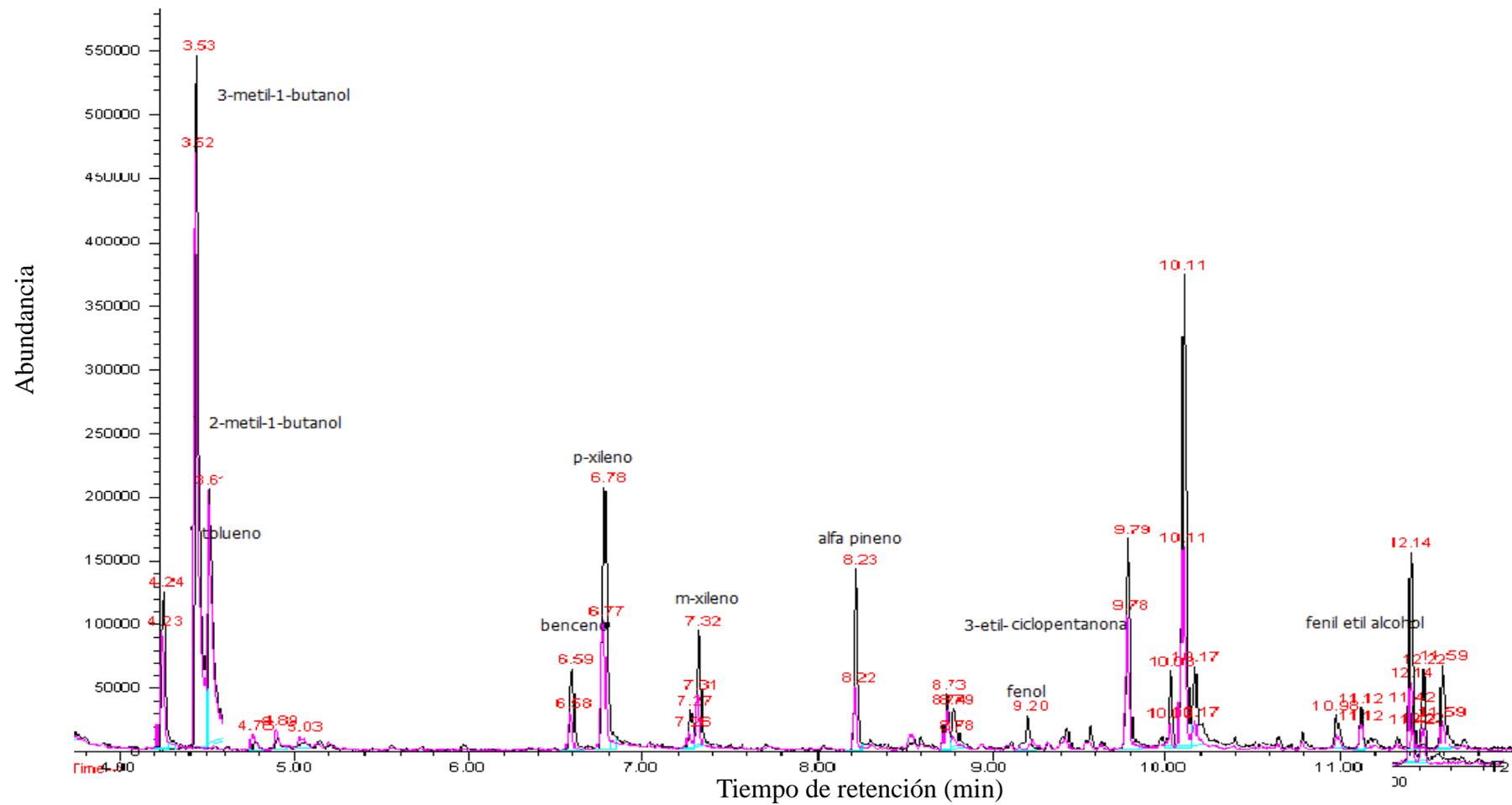


Figura 4.- Cromatograma de compuestos volátiles identificados (extraídos con diclorometano) de la interacción de *Trichoderma asperellum* en presencia  y en ausencia de *Sclerotium rolfsii* .

## 7. DISCUSIÓN

Para determinar el modo de acción de antibiosis con compuestos volátiles por *Trichoderma* spp., se han reportado dispositivos en donde el patógeno y el antagonista están físicamente separados entre sí para evitar la posibilidad del micoparasitismo y competencia; el primer dispositivo reportado fue la de placa invertida, que consistió en la siembra del antagonista en una caja Petri con medio de cultivo malta agar y en otra la siembra del patógeno, ambas cajas se invirtieron y se sellaron; esta dispositivo permitió evaluar el efecto de compuestos volátiles sobre el crecimiento micelial de patógenos (Dennis y Webster, 1971a).

Otro dispositivo que se reportó fue elaborado con manguera (grado médico), la cual llenaron con medio de cultivo y en un extremo sembraron al antagonista y en el extremo opuesto al patógeno, este dispositivo permitió determinar el efecto del tiempo de incubación sobre la producción de la 6-pentil-alfa-pirona en presencia y ausencia del patógeno; así como también determinar el efecto de la distancia entre los dos organismos sobre la producción de la 6-pentil-alfa-pirona (Cooney *et al.*, 1997b). Y por último un dispositivo con dos matraces invertidos unidos por sus bocas, lo que permitió evaluar el efecto de los compuestos volátiles sobre el crecimiento micelial de patógenos en diferentes días de incubación (Dal Bello *et al.*, 1997).

Las desventajas que presentaron estos dispositivos en comparación del empleado en este trabajo fueron: solo se puede medir el crecimiento micelial y tiempo de mayor inhibición de los patógenos en dos de ellos y en el otro no se puede medir el crecimiento

micelial, pero si el efecto del tiempo y distancia entre organismos para la producción de la 6-pentil-alfa-pirona. El dispositivo empleado en este trabajo presenta las ventajas además de las anteriores, capturar los compuestos volátiles de la interacción antagonista-patógeno y utilizar estos mismos compuestos para evaluar su actividad biológica e identificación.

De las interacciones reportadas Faheem Amin *et al.* (2010), mediante la técnica de caja Petri invertida (con medio de cultivo PDA), mostraron que los compuestos volátiles liberados por *T. viride* inhibieron 40.68 % el crecimiento micelial y 48.19 % la producción de esclerocios de *S. rolfsii*; mientras que Dal Bello *et al.* (1997) mediante el dispositivo de matraces invertidos con medio PDA, reportaron una inhibición de 16 a 28% del crecimiento micelial de *S. rolfsii* con compuestos volátiles de *T. hamatum*, mostrando la mayor inhibición en el día 7.

Estos resultados no coinciden con lo obtenido en este trabajo, donde los compuestos volátiles de *T. asperellum* Tc74 del día 6 inhibieron 90.3% el crecimiento micelial de *S. rolfsii* y 100 % a partir del día 9 al día 21, durante este tiempo los compuestos volátiles no permitieron la formación de esclerocios, por lo que *T. asperellum* Tc74 fue más eficiente para inhibir a *S. rolfsii*, comparado con *T. viride* y *T. hamatum*; sin embargo debe considerarse que los tres trabajos fueron establecidos en diferentes condiciones; entre éstos, el diseño de los dispositivos, la concentración y disponibilidad de nutrientes de los medios de cultivo, que influyen en los mecanismos de acción de *Trichoderma* (Hoitink *et al.*, 2006; Hoitink y Boehm, 1999), que en el caso de *T. asperellum* se utilizó

trigo, el cual Ruiz (2010) reportó que este sustrato incrementó la actividad antagónica en diferentes especies de *Trichoderma* en comparación con medio de cultivo PDA.

