



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO

**INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Rhizopus stolonifer* POR EFECTO DE COMPUESTOS VOLATILES DE *Trichoderma harzianum***

**TESIS PROFESIONAL**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P R E S E N T A:

**ERENDIRA GONZALES ESTRADA**

DIRECTORES DE TESIS

DR. HUMBERTO REYES PRADO

M. EN C. HUMBERTO FLORES BUSTAMANTE

## AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Estudios superiores del Jicarero UAEM, más que una institución académica, mi segundo hogar, agradezco a los profesores, personal académico y administrativo por todo el apoyo brindado.

Al Dr. Humberto Reyes Prado, por llevar acabo la dirección de este proyecto, agradezco la oportunidad y confianza, muchas gracias por su guía y enseñanza, y sobre todo porque a pesar de las dificultades y obstáculos siempre me mostro su apoyo incondicional.

Al M. en C. Humberto Flores Bustamante, por codirigir este proyecto, por la paciencia, el apoyo incondicional y sobre todo por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto.

Al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi), muchas gracias por permitirme el uso de las instalaciones, así como del equipo de laboratorio.

A la Dra. Norma R. Robledo Quintos, por su asesoría en el uso del CG-EM, muchas gracias por su tiempo y sobre todo por la paciencia y sus enseñanzas.

Al departamento de micología del CIB, por permitirme el uso de sus instalaciones y material de laboratorio, para el aislamiento y propagación de los hongos utilizados en este proyecto.

A la Dra. Janeth Téllez Román, por formar parte del comité de sínodos, por su asesoramiento, consejos y sobre todo por el apoyo en la revisión de escritura de la tesis.

Al Dr. Isaac Tello Salgado, por proporcionar la cepa de *Trichoderma harzianum*, por sus sugerencias, observaciones, así como de todas sus enseñanzas en el aula y campo.

Al Dr. Elizur Montiel Arcos, por la ayuda con la identificación de *Rhizopus stolonifer*, así como por sus grandes consejos dentro del aula y sus conocimientos invaluable en campo.

Al Dr. Juan Manuel Rivas González, por la confianza y por todo el apoyo brindado desde que lo conocí, lo considero un guía, un amigo.

Una vez más gracias a mi director, codirector, sínodos y profesores, he aprendido mucho de ustedes y sé que lo seguiré haciendo, me enseñaron el amor por la biología, por los hongos y por la educación. Gracias por brindarme su amistad.

## DEDICATORIAS

A la única persona en el mundo cuyo valor no se cuantifica con nada, Mamá eres la mujer y persona más importante para mí en este universo, muchas gracias por saber guiar y darme la libertad de elegir y seguir mi propio camino, gracias a eso soy la mujer que soy. Jamás podría terminar de agradecer todo lo que haces por mí, TE AMO!

Papá gracias por dejarme seguir mis sueños y apoyarme, todos estos gastos nunca los habría podido sobrellevar sin tu apoyo, muchas gracias, Te Quiero.

Erick, hermano eres mi pequeña y gran motivación de salir adelante y espero algún día saber guiar y apoyar tu camino en la vida, te volviste una razón para vivir y salir adelante, Te Quiero Mucho.

Mamachio, mi segunda mamá, aquella mujer capaz de calmar mi ego e inseguridades, aquella persona que no importa cómo me encuentre si algo me atormenta, simplemente me recibes con una sonrisa y me dices que todo ira bien, esas simples palabras destruyen mis más oscuros días, para motivarme, ponerme de pie y seguir avanzando, te amo mama! muchas gracias por todo.

Isra (mi chema), mi persona especial, te convertiste en la felicidad de mis días, gracias a tu apoyo y compañía los días pesados y tristes son cada vez más llevaderos y llenos de felicidad, por favor permanece en esta dimensión a mi lado por mucho mucho tiempo, Te Amo.

Diana, que hubiera sido de mi sin ti, mi amiga; compañera de clase, de aventuras, ridiculeces y más... el apoyo que me has dado nadie más lo ha hecho, gracias por todo, por reír, llorar, burlarnos de lo mal que nos trata la vida, nos miramos secamos las lágrimas y volvemos a empezar de nuevo. Quiero que sigamos juntas para siempre, poder seguir compitiendo por ser las mejores, hacer realidad nuestros sueños, ser las mejores amigas, hermanas, socias y todo lo que la Pachamama nos permita, Borahe!

Andy, esa amiga tan especial, tus ocurrencias siempre alegran mis días, gracias por tu apoyo y compañía, estar juntas vuelve mi vida un muy buen tiempo, cuando te encuentras lejos me haces tanta falta, sin embargo, no importa donde estés, se feliz siempre. Quiero que seas mi amiga para siempre, te quiero.

A mis hermanas Puchiis y Karla, gracias por su apoyo, cuando aún estaba por elegir la carrera, ustedes siempre me apoyaron y creyeron en mí, aun cuando me sentía insegura e incapaz, ustedes me decían sin dudarle - que yo podía hacerlo, que no dudara ni un momento de mí, y tenían razón, de alguna manera lo logre. Mi puchiis gracias por aguantar mis malos días, mi mal humor y aun así sonreírme cuando buscaba tu consuelo, te quiero, las quiero.

Abuelito, espero que donde sea que estés, te sientas orgulloso de mi, no me pudiste ver terminar la carrera, pero sé que siempre me apoyaste, fuiste la persona más bondadosa que conocí, no hay día que no te extrañe, jamás me olvidare de ti, te quiero.

A Betosaurio, eres el mejor maestro que tuve la dicha de conocer, tu apoyo, paciencia, regaños, bromas, bullying y todo lo que hiciste por mí, jamás podré terminar de agradecer, te convertiste en un guía, en un amigo y espero algún día poder compensar un poco y hacer que te sientas orgulloso, pues mis logros son por ti.

A el Dr. Humberto Reyes, nunca podre agradecer todo lo que ha hecho por mí, por su tiempo y confianza muchas gracias.

Y gracias a todas esas personas tan especiales para mí, mis amigos y compañeros (Quelui, Samuel, Mariana, Santiago, Hector, Noe, Maribel, Alondra, Beyda, Esteban, Lucino, Cesar, Ari, Edher, Ro, Piña, Celeste, etc, etc,) que de alguna manera dieron un impacto en mi vida, gracias por hacer este tiempo en la universidad un momento agradable y lleno de aventuras, los aprecio y les deseo lo mejor de la vida.

A Christian (Porta), que sin saberlo has sido mi pilar, tus palabras me han hecho fuerte durante los últimos 10 años, conseguí un sueño que me apasiona y sé que por intentar no pierdo nada y es que, gracias a ti, hoy puedo decir que vuelvo a ser yo, ya no seré más una sombra si puedo ser luz. Muchas Gracias por todo, Eres el mejor, Te Amo.

A BTS, mi fuente de inspiración, yo no sabía cómo amarme, como aceptar el tipo de persona que soy, cuando odiaba ser yo, cuando solo quería desaparecer, abrí una pequeña puerta mágica y los encontré. Todavía hay una parte incomoda de mí, pero sé que incluso todas las cicatrices de mis errores representan mi constelación. Si ustedes no hubieran estado yo que no era nadie, no brillaría ni siquiera un poco, ahora siento que tengo mi universo. La razón por la que la noche puede verse así de hermosa seguramente no es a causa de las estrellas o luces, es a causa de nosotros. Gracias por todo Kim Nam Joon, Kim Seok Jin, Min Yoon Gi, Jung Ho Seok, Park Jimin, Kim Tae Hyung & Jeon Jung Kook. Borahe!. Ustedes me enseñaron que con trabajo duro y esfuerzo cualquier sueño se cumple.

To BTS, my source of inspiration, I didn't know how to love myself, how to accept the type of person I am, when I hated being me, when I just wanted to disappear, I opened a little magic door and found them. There is still an uncomfortable part of me, but I know that even all the scars from my mistakes represent my constellation. If you had not been me who was nobody, I would not shine even a little, now I feel that I have my universe. The reason the night can look this beautiful is surely not because of the stars or lights, it is because of us. Thank you for everything Kim Nam Joon, Kim Seok Jin, Min Yoon Gi, Jung Ho Seok, Park Jimin, Kim Tae Hyung & Jeon Jung Kook. Borahe !. You taught me that with hard work and effort any dream comes true.

**Tus inicios parecerán humildes, pero tu futuro será tan prospero – (Agust D, 2016)**

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENES	
2.1 Hongos fitopatógenos en frutos	2
2.2 <i>Rhizopus stolonifer</i> en frutos	2
2.3 Control de hongos fitopatógenos	3
2.4 Alternativas al uso convencional de fungicidas	4
2.5 Compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. para el control de hongos fitopatógenos	5
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	10
5. HIPÓTESIS	11
6. OBJETIVO	
6.1 Objetivo general	11
6.2 Objetivos específicos	11
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Aislamiento y propagación de <i>Trichoderma harzianum</i>	11
7.2 Aislamiento y propagación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	12
7.3 Dispositivo para la extracción de compuestos volátiles	12
7.4 Identificación de los compuestos volátiles	13
7.5 Medición de la inhibición del crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> por <i>Trichoderma harzianum</i>	14
7.6 Análisis de datos	14
8. RESULTADOS	
8.1 Identificación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	15

8.2 Propagación de <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	16
8.3 Enfrentamiento e inhibición	17
8.4 Identificación de compuestos volátiles	20
9. DISCUSIÓN	26
10. CONCLUSIÓN	28
11. PERSPECTIVAS	28
12. REFERENCIAS CITADAS	29

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Especies del género <i>Trichoderma</i> empleadas en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas en diferentes cultivos, de acuerdo con López, 2011 y actualizado con investigaciones de Rosales, 2011 y Sinuco <i>et al.</i> , 2017.	7
<b>Cuadro 2.</b> Compuestos Orgánicos Volátiles identificados en especies de hongos del género <i>Trichoderma</i> spp.	8
<b>Cuadro 3.</b> Cronograma de siembra para la interacción de <i>Trichoderma harzianum</i> - <i>Rhizopus stolonifer</i> .	17
<b>Cuadro 4.</b> Descripción de la inhibición de <i>Rhizopus stolonifer</i> por efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> .	18
<b>Cuadro 5.</b> Compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de <i>R. stolonifer</i> , <i>T. harzianum</i> e interacción <i>T. harzianum</i> - <i>R. stolonifer</i> .	21

