



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA Y QUITINOLÍTICA  
DE *Trichoderma* spp., PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE  
*Moniliophthora roreri* Y *Moniliophthora perniciosa*.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Magister en  
Investigación en Biotecnología Agrícola**

Presentado por:

María Fernanda Garcés Moncayo

Guayaquil – Ecuador

2018

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por permitirme realizar la investigación en sus instalaciones.

Al PhD. Luis Galarza y al PhD. Christian Romero por su guía e invaluable ayuda

A mi familia por apoyarme siempre.

## **DEDICATORIA**

A mis padres María Esther Moncayo y Juan Vicente Garcés por toda la dedicación, cuidado, apoyo y amor con el que llenan mi vida.

A mis hermanas María Daniela y Diana Margarita por su amistad y apoyo en todo momento.

A mi abuelita y tías por el cariño y apoyo.

A Geovanny Rosales por haberme acompañado en el transcurso de la maestría y haber sido una persona especial en mi vida.

A Karina Marín por su linda amistad.

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

---

Ramón Espinel Ph. D  
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

---

Luís Galarza Romero Ph. D  
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

---

Christian Romero Bonifaz Ph. D  
CO-DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

---

Efrén Santos Ordóñez Ph.D  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1

---

José Flores Ms.C  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

María Fernanda Garcés Moncayo

## GLOSARIO

**Control biológico.** Proceso natural en el que se controla la población de patógenos por medio de enemigos naturales.

**Metabolito.** Molécula producto de un proceso químico dentro del metabolismo de un organismo.

**Quitina.** Polisacárido muy abundante en la naturaleza, específicamente un homopolímero lineal que forma parte de las paredes celulares de hongos y artrópodos.

**Quitinasa.** Enzima hidrolítica que degrada la quitina.

**Actividad antagónica.** Tipo de interacción que limita o bloquea la actividad de un organismo al entrar en contacto con una sustancia secretada por otro organismo.

**Actividad quitinolítica.** Facultad de algunos microorganismos de producir enzimas quitinolíticas con capacidad de degradar quitina.

## ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Resumen.....	1
Capítulo 1.....	2
1.1 Introducción y objetivos.....	2
1.2 Antecedentes y justificación.....	2
1.3 Objetivo general.....	5
1.4 Objetivos específicos.....	5
1.5 Marco teórico.....	6
Capítulo 2.....	9
2. Metodología.....	9
2.1 Efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> spp. frente <i>M. roreri</i> y <i>M. pernicioso</i> .....	9
2.2 Actividad quitinolítica de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	12
2.3 Identificación por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de compuestos bioactivos con potencial antifúngico.....	14
Capítulo 3.....	15
3. Resultados y Discusión.....	15
3.1 Efecto antagónico de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp. frente <i>M. roreri</i> y <i>M. pernicioso</i> .....	15
3.2 Actividad quitinolítica de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp., contra <i>M. roreri</i> y <i>M. pernicioso</i> .....	18
3.3 Detección de los compuestos volátiles con potencial antifúngico o con otro tipo de actividad biológica producidos por las cepas de <i>Trichoderma</i> .....	24
Conclusiones.....	26
Recomendaciones.....	27
Bibliografía.....	28
ANEXOS.....	35

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	9
<b>Tabla 2.</b> Actividad quitinolica en medio solido de <i>Trichoderma</i> spp. con diferentes fuentes de quitina coloidal.....	19
<b>Tabla 3.</b> Actividad quitinolítica total de <i>Trichoderma</i> spp. (mg/mL de NAGA).....	21
<b>Tabla 4.</b> Actividad quitinolítica total de <i>Trichoderma</i> spp. (mg/mL de NAGA) con quitina coloidal de <i>M. pernicioso</i> .....	22
<b>Tabla 5.</b> Actividad quitinolítica total de <i>Trichoderma</i> spp. (mg/mL de NAGA) con quitina coloidal de <i>M. roreri</i> .....	22
<b>Tabla 6.</b> Compuestos antimicrobianos y de interés biológico identificados en <i>Trichoderma</i> spp.....	35
<b>Tabla 7.</b> Compuestos antimicrobianos y de interés biológico identificados en los enfrentamientos de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. roreri</i> y <i>M. pernicioso</i> .....	36
<b>Tabla 8.</b> Especies donde se ha detectado Dibutyl phthalate.....	38
<b>Tabla 9.</b> Especies donde se ha detectado Ergosterol.....	38
<b>Tabla 10.</b> Especies donde se ha detectado Lanosterol.....	39
<b>Tabla 11.</b> Especies donde se ha detectado Hexadecanoic acid, methyl ester.....	39
<b>Tabla 12.</b> Especies donde se ha detectado Phenylethyl Alcohol.....	40
<b>Tabla 13.</b> Especies donde se ha detectado 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester.....	40
<b>Tabla 14.</b> Especies donde se ha detectado Valencene.....	41
<b>Tabla 15.</b> Especies donde se ha detectado $\alpha$ -selinene.....	41
<b>Tabla 16.</b> Especies donde se ha detectado Eicosane.....	42
<b>Tabla 17.</b> Especies donde se ha detectado Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl).....	42
<b>Tabla 18.</b> Especies donde se ha detectado n-Hexadecanoic acid.....	43
<b>Tabla 19.</b> Especies donde se ha detectado Bis(2-ethylhexyl) phthalate.....	44
<b>Tabla 20.</b> Especies donde se ha detectado Acorenone.....	45
<b>Tabla 21.</b> Especies donde se ha detectado Heneicosane.....	45
<b>Tabla 22.</b> Especies donde se ha detectado 1-Nonadecene.....	46
<b>Tabla 23.</b> Especies donde se ha detectado Diisooctyl phthalate.....	46



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructuras de <i>Trichoderma</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	10
<b>Figura 3.</b> Aislados de <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Moniliophthora perniciosa</i> ...	11
<b>Figura 4.</b> Cultivo dual in vitro de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., vs. <i>M. roreri</i> y <i>M. perniciosa</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Cambio de color esperado en las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con actividad quitinolítica.....	12
<b>Figura 6.</b> Extractos de <i>Trichoderma</i> spp. solubilizados en acetato de etilo.	14
<b>Figura 7.</b> Histograma del porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. roreri</i> .....	16
<b>Figura 8.</b> Histograma del porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. perniciosa</i> .....	17
<b>Figura 9:</b> Enfrentamiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. roreri</i> y <i>M. perniciosa</i> .....	18
<b>Figura 10.</b> Actividad quitinolítica de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. inoculadas en medio líquido (mg/mL de NAGA).....	20
<b>Figura 11.</b> Actividad quitinolítica de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en medio de detección sólido suplementado con quitina coloidal.....	23
<b>Figura 12.</b> Estructura de Dibutyl phthalate.....	38
<b>Figura 13.</b> Estructura Ergosterol.....	38
<b>Figura 14.</b> Estructura Lanosterol.....	39
<b>Figura 15.</b> Estructura de Hexadecanoic acid, methyl ester.....	39
<b>Figura 16.</b> Estructura de Phenylethyl Alcohol.....	40
<b>Figura 17.</b> Estructura de 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester.....	40
<b>Figura 18.</b> Estructura de Valencene.....	41
<b>Figura 19.</b> Estructura de $\alpha$ -selinene.....	41
<b>Figura 20.</b> Estructura de Eicosane.....	42
<b>Figura 21.</b> Estructura de Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl).....	43
<b>Figura 22.</b> Estructura de n-Hexadecanoic acid.....	44
<b>Figura 23.</b> Estructura de Bis(2-ethylhexyl) phthalate.....	44
<b>Figura 24.</b> Estructura de Acorenone.....	45
<b>Figura 25.</b> Estructura de Heneicosane.....	45
<b>Figura 26.</b> Estructura de 1-Nonadecene.....	46
<b>Figura 27.</b> Estructura de Diisooctyl phthalate.....	46

## ABREVIATURAS

**BCP.** Púrpura de bromocresol

**g.** gramo

**GC-MS.** Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas.

**mL.** Mililitro

**MS.** Metabolito secundario

**NAGA.** N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina

**PDA.** Papa dextrosa agar

**PDB.** Caldo de papa dextrosa.

**r.p.m.** Revoluciones por minuto

**R. Time** Tiempo de retención

**vs.** Versus

## Resumen

La moniliasis y la escoba de bruja causadas por *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* respectivamente, son enfermedades limitantes en el cultivo de cacao por las grandes pérdidas económicas que producen. Por consiguiente, se están buscando nuevas alternativas biológicas para controlar estas enfermedades. En este estudio, diez cepas de *Trichoderma*, aisladas de la rizósfera de una plantación de cacao han demostrado tener efecto antagonista sobre los patógenos antes mencionados en su interacción en cultivos duales, obteniendo porcentajes de inhibición de 89.32% a 96.69% para *M. roreri* y de 87.50% a 93.53% para *M. perniciosa*.

Dado que la quitina es uno de los mayores componentes de la pared celular de muchos hongos, se realizó un ensayo para determinar la producción de enzimas quitinolíticas que hidrolicen este polisacárido, resultando las cepas de *Trichoderma* eficientes al utilizar la quitina coloidal como fuente de carbono, obteniendo concentraciones de N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamina (NAGA) de entre 51.75 a 266.75 mg/mL, 21.75 a 94.25mg/mL y 24.25 a 71.75mg/mL respectivamente con quitina coloidal comercial, quitina de la pared celular de *M. perniciosa* y *M. roreri*.

Finalmente, se identificaron 17 compuestos con potencial biocontrolador y de interés biológico, por medio de análisis en cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) de extractos en acetato de etilo obtenidos de las diferentes cepas de *Trichoderma* en crecimiento individual y de extractos obtenidos a partir de los enfrentamientos con los dos agentes causales de enfermedades en el cultivo de cacao.

Al evaluar tanto el antagonismo, la producción de quitinasas y la producción de compuestos bioactivos, las diez cepas de *Trichoderma* utilizadas mostraron una prometedora actividad biológica que les permitiría ser utilizados como agentes biocontroladores para *M. roreri* y *M. perniciosa*.

**Palabras clave:** *Trichoderma* spp., *M. roreri*, *M. perniciosa*, antagonismo, quitina, N-acetil- $\beta$ -D glucosamina, metabolitos.

# Capítulo 1

## 1.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El cacao (*Theobroma cacao*) originario de Suramérica es un cultivo que ha sido domesticado y hoy se produce en regiones tropicales de América, África, Asia y Oceanía en más de 50 países, la mayoría ubicados en el Caribe y Latinoamérica. Es un cultivo que requiere de condiciones climáticas de temperatura y humedad adecuadas para que se pueda obtener una mayor producción y disminuir la proliferación de plagas y enfermedades<sup>1</sup>. Ecuador lidera la producción y exportación de cacao fino de aroma con un 62% del mercado mundial, este producto es altamente apetecido por sus características de sabor único, aunque buscando variedades consideradas más resistentes al ataque de patógenos se han introducido las variedades nacional y trinitario<sup>2</sup>.

Las plantaciones de cacao pueden verse gravemente afectadas por plagas fúngicas como *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*<sup>3</sup>, también conocidas como moniliasis, las cuales atacan a tejidos y frutos y escoba de bruja que ataca el fruto, cojines florales y los brotes, respectivamente. Para el control de estas enfermedades se utilizan fungicidas químicos que con el tiempo producen daños ambientales<sup>4</sup>. Por otro lado, el control biológico y su integración con métodos tradicionales de control se han convertido en una alternativa para encontrar mejores estrategias para reducir la incidencia de enfermedades en plantas. Los agentes de control biológico, especialmente los hongos han sido los más estudiados y utilizados debido a su amplio espectro de acción con otros hongos, bacterias, insectos y malezas, así como por los beneficios que ofrecen al ser fuentes naturales, tener bajo impacto ambiental, proveer protección a los cultivos y por ser más específicos que los productos químicos<sup>5,6</sup>.

En este estudio se investigará la capacidad antagónica de diez cepas de *Trichoderma* contra dos patógenos del cultivo de cacao *M. roreri* y *M. perniciosa* por medio de pruebas in vitro o cultivos duales. Se detectará además la actividad quitinolítica de las cepas de *Trichoderma* en presencia de las paredes celulares de los hongos patógenos y se identificarán por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas los compuestos biosintetizados con potencial para ser utilizados como antifúngicos.

## 1.2 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Ecuador es uno de los mayores exportadores de cacao a nivel mundial por tanto, su cultivo es de gran importancia económica, solo en el 2015 se exportaron 260 mil toneladas métricas, de cacao en grano y sus derivados<sup>2</sup>. Las provincias que cuentan con una mayor superficie cultivada son Manabí, Los Ríos y Guayas, también tiene una

participación Esmeraldas y El Oro. Además, se lo cultiva en menor cantidad en la Sierra en las provincias de Cotopaxi, Bolívar, Cañar y se ha incrementado su producción en la Amazonia <sup>7</sup>.

Ecuador produce cacao desde el año 1780, destacándose su producción en la década de 1890 donde se convirtió en el principal exportador de cacao del mundo, años después en la década de 1920 aparecieron las plagas y enfermedades que afectaron gravemente su producción, ocasionando pérdidas en un 30% en los cultivos<sup>2,8</sup> y en la economía ecuatoriana. En la actualidad las plantaciones de cacao continúan siendo afectadas por enfermedades fúngicas siendo las más peligrosas la moniliasis causada por *M. roleri*, y la escoba de bruja por *M. pernicioso* que pueden llegar a producir una pérdida completa del cultivo<sup>9</sup>. Un brote de moniliasis en el segundo semestre del 2015 provocó la disminución en un 14% de la producción, que representaron 20000 toneladas menos en exportaciones de enero a julio del 2016. Las provincias más afectadas fueron; Guayas, Los Ríos, El Oro, Manabí y una parte de Santo Domingo de los Tsáchilas. (Reyes, 2016).

La agricultura orgánica y el uso de microorganismos beneficios han ido en ascenso en los últimos años, especialmente los controladores biológicos que se han vuelto indispensables para el control de diferentes enfermedades provocadas por diversos patógenos. Así como el uso de microorganismos que facilitan la disponibilidad de nutrientes y producen fitohormonas que mejoran la nutrición, el crecimiento y la salud en general de la planta<sup>10</sup>. Tal es el caso de las cepas del género *Trichoderma* que han sido usadas en varios cultivos como biofertilizantes y biocontroladores. A partir de estas cepas se han desarrollado insumos biológicos comerciales que han sido aplicados en cultivos de arroz, frutilla, papa, tomate, maíz, para controlar patógenos como *Armillaria* spp, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium moniliforme*<sup>10,11</sup>.