Además la especie de *Trichoderma* fue diferente en cada caso, por lo que la liberación de compuestos volátiles pudieron ser diferentes, ya que la producción de metabolitos secundarios incluyendo compuestos volátiles y no volátiles son dependientes de la cepa y de las condiciones ambientales (El-Hasan *et al.*, 2008; Reino *et al.*, 2008). Y en el caso del patógeno, a pesar de que se utilizó a *S. rolfsii* en los tres casos, la respuesta ante los compuestos volátiles fue diferente y este puede estar influenciado además de los factores antes mencionados, por la diversidad genética y patogenicidad que puede existir entre aislamientos (Flores-Moctezuma *et al.* 2008; 2006).

Con respecto a la producción de esporas de *T. asperellum* durante las interacciones, se presentó una fase de incremento (del 3 al 6° día), una fase estacionaria (9 al 21) y una fase de disminución de la producción de esporas en el día 24, que fue asociada en la recuperación del crecimiento micelial de *S. rolfsii*; de acuerdo a Calvo *et al.* (2002) en muchos hongos el cambio de crecimiento micelial a esporulación está marcado por una mayor producción de metabolitos secundarios, por lo que la disminución de la esporulación, tal vez se deba a un balance entre biosíntesis y biotransformación de los compuestos volátiles liberados por *T. asperellum*, como un mecanismo de detoxificación (Ruocco *et al.*, 2009) y por lo tanto una disminución de la concentración de los compuestos volátiles en el dispositivo, permitiéndole a *S. rolfsii* recuperar el crecimiento; no así por el efecto de una volatilización de los mismos, como lo señalan

Serrano-Carreón *et al.* (2004) en la producción de la 6-pentil-alfa-pirona por *T. harzianum*.

Por otro lado la cantidad de esporas de *T. asperellum* en interacción con *S. rolfsii* fue mayor que cuando estuvo ausente el patógeno; en muchos hongos el cambio de crecimiento vegetativo a esporulación está relacionado con la interacción antagónica con otros hongos (Bruce *et al.*, 2000; Hynes *et al.*, 2007) o bien los mecanismos de acción se incrementan por estimulación de las respuestas de defensa de la planta al ataque de patógenos, aunque esto no está del todo claro (Vinale *et al.*, 2008). Por lo que es posible que la presencia del *S. rolfsii* sea uno de los factores que estimula a *T. asperellum* a producir más esporas y por lo tanto mayor cantidad de compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles liberados de *T. asperellum* tuvieron un efecto fungistático sobre *S. rolfsii*, esto se comprobó después del periodo de interacción (*T. asperellum*- *S. rolfsii*) ya que *S. rolfsii* continuo su crecimiento y producción de esclerocios.

Dado a los resultados obtenidos en las interacciones en los días 9 al 21, el bioensayo se repitió, considerando solo los días 9, 12 y 15, obteniéndose el mismo comportamiento que el bioensayo inicial, con lo cual se confirma la actividad fungistática de *T. asperellum* sobre *S. rolfsii*.

En pruebas de actividad biológica, los compuestos obtenidos con los diferentes solventes también mostraron efecto fungistático sobre *S. rolfsii* y este efecto fue mayor con los compuestos volátiles capturados de *T. asperellum* en presencia del patógeno, que los compuestos volátiles capturados en ausencia de este por lo cual se confirma lo antes expuesto, así como también se confirma, que los compuestos capturados son de *T.*

*asperellum* ya que los compuestos volátiles que pudieron liberar los sustratos (trigo y PDA), el patógeno y solventes no influyeron en la actividad biológica. Al respecto, no se ha reportado la actividad biológica de compuestos volátiles emitidos por *Trichoderma* en interacción con algún patógeno, a excepción de la 6-pentil-alfa-pirona que se obtuvo en fermentación líquida sin interacción con algún patógeno, este compuesto volátil inhibió el crecimiento micelial y viabilidad de conidios de *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans* (Michel-Aceves *et al.*, 2004).

Por primera vez se reporta la actividad biológica de compuestos volátiles capturados de *Trichoderma* en interacción con algún patógeno (*T. asperellum* - *S. rolfsii*).

La selección de los compuestos volátiles obtenidos con diclorometano del día 9 para continuar con la identificación, fue debido a fueron los que ejercieron mayor inhibición del crecimiento micelial de *S. rolfsii*, así como también el solvente utilizado para la extracción es de mediana polaridad, lo que le confiere la propiedad de capturar compuestos volátiles polares como no polares en comparación con los otros solventes (Durst y Gokel, 1985).

Los métodos de extracción de compuestos volátiles reportados para *Trichoderma*, en su mayoría han sido capturados por la técnica de microextracción en fase sólida (Polizzi *et al.*, 2011; De Sousa *et al.*, 2008) o cultivos filtrados (Vinale *et al.*, 2008; El-Hasan *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2004; Michel-Aceves *et al.*, 2004; Serrano-Carreón *et al.*, 2004; Whitaker *et al.*, 1998; Cooney *et al.*, 1997a). Estas extracciones son orientadas a la búsqueda de un solo compuesto volátil como lo es la 6-pentil-alfa-pirona en diferentes especies de *Trichoderma*, algunos en fermentación líquida o sólida,

utilizando como sustratos medios de cultivo. En todos los casos se ha realizado sin la presencia de patógenos (hospedero). En este trabajo la extracción se realizó con el polímero SQ, mediante head space dinámico (con flujo de aire) el cual permitió la captura de mayor cantidad de compuestos volátiles.

Entre los compuestos volátiles se identificaron a 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y tolueno, los cuales se identificaron en *Trichoderma* spp. y se les consideró como inductores de la esporulación (Nemcovic *et al.*, 2008). Otro de los compuestos es 3-etil-ciclopentanona, la cual también se encontró en *T. album* (Strunz *et al.*, 1977) y el fenol que ha sido identificado en *Gliocladium virens* (Kirby *et al.*, 1988). De los dos últimos dos compuestos mencionados anteriormente no se conoce su actividad biológica.

Otros compuestos como etilbenceno, p-xileno, m-xileno,  $\alpha$ -pineno y fenil etil alcohol, no se han reportado para *Trichoderma*, por lo cual aún no se conoce su actividad biológica sobre microorganismos. La 6-pentil-alfa-pirona es uno de los compuestos ampliamente estudiado y encontrado en *T. harzianum*; sin embargo, no se encontró en *T. asperellum*, de acuerdo a Reino *et al.* (2008), los compuestos volátiles y no volátiles de *Trichoderma* son dependientes de la cepa, por lo que pudo ser parte de las razones que no apareciera en este trabajo. Otros de los motivos es el método de extracción ya que para obtener la 6-pentil-alfa-pirona ha sido por microextracción en fase sólida o cultivos filtrados.

Los 10 compuestos volátiles mencionados anteriormente se identificaron en las tres extracciones realizadas con metanol, diclorometano y hexano; esto fue debido a que la

gama de compuestos extraídos fueron principalmente apolares, por lo que pudieron ser capturados en mayor cantidad con diclorometano y menor con los otros dos solventes (Durst y Gokel, 1985).

Se conoce que la toxicidad de los volátiles está relacionada con la capacidad hidrofóbica de adsorberse dentro de las membranas celulares, formando una capa hidrorepelente sobre la pared celular, que impide la absorción de agua por la célula del hongo (Scarselletti y Faull, 1994). También se conoce que pueden producir vacuolación en la mayoría de las hifas, así como adelgazamiento de las mismas, esto fue observado en *T. viride* contra *F. solani* (Rathore *et al.*, 1992). En el caso de los fenoles, destruyen las membranas citoplasmáticas de los microorganismos y desnaturalizan sus proteínas (Nester *et al.*, 2007). Por lo cual se esperaría que los compuestos volátiles de *T. asperellum* tuvieran un efecto fungicida y no fungistático, por lo que se puede atribuir, a que la abundancia de fenol fue baja con respecto a los demás compuestos identificados.