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Trichoderma harzianum</i> (40x/0,65).	11
<b>Figura 2.</b> Jitomates infectados con <i>Rhizopus stolonifer</i> .	12
<b>Figura 3.</b> Enfrentamiento a) <i>T. harzianum</i> , b) <i>R. stolonifer</i> .	12
<b>Figura 4.</b> Dispositivo de absorción de volátiles, cada cámara contiene una cepa diferente. 1) <i>R. stolonifer</i> , 2) Interacción <i>T. harzianum</i> - <i>R. stolonifer</i> , 3) <i>T. harzianum</i> .	13
<b>Figura 5.</b> Identificación de compuestos volátiles de <i>T. harzianum</i> , <i>R. stolonifer</i> e interacción <i>T. harzianum</i> – <i>R. stolonifer</i> , mediante CG-EM.	14
<b>Figura 6.</b> <i>Rhizopus stolonifer</i> visto al microscopio. a) estolones rastreros (4x/ 0,10), b) esporangio (40x/0,65), c) esporangióforo (10x/0,25) y d) esporangioesporas (40x/0,65).	15
<b>Figura 7.</b> Crecimiento en PDA de <i>Rhizopus stolonifer</i> durante las primeras 12h hasta el día 2.	16
<b>Figura 8.</b> Crecimiento en PDA de <i>Trichoderma harzianum</i> del día 2 hasta el día 7.	16
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de la interacción <i>Trichoderma harzianum</i> – <i>Rhizopus stolonifer</i> (T-R).	23
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de <i>Rhizopus stolonifer</i> .	24
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de <i>Trichoderma harzianum</i> .	25



## **ABREVIATURAS**

**6-PAP:** 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one

**CG-EM:** Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas

**CIB:** Centro de Investigaciones Biológicas

**COV's:** Compuestos Volátiles Orgánicos

**ELL:** extracción líquido-líquido

**FAO:** food and agriculture organization of the united nations. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**HSD:** Headspace dinámico

**HSE:** headspace estático

**MEA:** Malt Extract Agar. Agar Extracto de Malta

**PDA:** Potato Dextrose Agar. Agar Dextrosa y Papa

**SPME:** Solid Phase Microextraction. Microextracción en Fase Sólida

**UV:** ultravioleta

## RESUMEN

*Rhizopus stolonifer* es un hongo fitopatógeno considerado el principal agente causal de la pudrición blanda de productos agrícolas, como frutas y hortalizas. Infecta los tejidos vegetales provocando enfermedades y acelerado su proceso de descomposición. Estas enfermedades son impredecibles y representan grandes pérdidas de los productos agrícolas. A lo largo del tiempo ha sido controlado utilizando fungicidas sintéticos, que a pesar de ser eficaces representan un daño potencial para el ambiente y la salud humana. Como una alternativa al uso de productos sintéticos, se evaluó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) liberados por *Trichoderma harzianum*, ya que se ha documentado que estos COV's poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias. Se realizaron aislamientos de ambos hongos y una vez identificados se sembraron en medio PDA para su propagación. Se observó que existe un desbalance entre el tiempo de crecimiento y maduración de ambos hongos, por lo cual se diseñó un cronograma de siembra para poder realizar los enfrentamientos. Con la finalidad de saber si los COV's de *T. harzianum* poseen un antagonismo sobre *R. stolonifer*, ambos hongos fueron sembrados en cajas Petri con división, para evitar el contacto directo entre ambos, de esta interacción se absorbieron los volátiles del headspace, utilizando el método de extracción SPME y posteriormente identificados en el CG-EM. En general se identificaron 13 compuestos, 8 de estos se encontraron presentes en la interacción; 3 alcoholes (Alcohol fenólico, Fenol y Trichoacorenol), 3 terpenos (Limoneno, cis- $\alpha$ -Bisaboleno e Isoledeno), un aromático (p-Xyleno) y una enzima ( $\gamma$ -Muuroleno). La inhibición de *R. stolonifer* fue notable desde el segundo día de la interacción, sin embargo, al cuarto día *T. harzianum* invadió físicamente el área perteneciente a *R. stolonifer*, la inhibición no solo funcionó en evitar que *R. stolonifer* siguiera creciendo, ya que se observó una disminución parcial de micelio y esporas, hasta que el antagonista llegó a su muerte y la inhibición se detuvo.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los países en desarrollo se estima que de 15 al 50 % de los alimentos producidos se pierden después de la cosecha, las principales causas suelen ser, las plagas y enfermedades, así como la contaminación por plaguicidas y productos químicos (FAO, 2009). A las pérdidas biológicas de los productos se le suman las pérdidas económicas para los productores y comerciantes, y los efectos negativos al ambiente por el uso de los recursos, como: tierras, agua, fertilizantes y energía, que son utilizados para producir, elaborar, manipular y transportar alimentos que no serán aprovechados (FAO, 2011).

*Rhizopus stolonifer* es un hongo fitopatógeno, considerado uno de los principales causantes de las enfermedades postcosecha, por su rápido crecimiento micelial y potencial de invadir tejidos vegetales, es el responsable de causar la pudrición blanda de los productos agrícolas. Durante años con el fin de evitar pérdidas se ha empleado el uso de compuestos químicos (fungicidas sintéticos) en el tratamiento postcosecha, sin embargo, éstos suelen tener implicaciones negativas en la salud de los consumidores y en el ecosistema, debido a esto las tendencias actuales involucran el desarrollo de productos biológicos como alternativas al uso de fungicidas sintéticos, que sean capaces de frenar las pérdidas postcosechas y preservar la integridad y seguridad de la salud y el ambiente (Velázquez-del Valle *et al.*, 2007).

El género *Trichoderma*, es utilizado como agente de control biológico de hongos y nemátodos. Entre los mecanismos que permiten que desempeñe un papel de antagonista ante los fitopatógenos se encuentran: la competencia, micoparasitismo y antibiosis (producción de metabolitos) (Martínez *et al.*, 2013). Los compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma* como producto de su metabolismo secundario han hecho posible la elaboración de productos para el control biológico de patógenos en plantas (Kanchiswamy, *et al.*, 2015). *Trichoderma harzianum* es un hongo que ha sido ampliamente estudiado y reconocido por su producción de toxinas y antibióticos (Romero-Arenas *et al.*, 2009). En este trabajo, se identificaron los compuestos volátiles de *Trichoderma harzianum* y se observó la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* por efecto de *T. harzianum*, mediante estudios *in vitro*.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Hongos fitopatógenos en frutos**

Los productos agrícolas (frutas y hortalizas) son muy susceptibles al ataque de microorganismos, antes y después de la cosecha, así como durante su almacenamiento (Trigos *et al.*, 2008). Dentro de las principales plagas agrícolas los más perjudiciales son los agentes patógenos, así llamados porque provocan enfermedades en los cultivos, algunos son: hongos, virus y bacterias (Bedmar, 2011).

Los hongos fitopatógenos, causan enfermedades y aceleran los procesos de descomposición provocando grandes pérdidas biológicas y económicas (Trigos *et al.*, 2008), además producen micotoxinas las cuales se distribuyen ampliamente sobre el sustrato y pueden ocasionar graves enfermedades a los consumidores, según la FAO (2001) alrededor del 25% de los cultivos se encuentran contaminados con algún tipo de micotoxina.

Algunos de los principales géneros de hongos fitopatógenos causantes de las alteraciones más comunes en las cosechas son: *Alternaria*, *Botrytis*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Fusarium*, *Mucor* y *Rhizopus*, estos causan daños en el tejido de los productos agrícolas afectando a su aspecto físico, valor nutricional y dificultad de conservación (Fitenborg *et al.*, 1996).

### **2.2 *Rhizopus stolonifer* en frutos**

*R. stolonifer* es un hongo fitopatógeno que se distribuye ampliamente en el ambiente, es capaz de desarrollarse y crecer en temperaturas que van desde los 10°C hasta los 33°C y en humedades relativamente variables (Pontón, 2002). Es saprofito del suelo y del material orgánico, su micelio es aéreo de crecimiento acelerado (Velázquez-del Valle *et al.*, 2007), se reproducen de manera sexual y asexual, poseen esporangióforos que producen esporas de gruesas paredes resistentes a las condiciones ambientales adversas (sequías y altas temperaturas) que pueden mantenerse latentes por largo tiempo y distribuirse con facilidad sobre el sustrato (suelo), se dispersan por medio del aire lo que les permite llegar a los tejidos vegetales dañados donde germinan y generan la aceleración de la maceración de los tejidos y la pudrición de los frutos (Adaskaveg *et al.*, 2002).

*R. stolonifer* es considerado el principal agente causal de la pudrición blanda de algunas frutas y hortalizas. El mayor número de infecciones y pérdidas se presenta postcosecha, así como durante el empaquetamiento y transporte de los productos. Este fitopatógeno se ve beneficiado por la presencia de heridas como las magulladuras que sufren los productos agrícolas al ser cosechados, empaquetados y transportados. Su micelio y esporas aéreas aprovechan de las lesiones para introducirse e invadir el resto del organismo (Velázquez-del Valle *et al.*, 2007), llevan a cabo la maceración celular utilizando enzimas pécticas que degradan y disuelven las pectinas de las células vegetales (Barkai-Golan, 2001). Las enfermedades producidas por *R. stolonifer* son impredecibles y representan grandes cantidades de pérdidas anuales de los productos agrícolas (ATI, 2016).

### **2.3 Control de hongos fitopatógenos**

Las plagas y enfermedades son un problema que inició con la agricultura misma (Carreón, 2007), con la necesidad de combatirlas y evitar pérdidas biológicas y económicas en la agricultura, se han elaborado y utilizado sustancias químicas / orgánicas, inorgánicas o microbiológicas ya sean líquidas o sólidas (plaguicidas) cuyo propósito es producir un efecto tóxico sobre ciertos organismos vivos que sean dañinos para el cultivo y la cosecha (Bedmar, 2011),

Los plaguicidas que son utilizados para el control de hongos fitopatógenos se denominan fungicidas y se clasifican de acuerdo su modo de acción son: 1) Preventivos, se aplican antes de que se presente la enfermedad o al presentarse los síntomas iniciales; 2) Curativos y Erradicantes, son translaminares y sistémicos, puesto que son capaces de penetrar el tejido vegetal y matar el hongo que ya ha invadido, además pueden evitar la formación de esporas (FAO).

Para controlar la pudrición blanda causada por *R. stolonifer* los principales fungicidas sintéticos que se han utilizado son: Dicloran, Iprodione, Fludioxonil y Tebuconazole (Adaskaveg *et al.*, 2002). Todos estos lograron reducir más del 50% de la pudrición, sin embargo, en algunos casos han dejado de ser producidos por su alto riesgo ecológico, y otros más han dejado de ser utilizados debido a que el fitopatógeno ha generado resistencia a estos fungicidas (Velázquez-del Valle *et al.*, 2007).