En los últimos años nuevas estrategias para controlar la infección de hongos patógenos a plantaciones de cacao han sido desarrolladas, una de esas alternativas constituye la búsqueda de microorganismos benéficos que pueden ser usados como potenciales biocontroladores de enfermedades<sup>3</sup>. Varias especies del género *Trichoderma* han sido ampliamente estudiados por sus diferentes mecanismos de acción<sup>12,13</sup> que actúan a través de la antibiosis, micoparasitismo, producción de toxinas, producción de enzimas, inducción de respuestas de defensa de la plantas y exclusión competitiva<sup>14,15</sup>.

El micoparasitismo consiste en una compleja interacción entre el antagonista y el patógeno, donde la producción de enzimas por parte del antagonista es fundamental para que se produzca la lisis de la pared celular del patógeno y la pérdida de su contenido citoplásmico<sup>5</sup>. *Trichoderma* spp., ataca la hifa de su hospedero por enrollamiento y se adhiere a él a través de los carbohidratos de la pared celular, una vez unidos forma apresorios que van penetrando al hospedero por secreción de enzimas liticas y peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina) con el fin de extraer nutrientes para su propio crecimiento<sup>16,17</sup>.

Al estar en contacto con patógenos *Trichoderma* spp., tiende a producir quitinasas (hidrolizan quitina insoluble en sus componentes oligo y monomérico), glucanasas (degradan  $\beta$ -glucanos), proteasas (catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de aminoácidos pequeños e hidrofóbicos como alanina y valina), y lipasas (hidrolizan triglicéridos a monoglicéridos, diglicéridos o glicerol) para atacar al patógeno<sup>12,18-21</sup>.

Los compuestos antimicrobianos como antibióticos, péptidos no ribosómicos, terpenos volátiles y no volátiles, pirógenos, sideróforos, piranos y compuestos derivados de compuestos indólicos<sup>22</sup> que secretan *Trichoderma* spp., han sido ampliamente estudiados. En la actualidad enzimas como: celulasas, hemicelulasas, proteasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas han sido aisladas y purificadas a partir de diferentes cepas de *Trichoderma*<sup>5</sup> destacándose la producción de quitinasas y glucanasas ya que estos compuestos son utilizados como uno de los métodos más exitosos de acción en control biológico, debido a que suprimen al patógeno por medio de la destrucción de su pared celular<sup>23</sup>.

Dada la importancia pasada y presente del cultivo de cacao en el Ecuador, se están continuamente realizando investigaciones con el fin de encontrar nuevas alternativas para el control de sus dos patógenos principales *M. roreri* y *M. pernicioso*. Una opción es usar cepas locales de *Trichoderma* spp., debido a que su capacidad de biosintetizar una gran cantidad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden tener algún tipo de actividad biológica como antifúngico, o pueden ser capaces de producir enzimas quitinolíticas y usarse como agentes de control biológico.

### **1.3 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antagónica de diez cepas de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de los agentes causales de la moniliasis y la escoba de bruja en el cultivo cacao, mediante pruebas de antagonismo y detección de enzimas quitinolíticas para identificar potenciales biocontroladores.

### **1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos de esta investigación son:

- Analizar el efecto antagónico de diez aislados de *Trichoderma* spp., por medio de la interacción en cultivo dual frente a *M. roleri* y *M. pernicioso* para identificar las cepas que inhiban en mayor porcentaje el crecimiento de los hongos patógenos.
- Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad quitinolítica de diez aislados de *Trichoderma* spp., mediante la adición al medio de cultivo de quitina coloidal derivada de la pared celular de *M. roleri* y *M. pernicioso* para identificar potenciales biocontroladores.
- Identificar por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas compuestos bioactivos con potencial antifúngico sintetizados por diez aislados de *Trichoderma* spp., y que puedan ser utilizados para inhibir el crecimiento de *M. roleri* y *M. pernicioso*.

## 1.5 MARCO TEÓRICO

En agricultura los daños producidos por hongos, bacterias e insectos provocan millones de dólares en pérdidas económicas a nivel mundial ya que reducen las cosechas de los cultivos<sup>24</sup>. El uso indiscriminado de productos químicos como pesticidas contra plagas ha propiciado que exista disminución en la eficacia de estos productos y además una enorme contaminación ambiental, esto ha ocasionado que se generen patógenos altamente resistentes<sup>25-27</sup>. Como medida alternativa ecológica al uso de pesticidas y tratamientos contra plagas y enfermedades de las plantas, se han desarrollado productos basados en metabolitos secundarios producidos por especies de bacterias que actúan como antagonistas frente a estas plagas, que han demostrado ser más eficaces y con escaso impacto ambiental por ser biodegradables y de baja toxicidad para organismos que no requieren ser controlados<sup>26,28-30</sup>. La búsqueda de compuestos biológicamente activos producidos a partir de fuentes naturales ha sido de gran interés en los últimos años<sup>31</sup>.

El árbol tropical de cacao (*Theobroma cacao* L) donde se producen las semillas de chocolate, es el tercer producto agrícola más importante en los países tropicales después del té y del café. Anualmente se producen aproximadamente 3,700,000 toneladas de cacao lo que representa el 68% de la producción total proveniente de África, el 12% proviene de Indonesia, el 8% se produce en Latinoamérica y el 10% se produce en países tropicales<sup>32,33</sup>.

La producción de cacao es frecuentemente afectada por problemas fitosanitarios que producen pérdidas en la cosecha de hasta el 100%<sup>33</sup>. Las plantaciones se ven principalmente afectadas por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como la escoba de bruja causada por *M. pernicioso* (*Crinipellis pernicioso*), la moniliasis o pudrición acuosa producida por *M. roreri*<sup>34</sup> y la pudrición negra, causada por varias especies de *Phytophthora*<sup>33</sup>.

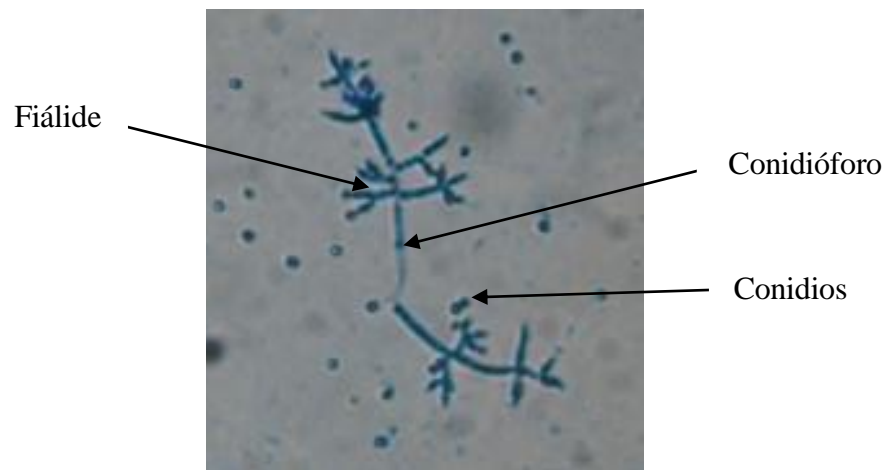
El control biológico es una estrategia innovadora, menos costosa, biodegradable y segura para el ser humano y el medio ambiente que sirve como intervención contra enfermedades en cultivos de importancia agrícola<sup>35,36</sup>, el uso de especies de hongos, bacterias o nemátodos como bioplaguicidas o entomopatógenos, si se utilizan de forma adecuada contribuyen a un manejo sustentable de los cultivos. El control biológico en los últimos años ha sido utilizado contra otros hongos, insectos y nemátodos causantes de enfermedades en las plantas. En este sentido, dicho control ha sido considerado una alternativa más natural y ambientalmente aceptable contrario a los métodos químicos convencionales<sup>37</sup>. Es el caso de *Trichoderma* spp., y *Aspergillus* spp., que son usados para controlar por medio de la inhibición el crecimiento de patógenos<sup>38</sup>.

En la rizósfera existen hongos del género *Trichoderma* que son muy comunes en el suelo, poseen capacidad micoparasítica contra especies fitopatógenas<sup>39</sup> y nemátodos<sup>40</sup> que son



de gran importancia económica por las pérdidas que causan en diferentes cultivares. Estos hongos se encuentran en gran parte de los suelos agrícolas, tienen la característica de ser saprofitos y fueron identificados por primera vez en 1794, desde esta fecha se han identificado 130 especies<sup>41</sup>.

La morfología de *Trichoderma* se describe como colonias algodonosas que se compactan con el tiempo, de color verde brillante que es producido debido a los conglomerados de conidios los cuales tienen su forma redonda o elipsoidal que se forma en las puntas de las hifas, pero pueden también ser de color blanco o amarillo y por lo general pueden formar anillos concéntricos. Poseen conidióforos hialinos, ramificados, que en ocasiones poseen forma piramidal, al igual que fiálides que pueden encontrarse solitarias o en racimos<sup>34</sup>.



**Figura 1.** Estructuras de *Trichoderma* (400x, tinción de estructuras con azul de metileno)

El género *Trichoderma* se reproduce asexualmente por medio de la alteración del micelio y esporas llamadas conidios que se producen por medio de células desnudas<sup>42</sup>. Estos hongos toleran un amplio rango de temperaturas que van desde 20 a 41°C y pueden vivir en suelos con pH ácidos y básicos con rangos de 5.5 a 8.5, dependiendo la especie<sup>12</sup> y con cantidades altas de materia orgánica, se desarrollan en una gran cantidad de sustratos como granos de arroz y maíz, residuos agroindustriales, rastrojos de soja y maíz, etc.<sup>43-46</sup>, estas características hacen que este hongo sea comúnmente usado como biocontrolador<sup>47</sup>.

*Trichoderma* spp., son una de las especies más estudiadas contra hongos fitopatógenos ya que son utilizados como controladores biológicos en diversos cultivos<sup>48</sup> debido a su capacidad de competir por nutrientes y por espacio con hongos patógenos<sup>49</sup>, tiene además

la capacidad de al estar expuesto a inhibidores microbianos (metabolitos y enzimas) producidos por patógenos, activa mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de detoxificación y para resistir la acción de enzimas secretadas por los patógenos, por lo que produce resistencia inducida<sup>5,12,50</sup>.

Bioplaguicidas producidos a base de *Trichoderma* spp., han sido desarrollados para controlar un amplio espectro de fitopatógenos como *Sclerotium* spp, *Fusarium* spp, *Pythium* spp. y *Rhizoctonia* spp., en diferentes cultivos<sup>39,47</sup> que generan grandes pérdidas económicas<sup>51</sup>. Esta especie fúngica se encuentra principalmente en el suelo junto a restos orgánicos y en la rizósfera de plantas vivas donde pueden permanecer por un largo tiempo en estado de latencia. El control biológico del género *Trichoderma* depende principalmente de las condiciones del suelo tanto físicas, químicas como biológicas.

En gran parte de la naturaleza existe mutualismo que es la relación entre endófitos y plantas, producto de esta dependencia se producen sustancias bioactivas que permiten que las plantas tengan un mejor crecimiento, resistencia a patógenos y competitividad en la naturaleza<sup>52</sup>. Aprovechando la capacidad de *Trichoderma* spp., de producir metabolitos secundarios y compuestos bioactivos se están desarrollando fungicidas biológicos y potenciales antibióticos<sup>53</sup>.

## Capítulo 2

### 2. METODOLOGÍA

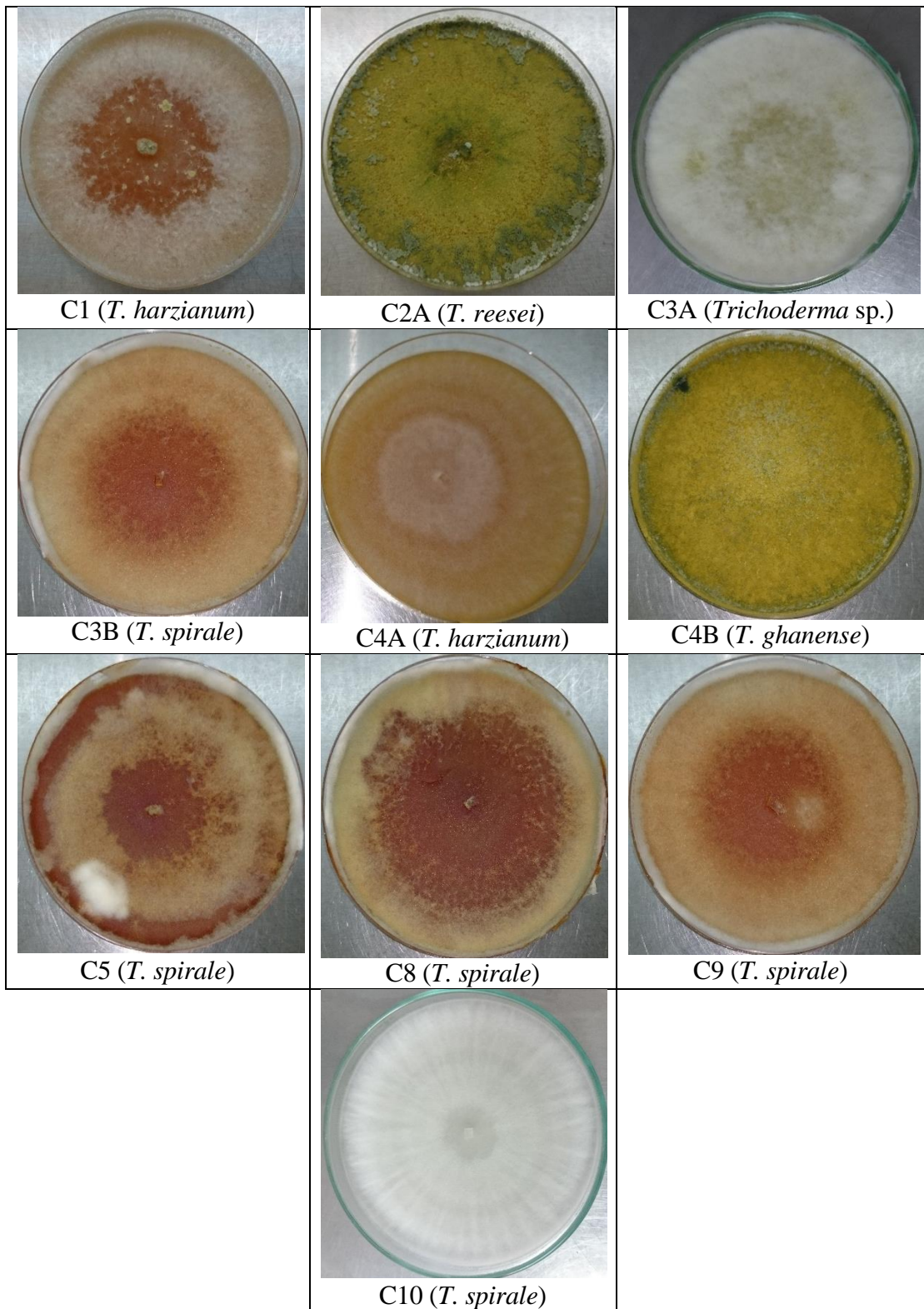
#### 2.1 Efecto antagónico de *Trichoderma* spp. frente *M. roleri* y *M. pernicioso*

##### 2.1.1 Condiciones de cultivo de *Trichoderma* spp.

Las 10 cepas de *Trichoderma* utilizadas en este estudio fueron obtenidas del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL) estas cepas fueron aisladas del suelo de una plantación de cacao ubicada en el cantón Naranjal perteneciente a la provincia del Guayas. Los aislados crecieron en medio PDA durante 7 días a 28°C. Las especies de *Trichoderma* fueron identificadas por el CIBE usando los primers que amplifican las secuencias ITS1 e ITS2.