Se han identificado otros compuestos volátiles en *T. harzianum* (Hanssen y Urbasch, 1990), *T. viride* (Prapulla *et al.*, 1992), *T. koningii* (Benoni *et al.*, 1990) y *T. atroviride* (Nemcovic *et al.*, 2008), pero para *T. asperellum* este es el primer reporte de identificación de compuestos volátiles, así como el primer reporte de extracción de compuestos de *T. asperellum* en presencia y ausencia de un patógeno (*S. rolfsii*) en fermentación sólida. Sería importante realizar bioensayos con la mezcla de estos compuestos en diferentes concentraciones y evaluar su efecto fungistático o fungicida.

## 8. CONCLUSIONES

1.- El dispositivo diseñado permitió capturar los compuestos volátiles liberados durante la interacción de *T. asperellum* con *S. rolfsii* y utilizar estos mismos compuestos para evaluar su actividad biológica e identificación.

2.- *T. asperellum* produce compuestos volátiles y estos se incrementan en interacción con *S. rolfsii*.

3.- Los días de menor crecimiento micelial y producción de esclerocios de *S. rolfsii* en la interacción con *T. asperellum* fueron de los días 9 al 21 y coincidió con la mayor producción de esporas de *T. asperellum*.

4.- Los compuestos volátiles extraídos con metanol, diclorometano y hexano del día 9 ocasionaron menor crecimiento micelial y producción de esclerocios de *S. rolfsii*.

5.- Los compuestos volátiles de *T. asperellum* en presencia y ausencia de *S. rolfsii* presentaron *in vitro*, actividad fungistática sobre *S. rolfsii*.

6.- Se identificaron 10 compuestos volátiles: cuatro alcoholes (2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, fenol y fenil etil alcohol), una cetona (3-etil-ciclopentanona), cuatro aromáticos (tolueno, etilbenzeno, p-xileno y m-xileno) y un heterocíclico ( $\alpha$ -pineno).

7.- Los compuesto volátiles más abundantes en la interacción de *T. asperellum*-*S. rolfsii* fueron: 3-metil-1-butanol, p-xileno y tolueno, mientras que en ausencia del patógeno además de los anteriores, 2-metil-1-butanol.

## 9. PERSPECTIVAS

- Capturar los compuestos volátiles por método de microextracción en fase sólida de la interacción *T. asperellum*-*S. rolfsii* y compararlos con los obtenidos.
- Identificar y cuantificar los compuestos volátiles con sus respectivos testigos inmediatamente después de extraerlos.
- Evaluar cada uno de los compuestos volátiles identificados de manera individual y en mezclas.
- Determinar la dosis letal de todos los compuestos volátiles encontrados.
- Evaluar el comportamiento de la liberación de compuestos volátiles de *Trichoderma* en presencia del patógeno y la planta.
- Determinar mediante microscopía de barrido, el efecto de los compuestos volátiles de *T. asperellum* en la membrana de las hifas de *S. rolfsii*.

## 10. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D. F. 838 p.
- Ahmad, J. S. and Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.
- Almassi, F., Ghisalberti, E. L., Narbey, M. J. and Sivasithamparam, K. 1991. New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products* 54: 396-402.
- Alonso-Reyes, B., Martinez, B., Gracia-Rivero, G., Jimenez, M. G. 2002. *In vivo* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* against *S. rolfsii* disease in tomato seedlings. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66: 45-48.
- Artigues, M. and Davet, P. 1984. Comparaison des aptitudes parasitaires de clones de *Trichoderma* vis á vis de quelques champignons á sclerotes. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 413-417.
- Barnett, H. L. and Barry, B. H. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4a ed. Macmillan Publishing Company. New York, U. S. A. 218 p.
- Bell, D. K. and Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. and Codón A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Benoni, H., Taraz, K., Korth, H. and Pulverer, G. 1990. Characterization of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from the soil fungus *Trichoderma koningii*. *Naturwissen* 77: 539-540.
- Bruce, A., Wheatley, R. E., Humphirs, S. N., Hackett, C. A. and Florence, M. E. J. 2000. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *Holzforschung* 54: 481-486.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. and Keller, N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459.

- Chastagner, G. A., Staley J. M. and Riley, K. 1990. Control of *Sclerotium rolfsii* on bulbous iris and lilies with in-furrow fungicide applications. *Acta Horticulturae* 266: 457-467.
- Chet, I. 1990. Mycoparasitism- recognition, physiology and ecology. *In*: R. R. Barker and P. E. Dunn (Eds). *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Alan Liss, New York, U. S. A. pp 725-733.
- Chet, I. and Benhamou, S. H. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. *In*: Harman, G. E. and Kubice, C. P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor and Francis Ltd., London, U. K. pp 153-152.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48: 37-43.
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R. and Avent, A. G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 503-513.
- Collins, R. P. and Halim, A. F. 1972. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *Journal Agricultural Food Chemistry* 20: 437-438.
- Cooney, J. M., Laurent, D. R., Jensen, D. J. and Perry-Meyer, L. J. 1997a. Effect of solid substrate, liquid supplement and harvest time on 6-*n*-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) production by *Trichoderma* spp. *Journal Agricultural Food Chemistry* 45: 531-534.
- Cooney, J. M., Laurent, D. R. and Perry-Meyer, L. J. 1997b. A novel tubular bioassay for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface. *Letters in Applied Microbiology* 24: 460-462.
- Cutler, H. G., Cox, R. H., Crumley, F. G. and Cole, P. D. 1986. 6-pentyl-a-pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agricultural and Biological Chemistry* 50: 2943-2945.

- Cutler, H. G., Himmelsbach, D. S., Arrendale, R. F., Cole, P. D. and Cox, R. H. 1989. Koninginin A: a novel plant regulator from *Trichoderma koningii*. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 2605-2611.
- Cutler, H. G., Himmelsbach, D. S., Yagen, B., Arrendale, R. F., Jacyno, J. M., Cole, P. D. and Cox, R. H. 1991. Koninginin B: a biologically active congener of koninginin A from *Trichoderma koningii*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 39: 977-980.
- Dal Bello, G. M., Monaco, C. I. y Chavez, A. R. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Revista Iberoamericana de Micología* 14: 131-134.
- Demain, A. L. and Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology* 69: 1-39.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 41-48.
- De Sousa, R. A., Batista, F. S. and Ferreira, L. S. G. 2008. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 712-717.
- Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Tesis de Licenciatura. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
- Díaz, P. C. y Castro J. L. 1977. Estudios sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Agronomía Tropical* 27: 539-547.
- Diomande, M. and Beute, M. K. 1977. Comparison of soil plate fungicide screening and field efficacy in control of *Sclerotium rolfsii* on peanuts. *Plant Diseases Reporter* 61: 408-412.
- Dunlop, R. W., Simon, A., Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E. L. 1989. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *Journal of Natural Products* 52: 67-74.

- Durst, H. D and Gokel, G. W. 1985. Química orgánica experimental. Editorial Reverté. S A. España. 592 p.
- Elad, Y. and Chet, I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica* 11: 55-58.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Hennies, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73: 85-88.
- El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J. and Buchenauer, H. 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 62-68
- Faheem Amin, Razdan, V. K., Mohiddin, F. A., Bhat, K. A. and Sheikh, P. A. 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*. *Journal of Phytopathology* 2: 34-37.
- Fernández-Larrea, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62: 96-100.
- Ferreira, S. A. and Boley, R. A. 1992. *Sclerotium rolfsii*. Disponible en internet: [http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s\\_rolfs.htm](http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s_rolfs.htm).
- Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A. and Nava-Juárez, R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. *Crop Protection* 25: 195-201.
- Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Rogel-Hernández, M. A. y Martínez-Romero, M. E. 2008. Diversidad genética de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 7-14.
- Fogliano, V., Ballio, A., Gallo, M., Woo, S. L., Scala, F. and Lorito, M. 2002. *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 323-333.