## 2.4 Alternativas al uso convencional de fungicidas

A lo largo del tiempo los fitopatógenos han sido controlados utilizando fungicidas Asintéticos, que a pesar de ser eficaces representan un daño potencial para el ambiente y la salud humana (Dofur *et al.*, 2011). Además, el uso inmoderado de fungicidas sintéticos utilizados en productos postcosecha ha traído como consecuencia que los hongos fitopatógenos desarrollen resistencia a éstos (Taheri *et al.*, 2018), debido a esto las dosis utilizadas se intensifican, provocando que éstos se acumulen en los alimentos, suelos y aguas, por lo que ha actualmente ha generado una creciente preocupación ambiental con respecto a la eliminación indiscriminada de fungicidas.

Los plaguicidas han contribuido a mantener la calidad de los alimentos a costos económicos no muy elevados, sin embargo, el alto precio lo ha pagado el medio ambiente (Velázquez-del Valle *et al.*, 2007). Por lo que se han implementado el uso de alternativas que preserven la integridad y seguridad de los seres humanos, como del medio, y por supuesto que tengan un efecto eficaz sobre el patógeno (James *et al.*, 1993).

En un enfoque alternativo para el control de la pudrición causada por *R. stolonifer* en el melocotón (*Prunus persica*) se evaluó la eficacia del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) cuyos resultados demostraron su capacidad como inhibidor de *R. stolonifer*, con variaciones en las concentraciones utilizadas, siendo así una alternativa viable a los fungicidas sintéticos (Taheri *et al.*, 2018). En otros estudios, se evaluó el uso bacterias antagonistas con potencial de biocontrol de *R. stolonifer* en frutos de zarzamora, de 86 aislamientos de bacterias de plantas y del suelo, 4 de ellas presentaron un efecto antagónico ante *R. stolonifer*, donde *Bacillus licheniformis* con un porcentaje de inhibición de 41.42% y 42.78% y *Bacillus subtilis* 40.04% y 41.46% fueron las más efectivas (Chávez-Díaz *et al.*, 2013).

En cuanto a los compuestos volátiles orgánicos, Scarselletti y Faull en 1994, mencionan que estos resultan ser tóxicos para algunos hongos debido a que poseen capacidad hidrofóbica de adsorberse dentro de las membranas celulares, formando una capa hidrorepelente sobre la pared los hongos impidiendo que las células de estos absorban agua, lo que les causa la muerte. Los primeros estudios que se realizaron y permitieron identificar compuestos

volátiles, fueron del hongo *T. viride* en el cual se encontró el compuesto 6-pentil-2H-pirán-2-ona (6-PAP) (Collins y Halim, 1972; Prapulla *et al.*, 1992).

Actualmente las investigaciones sobre compuestos volátiles pretenden obtener información de la actividad antifúngica y antimicrobiana de los organismos productores de compuestos volátiles, como es el caso de *Codium bursa*, un alga que emite compuestos volátiles que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Jerkovi'c *et al.*, 2019).

## **2.5 Compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos**

*Trichoderma* es un hongo microscópico filamentoso anaerobio facultativo, se encuentra presente en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Posee un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas, permitiéndole colonizar diferentes sustratos, así como el suelo y la madera (Infante *et al.*, 2009). *Trichoderma* puede adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin 1988, Jackson *et al.*, 1991).

Las especies de *Trichoderma* poseen una gran plasticidad ecológica estrechamente relacionada con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos, algunas especies secretan más de 70 metabolitos entre ellos algunos que funcionan como estimuladores del crecimiento, inducción de resistencia de la planta-huésped y desarrollo vegetal, además tiene compatibilidad con productos agroquímicos (Martínez *et al.* 2013). Contribuye en el control de hongos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas, algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes de control biológico de hongos causantes de enfermedades a diferentes plantas hortícolas (Cuadro 1.) (Score y Palfreyman 1994, Druzhinina y Kubicek 2005, Ávila-Miranda 2006, Rojo 2007). Además, *Trichoderma* produce metabolitos secundarios que han sido usados como agentes biofertilizadores, bioprotectores y biocontroladores en agricultura, contra diferentes hongos fitopatógenos como *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotim*, *Pythium*, *Colletotricum* y *Fusarium* (Sivan & Chet, 1989; Ahmed, *et al.*, 1999, Harman, *et al.*, 2004)

Las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles (Cuadro 2) y no volátiles, cuya función es impedir la colonización por microorganismos antagónicos, se han caracterizado químicamente más de 180 metabolitos secundarios que provocan un efecto inhibitorio o letal en microorganismos fitopatógenos (Gams & Bisset 1998; Reino *et al.*, 2008).

Los compuestos orgánicos volátiles (COV's) son unos de los diversos metabolitos secundarios producidos por los hongos (Sinuco *et al.*, 2017). Son sólidos y líquidos a base de carbono que a una temperatura de aproximados 20°C se evaporan y se vuelven gaseosos (Pagans *et al.*, 2006). Varios autores han estudiado e identificado los componentes volátiles de dichos compuestos, algunos de ellos son: dióxido de carbono, etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentanol, todos estos en concentraciones variadas son los que intervienen en el mecanismo fungistático (Dal Bello *et al.*, 1997). Debido a los COV's el hongo no necesariamente debe estar en contacto con el fitopatógeno, ya que pueden penetrar los poros del suelo y diseminarse por el aire a largas distancias (Aochi y Farme, 2015). Es esta la propiedad que permite que sean útiles para el control biológico de enfermedades.

Se ha comprobado que *T. harzianum*, *T. viride* y *T. koningii*, son capaces de producir 6-PAP, este posee la capacidad de inhibir del crecimiento micelial de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (Dennis y Webster, 1971) *B. cinérea* y *Fusarium oxysporum* (Castañeda *et al.*, 2017). El perfil de los COV's de una determinada especie o cepa varía según el sustrato, la duración de la incubación, tipo de nutrientes, temperatura y otros parámetros ambientales (Pasanen *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 2004; Fiedler *et al.*, 2005). Al uso de las propiedades antagónicas y de control biológico de los COV's para prevenir el hongo después de la cosecha, se le denomina micofumigación (Morath *et al.*, 2012).



**Cuadro 1.** Especies del género *Trichoderma* empleadas en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas en diferentes cultivos, de acuerdo con López, 2011 y actualizado con investigaciones de Rosales, 2011 y Sinuco *et al.*, 2017.

Especie	Fitopatógeno	Cultivo y autor que lo reporta
<i>T. atroviride</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Papa (Lahlali y Hijri, 2010)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Fresa (Fraize <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Alfalfa (Savazzini <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Armillaria mellea</i>	Uva (Savazzini <i>et al.</i> , 2008)
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate (Cotxarrera <i>et al.</i> , 2002; Segarra <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Pepino (Trillas <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Pythium</i> sp.	Tomate (Aerts <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>In vitro</i> (Rosales, 2011)
<i>T. hamatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Rábano (Heremans <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Sclerotinia minor</i>	Lechuga (Rabeendran <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Begonia (Horst <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Xanthomonas vesicaria</i>	Tomate (Alfano <i>et al.</i> , 2007)
<i>T. harzianum</i>	<i>Botrytis cinérea</i>	Pepino (Elad, 2000), tomate (Fiume, 2006).
	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Pepino (Elad, 2000)
	<i>Pseuoperonospora cubensis</i>	Pepino (Elad, 2000)
	<i>Sphaeroteca fusca</i>	Pepino (Elad, 2000)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Melón (Lopez <i>et al.</i> , 2010), vid (El-mohamedy ket al. 2010.)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Tomate (Strashnov <i>et al.</i> , 1985; Amer y Abou-El-Seoud, 2008),
	<i>Pythium</i> sp.	Rábano (Lee <i>et al.</i> , 2008)
<i>T. viride</i>	<i>Fusarium</i> sp.	Maíz (Harman <i>et al.</i> , 2004)
		Vid (Di marco y Osti, 2007)
		<i>In vitro</i> (C. Sinuco <i>et al.</i> , 2017)

**Cuadro 2.** Compuestos Volátiles identificados en especies de hongos del género *Trichoderma* spp.

Especie y Autor que lo reporta	Compuesto		
<i>Trichoderma</i> spp. (Mariano Dal Bello <i>et al.</i> , 1997 y Sinuco <i>et al.</i> , 2017)	Etanol Acetaldehido Acetona Propanol Isobutanol Isopentanol Benzaldehido 3-octanone 1-octen-3ol 3-octanol		
	Cloroformo 5-metil-2-etilfuran tolueno 1,2-dicloroetano 2-metil-1-propanol n-C12 limoneno 2-metil-1-butanol 2-pentil furan C3-benceno 3-metil-beten-1-ol 6-metil-2-heptona 3-octanona 3-octanol 1-octen-3-ol 2-butanona 2-decanona lilol 2-(2-etoxi-etoxi) etanol tert.butil-p-metoxibenceno sesquiterpenos 5, etileno-dihidro-5metil-2-furonona benzotiazol lilo3 di-n-etilftalato diterpeno 6-PAP		
		<i>Trichoderma atroviride</i>	
		<i>Trichoderma viride</i> (Sinuco <i>et al.</i> , 2017)	Alcohol isobutilico Alcohol isopentilico 3-metilbutanal Alcohol bencílico Alcohol 2-feniletílico Gama-butirolactona 2-metil-2-propanol 3-metil-1butanol 3-hidroxi-2-butanona (acetoina) 6-PAP

**Continuación de cuadro 2.** Compuestos Volátiles identificados en especies de hongos del género *Trichoderma* spp.

---

<i>Trichoderma hamatum</i> (Mariano Dal Bello <i>et al.</i> , 1997)	Dióxido de carbono Etileno Oxígeno Etanol Acetaldehído 6-PAP Masoilactona 8-decenolactona
<i>Trichoderma virens</i> (Sinuco <i>et al.</i> , 2017)	3-metil-1butanol 6-PAP
<i>Trichoderma harzianum</i>	6-PAP Koninginina A, B, D y E seco- koninginina hidroxi koninginina B
<i>Trichoderma koningii</i>	Koninginina A, B, C y E 6-PAP

---

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Por un lado, *R. stolonifer* es un hongo fitopatógeno, considerado uno de los principales causantes de la pudrición blanda postcosecha de frutos y hortalizas, ocasionando importantes pérdidas biológicas y económicas. Por lo que, para reducir y controlar la pudrición postcosecha, se ha empleado el uso de fungicidas sintéticos que, a pesar de ser eficaces, éstos representan un riesgo para el ambiente y la salud humana (Velázquez-del Valle *et al*, 2007). Por lo anterior, en los últimos años se han buscado alternativas para emplear productos biológicos que reduzcan las pérdidas postcosechas y preserven la integridad y seguridad de la salud y el ambiente.