**Tabla 1.** Cepas de *Trichoderma*.

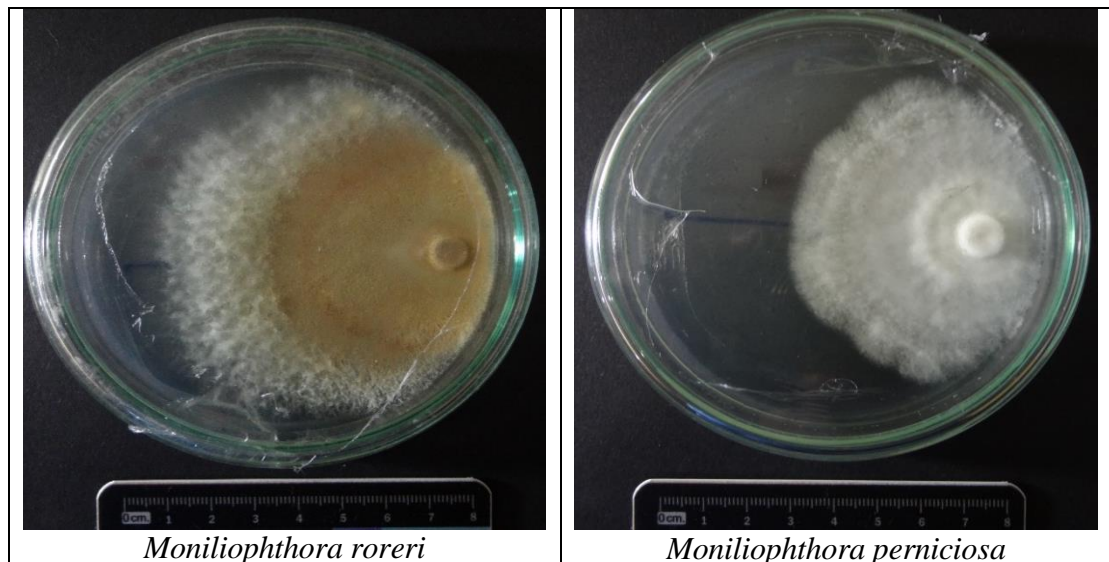
<b>Aislados</b>	<b><i>Trichoderma</i> spp.</b>
C1	<i>T. harzianum</i>
C2A	<i>T. reesei</i>
C3A	<i>Trichoderma</i> sp.
C3B	<i>T. spirale</i>
C4A	<i>T. harzianum</i>
C4B	<i>T. ghanense</i>
C5	<i>T. spirale</i>
C8	<i>T. spirale</i>
C9	<i>T. spirale</i>
C10	<i>T. spirale</i>



**Figura 2.** Aislados de *Trichoderma* spp.

### 2.1.2 Condiciones de cultivo de las cepas de *M. roreri* y *M. pernicioso*.

Las cepas de *M. roreri* y *M. pernicioso* están conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Banco de Germoplasma del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Estas cepas fueron crecidas en cajas Petri con PDA durante 7 días a  $28^{\circ}\text{C}$  para ser posteriormente utilizadas en las pruebas de antagonismo.



**Figura 3.** Aislados de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora pernicioso* (cajas Petri de 9cm de diámetro).

### 2.1.3 Enfrentamiento de *Trichoderma* spp., vs. *M. roreri* y *Trichoderma* spp., vs. *M. pernicioso*.

La evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp., se realizó por medio de cultivos duales en cajas Petri de 9 cm de diámetro. Discos de 5 mm de diámetro con micelio de *M. roreri* y de *M. pernicioso* fueron colocados en un extremo a 1.5 cm del borde de las cajas Petri con PDA. Las cepas patógenas crecieron por 7 días, transcurrido este tiempo, discos de 5mm de diámetro de las cepas de *Trichoderma* con micelio de 4 días de crecimiento fueron colocados en el extremo opuesto de la caja Petri de modo que los enfrentamientos se mantengan 6 cm equidistantes. Se realizaron cinco repeticiones para cada enfrentamiento y los testigos fueron siembras de los patógenos en el centro de cajas Petri. Las cajas fueron incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 5 días. Se registró el crecimiento lineal de las dos colonias enfrentadas dos veces al día, hasta que uno de los dos hongos completara la caja <sup>54</sup>.

Se determinó el porcentaje de inhibición del patógeno en base al crecimiento radial del micelio de los controles del patógeno con respecto a los enfrentamientos entre *Trichoderma* spp., y los patógenos, usando la siguiente formula <sup>55</sup>:

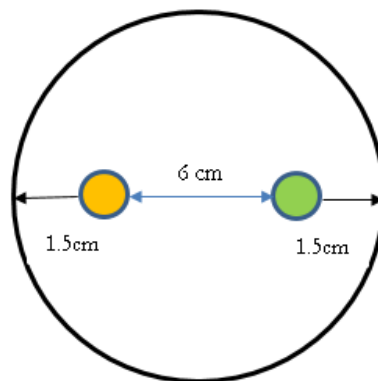
$$\text{ATP} = 100 * [\text{RPC} - (\text{RFP} - \text{RIP})/\text{RCP}]$$

Donde:

RPC (radio control) = radio de crecimiento del micelio del patógeno control al día final.  
RFP (radio del patógeno en cultivo dual) = radio de crecimiento del micelio del patógeno en presencia del antagonista al día final.

RIP (radio de la ventaja del patógeno) = radio de crecimiento del micelio del patógeno al día que inicio el enfrentamiento, aún sin el antagonista (cultivo del séptimo día).

Los datos se analizaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey.

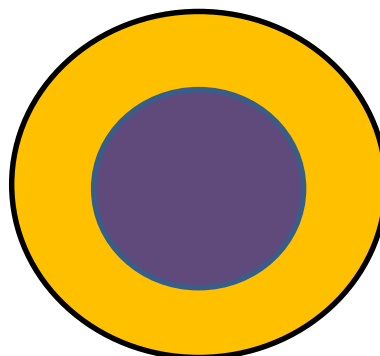


**Figura 4.** Cultivo dual in vitro de las cepas de *Trichoderma* spp., vs. *M. roleri* y *M. pernicioso*.

## 2.2 Actividad quitinolítica de los aislados de *Trichoderma* spp.

### 2.2.1 Medio basal indicador de la actividad quitinolítica.

Se preparó medio basal con los siguientes reactivos 0.3 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3.0 g de  $(NH_4)_2SO_4$ , 2.0 g de  $KH_2PO_4$ , 1.0 g de ácido cítrico monohidratado, 15 g de agar, 200  $\mu L$  de Tween-20, 4.5 g de quitina coloidal y 0.15 g de bromocresol púrpura; el pH fue ajustado a 4.7 antes de ser esterilizado, a  $121^\circ C$  por 15 min. El medio fue vertido en cajas Petri y en el centro se sembraron discos de *Trichoderma* spp. Las cajas se incubaron a  $28^\circ C$  durante 3 días hasta observar la formación de una zona coloreada<sup>56</sup>.



**Figura 5.** Cambio de color esperado en las cepas de *Trichoderma* con actividad quitinolítica.

### **2.2.2 Preparación de las paredes celulares de *M. roreri* y *M. pernicioso* como fuente de carbono.**

Se inocularon por separado discos de 5 mm de diámetro de *M. roreri* y *M. pernicioso* en 100 mL de medio PDB en matraces de 250 mL y se mantuvo en agitación a 120 rpm durante 20 días a 28°C, el micelio se recolectó por filtrado en papel Whatman N°1, usando un embudo Buchner y una bomba de vacío, se lavó con agua destilada y se trituró utilizando nitrógeno líquido, el micelio se secó en estufa a 40°C por 24 horas<sup>23</sup>.

### **2.2.3 Preparación de la quitina coloidal.**

Cinco gramos de quitina comercial fueron hidrolizados con 60 mL de HCl concentrado mediante agitación constante empleando un agitador magnético a 4°C de temperatura durante toda la noche. Al día siguiente la mezcla se neutralizó con etanol al 95% (-20°C) y se mantuvo en agitación rápida por 5 minutos, la suspensión de quitina fue centrifugada a 3000 rpm durante 20 min a 4 °C. El pellet de quitina coloidal fue lavado con agua destilada estéril y se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El lavado del pellet se realizó hasta que el olor a alcohol desapareció. La quitina coloidal fue almacenada a 4 °C hasta su uso<sup>56,57</sup>.

La quitina coloidal a partir de *M. roreri* y *M. pernicioso* fue preparada siguiendo la misma metodología que la quitina comercial, en la cual se reemplazó el producto comercial por 25g de las paredes celulares de cada patógeno.

### **2.3.4 Detección de la actividad quitinolítica total por espectrometría.**

Se utilizó la quitina coloidal obtenida de las paredes celulares de *M. roreri* y *M. pernicioso* como fuente de carbono e inductor de la actividad quitinolítica de las diez cepas de *Trichoderma*. Discos de 3 mm de diámetro con micelio de *Trichoderma* spp., de 4 días de crecimiento fueron inoculados en 50mL de medio basal similar al de la prueba indicadora, pero en este medio no se adicionó el colorante bromocresol púrpura ni el agar. La quitina coloidal que se utilizó fue la obtenida de la quitina comercial y la obtenida de la pared celular de *M. roreri* y de *M. pernicioso*, todas adicionadas por separado en distintos frascos Erlenmeyer de 250 mL. Las muestras, se incubaron a 28°C durante 5 días a 200 rpm de agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se filtró por papel filtro de 0.22 µm y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Para medir la actividad quitinolítica total, se preparó una reacción con 1 mL del sobrenadante del medio de cultivo filtrado, 0,3 mL del tampón de acetato sódico 1 M (tampón SA) de pH 4.6, adicionalmente se agregó 0,2 mL de quitina coloidal y se incubó a 40°C durante 20 horas. Luego se procedió a centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min a 6°C. Una vez concluida la centrifugación, se mezcló una alícuota de 0,75 mL del sobrenadante, 0,25 mL de una solución al 1% de ácido dinitrosalicílico en NaOH 0,7 M y 0,1 mL de NaOH 10 M en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, los cuales se calentaron a 100°C durante 5 min en baño maría. La absorbancia de la reacción se midió a A<sub>582</sub>

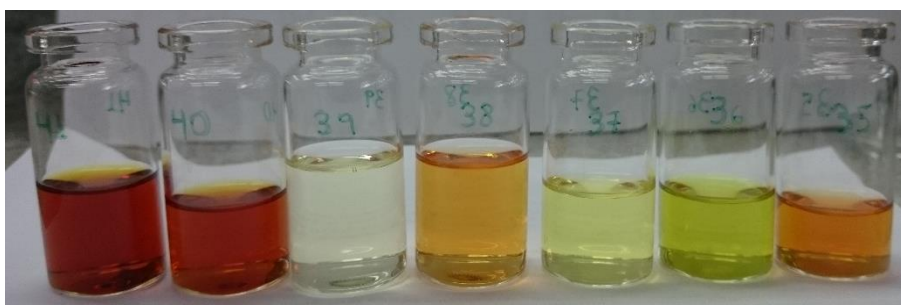
después de enfriar las muestras a temperatura ambiente<sup>58</sup>. Se utilizó como estándar una curva de calibración con N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (NAGA) para determinar la concentración del sacárido reductor. La actividad quitinolítica se estimó en términos de la concentración (mg/mL) de NAGA liberada<sup>56</sup>.

### 2.3 Identificación por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de compuestos bioactivos con potencial antifúngico.

#### 2.3.1 Extracción de los metabolitos de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* crecieron por 7 días en medio PDA a 28°C, los patógenos *M. royeri* y *M. pernicioso* crecieron durante 15 días en medio PDA a 28°C, además se usaron los cultivos de los antagonistas contra los patógenos que estuvieron en enfrentamiento durante siete días (las que se usaron en el ensayo de antagonismo). Luego se cortó el agar con el micelio de los hongos en pedazos pequeños y se colocó en frascos Erlenmeyer de 250 mL, a los que se les añadió 30 mL de acetato de etilo, se cubrió y agitó a 120 rpm por 48 horas<sup>59,60</sup>

Los extractos se concentraron hasta 2 mL utilizando un rotavaporador (Heidolph, Laborota 4001) y se filtraron a través de filtros desechables de 0.22  $\mu$ m, estos fueron luego utilizados para el análisis en cromatografía de gases/masas.