- Galindo, E., Flores, C. Larralde-Corona, P., Corkidi-Blanco, G., Rocha-Valadez, J. A., Serrano-Carreón, L. 2004. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 18: 1-8.
- Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology Biochemistry* 23: 1011-1020.
- Guigón-López, C. y González-González, P. A. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 117-124.
- Hanssen, H. P and Urbasch, I. 1990. 6-pentyl-alpha-pyrone. A fungicidal metabolic product of *Trichoderma* spp. (Deuteromycotina). *Proceedings of the Fourth International Mycological Congress, Regensburg, Germany.* p 260.
- Haram, S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet, I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980-985.
- Harman, G. 2003. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum*. Cornell University, Geneva, N. Y. 14456. Disponible en internet en: <http://www.iicasaninet.net/pub7sanveg/html/biocontrol/patogenos/trichoderma.html>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plants symbionts. *Microbiology* 2: 43-56.
- Harman, G. E. and Kubicek, C. P. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. Taylor and Francis Ltd., London, U. K. 393 p.
- Hernández-Cruz, P., Pérez-Campos, E., Martínez-Martínez, L., Ortiz, B. y Martínez, G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica* 24: 21-27.

- Hernández-Jiménez, J., Montes-Belmont, R., Flores-Moctezuma, H. E., Nava-Juárez, R. A. y Chanona-Perez, J. 2004. Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 345-350.
- Hill, R. A., Cutler, H. G. and Parker, S. R. 1995. *Trichoderma* and metabolites as control agents for microbial plant diseases. The Patent Cooperation Treaty, International Patent Application WO 95 20,879. *Chemical Abstracts* 123: 220823.
- Hoitink, H. A. J., Madden, L. V. and Dorrance, A. E. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology* 96: 186-189.
- Hoitink, H. A. J. and Boehm, M. J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37: 427-446.
- Howell, C. R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. *In*: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (Eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd.. London. U. K. pp 173-183.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases* 87: 4-10.
- Howell, C. R., Stipanovic, R. D. and Lumsden, R. D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science Technology* 3: 435-441.
- Hjeljord, L. G., Stensvand, A. and Tronsomo, A. 2001. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 91: 1172-1180.
- Hjeljord, L. and Tronsomo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. *In*: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (Eds). *Trichoderma*

- and *Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London. U. K. pp 131-151.
- Hynes, J., Müller, C. T., Jones, T. H. and Boddy, L. 2007. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *Journal of Chemical Ecology* 33: 43-57.
- Inbar, J. and Chet, I. 1997. Lectins and biocontrol. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17: 1-20.
- Jenkins, S. F. 1985. Effect of preplant soil fumigation and postplant fungicide application on control of southern blight of tomato. *Phytopathology* 75: 1362.
- Jenkins, S. F. and Averre, C. W. 1986. Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. *Plant Disease* 70: 614-619.
- Kirby, G. W., Rao, G. V. and Robins, D. J. 1988. New co-metabolites of gliotoxin in *Gliocladium virens*. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1*: 301-304.
- Kikuchi, T., Mimura, T., Harimaya, K., Yano, H., Arimoto, T., Masada, Y. and Inoue, T. 1974. Volatile metabolite of aquatic fungi. Identification of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma* and *Aspergillus* species. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 22: 1946-1948.
- Khatabi, N., Ezzahiri, B., Louali, L. and Oihabi, A. 2001. Effect of fungicides on *Trichoderma harzianum* on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 143-148.
- Larsen, T. O. and Frisvad J. C. 1995. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research* 19: 1153-1166.
- Le Doan, T., El Hajji, M., Rebuffat, S., Rajeswari, M. R. and Bodo, B. 1986. Fluorescein studies of the interaction of trichorzianine A IIIc with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 858: 1-5.

- Lorenzo, N. 2001. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Tesis de Maestría. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.
- Lorito, M., Woo, S. L. and Scala, F. 2004. Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante: i funghi. *Agroindustria* 3: 181-195.
- Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P. and Scala, F. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 9: 206-213.
- Madi, L., Katan, J. and Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* 87: 1054-1060.
- Manocha, M. 1991. Handbook of applied mycology I: Soil and Plants. In: Arora, D. K., Rai Mukerji, K. and Knudsen, G. (Eds). *Physiology and biochemistry of biotrophic mycoparasitism*. Merced-Dekker, Inc. New York, U. S. A. pp 273-300.
- Marini, C. J. R. 2010. Efecto de fungicidas químicos sobre la actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* Tc74 frente a *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp. aislados de cormos de gladiola. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Orizaba, México. 51 p.
- McCarter, M. 1991. *Compendium of tomato diseases*. APS Press. St. Paul, Minnesota, U. S. A. 73 p.
- Merlier, A. M. O., Boier, J. M., Pons, J. B. and Renaud, M. C. 1984. European Patent Application EP 124388. *Chemical Abstract* 183747r, 102.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O. y Lezama-Gutiérrez, R. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6-pentil-a-pirona de *Trichoderma* spp. sobre especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 14-21.
- Montes-Belmont, R. y Flores-Moctezuma, H. E., 2007. Efecto de metabolitos antifúngicos de origen vegetal sobre aislamientos de *Sclerotium rolfsii* avances.

IX Congreso Internacional/XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. XIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología. XLVII Annual Meeting of the American Phytopathological Society-Caribbean Division. Cancún, Quintana Roo, México.

- Montes-Belmont, R., Nava-Juárez, R. A., Flores-Moctezuma, H. E. y Mundo-Ocampo, M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.), en el Estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 300-304.
- Moss, M. O., Jackson, R. M., Rogers, D. 1975. The characterization of 6-(pent-1-enyl)- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma viride*. *Phytochemistry* 14: 2706-2708.
- Nemcovic, M., Jakubikova, L., Viden, I. and Farkas, V. 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters* 284: 231-236.
- Nester, E., Anderson, D., Roberts, E., Nester, M. 2007. *Microbiología humana*. Quinta edición, Editorial Manual Moderno, México D. F. México. pp 545-560.
- Noyd, K. R. 2000. *Mycology reference cards*. APS Press. St Paul, Minnesota. U. S. A. 8 cards.
- Ojika, M. 2008. Isolation of bioactive natural products from myxobacteria. *In*: Steven M. Colegate, Russell, J. Molyneux (Eds). *Bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination*. CRC Press. Taylor and Francis, Ltd., New York, U. S. A. 605 p.
- Ortega. G. J. G. 2010. Diagnóstico de hongos fitopatógenos de jitomate y efecto de *Trichoderma asperellum* Tc74 sobre *Fusarium* spp. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. 82 p.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review Phytopathology* 23: 23-54
- Parker, S. R., Cutler, H. G. and Schreinner, P. R. 1995a. Koningin C: isolation of a biologically active natural product from *Trichoderma koningii*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 59: 1126-1127.