Por otro lado, *Trichoderma* spp. es un género de hongos altamente colonizadores y competitivos lo que les permite actuar como inhibidores de fitopatógenos. Los compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma* spp., han hecho posible la elaboración de productos para el control biológico de patógenos en plantas, siendo utilizados como alternativa al uso de fungicidas sintéticos, pues resulta amigable con el medio ambiente, es seguro y puede proveer protección al cultivo a lo largo del tiempo (Kanchiswamy, *et al.*, 2015).

El género *Trichoderma* ha sido ampliamente estudiado por sus efectos antagónicos sobre los fitopatógenos, pero los estudios documentados sobre la interacción y posible inhibición de *T. harzianum* sobre *R. stolonifer* no mencionan la inhibición por volátiles. En este trabajo, se pretende conocer si *T. harzianum* por medio de los compuestos orgánicos volátiles puede inhibir el crecimiento micelial de *R. stolonifer*. El conocimiento generado en este trabajo aportará al diseño de un producto de biocontrol utilizando los COVs de *T. harzianum* para inhibir el crecimiento de *R. stolonifer* sobre frutos y hortalizas.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Será posible la inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* por medio de los compuestos orgánicos volátiles de *T. harzianum*?

### **5. HIPÓTESIS**

*T. harzianum* será capaz de inhibir el crecimiento micelial de *R. stolonifer* por efecto de sus compuestos volátiles.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Identificar los compuestos volátiles de *Trichoderma harzianum* y calcular el área de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

### 6.2 Objetivos específicos

- Identificar los compuestos volátiles orgánicos de la interacción de *T. harzianum* y *R. stolonifer*
- Calcular el área de inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* por efecto de los COV's de *T. harzianum*.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2 Aislamiento y propagación de *Trichoderma harzianum*

De cepas proporcionadas por el departamento de micología del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la UAEM. Se realizó la propagación de *T. harzianum* (Fig. 1). Se utilizó como medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA) de la marca BD Bioxon, su preparación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (39 g/L), se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 120°C, con una presión de 15 lb/in<sup>2</sup>. Al concluir la esterilización se dejó enfriar durante 15 minutos, posteriormente dentro de la campana de flujo laminar, se vertió el contenido en cajas Petri (100 x 15 mm), una vez que el medio solidifico se cerró y selló con plástico parafilm, se mantuvo bajo observación durante 24h a temperatura ambiente, para verificar que este no se encontrara contaminado. La siembra se realizó en la campana de flujo laminar, con ayuda del haza se tomó una muestra de micelio de *T. harzianum* y se sembró en el centro de la caja, se selló con parafilm y se etiquetó, posteriormente se conservó a temperatura ambiente (de 28 a 32 °C).



**Fig. 1.** *Trichoderma harzianum* (40x/0,65).

### 7.3 Aislamiento y propagación de *Rhizopus stolonifer*

De jitomates comerciales infectados con *R. stolonifer* (Fig. 2), se tomó una muestra (10mm<sup>3</sup>) de tejido infectado con micelio y se sembró en cajas Petri (100 x 15 mm) con medio PDA, las cuales fueron conservadas a temperatura ambiente, en las primeras 24 h se pudo observar el crecimiento micelial. Con la finalidad de verificar si realmente el micelio correspondía a *R. stolonifer* una vez que este se encontró desarrollado y tenía presencia de esporas, se tomó una muestra y se realizaron improntas en un portaobjetos, al cual se le agregó una gota de azul algodón y se observó al microscopio, se utilizaron claves taxonómicas para su identificación. Una vez que se confirmó la identidad de *R. stolonifer*, con ayuda del haza se tomó una muestra de micelio y se realizaron resiembras, se sellaron con parafilm y se etiquetaron, posteriormente se conservaron a temperatura ambiente.

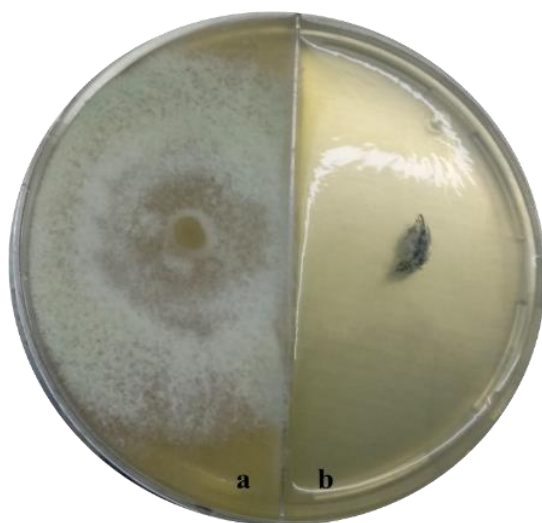


**Fig. 2.** Jitomates infectados con *Rhizopus stolonifer*.

### 7.3 Medición de la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* por *Trichoderma harzianum*

Ambos hongos se sembraron en una caja Petri con división (100 x 15 mm), *R. stolonifer* debido a su rápido crecimiento, se sembró 5 días después a la siembra de *T. harzianum* (Fig. 3). Fue en el tercer día de la interacción *T. harzianum* - *R. stolonifer*, cuando se observó la mayor presencia de inhibición micelial de *R. stolonifer*.

Para medir el área de inhibición del crecimiento micelial de *T. harzianum* – *R. stolonifer*, se realizaron mediciones de los halos de crecimiento mediante registro fotográfico que fue sometido a análisis de dimensiones utilizando el programa ImageJ (Versión 1.52a Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Se realizaron una serie de 15 mediciones por cada una de las 20 cajas con interacción, de esta manera se obtuvo un porcentaje del área de inhibición.



**Fig. 3.** Enfrentamiento a) *T. harzianum*, b) *R. stolonifer*.

#### **7.4 Dispositivo para la absorción pasiva de compuestos volátiles**

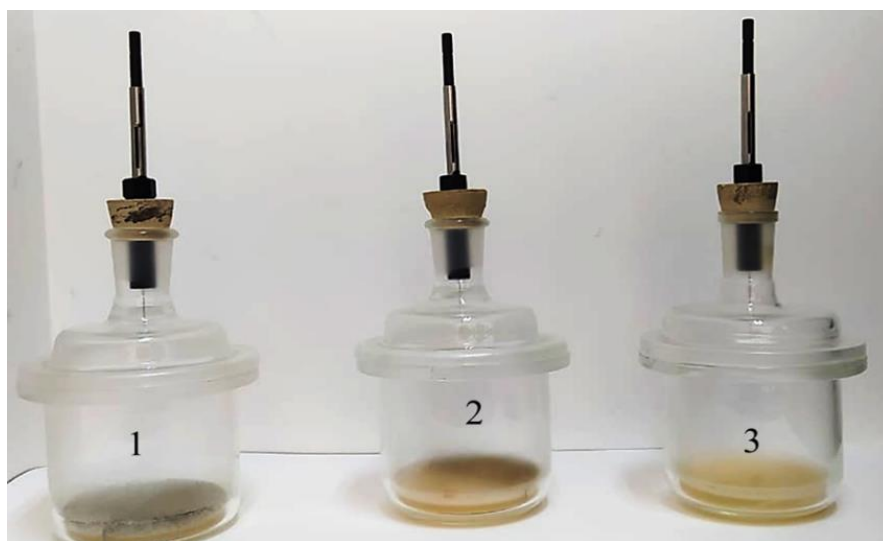
Para la absorción de volátiles de *T. harzianum*, *R. stolonifer* o de la interacción, se utilizó el método de microextracción en fase sólida (SPME), con una fibra recubierta con polidimetilsiloxano-divinilbenceno de 65  $\mu$ M, stableflex 24Ga y un soporte manual de 3pk, (PDMS / DVB, 57326-U, Supelco, Inc., Bellefonte, PA), que tiene una alta afinidad a 2,6 mvp (Sala et al.2000, Robledo et al.2009).

En el dispositivo de vidrio Pyrex de 10 cm de diámetro y 12 cm de altura, se esterilizó en el horno durante 30 min. a una temperatura de 150° C, en el centro inferior se colocó una caja Petri (100 x 15 mm) con el cultivo correspondiente (*T. harzianum*, *R. stolonifer*, o medio PDA), esta se mantuvo destapada para permitir la exposición y liberación de los COV's en el headspace, la fibra SPME se expuso al espacio superior a través de un pequeño orificio en

la parte superior de la tapa. El proceso de adsorción de los compuestos volátiles por medio de la fibra (SPME) fue de 19h 40 min por cepa.

Para capturar los compuestos volátiles se utilizaron como testigos; caja solo con medio PDA (como blanco), cepa de *T. harzianum* y de *R. stolonifer*, con el objetivo de extraer e identificar los compuestos que estos liberan por sí mismos, para finalmente compararlos con los compuestos extraídos de la interacción *T. harzianum* – *R. stolonifer*.

Para la absorción de volátiles de los hongos individualmente, así como de la interacción entre ellos, se realizaron 3 absorciones por cada hongo e interacción en el dispositivo de adsorción de volátiles con SPME, cada cámara conteniendo una cepa diferente (Fig. 4). Una vez terminado el proceso de adsorción de compuestos, se almacenaron a una temperatura de  $-4\text{C}^{\circ}$  y posteriormente la muestra se inyectó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM) para la identificación de los compuestos.



**Fig. 4.** Dispositivo de adsorción de volátiles, cada cámara contiene una cepa diferente. 1) *R. stolonifer*, 2) Interacción *T. harzianum* - *R. stolonifer*., 3) *T. harzianum*.

### 7.5 Identificación de los compuestos volátiles

De los compuestos volátiles que fueron adsorbidos de cada hongo y de los compuestos liberados de la interacción *T. harzianum* – *R. stolonifer* del día de mayor inhibición micelial, se identificaron por medio de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de



masas (CG-EM) (Fig. 5), equipado con una columna Agilent de 30 m, (diámetro interno de 250  $\mu\text{m}$  y espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Agilent, EUA). Al inicio la temperatura del horno fue de 50° C manteniéndose por 2 min con un incremento de 8° C/min hasta llegar a los 220° C. Se utilizó gas acarreador hidrogeno a un flujo de 2 ml/min. La temperatura del auxiliar fue de 250°C. El inyector se trabajó en modo splitless a una temperatura de 250°C y el DSM se trabajó con ionización electrónica (70 EV, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 35 a 550 UMA, provisto de una biblioteca espectral (NIST 98 y Wiley 275) (Sanchez A. 2009).

La identificación de los compuestos se llevó a cabo teniendo en cuenta los tiempos de retención, la evaluación de los espectros de masas y la comparación con la biblioteca espectral (NIST); además se determinó el área bajo la curva para cada compuesto identificado.

## 7.6 Análisis de datos

Los datos de inhibición del crecimiento micelial se calcularon en (%) de inhibición con la fórmula  $I\% = \frac{AI - AF}{AI} * 100$ , donde  $I\%$  = inhibición del hongo en porcentaje,  $AI$  = área del micelio inicial y  $AF$  = área del micelio final.