**Figura 6.** Extractos de *Trichoderma* spp. solubilizados en acetato de etilo.

#### 2.3.2 Análisis de los metabolitos por cromatografía de gases/masas.

La separación de compuestos volátiles se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tomando como referencia el método de: <sup>61</sup>, se usó el equipo Agilent Technologies 7890A cromatógrafo de gases con 5975C espectrómetro de masas con detector de triple eje, con una columna no polar DB-5MS, 30 m x 0.25 mL x 0.25  $\mu$ m, el flujo de helio fue de 1.2mL/min, la temperatura inicial del horno fue de 70°C por 2 min, luego a 5°C/min hasta 285°C, con una retención de 5 min; la temperatura del inyector se mantuvo a 260°C (splitless) y la temperatura del detector fue de 230°C.

Los gráficos de las estructuras químicas de los metabolitos se realizaron utilizando el programa ChemDraw Professional 17.0



## Capítulo 3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

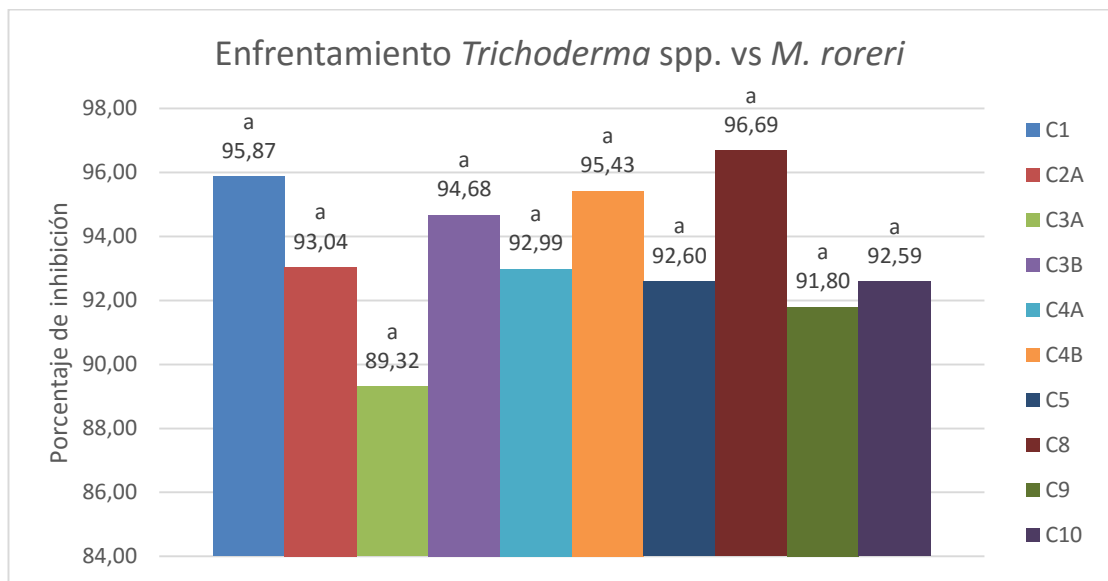
#### 3.1 Efecto antagónico de diferentes aislados de *Trichoderma* spp. frente *M. roleri* y *M. pernicioso*.

El efecto antagónico de *Trichoderma* spp., en cultivo dual contra *M. roleri* y *M. pernicioso* mostró la capacidad de las cepas de *Trichoderma* spp., para reducir el crecimiento de los patógenos y también para crecer sobre ellos, a pesar de que los patógenos contaron con una ventaja de crecimiento previa a la confrontación de 7 días (Figura 4).

La prueba de rangos múltiples Tukey=0.05 muestra que en general todas las cepas de *Trichoderma* tuvieron una buena capacidad de inhibición contra *M. roleri* y no hay diferencia significativa entre ellas. Las cepas C8 (*T. spirale*) con 96.69%, C1 (*T. harzianum*) con 95,87%, C3B (*T. spirale*) con 94.68% y C4B (*T. ghanense*) con 95.43% fueron las que tuvieron un mayor porcentaje de inhibición, la cepa con menor porcentaje de inhibición fue C3A (*Trichoderma* sp.) con 89.32% (Figura 7).

A partir del segundo día del enfrentamiento se dio el contacto entre el antagonista y el patógeno, por lo que se detuvo el crecimiento de *M. roleri*, a partir de este momento las diferentes cepas de *Trichoderma* colonizaron las cajas Petri, el patógeno contó con una ventaja de siete días debido a su lento crecimiento, el que también ha sido reportado por Villamil et al<sup>62</sup>.

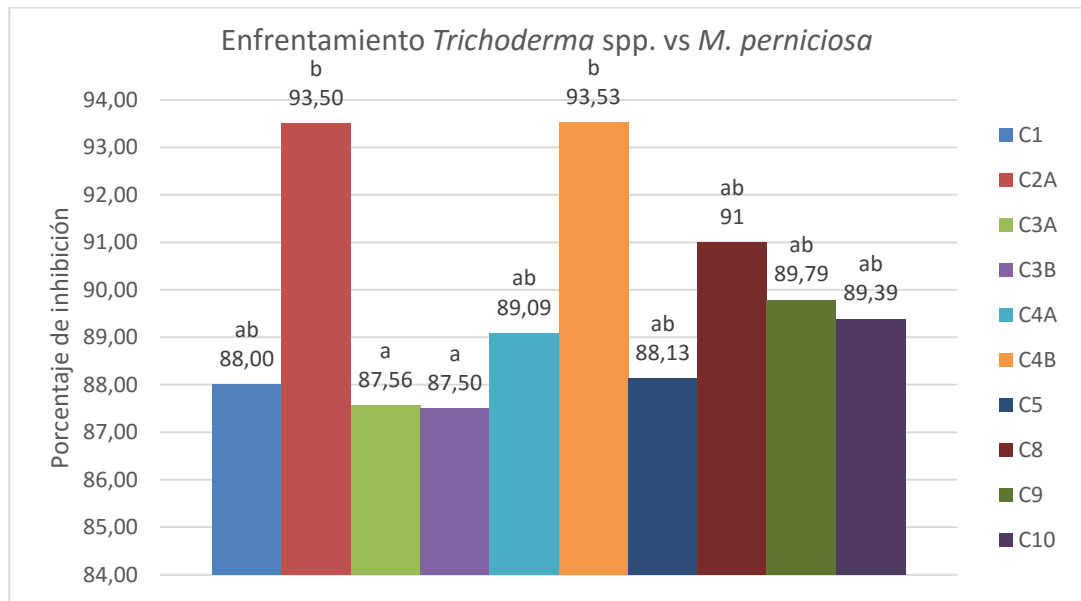
Los porcentajes de inhibición reportados por Magdama<sup>63</sup> fueron del 89,57% al 100% similares a los obtenidos en el presente estudio; sin embargo, Mejía y Alvarado<sup>64</sup> obtuvo valores más bajos de antagonismo de 46,77% a 40,13% esto se puede deber a que durante el cálculo de antagonismo no se tomó en cuenta el valor de crecimiento del patógeno durante su tiempo de ventaja.



**Figura 7.** Histograma del porcentaje de inhibición de *Trichoderma* spp. contra *M. roreri*. Porcentaje calculado en base al crecimiento radial de micelio de los controles del patógeno con respecto a los enfrentamientos entre *Trichoderma* y *M. roreri*. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según prueba de Tukey.

La actividad antagónica de las 10 cepas de *Trichoderma* contra *M. pernicioso* al momento de realizar la prueba de rangos múltiples de Tukey=0.05, mostró que existen diferencias significativas entre los enfrentamientos, agrupándose en tres categorías estadísticamente distintas. La mayor capacidad de inhibición en los enfrentamientos fue de las cepas C2A (*T. reesei*) con 93,5% y C4B (*T. ghanense*) con 93,53% y las que menor porcentaje tuvieron son C3A (*Trichoderma* sp.) con 87,56% y C3B (*T. spirale*) con 87,50% mientras que entre las otras cepas [C1 (*T. harzianum*), C5 (*T. spirale*), C4A (*T. harzianum*), C10 (*T. spirale*), C9 (*T. spirale*) y C8 (*T. spirale*)] los porcentajes de inhibición fueron muy cercanos entre 91 y 88%. El tiempo de contacto en el enfrentamiento se dio al tercer día por lo que las cepas de *Trichoderma* se desarrollaron a una velocidad mayor comparada con *M. pernicioso* que tuvo un crecimiento muy limitado (Figura 8).

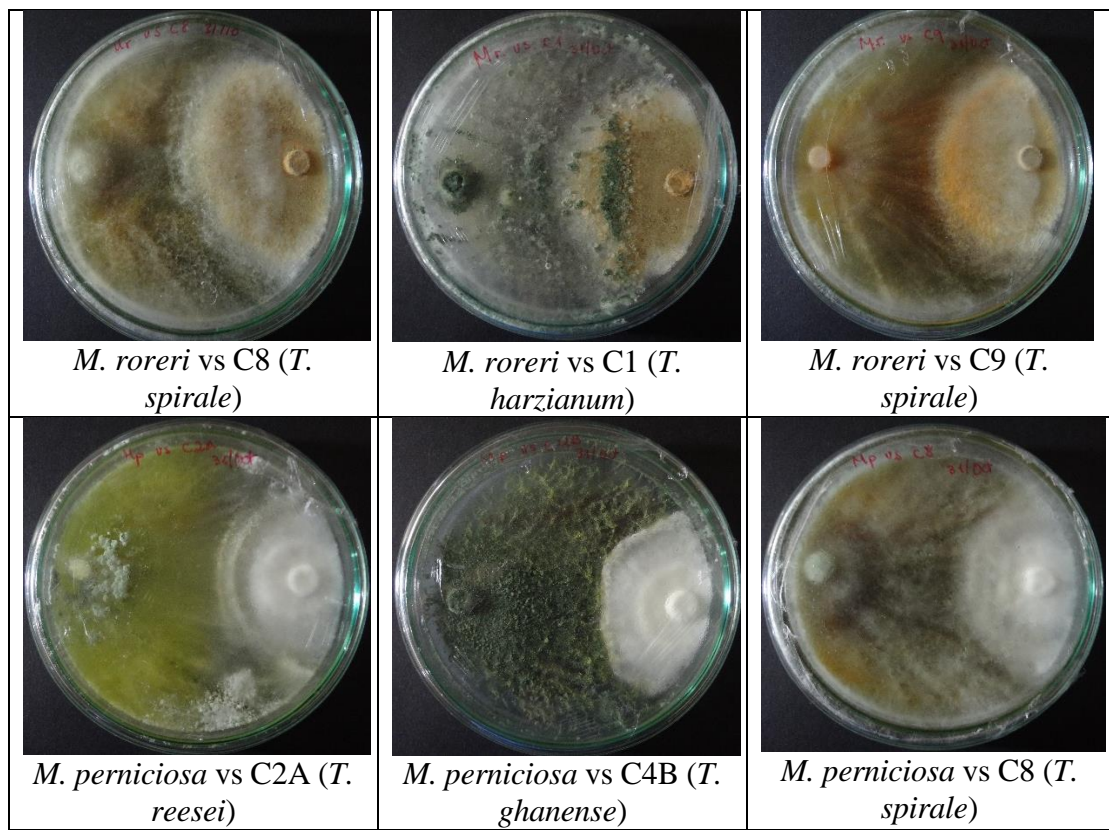
Los valores más altos obtenidos por Garcia et al<sup>65</sup> de potencial antagónico de *Trichoderma* spp., contra *M. pernicioso* fueron de 95,53% y 93,50% observándose resultados similares a las cepas utilizadas en este ensayo.



**Figura 8.** Histograma del porcentaje de inhibición de *Trichoderma* spp. contra *M. pernicioso*. Porcentaje calculado en base al crecimiento radial de micelio de los controles del patógeno con respecto a los enfrentamientos entre *Trichoderma* spp. y *M. pernicioso*. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) según prueba de Tukey.

El antagonismo de *Trichoderma* spp. contra un gran número de hongos patógenos ya se ha estudiado. Por ejemplo Qualhato et al<sup>4</sup> observaron la interacción de cuatro especies de *Trichoderma* contra tres patógenos: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Las cepas más efectivas como antagonistas fueron *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum*, mientras que Reyes et al<sup>66</sup> obtuvieron como resultado en su ensayo de antibiosis de *Trichoderma* spp., sobre *M. roreri* los valores más altos de porcentaje de inhibición de las cepas *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. pleurotica*, *T. virens* y *T. harzianum*. Al comparar con los resultados obtenidos en este estudio las cepas con mejor potencial de antagonismo para *M. roreri* fueron *T. spirale* y *T. harzianum* y para *M. pernicioso* fueron *T. reesei* y *T. ghanense*.

En un estudio de antagonismo realizado por Villamil et al<sup>62</sup> utilizando hongos y bacterias aisladas de la rizósfera de cacao se encontró siete microorganismos con la capacidad de restringir el crecimiento de *M. roreri*, siendo los más efectivos dos hongos del género *Trichoderma* que limitaron su crecimiento y esporulación, coincidiendo con los resultados en este estudio donde las cepas utilizadas tuvieron altos valores de inhibición de crecimiento de *M. roreri* y *M. pernicioso*.



**Figura 9:** Enfrentamiento de las cepas de *Trichoderma* contra los patógenos *M. roreri* y *M. pernicioso*. *Trichoderma* spp., se encuentra ubicado al lado izquierdo, mientras que los patógenos al lado derecho de la caja Petri.

### 3.2 Actividad quitinolítica de los aislados de *Trichoderma* spp., contra *M. roreri* y *M. pernicioso*.

La quitina es un polímero formado por unidades de  $\beta$ -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, es lineal por sus enlaces  $\beta$ -(1,4) glucosídicos unidos por dos puentes de hidrogeno entre los monosacáridos que la conforman<sup>67</sup>. La quitina está presente en la pared celular de la mayoría de los hongos patógenos y *Trichoderma* spp., por su actividad micoparasítica enrolla al patógeno y libera enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces  $\beta$ -(1,4) de la quitina que conforma la pared celular de los patógenos liberando su contenido citoplasmático<sup>17</sup>.