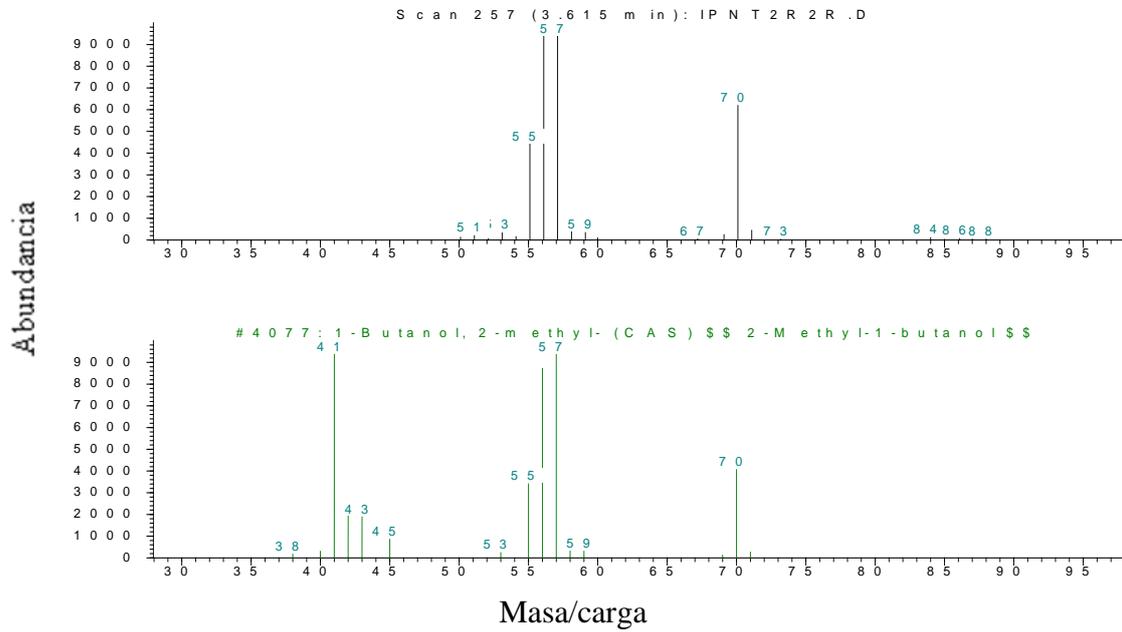
- Parker, S. R., Cutler, H. G. and Schreinner, P. R. 1995b. Koninginin E: a biologically active natural product from *Trichoderma koningii*. Bioscience Biotechnology Biochemistry 59: 1747-1749.
- Pérez, N. 2004. Manejo ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 p.
- Pineda, J. B. y Díaz, P. C. 1981. Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en *Phaseolus vulgaris* mediante la utilización de *Penicillium notatum* Westl. Agronomía Tropical 31: 265-281.
- Polizzi, V., Adams, A., Picco, A. M., Adriaens, E., Lenoir, J., Peteghem, C. V., De Saeger, S. and De Kimpe, N. 2011. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. Building and Environment 46: 945-954.
- Prapulla, S. G., Karanth, N. G., Enger, K. H., Tressl, R. 1992. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma viride*. Flavour and Fragrance Journal 7: 231 – 234.
- Punja, Z. K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Reviews Phytopathology 23: 97-127.
- Punja, Z. K. 1996. Influence of nitrogen and calcium compounds on development of disease due to *Sclerotium rolfsii*. In: Engelhard, A. W. (Ed). Soilborne plant pathogens management of disease with macro-and microelements. APS PRESS. St. Paul Minnesota, U. S. A. 217 p.
- Punja, Z. K., Grogan, R. G. and Unruh, T. 1982. Chemical control of *Sclerotium rolfsii* on golf greens in northern California. Plant Disease 66: 108-111.
- Punja, Z. K., Jenkins, S. F. and Grogan, R. G. 1984. Effect of volatile compounds, nutrients and source of sclerotia on eruptive sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 74: 1290-1295.
- Ramírez, R., Santos, R., Bracho, F., Sandoval, L. y Castro de Rincón, C. 1998. Control de *Sclerotium rolfsii* Sacc. con fungicidas y humus. Revista Facultad de Agronomía (LUZ) 15: 534-544.
- Ramírez, S. L. 2011. Evaluación *in vitro* de *Trichoderma asperellum* Tc74 y fungicidas sintéticos en el control de patógenos asociados a la muerte de hojas de cedro

- limón (*Cupressus macrocarpa* Hartw). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 92 p.
- Rathore, V. R. S., Mathur, K., Hodha, B. C. and Mathur, K. 1992. Activity of volatile and non-volatile substances produced by *Trichoderma viride* on ginger rhizome rot pathogens. *Indian Phytopathology* 45: 253-254.
- Rebuffat, S., El Hajji, M., Hennig, P., Davoust, D. and Bodo, B. 1989. Isolation, sequence and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*. *International Journal of Peptide and Protein Research* 34: 2000-2010.
- Reino, J. L., Guerriero, R. F., Hernández-Galá, R. and Collado, I. G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7: 89-123.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56.
- Roberti, R., Flori, P. and Pisi, A. 1996. Biological control of soil-borne *Sclerotium rolfsii* infection by treatment of bean seeds with species of *Trichoderma*. *Petria* 6: 105-116.
- Rossmann, A. Y., Samuels, G. J., Rogerson, C. T. and Lowen, R. 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology* 42: 1-248.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S. L. and Lorito, M. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 291-301.
- Ruiz, R. A. 2010. Actividad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. propagadas en medio PDA y cuatro sustratos vegetales, sobre 12 cepas de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 120 p.
- Sandoval, I. y López, M. 2002. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad* 4: 69-72.

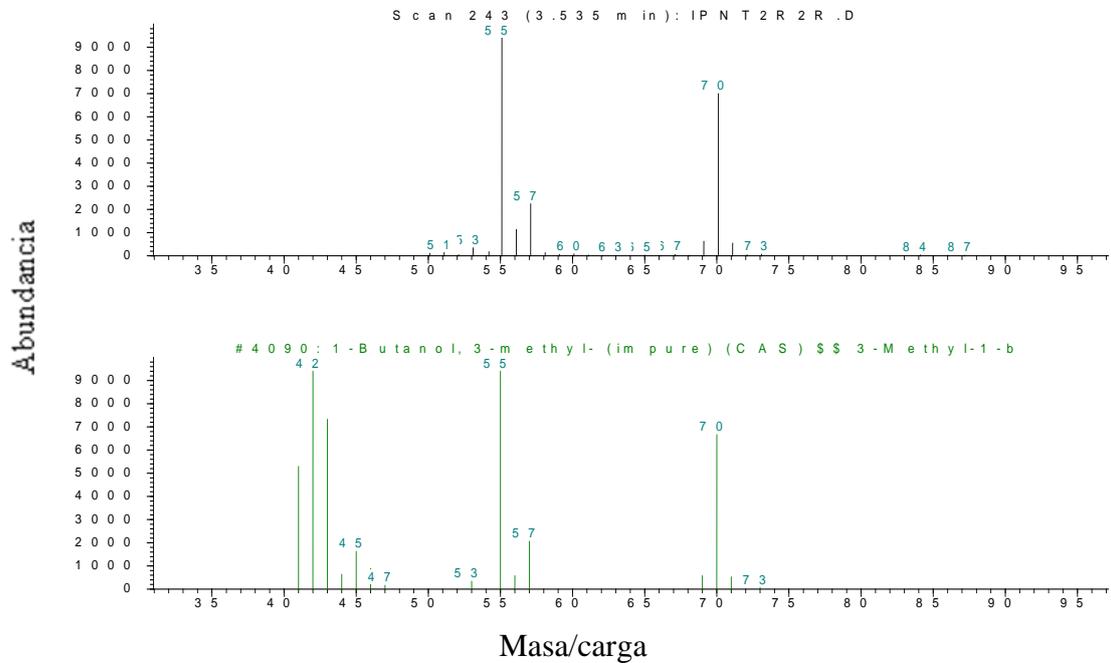
- Scarselletti, R. and Faul, J. L. 1994. *In vitro* activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum* in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mycological Research 98: 1207-1209.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. and Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Applied Environmental Microbiology 60: 4364-4370.
- Schuster, A. and Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology 87: 787-799.
- Serrano-Carreón, L., Flores, C., Rodríguez, B. and Galindo, E. 2004. *Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone production by *Trichoderma harzianum* in a two liquid phases, extractive fermentation system. Biotechnology Letters 26: 1403-1406.
- Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M. and Belin, J. M. 1993. Metabolism linoleic acid and 6 penthyl- $\alpha$ -pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. Applied and Environmental Microbiology 59: 2945-2950.
- Shem, M. Y., Star, J. L., Keller, N. P., Woodard, K. E. and Lee, T. A. 1998. Distribution of isolates of *Sclerotium rolfsii* tolerant to pentachloronitrobenzene in Texas peanut fields. Plant Disease 82: 103-106
- Simon, A., Dunlop, R. W., Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. Soil Biology and Biochemistry 20: 263-264.
- Singh, R. K. and Dwivedi, R. S. 1991. Ecology and biology of *Sclerotium rolfsii* Sacc. International Journal of Tropical Plant Diseases 9: 161-171.
- Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, U. K. pp 139-191.

- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L. y Coronado, M. F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía (LUZ) 16: 509-516.
- Strunz, G. M., Ren, W. Y., Stillwel, M. A. and Valenta, Z. 1977. Structure and synthesis of a new cyclopentanone derivative from *Trichoderma album*. Canadian Journal of Chemistry 55: 2610-2612.
- Tlapal, B. B. 2008. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de tomate (*Solanum esculentum*). In: Bautista, M. N., Chavarin, P. C. and Valenzuela, E. F. (Eds.). Jitomate tecnologías para su producción en invernadero. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México. pp 65-94.
- Ulloa, M. y Herrera, T. 1994. Etimología e iconografía de géneros de hongos. 1ª Ed. Cuadernos del Instituto de Biología No. 1. UNAM. México. 300 p.
- Vey, A., Hoag, I. R. E. and Butt, T. M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T. M., Jackson, C. and Magan, N. (Eds.). Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CAB International Publishing, Bristol, U. S. A. pp 311.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S. and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40: 1-10.
- Whitaker, G., Poole, P. R., Cooney, J. M. and Lauren, D. R. 1998. Production of [<sup>14</sup>C]-6-pentyl-2-pyrone in liquid cultures of *Trichoderma harzianum*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46: 3747-3749.
- Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology 86: 125-126.