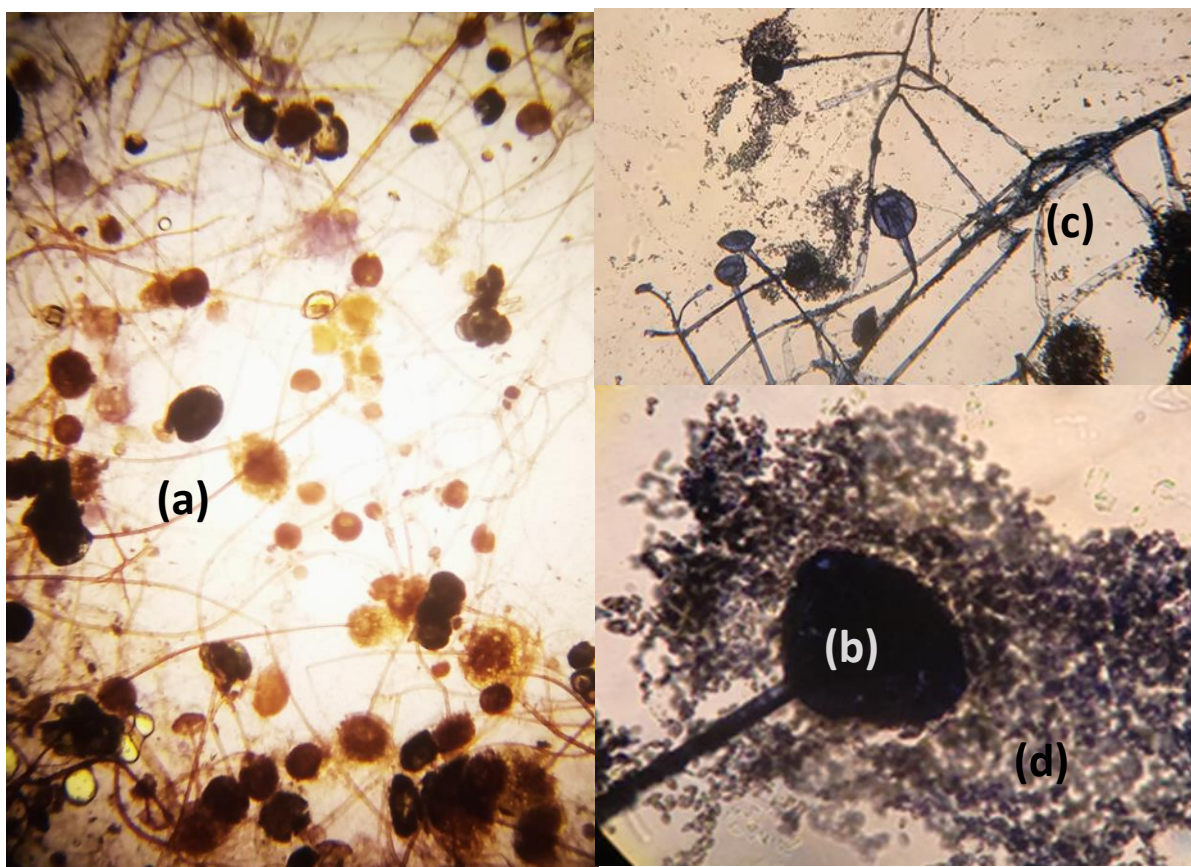


**Fig. 5.** Identificación de compuestos volátiles de *T. harzianum*, *R. stolonifer* e interacción *T. harzianum* – *R. stolonifer*, mediante CG-EM.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Identificación de *Rhizopus stolonifer*

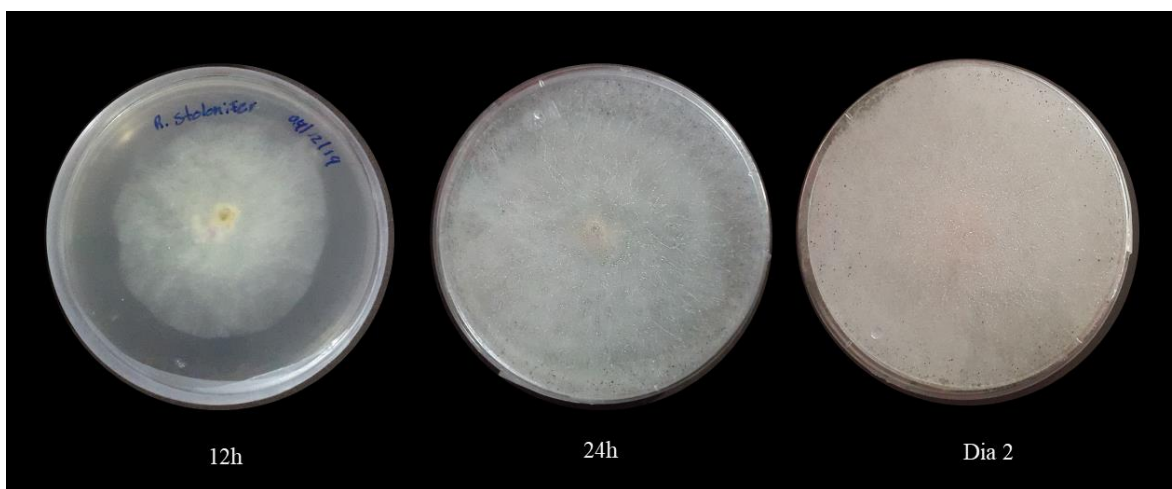
De acuerdo con la tinción con azul algodón del micelio que fue aislado del jitomate y una vez observado al microscopio, se pudieron identificar las estructuras morfológicas, para posteriormente con ayuda de claves taxonómicas, se pudo corroborar que efectivamente el hongo es *R. stolonifer* (Fig. 4).



**Fig. 6.** *Rhizopus stolonifer* visto al microscopio. a) estolones rastreros (4x/0,10) , b) esporangio (40x/0,65), c) esporangióforo (10x/0,25 ) y d) esporangioesporas (40x/0,65).

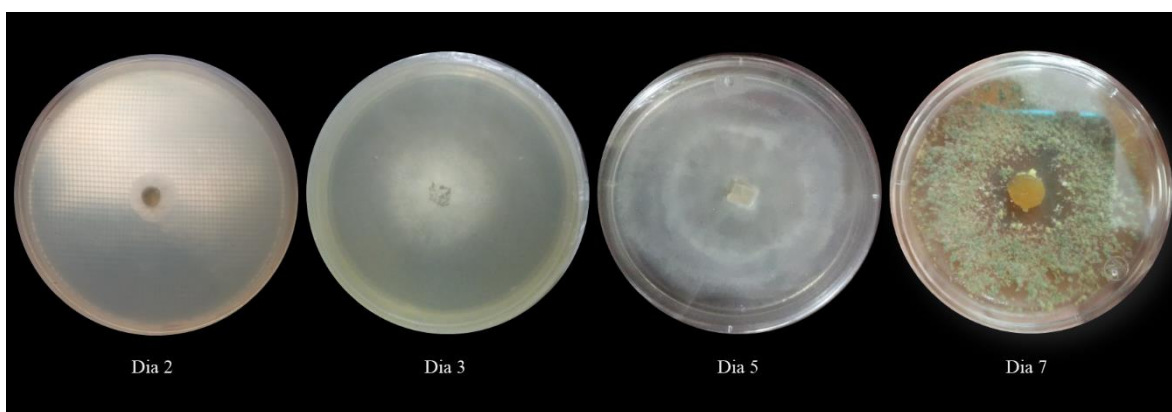
## 8.2 Propagación de *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma harzianum*

*R. stolonifer* posee un rápido crecimiento micelial, desde las primeras 12h después de la resiembra se observó como el micelio radial creció 4.5 cm y a las 24h el medio se encontró totalmente colonizado, en el segundo día ya presentaba esporangios, mientras que para el tercer día el micelio era totalmente denso y esporulado (Fig. 5).



**Fig. 7.** Crecimiento en PDA de *Rhizopus stolonifer* durante las primeras 12h hasta el día 2.

En contraparte *T. harzianum* en las primeras 24h después de la resiembra no se observó un crecimiento notable, al segundo día el radio micelial era de 2.2 cm, al cuarto día 4.5 cm, al quinto día se comenzó a observar la colonización casi completa de la caja e indicios de esporulación, sin embargo, fue hasta el séptimo día que hubo presencia de esporulación madura en tono verdoso (Fig. 6).



**Fig. 8.** Crecimiento en PDA de *Trichoderma harzianum* del día 2 hasta el día 7.

### 8.3 Enfrentamiento e inhibición

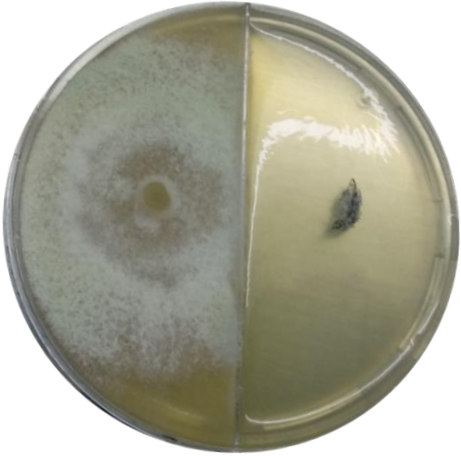

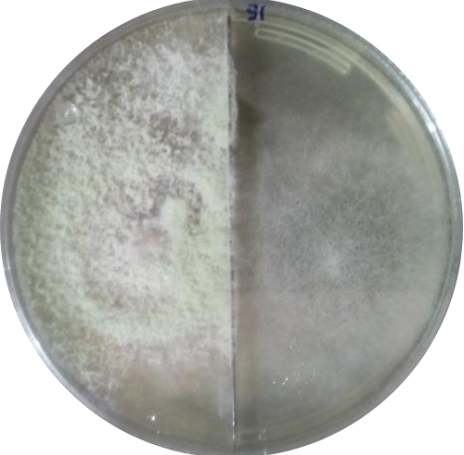
Debido a que los tiempos de crecimiento y maduración son diferentes para *T. harzianum* y *R. stolonifer*, se diseñó un cronograma de siembra (Cuadro 3), para poder realizar los enfrentamientos, las siembras se realizaron con diferencia de 5 días, lo que permitió observar la clara inhibición de *R. stolonifer*.