La detección de la actividad quitinolítica de las cepas de *Trichoderma* en medio solido se realizó en medio suplementado con quitina coloidal obtenida de tres fuentes: una comercial, de la pared celular de *M. roreri*, y de la pared celular de *M. pernicioso*, también se adicionó púrpura de bromocresol que permite el cambio de color del medio al ser positiva la producción de quitinasas. Esta es una prueba semicuantitativa que permite una selección rápida de las cepas con actividad quitinolítica positiva, exhibe

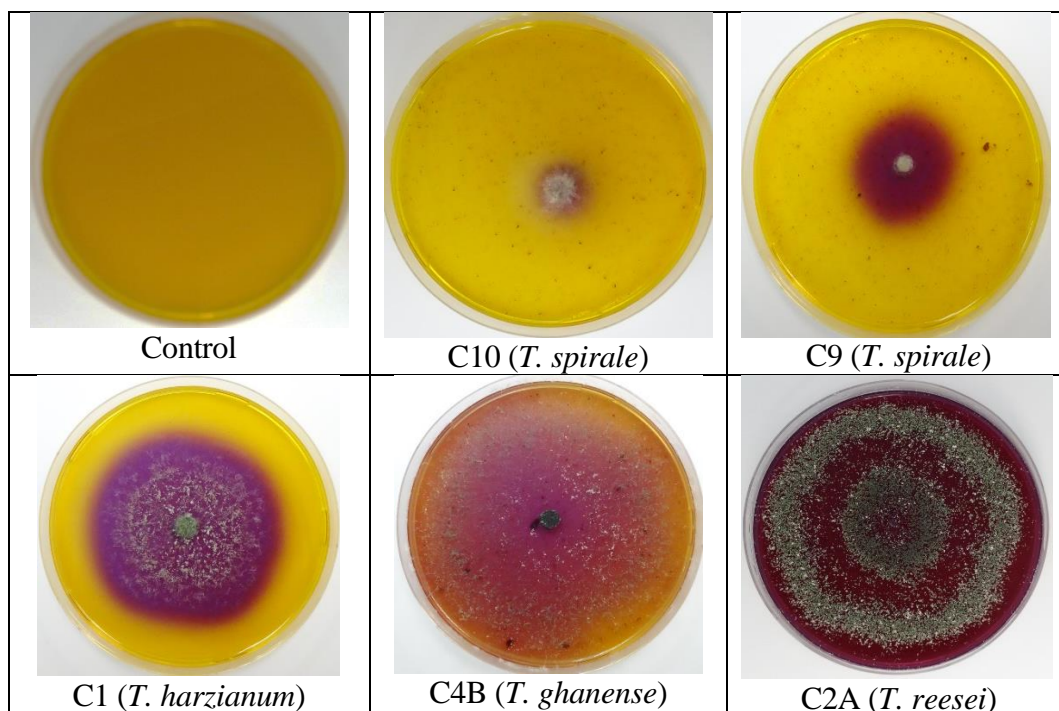
sensibilidad media ya que sus resultados pueden variar por el tiempo de incubación, el tamaño del inóculo y por el tamaño de las partículas de la quitina coloidal.

Las cepas de *Trichoderma* con actividad quitinolítica utilizan la quitina coloidal como fuente de carbono y la descomponen en N-acetil glucosamina lo que provoca un aumento en el pH del medio que induce el cambio del púrpura bromocresol de color amarillo a púrpura (pH 4,7) en la zona alrededor del crecimiento de *Trichoderma* spp<sup>56</sup>. Este cambio de coloración se observó con las cepas inoculadas en el medio basal de detección de quitinasas con las 3 distintas fuentes de carbono que se usaron en este estudio (Tabla 2 y Figura 10). Las 10 cepas dieron positivo utilizando quitina coloidal de la pared celular de *M. roreri* y la pared celular de *M. pernicioso*, aunque las cepas C5 (*T. spirale*), C9 (*T. spirale*) y C10 (*T. spirale*) dieron negativo con la quitina coloidal comercial.

**Tabla 2.** Actividad quitinolítica cualitativa en medio sólido de *Trichoderma* spp., con diferentes fuentes de quitina coloidal.

<b>Aislados</b>	<b>Quitina comercial</b>	<b>Quitina derivada de <i>M. roreri</i></b>	<b>Quitina derivada de <i>M. pernicioso</i></b>
Control	negativo	negativo	negativo
<i>M. roreri</i>	negativo	negativo	negativo
<i>M. pernicioso</i>	negativo	negativo	negativo
C1	positivo	positivo	positivo
C2A	positivo	positivo	positivo
C3A	positivo	positivo	positivo
C3B	positivo	positivo	positivo
C4A	positivo	positivo	positivo
C4B	positivo	positivo	positivo
C5	negativo	positivo	positivo
C8	positivo	positivo	positivo
C9	negativo	positivo	positivo
C10	negativo	positivo	positivo

Los resultados obtenidos de la actividad quitinolítica por medio basal y por espectrofotometría no necesariamente deben tener concordancia como se observó con las cepas C5, C9 y C10 que en el primer ensayo con púrpura de bromocresol y con quitina coloidal comercial como fuente de carbono resultaron con actividad negativa (Tabla 2) y al medir la producción de NAGA por espectrofotometría la concentración fue media para C9 59,25 mg/mL (*T. spirale*), y alta para C5 191,75 mg/mL (*T. spirale*) y C10 109,25 mg/mL (*T. spirale*) (Tabla 3), esto se puede deber a los diferentes medios donde crecieron las cepas, los tipos de incubación, los tiempos de incubación, y la pureza dado que la quitina coloidal obtenida de las paredes celulares de los patógenos podría haber contenido también otros restos celulares y se dificultó la disponibilidad de la quitina coloidal como fuente de carbono. Resultados similares fueron obtenidos por Agrawal y Kotasthane<sup>56</sup>.



**Figura 10.** Actividad quitinolítica de cepas de *Trichoderma* observada a los tres días de ser inoculadas en medio de detección sólido suplementado con quitina coloidal y púrpura de bromocresol.

La actividad quitinolítica total de las 10 cepas de *Trichoderma* fue medida por la liberación de azúcares reductores de la quitina coloidal. Se preparó una curva estándar con N-acetil  $\beta$ -D-glucosamina (NAGA), midiendo esta azúcar reductora al liberarse de la quitina coloidal derivada de las paredes celulares de *M. roreri* y *M. pernicioso*. En presencia de enzimas quitinolíticas, estas se expresan en mg/mL de NAGA liberada. Esta actividad se clasificó según Agrawal y Kotasthane<sup>56</sup> en baja de 30 a 60 mg/mL, en media de 61 a 80 mg/mL y alta de 81 mg/mL en adelante.

Los resultados de la actividad quitinolítica derivada de las 3 diferentes fuentes de quitina coloidal (Figura 11), muestran mayor concentración de NAGA liberada con la quitina coloidal comercial, seis fueron las cepas que tuvieron concentraciones altas C4A (*T. harzianum*) 81.75 mg/mL C3B (*T. spirale*) 89.25 mg/mL, C1 (*T. harzianum*) 96.75 mg/mL, C2A (*T. reesei*) 101.75 mg/mL, C5 (*T. spirale*) 116.75 mg/mL y C8 (*T. spirale*) 266.75 mg/mL. Con la quitina coloidal derivada de *M. pernicioso* solo la cepa C1 (*T. harzianum*) 94.25 mg/mL tuvo una actividad alta y la C2A (*T. reesei*) 61.75 mg/mL una actividad media. Por otra parte, la quitina coloidal derivada de *M. roreri* estimuló una actividad media en las cepas C4B (*T. ghanense*) y C4A (*T. harzianum*).

En general la quitina coloidal comercial fue capaz de inducir la mayor actividad quitinolítica y producción de NAGA en un mayor número de cepas de *Trichoderma*, seguido por *M. pernicioso* y luego por *M. roreri*. El hecho que *Trichoderma* spp., haya

producido quitinasas en presencia de la pared celular de los patógenos puede indicar que esta fuente de carbono actúa como inductor en la síntesis de estas enzimas. En el trabajo realizado por Mallikharjuna et al<sup>23</sup> se expuso que la producción de quitinasas también está influenciada por el pH del medio, la temperatura de incubación, la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, con las condiciones adecuadas se incrementa significativamente su producción.

El ensayo realizado por Agrawal y Kotasthane<sup>56</sup> reportó mayor actividad quitinolítica de las cepas de *Trichoderma* al utilizar quitina coloidal comercial obteniendo concentraciones de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (NAGA) entre 37.67 a 327.67mg/mL, y con quitina coloidal de *Rhizoctonia solani* se obtuvo concentraciones de 37.67 a 174.33mg/mL. Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, la mayor concentración de NAGA se obtuvo con la quitina coloidal comercial entre 51.75 a 266.75 mg/mL, mientras que las cepas de *Trichoderma* mostraron una menor preferencia para la quitina coloidal derivada de *M. pernicioso* que fue entre 21.75 a 94.25 mg/mL y de *M. royeri* entre 24.25 a 71.75mg/mL.

Usando una fuente diferente de quitina coloidal a la pared celular de hongos patógenos, se obtuvieron valores de NAGA muchos más bajos, como se reportó en la investigación realizada por Pandey et al<sup>68</sup> donde se usó quitina coloidal derivada de conchas marinas como fuente de carbono para siete aislados de *Trichoderma* spp., cuyos valores fueron de entre 6.2 a 3.9 mg/mL de NAGA para la quitina coloidal comercial y de 4.8 a 1.8 mg/mL de NAGA para la actividad inducida por la quitina obtenida de las conchas marinas. Al comparar estos resultados con los que se obtuvieron en la presente investigación, los diez aislados de *Trichoderma* spp., fueron más eficientes para utilizar la quitina coloidal como fuentes de carbono tanto para la quitina coloidal comercial como para la obtenida de las paredes celulares de *M. royeri* y *M. pernicioso*, también su actividad quitinolítica fue mayor (Tablas 3, 4 y 5).

**Tabla 3.** Actividad quitinolítica total de *Trichoderma* spp., (mg/mL de NAGA) con quitina coloidal comercial como fuente de carbono, medida por espectrofotometría.

<b>Quitina comercial</b>	
Actividad baja	
C10	51,75 mg/mL
C4B	54,25 mg/mL
Actividad media	
C9	64,25 mg/mL
C3A	74,25 mg/mL
Actividad alta	
C4A	81,75 mg/mL
C3B	89,25 mg/mL
C1	96,75 mg/mL

C2A	101,75 mg/mL
C5	116,75 mg/mL
C8	266,75 mg/mL

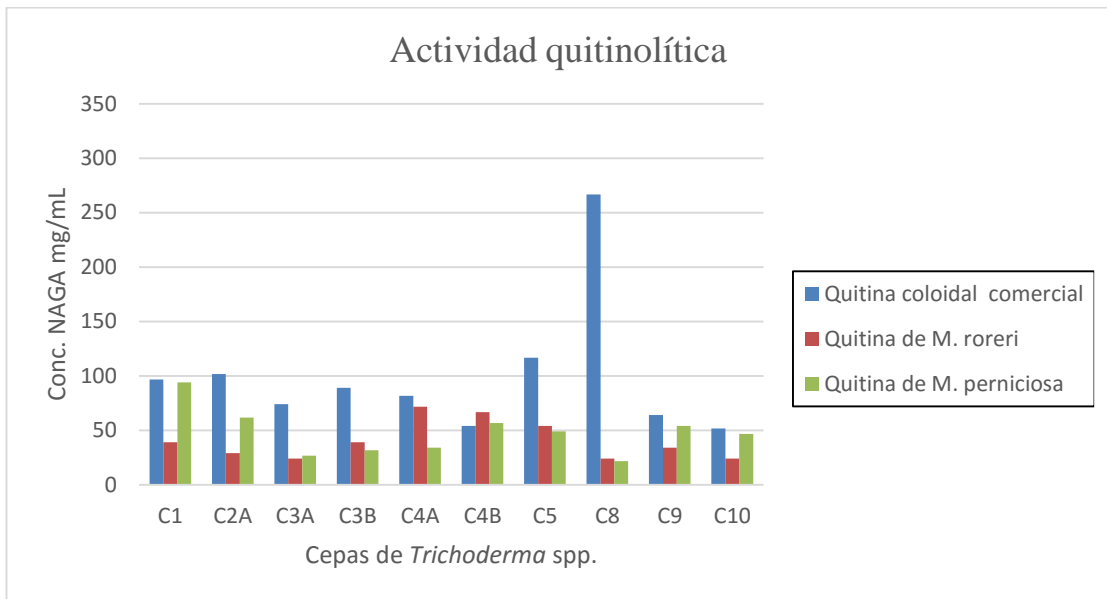
**Tabla 4.** Actividad quitinolítica total de *Trichoderma* spp., (mg/mL de NAGA) con quitina coloidal de *M. pernicioso* como fuente de carbono, medida por espectrofotometría.

<b>Quitina derivada de <i>M. pernicioso</i></b>	
Actividad baja	
C8	21,75 mg/mL
C3A	26,75 mg/mL
C3B	31,75 mg/mL
C4A	34,25 mg/mL
C10	46,75 mg/mL
C5	49,25 mg/mL
C9	54,25 mg/mL
C4B	56,75 mg/mL
Actividad media	
C2A	61,75 mg/mL
Actividad alta	
C1	94,25 mg/mL

**Tabla 5.** Actividad quitinolítica total de *Trichoderma* spp., (mg/mL de NAGA) con quitina coloidal de *M. roreri* como fuente de carbono, medida por espectrofotometría.

<b>Quitina derivada de <i>M. roreri</i></b>	
Actividad baja	
C3A	24,25 mg/mL
C8	24,25 mg/mL
C10	24,25 mg/mL
C2A	29,25 mg/mL
C9	34,25 mg/mL
C1	39,25 mg/mL
C3B	39,25 mg/mL
C5	54,25 mg/mL
Actividad media	
C4B	66,75 mg/mL
C4A	71,75 mg/mL





**Figura 11.** Actividad quitinolítica de las cepas de *Trichoderma* (mg/mL de NAGA) inoculadas en medio líquido suplementado con quitina coloidal obtenida de la pared celular de *M. royeri*, de *M. pernicioso* y de quitina coloidal comercial.

### 3.3 Detección de los compuestos volátiles con potencial antifúngico o con otro tipo de actividad biológica producidos por las cepas de *Trichoderma*.

Los extractos de *Trichoderma* spp., fueron analizados en cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS), usando una columna no polar y como solvente acetato de etilo. La identificación de los compuestos se basó en el área del pico que es proporcional a la cantidad del compuesto. Se seleccionaron únicamente la fórmula química y el peso molecular de aquellas moléculas que exhibían una calidad superior al 90% (Anexos: Tablas 6 y 7).