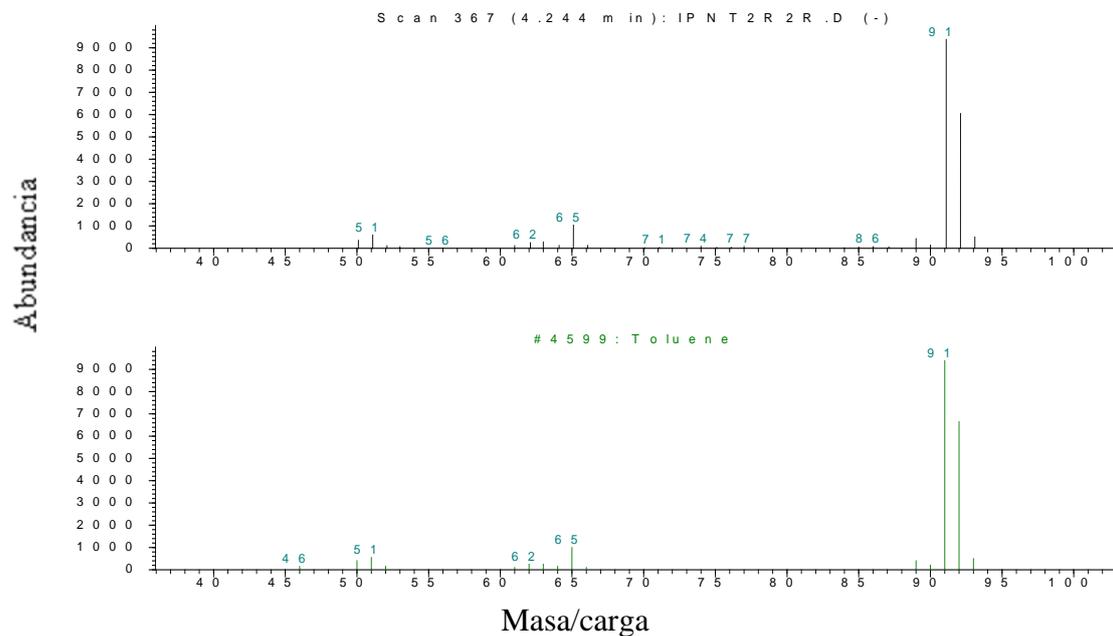
## 11. ANEXO



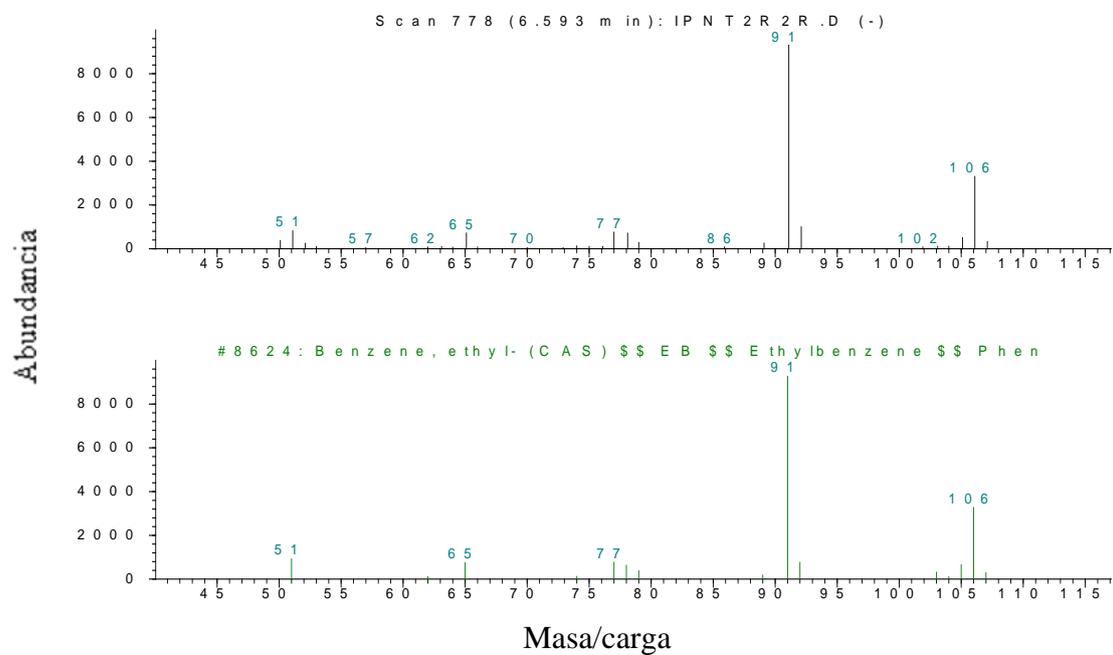
### 2-metil-1-butanol



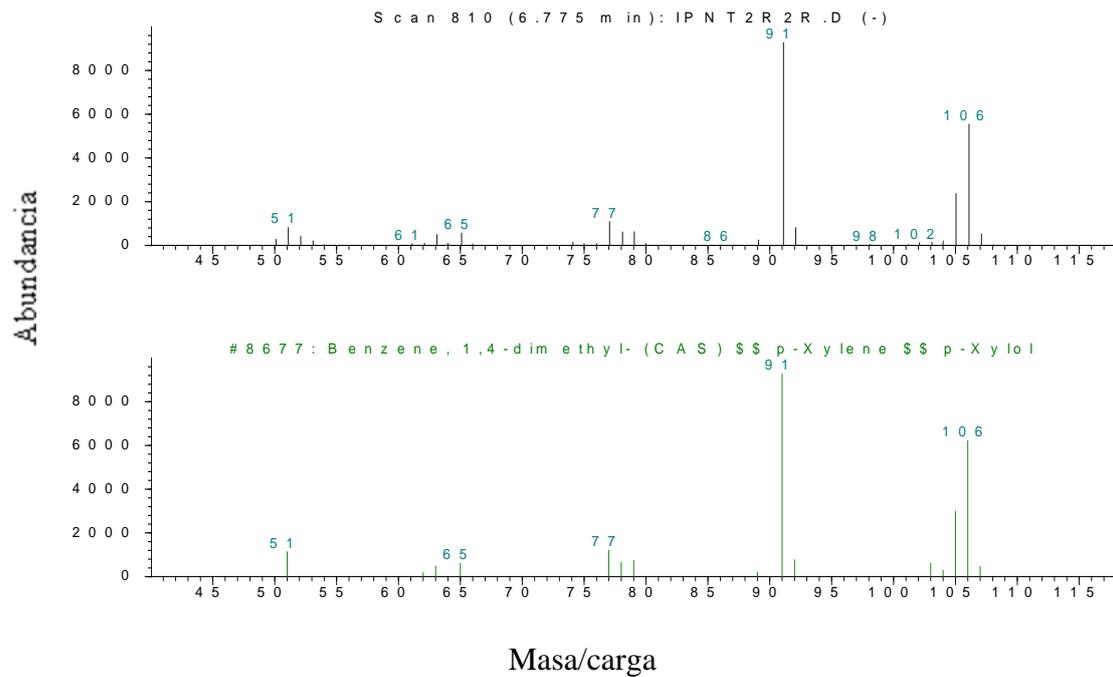
### 3-metil-1-butanol



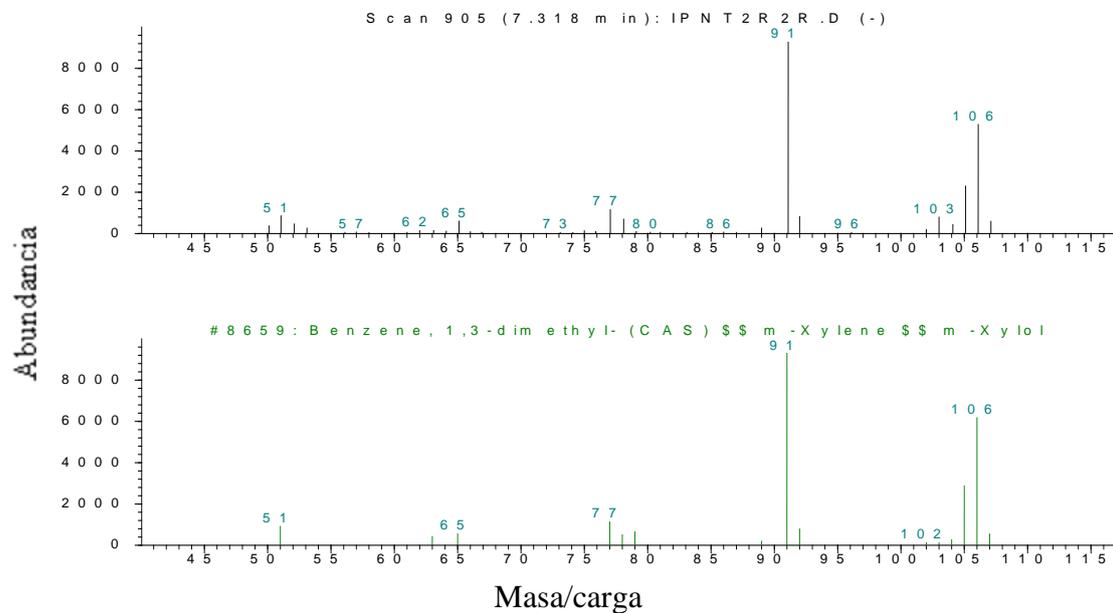
### Tolueno



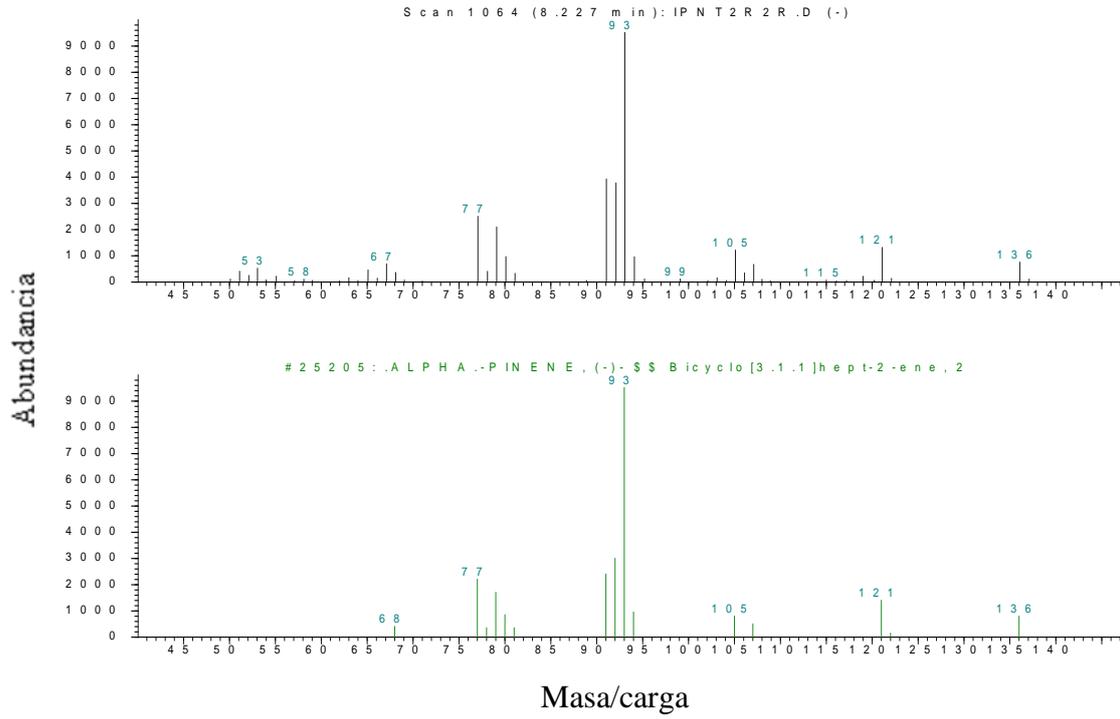