**Cuadro 3.** Cronograma de siembra para la interacción de *Trichoderma harzianum* - *Rhizopus stolonifer*

Día de siembra	1	2	3	4	5	6
Siembra	<i>T. harzianum</i>				<i>R. stolonifer</i>	
		<i>T. harzianum</i>				<i>R. stolonifer</i>

La inhibición de *R. stolonifer* fue notable desde el segundo día de la interacción (Cuadro 4.), *R. stolonifer* colonizó totalmente el área de la caja que le correspondía y el micelio ya con presencia de esporangios invadió el área perteneciente a *T. harzianum*, sin embargo luego de invadir unos milímetros unas horas después este empezó a retroceder, para el tercer día *T. harzianum* fue estimulado ante la presencia del antagonista y comenzó el incremento de conidios y esporas, la cuales tomaron el tono verde intenso. Para el cuarto día *T. harzianum* invadió un 30% del área de *R. stolonifer*, en el quinto día la inhibición fue entre el 50 y 60%, en el sexto día la inhibición fue mayor al 60%, sin embargo, esta se empezó a detener, ya que *T. harzianum* tomo un color amarillo/marrón claro. A pesar de esto *R. stolonifer* no se recuperó. Se concluye en que es necesario que *T. harzianum* tenga presencia de conidios, para lograr el efecto de inhibición micelial sobre *R. stolonifer*.

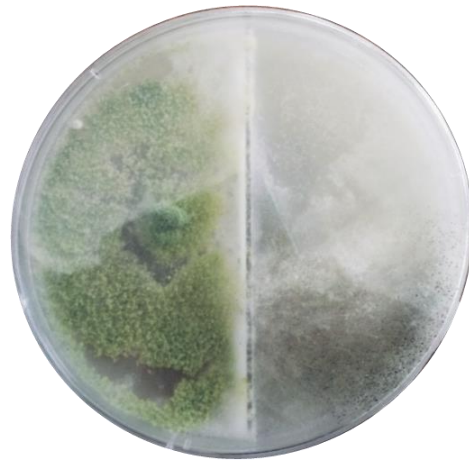
**Cuadro 4.** Descripción de la inhibición de *Rhizopus stolonifer* por efecto de *Trichoderma harzianum*

Días de enfrentamiento	Características del crecimiento e Inhibición de <i>R. stolonifer</i> por <i>T. harzianum</i>	Imágenes de la interacción. De lado derecho <i>T. harzianum</i> y de lado Izquierdo <i>R. stolonifer</i>
1	A los 5 días de la siembra de <i>T. harzianum</i> se sembró <i>R. stolonifer</i> .	
2	<i>R. stolonifer</i> empieza a invadir el área de <i>T. harzianum</i> , el cual empieza a incrementar la densidad del micelio y empieza a tornarse verde	
3	<i>R. stolonifer</i> retrocede y <i>T. harzianum</i> presenta una mayor coloración verde	

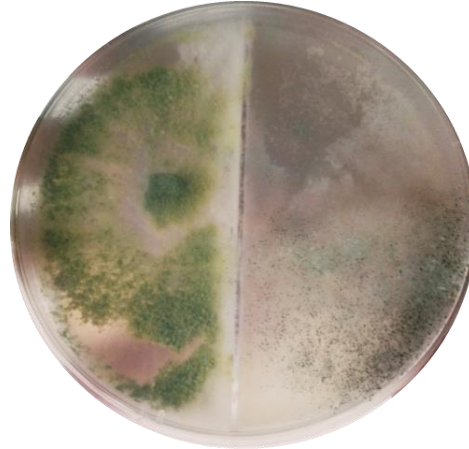
**Continuación cuadro 4.** Descripción de la inhibición de *Rhizopus stolonifer* por efecto de *Trichoderma harzianum*.

---

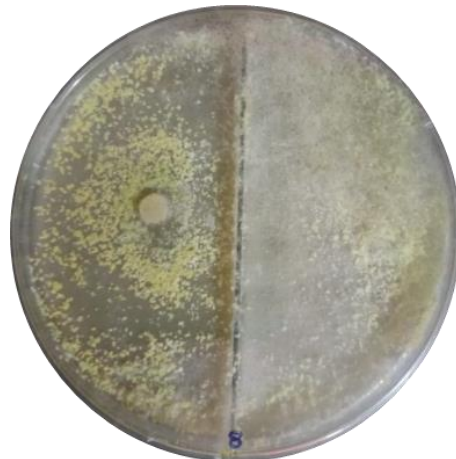
4 Inhibición de *R. stolonifer* en un 25 a 30 %



5 Inhibición de *R. stolonifer* en un 50 a 60 %




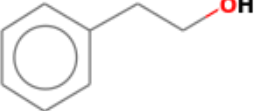
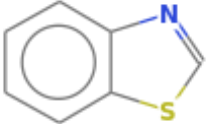
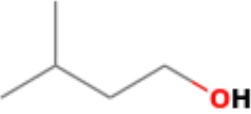
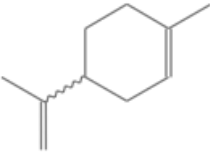
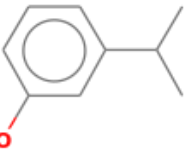
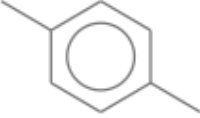
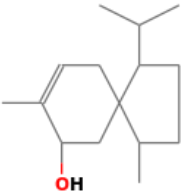
6 Inhibición >60%  
*T. harzianum* empieza tomar un color amarillo/marrón claro, la inhibición comienza a detenerse.



#### 8.4 Identificación de compuestos volátiles

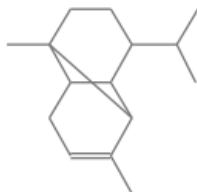
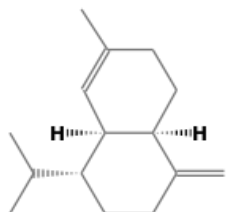
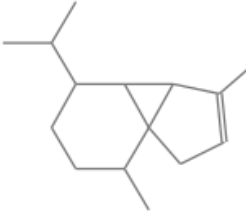
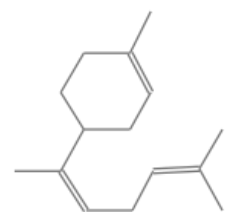
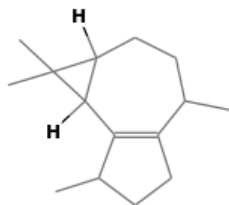
Se utilizó el método de extracción SPME el cual permitió la adsorción de compuestos volátiles emitidos por sistemas vivos, en este caso los liberados por ambos hongos y la interacción de éstos; la alta temperatura de desorción en el puerto de inyección del CG-EM asegura la esterilidad para los análisis posteriores (Henryk j. *et al.*, 2013). La adsorción se llevó cabo a una temperatura entre los 24 y 30°C durante 19 h y 40 min, se tomó en cuenta la maduración del hongo, en el caso de *T. harzianum* se realizó el día 7 después de su inoculación, para *R. stolonifer* el día 3, en el caso de la interacción T-R, la adsorción se realizó al tercer día, ya que es el día cuando se observa el mayor índice de inhibición micelial. Con base en estos aspectos y tomando en cuenta una calidad mínima del 70% para cada compuesto, en general se identificaron 13 compuestos (Cuadro 5) de los cuales 8 de estos se encontraron presentes en la interacción T-R; 3 alcoholes (Alcohol fenético, Fenol y Trichoacorenol), 3 terpenos (Limoneno, cis- $\alpha$ -Bisaboleno e Isoledeno), un aromático (p-Xyleno) y una enzima ( $\gamma$ -Muuroleno). En los siguientes cromatogramas se pueden observar los espectros de masa de los compuestos encontrados en la interacción T-R (Fig. 9), *R. stolonifer* (Fig. 10) y *T. harzianum* (Fig. 11).

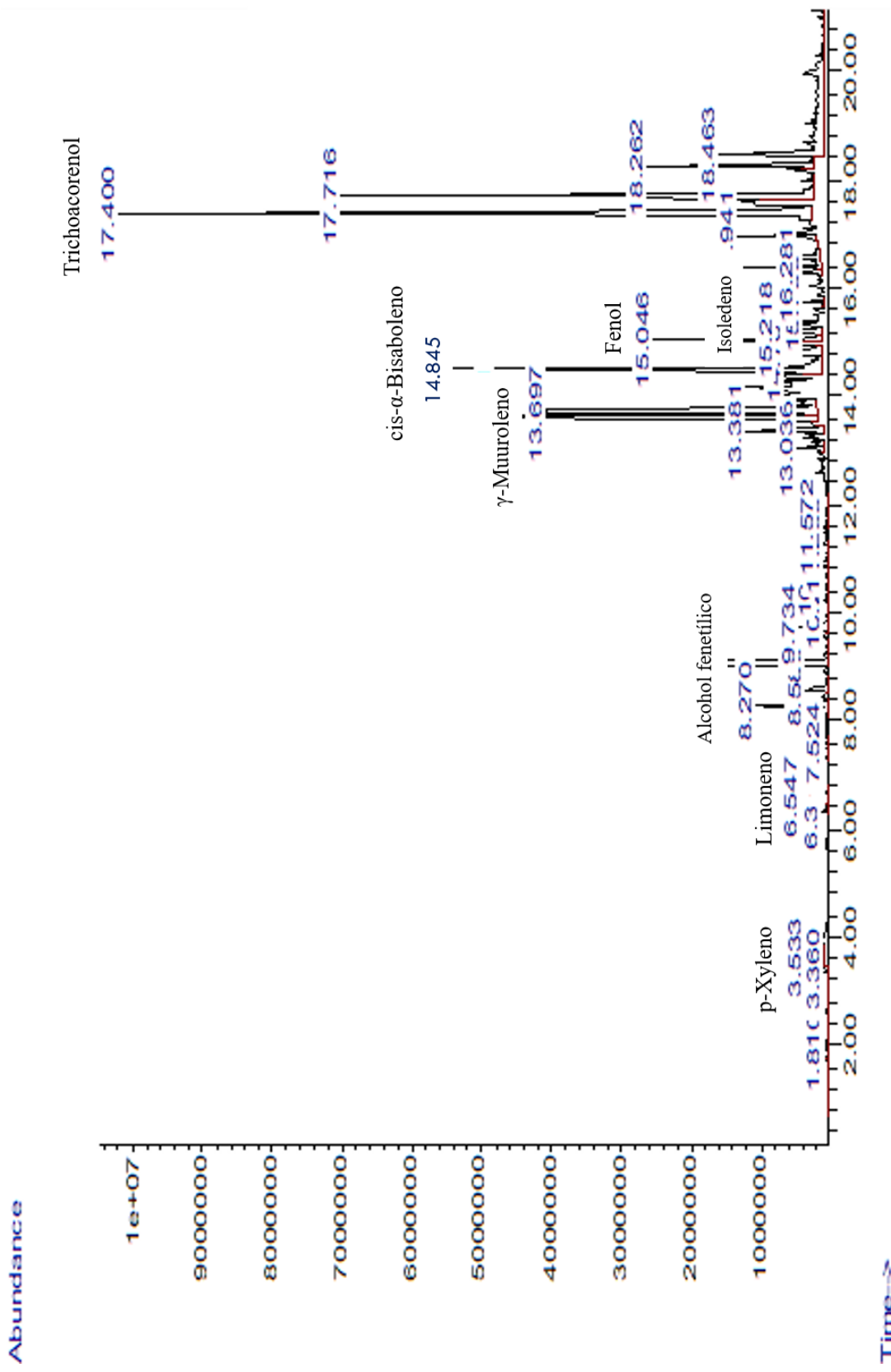
**Cuadro 5.** Compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de *R. stolonifer*, *T. harzianum* e interacción *T. harzianum* - *R. stolonifer*.