Los cromatogramas obtenidos dieron un promedio de 38 compuestos en cada uno de los extractos analizados, sin embargo, para posteriores análisis se seleccionaron solamente las moléculas con mayor importancia biológica y que pueden servir como biocontroladores contra los patógenos de cacao estudiados. En contraste un estudio llevado a cabo por Siddiquee et al<sup>61</sup> usando cromatografía de gases/espectrometría de masas con diferentes columnas capilares (no polar, de polaridad media y alta) y diferentes solventes (acetato de etilo, n-hexano, n-butanol y metanol), reportaron más de 278 compuestos volátiles extraídos a partir de *Trichoderma harzianum* mientras que en la presente investigación se usó una columna no polar y como solvente acetato de etilo.

*Trichoderma* spp., y su mecanismo de acción denominado antibiosis, consiste en la biosíntesis de una gran variedad de compuestos con propiedades antifúngicas o antimicrobianas que imposibilitan el desarrollo de otros microorganismos<sup>12</sup>. Los compuestos que producen *Trichoderma* spp., reducen el crecimiento micelial, inhabilitan la germinación de conidios y el desarrollo de tubos germinativos de diversos hongos, también provocan vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis de las células de bacterias y hongos<sup>69,70</sup>. Compuestos con actividad antifúngica como: dibutyl phthalate; ergosterol; hexadecanoic acid, methyl ester; 9-Octadecenoic acid (Z); methyl ester y eicosane, phenylethyl alcohol;  $\alpha$ -selinene; phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl); bis(2-ethylhexyl) phthalate; acorenone; heneicosane; 1-Nonadecene y diisooctyl phthalate fueron encontrados al analizar los extractos de acetato de etilo de las diez cepas de *Trichoderma*.

Diecisiete compuestos con potencial antifúngico o con otro tipo de actividad biológica y de interés biológico fueron identificados al comparar los metabolitos obtenidos en la presente investigación con metabolitos bioactivos obtenidos de otros microorganismos en investigaciones anteriores. (Anexos: Figuras 12 a 17). Por ejemplo. Los compuestos dibutyl phthalate; hexadecanoic acid, methyl ester; y 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester; fueron encontrados en extractos metanolicos de *Aspergillus flavipes* durante el ensayo realizado por Verma et al<sup>71</sup> para encontrar metabolitos bioactivos que sean efectivos en el control de *Sclerotinia sclerotiorum*. La mayoría de estos compuestos con actividad biológica han sido identificados y reportados en especies de *Trichoderma* como: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma sporulosum* y en otros hongos como:

*Aspergillus flavipes*, *Penicillium roqueforti* y en la bacteria perteneciente al orden Actinomycetales *Streptomyces cacaoi* (Anexos: Tablas 8 a 23).

No solo en las cepas de *Trichoderma* y en los enfrentamientos se observaron compuestos bioactivos, también los patógenos *M. rorei* y *M. pernicioso* produjeron eicosano, bis(2-ethylhexyl) phthalate, ergosterol, dibutyl phthalate, phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) y heneicosano, los cuales son conocidos por exhibir propiedades antimicrobianas, que seguramente utilizan como mecanismo de defensa contra otros microorganismos.

Los metabolitos 9-octadecenoic acid (Z)-, methyl ester, valencene y hexadecanoic acid, methyl ester fueron únicamente detectados en los extractos obtenidos en los enfrentamientos de *Trichoderma* spp., con los patógenos. Mientras que dibutyl phthalate, lanosterol y phenylethyl alcohol fueron sintetizados solo cuando las cepas de *Trichoderma* crecen individualmente (Anexos: Tabla 8, 10 y 12). El n-hexadecanoic acid fue el compuesto presente en la mayoría de extractos tanto en crecimiento individual como en los enfrentamientos (Anexos: Tabla 18), seguido por el eicosano (Anexos: Tabla 16), y phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) (Anexos: Tabla 17). Los compuestos que solo aparecieron en una cepa de *Trichoderma* o solo en los enfrentamientos fueron: lanosterol en C3A (*Trichoderma* sp.) (Anexos: Tabla 10), phenylethyl alcohol en C2A (*T. reesei*) (Anexos: Tabla 12),  $\alpha$ -selinene en *M. pernicioso* vs C2A (*T. reesei*) (Anexos: Tabla 15), acorenone C2A (*T. reesei*) (Anexos: Tabla 20) y diisooctyl phthalate en *M. roreri* vs C9 (*T. spirale*) (Anexos: Tabla 23).

Se debe resaltar que los compuestos observados en los crecimientos individuales de *Trichoderma* spp., no necesariamente fueron observados en los extractos obtenidos de *Trichoderma* spp., en enfrentamiento con los patógenos *M. roreri* y *M. pernicioso*, debido a que la producción de metabolitos depende de varios elementos, uno de ellos puede ser los días de incubación de los hongos antes de extraer sus compuestos en este caso fue de siete días para los crecimientos individuales y en los enfrentamientos fue de catorce días (siete de la ventaja de los patógenos y siete en enfrentamiento con las cepas de *Trichoderma*), y también de las condiciones del medio en que se cultivan los microorganismos. Aún se conoce poco sobre los factores que determinan la producción de metabolitos individuales<sup>72</sup>.

El efecto sinérgico de la producción de metabolitos con la producción de enzimas de *Trichoderma* spp. hace más exitosa su capacidad antagónica y de biocontrolador de varios patógenos de plantas<sup>73</sup>. Durante este estudio también se observó la producción de metabolitos (extractos obtenidos en acetato de etilo) con actividad antimicrobiana por parte de los patógenos *M. rorei* y *M. pernicioso* pero la producción de quitinasas (medido en la prueba de actividad quitinolítica detectada en medio basal indicador) fue negativa, por lo que *Trichoderma* spp. igual presentó ventaja en el control de su crecimiento.

## Conclusiones

Las diez cepas de *Trichoderma* mostraron efecto antagónico contra *M. roreri* y entre ellas las que se destacaron por inhibir en un mayor porcentaje el crecimiento del hongo fueron: C8 (*T. spirale*), C1 (*T. harzianum*), C3B (*T. spirale*) y C4B (*T. ghanense*). Para *M. pernicioso* se observó que las cepas son C2A (*T. reesei*) y C4A (*T. harzianum*) fueron las que mostraron mayor efectividad.

Los resultados de este estudio muestran que de los diez aislados de *Trichoderma*, seis tienen actividad quitinolítica alta en medio suplementado con quitina coloidal comercial, estas cepas fueron: C4A (*T. harzianum*) 81.75 mg/mL C3B (*T. spirale*) 89.25mg/mL, C1 (*T. harzianum*) 96.75mg/mL, C2A (*T. reesei*) 101.75 mg/mL, C5 (*T. spirale*) 116.75 mg/mL y C8 (*T. spirale*) 266.75 mg/mL. Las cepas C4B (*T. ghanense*) y C4A (*T. harzianum*) exhiben actividad quitinolítica media con la quitina coloidal de *M. roreri*. Por otro lado, las cepas C1 (*T. harzianum*) y C2A (*T. reesei*) tuvieron actividad alta y media respectivamente con la quitina coloidal de *M. pernicioso*. La quitina coloidal obtenida a partir de las paredes celulares de los patógenos del cultivo de cacao actuaron como inductores para la producción de quitinasas por consiguiente, los aislados de *Trichoderma* tienen potencial para ser utilizados como biocontroladores.

Se identificaron 17 compuestos con potencial antimicrobiano y de interés biológico en las diez cepas de *Trichoderma*. La capacidad de producir compuestos fue detectada en todos los aislados mientras crecían individualmente y cuando se encontraban en enfrentamiento con los patógenos de cacao *M. roreri* y *M. pernicioso*, confirmando que el efecto antagónico de *Trichoderma* spp. pudo deberse principalmente a su habilidad para producir compuestos que inhiben o detienen el crecimiento de otros hongos.

## Recomendaciones

Evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* spp., para contrarrestar los efectos perjudiciales provocados por *M. roleri* y *M. pernicioso*. en plántulas de cacao cultivadas en condiciones de invernadero.

Para llevar a cabo el ensayo de la actividad quitinolítica, se deberían utilizar distintas fuentes de carbono-nitrógeno, y cultivar los hongos en diferentes rangos de pH y temperaturas de incubación para estimular la biosíntesis de enzimas quitinolíticas y de metabolitos con propiedades antimicrobianas.

Para la extracción de un mayor rango de metabolitos con potencial antimicrobiano se podrían utilizar solventes como n-hexano para remover ácidos grasos y componentes no polares, y n-butanol para separar compuestos polares.

Para determinar si todas las cepas de *Trichoderma* biosintetizan compuestos con propiedades antifúngicas, se deberían realizar ensayos microbiológicos, utilizando diferentes concentraciones de los extractos orgánicos contra diferentes patógenos que afecten otros cultivos de interés económico

Fraccionar los extractos obtenidos de las cepas de *Trichoderma* para que sean analizados y purificados, utilizando otros métodos como cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía en columna.

Para confirmar la identidad de los compuestos se deberían usar estándares analíticos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arvelo M, Delgado T, Maroto S, Rivera J, Higuera I, Navarro A. *Estado Actual Sobre La Producción Y El Comercio Del Cacao En América*. San José: C.R.; 2016.
2. ANECACAO. Historia del Cacao | Anecacao Ecuador. <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>. Published 2015. Accessed September 23, 2017.
3. Tirado Gallego PA, Lopera Álvarez A, Ríos Osorio LA. Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Rev Corpoica - Cienc y Tecnol Agropecu*. 2016;17(3):417-430. doi:10.21930/rcta.vol17\_num3\_art:517.
4. Qualhato TF, Lopes FAC, Steindorff AS, Brandão RS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett*. 2013;35(9):1461-1468. doi:10.1007/s10529-013-1225-3.
5. Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem Eng J*. 2007;37(1):1-20. doi:10.1016/j.bej.2007.05.012.
6. Butt TM, Copping LG. Fungal biological control agents. *Pestic Outlook*. 2000;11(5):186-191. doi:10.1039/b008009h.
7. Solórzano E, Amores F, Jiménez J, Nicklin C, Barzola S. Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. *Cienc y Tecnol*. 2015;8(1):37-47.
8. ProEcuador. Análisis del Sector Cacao y elaborados. *Pro Ecuador*. 2013:42. [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC\\_AS2013\\_CACAO.pdf%5Cnhttp://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/cacao-y-elaborados/](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf%5Cnhttp://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/cacao-y-elaborados/).
9. Bailey BA, Bae H, Strem MD, et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biol Control*. 2008;46(1):24-35. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.003.
10. Sanjúan Pinilla J, Moreno Sarmiento N. Aplicación de insumos biológicos: una oportunidad para la agricultura sostenible y amigable con el medioambiente. *Rev Colomb Biotechnol*. 2010;12(1):4-7. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752010000100001&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752010000100001&script=sci_arttext&tlng=pt). Accessed February 4, 2018.
11. Chiriboga H, Gómez G, Garcés Karla. *Protocolos Para Formulación Y Aplicación Del Bio-Insumo: Trichoderma Spp. Para El Control Biológico de Enfermedades*. (IICA, ed.). Paraguay; 2015. <http://www.iicabr.iica.org.br/wp-content/uploads/2016/05/Trichoderma-SSP2.pdf>. Accessed February 4, 2018.
12. Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp. y su función en el control de

- plagas en los cultivos. *Rev Protección Veg.* 2013;28(1):1-11.
13. Saravanakumar K, Yu C, Dou K, Wang M, Li Y, Chen J. Synergistic effect of Trichoderma-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biol Control.* 2016;94:37-46. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.12.001.
  14. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(1):43-56. doi:10.1038/nrmicro797.
  15. Howell CR. Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases : *USDA/ARS South Plains Agric Res Cent.* 2003;87(1):7. doi:10.1094/PDIS.2003.87.1.4.
  16. Almeida FBDR, Cerqueira FM, Silva RDN, Ulhoa CJ, Lima AL. Mycoparasitism studies of Trichoderma harzianum strains against Rhizoctonia solani: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett.* 2007;29(8):1189-1193. doi:10.1007/s10529-007-9372-z.
  17. Barnett HL. The nature of mycoparasitism by fungi. *Annu Rev Microbiol.* 1962;17(706):1-14.
  18. González I, Infante D, Peteira B, et al. Caracterización bioquímica de aislamientos de aislamientos de Trichoderma spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Rev Protección Veg.* 2011;26(1):23-29.
  19. Chérif M, Benhamou N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a Trichoderma sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology.* 1990;80:1406-1414.
  20. Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microb Technol.* 1993;15(3):178-192. doi:10.1016/0141-0229(93)90136-P.
  21. Castro R, Álvarez A, Machado E, Mendoza M, Gómez R, García P. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363 706 usando quitina coloidal como sustrato. *Rev la Soc Química Perú.* 2011;77(2):101-108.
  22. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E, Larsen J. Ecological functions of Trichoderma spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016;92(4):fiw036. doi:10.1093/femsec/fiw036.
  23. Mallikharjuna R, Siva Raju K, Ravisankar H. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by Trichoderma isolates from tobacco rhizosphere. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47(1):25-32. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.007.
  24. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal.* 2000;11(3):137-147. doi:10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I.
  25. Kim PI, Chung KC. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS*