### Etilbenceno



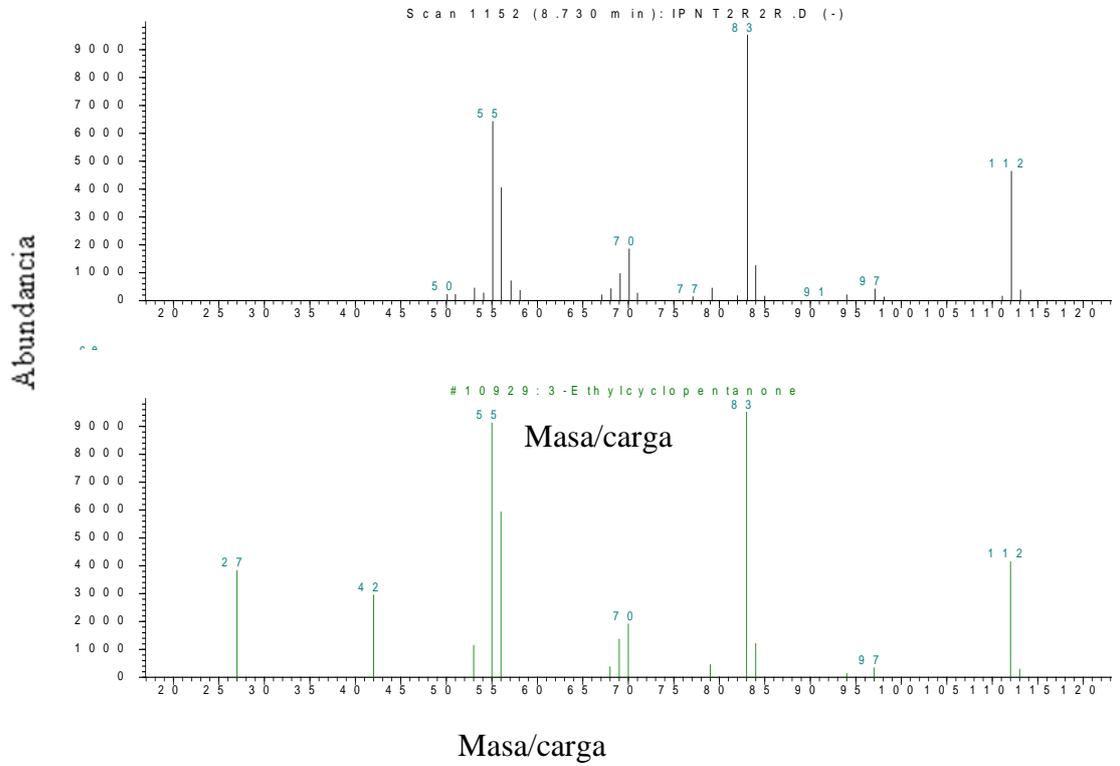
**p-Xileno**



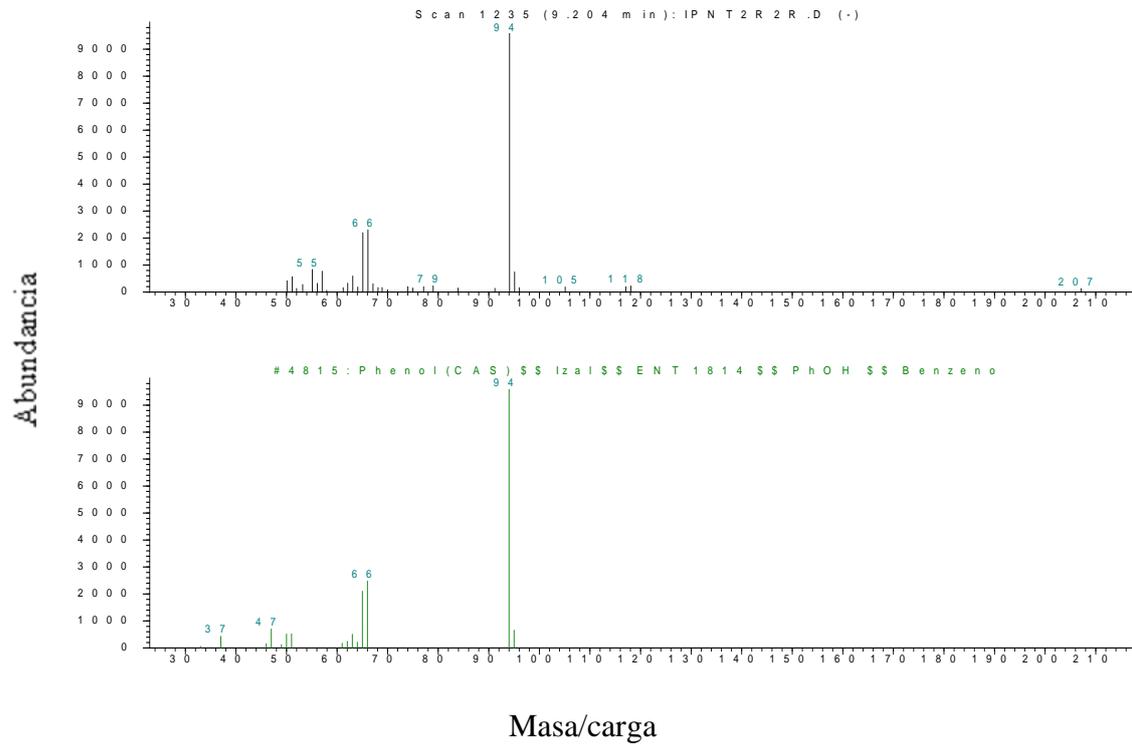
**m-Xileno**



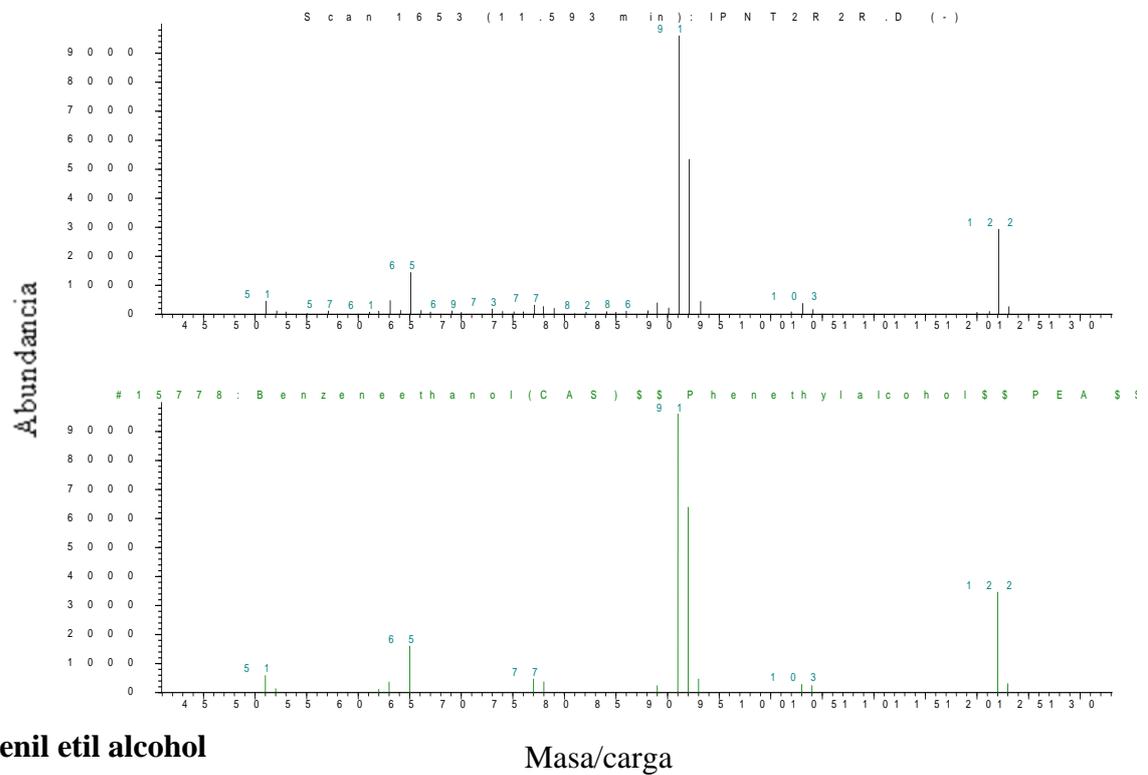
**$\alpha$ -Pino**



**3-Etil-ciclopentanona**



**Fenol**



**Fenil etil alcohol**

Masa/carga