Compuesto	Tiempo de retención	CAS	Fórmula molecular	<i>R. stolonifer</i>	<i>T. Harzianum</i>	Interacción T-R
Benzene, 1-methyl-4-propyl- (Tolueno)	7.064	1074-55-1			X	
Phenylethyl Alcohol (Alcohol fenétflico)	8.270	60-12-8		X	X	X
Benzothiazole (benzotiazol)	10.366	95-16-9			X	
1-Butanol, 3-methyl- (Isopentyl alcohol)	1.753	123-51-3		X	X	
Limoneno	6.547	138-86-3			X	X
Fenol, 3-(1-methylethyl)-	15.046	618-45-1			X	X
p-Xyleno	3.533	106-42-3		X	X	X
Spiro[4.5]dec-8-en-7-ol, 4,8-dimethyl-1-(1-methylethyl)- (Trichoacorenol)	17.400	61050-89-3			X	X

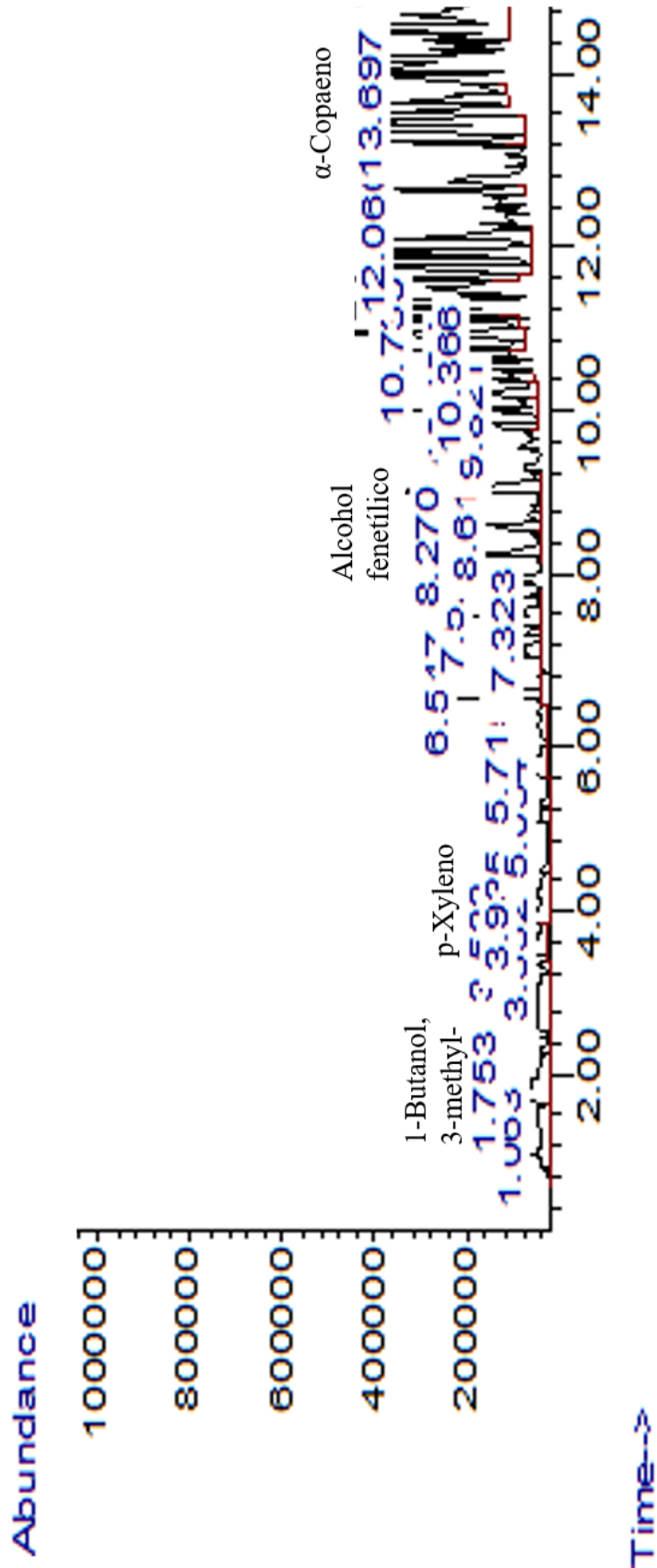


**Continuación cuadro 5.** Compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de *R. stolonifer*, *T. harzianum* e interacción *T. harzianum* - *R. stolonifer*.

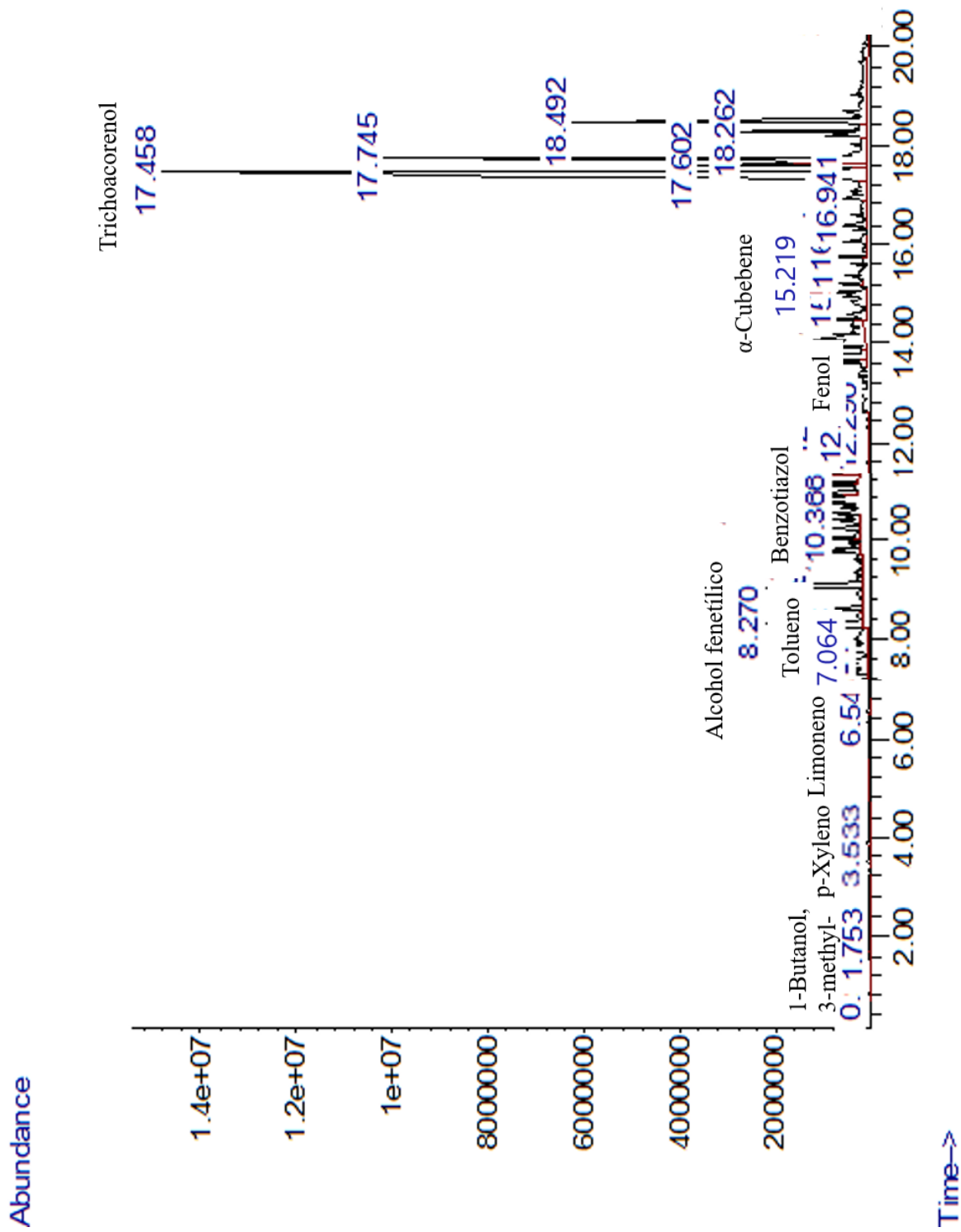
$\alpha$ -Copaeno	15.219	3856-25-5		x	x	
$\gamma$ -Muuroleno	13.697	30021-74-0			x	x
$\alpha$ -Cubebene	15.219	17699-14-8			x	
cis- $\alpha$ -Bisaboleno	14.845	29837-07-8				x
Isoledeno	15.218	95910-36-4				x



**Fig. 9.** Cromatograma de compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de la interacción *Trichoderma harzianum* – *Rhizopus stolonifer* (T-R).



**Fig. 10.** Cromatograma de compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de *Rhizopus stolonifer*



**Fig. 11.** Cromatograma de compuestos volátiles identificados (mediante adsorción SPME) de *Trichoderma harzianum*

## 9 DISCUSIÓN

En este estudio el propósito de utilizar la caja Petri con división durante la interacción de ambos hongos, es que esta funcionara como una barrera física que impidiera el contacto directo entre ambos hongos y que fuesen los COV's los encargados de la inhibición, se observó que en el segundo día de la interacción esta barrera funcionó correctamente, sin embargo, al cuarto día *T. harzianum* invadió físicamente el área perteneciente a *R. stolonifer*, por lo que puede que la inhibición se vea no solo influenciada por los COV's sino también por micoparasitismo o competencia.

La interacción entre *T. harzianum* y hongos postcosecha como *Mucor spp.*, *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger*, *Pythium spp* y entre estos *R. stolonifer*, ha sido estudiada por Guédez *et al.*, (2009), quienes determinaron que el mecanismo de acción de *T. harzianum* empleado como biocontrolador sobre los hongos postcosecha en frutos de fresa fue el de micoparasitismo. Las hifas de *T. harzianum* cubrieron a las hifas del hongo a controlar, alimentándose de esta manera y degradando el micelio del hongo controlado.