- Microbiol Lett.* 2004;234(1):177-183. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.032.
26. Liu CH, Zou WX, Lu H, Tan RX. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *J Biotechnol.* 2001;88(3):277-282. doi:10.1016/S0168-1656(01)00285-1.
  27. Narayanan K. Insect defence: Its impact on microbial control of insect pests. *Curr Sci.* 2004;86(6):800-814.
  28. Senthil Nathan S. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresour Technol.* 2007;98(9):1856-1860. doi:10.1016/j.biortech.2006.07.044.
  29. Pushpalatha E, Muthukrishnan J. Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes. *J Appl Entomol.* 1999;123(6):369-373. doi:10.1046/j.1439-0418.1999.00373.x.
  30. Tsao R, Romanchuk FE, Peterson CJ, Coats JR. Plant growth regulatory effect and insecticidal activity of the extracts of the Tree of Heaven (*Ailanthus altissima* L.). *BMC Ecol.* 2002;2:1. doi:10.1186/1472-6785-2-1.
  31. Demain AL. From natural products discovery to commercialization: A success story. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Vol 33. Springer-Verlag; 2006:486-495. doi:10.1007/s10295-005-0076-x.
  32. Nair KPP. The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World - K. P. Prabhakaran Nair - Google Books. 2010:351. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123846778>. Accessed September 24, 2017.
  33. Hebbar PK. Cacao Diseases : Important Threats to Chocolate Production Worldwide Cacao Diseases : A Global Perspective from an Industry Point of View. *Phytopathology.* 2007;97(12):1658-1663. doi:10.1094/PHYTO-97-12-1658.
  34. Evans HC, Stalpers JA, Samson RA, Benny GL. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can J Bot.* 1978;56(20):2528-2532. doi:10.1139/b78-305.
  35. Heredia García E, Delgadillo Sánchez F. *El Ajo En México : Origen, Mejoramiento Genético, Tecnología de Producción.* Celaya Gto.: INIFAP Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental Bajío ;SAGAR; 2000. <http://www.worldcat.org/title/ajo-en-mexico-origen-mejoramiento-genetico-tecnologia-de-produccion/oclc/651544290>. Accessed September 24, 2017.
  36. Nava-Pérez E, García-Gutiérrez C, Camacho-Báez JR, Vázquez-Montoya EL. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai.* 2012;8(3):17-29.
  37. Eziashi EI, Omamor IB, Odigie EE. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. *African J Biotechnol Vol.* 2007;6(4):388-392.
  38. Paul B. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grapevine by an aggressive mycoparasite, *Pythium radiosum*. *FEMS Microbiol Lett.*



- 1999;176(1):25-30. doi:10.1016/S0378-1097(99)00213-X.
39. Dubey SC, Suresh M, Singh B. Evaluation of Trichoderma species against Fusarium oxysporum f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. *Biol Control*. 2007;40(1):118-127. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.06.006.
  40. Sharon E, Bar-Eyal M, Chet I, Herrera-Estrella A, Kleifeld O, Spiegel Y. Biological Control of the Root-Knot Nematode Meloidogyne javanica by Trichoderma harzianum. *Phytopathology*. 2001;91(7):687-693. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.7.687.
  41. Degenkolb T, von Döhren H, Nielsen KF, Samuels GJ, Brückner H. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of Trichoderma and Hypocrea. *Chem Biodivers*. 2008;5(5):671-680. doi:10.1002/cbdv.200890064.
  42. Webster J, Weber R. *Introduction to Fungi*. Vol 33. Third Edit.; 2007. doi:10.2307/2806321.
  43. Hubbard J, Harman G, Hadar Y. Effect of Soilborne Pseudomonas spp. on the Biological Control Agent, Trichoderma hamatum, on Pea Seeds. *Seeds*. 1983. [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n05\\_655.PDF](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n05_655.PDF).
  44. Kubicek C, Harman GE. *Trichoderma and Gliocladium Volume 1 Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor & Francis; 1998. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
  45. Druzhinina IS, Komoń -Zelazowska M, Atanasova L, Seidl V, Kubicek CP. Evolution and ecophysiology of the industrial producer Hypocrea jecorina (Anamorph Trichoderma reesei) and a new sympatric agamospecies related to it. Herrera-Estrella A, ed. *PLoS One*. 2010;5(2):e9191. doi:10.1371/journal.pone.0009191.
  46. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Martínez-Rojero RD, Rodríguez-Morán NL, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A. Producción masiva de Trichoderma harzianum Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Rev Chapingo Ser Hortic*. 2008;14(2):185-191.
  47. Amini J. Evaluation of Trichoderma Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato. *Icpp*. 2008;41(30):39-57. <http://en.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=40317>. Accessed September 26, 2017.
  48. Jayalakshmi S., Raju S, Usha Rani S, Benagi VI, Sreeramulu K. Trichoderma harzianum L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (Cicer arietinum L.) against wilt disease caused by Fusarium oxysporum f. sp. ciceri. *Aust J Crop Sci*. 2009;3(1):44-52.
  49. Zeilinger S, Omann M. Trichoderma biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regul Syst Bio*. 2007;1:227-234. doi:4315880117257.
  50. Harman GE. Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in Perceptions Derived from Research on Trichoderma harzianum T-22. *Plant Dis*. 2000;84(4):377-393.
  51. Küçük Ç, Kıvanç M. Mycoparasitism in the biological control of Gibberella zeae

- and *Aspergillus ustus* by *Trichoderma harzianum* strains. *Agric Technol.* 2008;4(2):49-55. doi:10.1186/1741-7007-7-58.
52. Strobel GA. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol.* 2002;22(4):315-333. doi:10.1080/07388550290789531.
  53. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(3):787-799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1.
  54. Gopalakrishnan S, Humayun P, Kiran BK, et al. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011;27(6):1313-1321. doi:10.1007/s11274-010-0579-0.
  55. Edington L V., Khew KL, Barron GL. Fungitoxic Spectrum of Benzimidazole Compounds. *Phytopathology.* 1971;61:42-44. [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01\\_42.PDF](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01_42.PDF). Accessed January 11, 2018.
  56. Agrawal T, Kotasthane AS. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus.* 2012;1(73):1-10. doi:10.1186/2193-1801-1-73.
  57. Roberts WK, Selitrennikoff CP. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *J Gen Microbiol.* 1988;134(1):169-176. doi:10.1099/00221287-134-1-169.
  58. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426-428. doi:10.1021/ac60147a030.
  59. Daejung K, Kim J, Choi JN, Liu K-H, Lee CH. Chemotaxonomy of *Trichoderma* spp. Using Mass Spectrometry-Based Metabolite Profiling. *J Microbiol Biotechnol.* 2011;21(1):5-13. doi:10.4014/jmb.1008.08018.
  60. Smedsgaard J. Micro-scale extraction procedure for standardization screening of fungal metabolite production in cultures. *J Chromatogr A.* 1997;760(2):264-270. doi:10.1016/S0021-9673(96)00803-5.
  61. Siddiquee S, Cheong BE, Taslima K, Kausar H, Hasan MM. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(4):358-367. doi:10.1093/chromsci/bms012.
  62. Villamil J, Blanco J, Viteri S. Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.) In vitro evaluation of Native Microorganisms for their Antagonism against *Moniliophthora roreri* Cif & Parin Cocoa (*Th. Rev Fac Nac Agron.* 2012;65(1):6305-6315.
  63. Magdama F. Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de zona cacaotera, como alternativa de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones in vitro. 2010. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/11929/1/TESIS.pdf>.
  64. Mejía F, Alvarado R. Trabajo de Graduación Evaluación in vitro de hongos nativos antagonistas de *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par., Evans et al.,) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). 2016.

65. Garcia Simões ML, Tauk-Tornisielo SM, Rocha Niella G, Tapia Tapia DM. Evaluation of *Trichoderma* spp for the biocontrol of *Moniliophthora perniciosa* Subgroup 1441. *J Biol Life Sci.* 2012;3(1):18-36. doi:10.5296/jbls.v3i1.1097.
66. Reyes Figueroa O, Ortiz García CF, Torres de la Cruz M, Lagunes Espinoza L del C, Valdovinos Ponce G. *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*. *Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient.* 2016;XXII(2):149-163. doi:10.5154/r.rchscfa.2015.08.036.
67. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31(7):603-632. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
68. Pandey S, Shahid M, Srivastava M, et al. Chitinolytic assay for *Trichoderma* species isolated from different geographical locations of Uttar Pradesh. *African J Biotechnol.* 2014;13(45):4246-4250. doi:10.5897/A.
69. Carsolio C, Benhamou N, Haran S, et al. Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene , ech42 , in Mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(3):929-935.
70. González DR. Identificación y control in vitro con quitosana *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Protección Veg.* 2008;23(1):2008.
71. Verma A, Johri BN, Prakash A. Antagonistic Evaluation of Bioactive Metabolite from Endophytic Fungus , *Aspergillus flavipes* KF671231. *J Mycol.* 2014;2014:1-5. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2014/371218.
72. Klein D, Eveleigh DE. *Trichoderma and Gliocladium.* (Kubicek CP, Harman GE, eds.); 1998.
73. Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev.* 2008;7(1):89-123. doi:10.1007/s11101-006-9032-2.
74. Stoppacher N, Kluger B, Zeilinger S, Krska R, Schuhmacher R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J Microbiol Methods.* 2010;81(2):187-193. doi:10.1016/j.mimet.2010.03.011.
75. Nandhini U, Kumari L, Sangareshwari S. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Bioactive Constituents from the Marine *Streptomyces*. *Asian J Pharm Clin Res.* 2015;8(2):244-246.
76. Sealey Cardona M. Importancia de la biosíntesis del ergosterol en la proliferación celular y en el mecanismo de acción de fármacos en tripanosomátidos. 2007. <http://digibug.ugr.es/handle/10481/1605>.
77. Zhao L, Chen X-J, Zhu J, et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature.* 2015;523(7562):607-611. doi:10.1038/nature14650.
78. ACOFARMA. *Ficha de Información Técnica Alcohol Feniletílico.* [http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/6413-4ee207daebe03c72d7c0e9b12151166def68d704/main/files/Alcohol\\_fenilet\\_lic\\_o.pdf](http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/6413-4ee207daebe03c72d7c0e9b12151166def68d704/main/files/Alcohol_fenilet_lic_o.pdf). Accessed January 28, 2018.
79. Jeleń HH. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(5):263-267. doi:10.1046/j.1472-

765X.2003.01305.x.

80. Ambrož M, Matoušková P, Skarka A, Zajdlová M, Žáková K, Skálová L. The effects of selected sesquiterpenes from myrica rubra essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules*. 2017;22(6). doi:10.3390/molecules22061021.
81. Intaraudom C, Boonyuen N, Supothina S, et al. Novel spiro-sesquiterpene from the mushroom Anthracophyllum sp. BCC18695. *Phytochem Lett*. 2013;6(3):345-349. doi:10.1016/j.phytol.2013.04.006.

## ANEXOS

**Tabla 6.** Compuestos antimicrobianos y de interés biológico identificados en *Trichoderma* spp., en extractos de acetato de etilo por GC/MS.

Cepa	R. time	Compuesto	Área %
<i>M. roreri</i>	35.417	Eicosane	0.74
	27.431	n-Hexadecanoic acid	0.23
	37.928	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.97
	39.049	Ergosterol	3.07
	27.966	Dibutyl phthalate	0.40
<i>M. pernicioso</i>	18.316	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	0.44
	28.285	n-Hexadecanoic acid	18.41
	34.718	Heneicosane	1.93
	37.920	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	1.21
	41.137	Eicosane	1.83
	27.958	Dibutyl phthalate	0.62
C1 ( <i>T. harzianum</i> )	26.577	1-Nonadecene	0.26
	28.523	Hexadecanoic acid	0.55
	31.071	Eicosane	0.13
C2A ( <i>T. reesei</i> )	8.154	Phenylethyl Alcohol	0.23
	18.346	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	0.09
	37.972	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.24
	22.498	Acorenone	0.26
	40.520	Eicosane	0.20
	41.107	1-Nonadecene	0.03
C3A ( <i>Trichoderma</i> sp.)	18.339	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.24
	27.966	Dibutyl phthalate	0.24
	28.479	Hexadecanoic acid	14.62
	37.943	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.65
	27.431	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.33
	27.966	Dibutyl phthalate	0.24
	38.790	Ergosterol	0.40
	43.752	Lanosterol	0.10
C3B ( <i>T. spirale</i> )	28.523	Hexadecanoic acid	26.65
	37.935	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.47
C4A ( <i>T. harzianum</i> )	28.241	Hexadecanoic acid	2.22
	37.051	Phenol, 2,4-bis(1-phenylethyl)-	0.61
	40.520	Eicosane	0.82
	38.834	Ergosterol	0.13
C4B ( <i>T. ghanense</i> )	28.308	Hexadecanoic acid	11.02
	30.492	1-Nonadecene	0.37
	30.759	Heneicosane	0.11
C5 ( <i>T. spirale</i> )	18.339	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.12
	28.501	Hexadecanoic acid	9.98
	37.958	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.37
C8 ( <i>T. spirale</i> )	28.412	Hexadecanoic acid	7.17
	40.513	Eicosane	0.46
	38.752	Ergosterol	0.47

Continuación Tabla 6

C9 ( <i>T. spirale</i> )	28.419	Hexadecanoic acid	6.81
	30.506	1-Nonadecene	0.30
	37.512	Eicosane	0.16
	39.042	Ergosterol	1.07
C10 ( <i>T. spirale</i> )	18.338	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.06

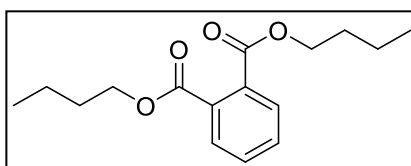
**Tabla 7.** Compuestos antimicrobianos y de interés biológico identificados en los enfrentamientos de *Trichoderma* spp., contra *M. roreri* y *M. pernicioso* en extracto de acetato de etilo por GC/MS.

Enfrentamiento	R. time	Compuesto	Área %
<i>M. roreri</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	18.339	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.48
	28.597	n-Hexadecanoic acid	10.67
	37.958	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.19
	27.461	Hexadecanoic acid, methyl ester	1.05
	25.782	Valencene	0.28
<i>M. pernicioso</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	28.634	n-Hexadecanoic acid	8.23
	36.004	Eicosane	0.54
	39.584	Heneicosane	0.41
	27.446	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.47
<i>M. roreri</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	18.338	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.38
	28.568	n-Hexadecanoic acid	8.42
	42.229	Eicosane	0.13
	27.453	Hexadecanoic acid, methyl ester	1.15
	30.774	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	2.04
<i>M. pernicioso</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	44.859	Eicosane	0.02
	30.752	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	0.49
	38.581	Valencene	0.88
	42.110	$\alpha$ -selinene	0.47
<i>M. pernicioso</i> vs. C3A ( <i>Trichoderma</i> sp.)	18.353	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.06
	28.545	n-Hexadecanoic acid	2.39
<i>M. roreri</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	27.951	Octadecane	1.03
	28.538	n-Hexadecanoic acid	6.30
	35.439	Eicosane	0.70
	35.996	Heneicosane	0.48
	37.950	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.31
	27.446	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.65
	25.774	Valencene	0.29
<i>M. pernicioso</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	18.339	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.79
	28.479	n-Hexadecanoic acid	8.73
	35.424	Eicosane	0.74
	42.066	Heneicosane	0.70
	27.439	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.34
<i>M. roreri</i> vs. C4A ( <i>T. harzianum</i> )	28.694	n-Hexadecanoic acid	2.55
<i>M. pernicioso</i> vs. C4A ( <i>T. harzianum</i> )	18.353	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.23
	28.389	n-Hexadecanoic acid	2.90

<i>M. roreri</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	18.309	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.62
	30.506	1-Nonadecene	0.52
	35.543	Eicosane	0.44
	35.944	Heneicosane	0.21
	27.431	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.55
<i>M. pernicioso</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	28.456	n-Hexadecanoic acid	5.07
	31.858	Heneicosane	0.69
	34.221	1-Nonadecene	0.43
	39.569	Eicosane	0.48
	27.438	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.38
<i>M. roreri</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	28.508	n-Hexadecanoic acid	6.75
	28.917	Eicosane	0.79
	39.057	Heneicosane	0.33
	27.446	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.72
<i>M. pernicioso</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	28.523	n-Hexadecanoic acid	3.06
	35.439	Eicosane	0.65
	27.454	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.55
	30.759	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	0.92
<i>M. roreri</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	27.959	Heneicosane	0.56
	28.494	n-Hexadecanoic acid	8.27
	39.050	Eicosane	0.56
	27.446	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.64
	25.767	Valencene	0.17
<i>M. pernicioso</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	28.456	n-Hexadecanoic acid	8.14
	39.057	Eicosane	0.67
	39.577	Heneicosane	0.67
<i>M. roreri</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	18.316	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.10
	28.411	n-Hexadecanoic acid	11.19
	37.928	Diisooctyl phthalate	0.50
	39.057	Eicosane	0.25
<i>M. pernicioso</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	18.301	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.12
	28.441	n-Hexadecanoic acid	11.37
	35.930	Eicosane	0.44
	38.790	Ergosterol	0.46
	30.737	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	0.85
<i>M. roreri</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	28.568	n-Hexadecanoic acid	10.65
	28.902	Eicosane	0.66
	42.073	Heneicosane	0.49
	27.438	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.43
	25.760	Valencene	0.30
<i>M. pernicioso</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	27.268	Octadecane	0.03
	28.634	n-Hexadecanoic acid	5.30
	42.400	Eicosane	0.17
	27.446	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.22

**Tabla 8.** Especies donde se ha detectado Dibutyl phthalate

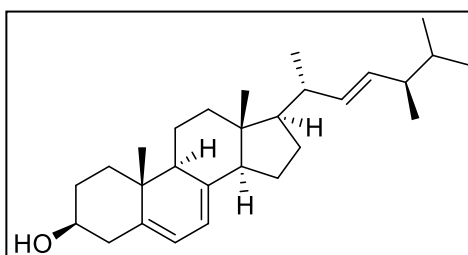
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Dibutyl phthalate	Ester	<i>Trichoderma atroviride</i>	74	Antifúngica
		<i>Aspergillus flavipes</i>	71	
		<i>Trichoderma harzianum</i>	61	
		<i>Streptomyces cacaoi</i>	75	
		<i>Moniliophthora roreri</i>	Presente estudio	
		<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Presente estudio	
		C3A ( <i>Trichoderma</i> spp.)	Presente estudio	



**Figura 12.** Estructura de Dibutyl phthalate.

**Tabla 9.** Especies donde se ha detectado Ergosterol.

Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Ergosterol	Esterol	<i>Trichoderma harzianum</i>	73	Antifúngica, Antitumoral 76
		<i>Trichoderma hamantum</i>	72,73	
		<i>Trichoderma polysporum</i>	72	
		<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	72,73	
		<i>Trichoderma sporulosum</i>	72,73	
		<i>Moniliophthora roreri</i>	Presente estudio	
		C3A ( <i>Trichoderma</i> spp.)	Presente estudio	
		C4A ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	Presente estudio	
		C8 ( <i>Trichoderma spirale</i> )	Presente estudio	
		C9 ( <i>Trichoderma spirale</i> )	Presente estudio	

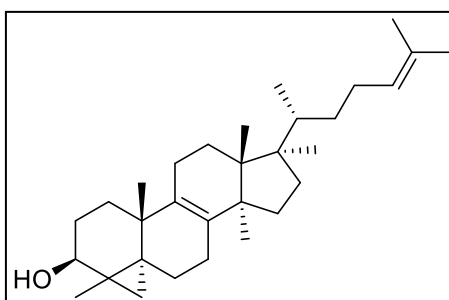


**Figura 13.** Estructura Ergosterol



**Tabla 10.** Especies donde se ha detectado Lanosterol

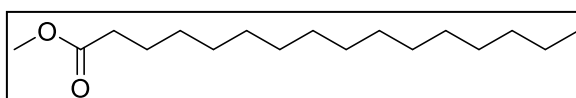
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad
Lanosterol	Esterol	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	<sup>73</sup>	Tratamiento de catarata en los ojos <sup>77</sup>
		<i>Trichoderma hamantum</i>	<sup>73</sup>	
		C3A ( <i>Trichoderma</i> spp.)	Presente estudio	



**Figura 14.** Estructura Lanosterol

**Tabla 11.** Especies donde se ha detectado Hexadecanoic acid, methyl ester.

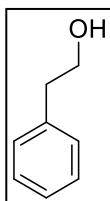
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Hexadecanoic acid, methyl ester	Ester metílico de ácido graso	<i>Aspergillus flavipes</i>	<sup>71</sup>	Antifúngica
		C3A ( <i>Trichoderma</i> spp.)	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	



**Figura 15.** Estructura de Hexadecanoic acid, methyl ester

**Tabla 12.** Especies donde se ha detectado Phenylethyl Alcohol.

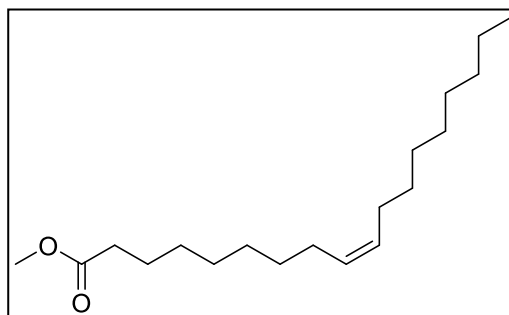
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Phenylethyl Alcohol	Alcohol primario aromático	<i>Trichoderma harzianum</i>	61	Antimicrobiano, aromatizante de alimentos y conservante <sup>78</sup>
		<i>Trichoderma atroviride</i>	74	
		C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	



**Figura 16.** Estructura de Phenylethyl Alcohol.

**Tabla 13.** Especies donde se ha detectado 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester

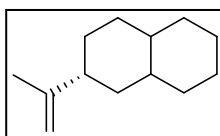
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	Methyl ester	<i>Aspergillus flavipes</i>	71	Antifúngica
		<i>M. pernicioso</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	



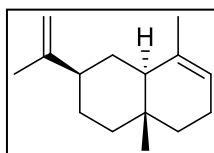
**Figura 17.** Estructura de 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester.

**Tabla 14.** Especies donde se ha detectado Valencene

Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Valencene	Sesquiterpene	<i>Penicillium roqueforti</i>	<sup>79</sup>	Antimicrobiano Efecto antiproliferativo en varios tipos de cáncer <sup>80</sup>
		<i>M. roreri</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. perniciosavs.</i> C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	

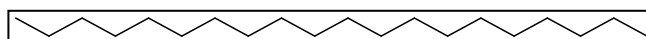
**Figura 18.** Estructura de Valencene**Tabla 15.** Especies donde se ha detectado  $\alpha$ -selinene

Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
$\alpha$ -selinene	Selineno (sesquiterpeno)	<i>Penicillium roqueforti</i>	<sup>79</sup>	Antimicrobiano
		<i>M. pernicioso</i> vs.C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	

**Figura 19.** Estructura de  $\alpha$ -selinene

**Tabla 16.** Especies donde se ha detectado Eicosane.

Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Eicosane	Alcano acíclico	<i>Streptomyces cacaoi</i>	75	Antibacteriano, antifúngico
		<i>Trichoderma harzianum</i>	61	
		<i>M. roleri</i>	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i>	Presente estudio	
		C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		C4A ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
<i>M. pernicioso</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio			

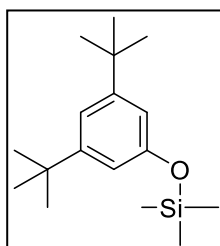


**Figura 20.** Estructura de Eicosane

**Tabla 17.** Especies donde se ha detectado Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl).

Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	Compuesto alquilfenólico	<i>Streptomyces cacaoi</i>	75	Antimicrobiana
		<i>Trichoderma harzianum</i>	61	
		<i>Moniliophthora pernicioso</i>	Presente estudio	
		C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		C3A ( <i>Trichoderma</i> spp.)	Presente estudio	
		C4A ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roleri</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	

	<i>M. roreri</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio
	<i>M. roreri</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio
	<i>M. pernicioso</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio
	<i>M. pernicioso</i> vs. C3A ( <i>Trichoderma</i> spp.)	Presente estudio
	<i>M. pernicioso</i> vs. C4A ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio

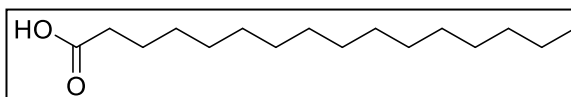


**Figura 21.** Estructura de Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)

**Tabla 18.** Especies donde se ha detectado n-Hexadecanoic acid.

Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
n-Hexadecanoic acid	ácido graso saturado	<i>Streptomyces cacaoi</i>	75	Cosmético, antioxidante
		<i>Trichoderma harzianum</i>	61	
		<i>Moniliophthora roreri</i>	Presente estudio	
		<i>Moniliophthora pernicioso</i>	Presente estudio	
		C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		C3A ( <i>Trichoderma</i> sp.)	Presente estudio	
		C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		C4A ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. pernicioso</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
<i>M. pernicioso</i> vs. C3A ( <i>Trichoderma</i> sp.)	Presente estudio			

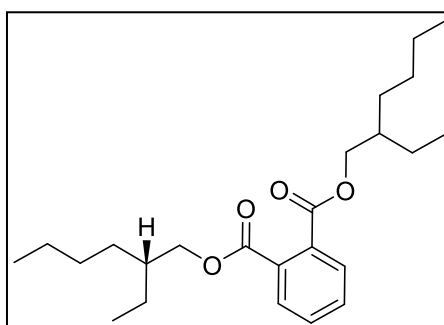
	<i>M. roreri</i> vs. C4A ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio
	<i>M. pernicioso</i> vs. C4A ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio



**Figura 22.** Estructura de n-Hexadecanoic acid.

**Tabla 19.** Especies donde se ha detectado Bis(2-ethylhexyl) phthalate.

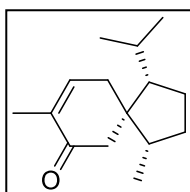
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	Phthalate	<i>Streptomyces cacaoi</i>	<sup>75</sup>	Antimicrobiano
		<i>Moniliophthora roreri</i>	Presente estudio	
		<i>Moniliophthora pernicioso</i>	Presente estudio	
		C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		C3A ( <i>Trichoderma</i> sp.)	Presente estudio	
		C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	



**Figura 23.** Estructura de Bis(2-ethylhexyl) phthalate.

**Tabla 20.** Especies donde se ha detectado Acorenone.

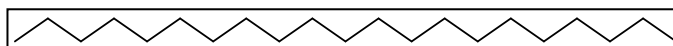
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Acorenone	Acoranes spiro-sesquiterpe	<i>Trichoderma harzianum</i>	<sup>73</sup>	Antibacterial, actividad citotóxica, actividad antimalarial <sup>81</sup>
		C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	



**Figura 24.** Estructura de Acorenone.

**Tabla 21.** Especies donde se ha detectado Heneicosane.

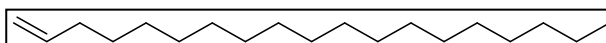
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Heneicosane	Alcano	<i>Streptomyces cacaoi</i>	<sup>75</sup>	Antibacterial
		<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Presente estudio	
		C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. perniciosa</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. perniciosa</i> vs. C8 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C5 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C10 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. perniciosa</i> vs. C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		<i>M. roreri</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. perniciosa</i> vs. C3B ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	



**Figura 25.** Estructura de Heneicosane.

**Tabla 22.** Especies donde se ha detectado 1-Nonadecene.

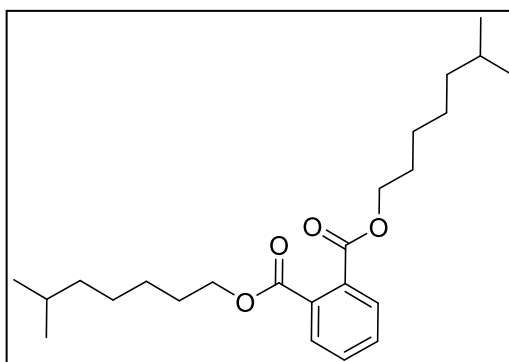
Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
1-Nonadecene	Alcano	<i>Streptomyces cacaoi</i>	<sup>75</sup>	Antioxidante, antimicrobiano
		C1 ( <i>T. harzianum</i> )	Presente estudio	
		C2A ( <i>T. reesei</i> )	Presente estudio	
		C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	
		<i>M. perniciosus</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	
		<i>M. royeri</i> vs. C4B ( <i>T. ghanense</i> )	Presente estudio	



**Figura 26.** Estructura de 1-Nonadecene.

**Tabla 23.** Especies donde se ha detectado Diisooctyl phthalate.

Compuesto	Categoría química	Microorganismos	Referencia	Actividad Biológica
Diisooctyl phthalate	Phthalate	<i>Streptomyces cacaoi</i>	<sup>75</sup>	Anticancerígeno, antibacterial
		<i>M. royeri</i> vs. C9 ( <i>T. spirale</i> )	Presente estudio	



**Figura 27.** Estructura de Diisooctyl phthalate