Respecto a que los COV's de *T. harzianum* pueden inhibir a *R. stolonifer* en los primeros días del enfrentamiento, se puede decir que ocurre solo si *Trichoderma* no invade físicamente a *R. stolonifer*. En este contexto, se ha reportado que los COV's pueden tener actividad fungicida como lo reporta Sinuco *et al.*, en 2017, donde realizaron una evaluación de la actividad fungicida de los compuestos volátiles de *T. viride*, mediante muestreo con headspace dinámico (HSD) y headspace estático (HSE) donde se encontraron alcoholes y lactonas, mientras que con extracción líquido-líquido (ELL) se encontraron en su mayoría alcoholes y ácidos orgánicos. Lo que determina que la técnica de extracción es importante para el tipo de compuesto a identificar. Algunas técnicas de extracción de compuestos volátiles han permitido la identificación de 6-PAP una lactona insaturada, a la cual se le atribuye la actividad nematocida (Yang *et al.*), además de ser un excelente antifúngico natural.

En este estudio se utilizó el método de microextracción en fase sólida (SPME). Entre los compuestos identificados en *T. harzianum* se encontró Tolueno y 1-Butanol, 3-methyl-, a los cuales se les atribuye la capacidad de influir sobre la estimulación de la conidiación

(inducción al aumento de producción de esporas) (Nemcovic *et al.*, 2008). Otro compuesto es el benzotiazol este posee capacidad fungicida, así como actividad biológica contra nematodos, bacterias fitopatógenas y algunos insectos (Vishnu Ji Ram *et al.*, 2019) es utilizado para la elaboración de fungicidas. Sin embargo, estos compuestos fueron identificados solo en *T. harzianum* y no cuando ocurrió la interacción T-R.

Dentro de los compuestos identificados presentes en la interacción, se encuentra los compuestos, p-Xyleno,  $\alpha$ -Cubebene, cis- $\alpha$ -Bisaboleno, Isoledeno y Limoneno, los cuales han sido previamente reportados en *Trichoderma spp*, sin embargo, su actividad biológica aun no es clara. Entre los otros compuestos como el Trichoacorenol aislado por primera vez en 1968 en *Fusidium coccineum* y posteriormente en *Trichoderma koningii*, donde se le describió y se le dio el nombre actual, se encuentra relacionado con el metabolismo del hongo (Rinkel J., 2019). Y el Fenol, el cual provoca daño citoplasmático y la desnaturalización de las proteínas en los microorganismos (Mester *et al.*, 2007) posiblemente el fenol sea uno de los compuestos que más influyan en la actividad inhibitoria sobre de *R. stolonifer* sin embargo, no se puede decir que sea un solo compuesto el que se encargue de la inhibición, ya que es importante tanto la concentración, la mezcla de los volátiles y el tiempo del desarrollo del organismo al que se aplican, además que el perfil volátil cambia a medida que los hongos crecen y maduran (Bailly *et al.*, 2012).

En este estudio no se detectó la presencia de la lactona 6-PAP, un factor podría ser debido a la maduración del hongo, se ha documentado que la mayor producción de 6-PAP comienza después del cuarto día de incubación y se logra la máxima expresión después del sexto día, por otra parte se menciona que *T. harzianum* posee menor formación de 6-PAP en contra parte a *Trichoderma atroviride* como el productor más eficiente, así mismo se destacó que la emisión de 6-PAP podría estar ligada a la composición del sustrato en el que crezca *T. harzianum* (Henryk j. *et al.*, 2013), en estudios realizados con anterioridad se han utilizado medios como caldo de papa dextrosa (PDB) o agar extracto de malta (MEA), y se ha identificado con éxito la formación de tal lactona (Scarselletti y Faull 1994; El-Hasan *et al.* 2007; Siddiquee *et al.* 2009, 2012).

Por primera vez se llevó a la cabo adsorción de volátiles en *R. stolonifer*, los compuestos identificados fueron, Alcohol fenético, 1-Butanol, 3-methyl-, p-Xyleno y  $\alpha$ -Copaeno, compuestos que también fueron identificados en *T. harzianum*.

## **10 CONCLUSIÓN**

En este estudio la inhibición de *R. stolonifer* por efecto de *T. harzianum* fue notable, los compuestos volátiles identificados pudieron haber sido los responsables de la inhibición, sin embargo, debido a que dentro del tercer día del enfrentamiento se observó a *T. harzianum* invadir físicamente el área de *R. stolonifer*, no se descarta el uso de otro tipo de mecanismo antagónico.

## **11 PERSPECTIVAS**

- Observar al microscopio para determinar si existe algún tipo de interacción entre las hifas (enrollamiento, penetración, vacuolización o lisis).
- Modificar el sistema de captura de volátiles para no tener influencia del contacto físico entre los hongos.
- Uso de bioensayos con extractos volátiles de *T. harzianum* sobre *R. stolonifer*

## 12 REFERENCIAS CITADAS

Acosta-Suárez M., Pichardo T., Roque B., Cruz-Martín M., Mena E., Leiva-Mora M., Castro R., Alvarado-Capó Y. (2013). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotechnología Vegetal*, Vol. 13, 4: 231 – 235.

Cardoza R., Hermosa M., Vizcaíno J., Sanz L., Monte E. Y Gutiérrez S. (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. *Rev. Research Signpost*. 1-22.

Dal B., Mónaco I. y Cháves R. (1997). Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Revista Iberoamericana de Micología* 14: 131-134.

FAO. (2001). Manual de capacitación. La importancia de comer frutas y hortalizas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 46. FAO, Roma.

FAO. (2009). Las pérdidas post-cosecha agravan el hambre. FAO, Roma. Recuperado de : <http://www.fao.org/news/story/es/item/36864/icode/#:~:text=2%20de%20noviembre%20de%202009,seg%C3%BAAn%20advirti%C3%B3%20hoy%20la%20FAO.>

FAO. (2011). Evitar los desperdicios postcosecha es crucial para la seguridad alimentaria en África. FAO, Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/news/story/es/item/79492/icode/>

Guédez C., Cañizález L., Castillo C., & Olivar R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 34-38

Hernández A., Velázquez del Valle M., Veranza L., Melo Giorgana G. y Guerra M. (2010). Effect of chitosan on three isolates of *Rhizopus stolonifer* obtained of peach, papaya and tomato, *Fruits*. 65: 245–253.

Infante D., Martínez B., González N. y Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24: 14-21.



Jeleń H., Błaszczyk L., Chełkowski J., Rogowicz K. y Strakowska J. (2013) Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol Progress* (2014) 13:589–600.

Lee S, Yap M., Behringer G., Hung R. y Bennett J. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol Biotechnol* (2016) 3:7

Lezcano J., Martínez B., y Alonso O. (2010). Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes*, 1-33.

Martínez B., Infante D. y Reyes Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. Universidad Agraria de La Habana «Fructuoso Rodríguez Pérez» (UNAH). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. 1-11.

Morath S., Hung R. y Bennett J. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal biology reviews* 26: 73–83.

Nemcovic M., Jakubikova L., Viden I. y Farkas V. (2008). Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma spp.* *FEMS Microbiol Lett* 284. 231–236.

Plascencia R., Olalde V., Mena Violate H., Ceja Torres L. José Venegas J., Oyoque G. y Angoa M. (2012). Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre *Vs. botrytis cinerea* y *rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai*. 8: 103-110.

Rinkel J. y Dickschat J. (2020). Mechanistic Studies on Trichoacorenol Synthase from *Amycolatopsis benzoatilytica*. *ChemBioChem* (2020) 21: 807 – 810.

Romero O., Huerta M., Damián M., Domínguez F. y Arellano D. (2009). Características de *trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Rev. colomb. biotecnol.*, 11: 143-151.

Ruiz Rosales. (2011). Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* - *Sclerotium rolfsii*. Instituto Politécnico Nacional. 23-27.

Sinuco C., Pérez C. y Moreno N. (2007). Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. Rev. Colomb. Biotecnol. 19: 63-70.

Taheri P, Ndam L., Fujii Y. (2018). Alternative approach to management of Rhizopus rot of peach (*Prunus persica* L.) using the essential oil of *Thymus vulgaris* (L.). Mycosphere 9: 510–517.

Trigos A., Ramírez K., Salinas A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. Revista Mexicana de Micología. 1-2.

Velázquez del Valle M., Bautista S., Hernández A., Guerra M. y Amora E. (2007). Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. Revista Mexicana de Fitopatología 26:49-55.

Vishnu Ji Ram, Arun Sethi, Mahendra Nath, Ramendra Pratap. (2019). The Chemistry of Heterocycles. Chapter 5 - Five-Membered Heterocycles. Elsevier (2019) 149-478.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DIRECCIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES  
Escuela de Estudios Superiores del Jicarero

Dirección

El Jicarero, Jojutla, Morelos, 11 Marzo 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Licenciado en Biología: **C. ERENDIRA GONZALES ESTRADA**, con el título del trabajo: **“INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE Rhizopus stolonifer POR EFECTO DE COMPUESTOS VOLATILES DE Trichoderma harzianum”**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR:           SI          

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**A T E N T A M E N T E**

\_\_\_\_\_  
**Dr. HUMBERTO REYES PRADO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**HUMBERTO REYES PRADO | Fecha:2021-03-11 15:16:48 | Firmante**

Sg2O39jOwO/nmZnH06lxXEwIWDjsLTOuCe+0HLyfZrAeX6zbDcGO9j+BGVfgViYO1UTwMeKMpsIV1hMSXtO+GerViCJO/U55CJbBI/00o9vyTKNijGebDjRO2wDvtdni8lZxCQhEn  
bMB+Q+nIFi79AqUZw6zKqrOJ6fIGaQt/et8/57nvP0d93yIMDJcAsAHi/fnTCT+lJA480WNwtXGpVY8fuHmaR7ce/ikcxBo/OiMTCK7WPNF4TXhyM5uyA/Y5wCXqdBpngEZcJdLfX  
Hhd4VqyUqac/oIN/qNqFL5Zz1cmHx2GtMdun4Yo8GDStzwwe5G80FXm7VQUgTNxB/A==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

**JE1ziX**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fFicjrpiJwbzyQQODkEGqgZz2uRssEUs>



El Jicarero, Jojutla, Morelos, 11 Marzo 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Licenciado en Biología: **C. ERENDIRA GONZALES ESTRADA**, con el título del trabajo: **“INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE Rhizopus stolonifer POR EFECTO DE COMPUESTOS VOLATILES DE Trichoderma harzianum”**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
**Dra. JANETH TÉLLEZ ROMÁN**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JANETH TELLEZ ROMAN | Fecha:2021-03-12 11:38:29 | Firmante**

hYnbxkxrWfU/qomLO1R5OvQCcQ42/rFFe7MpZyXPnoxIn5OFF6RFhEct/LhSHIFFPiBrPX5g3A+4sb5TnFDRGBIpd46+emHz5Ei7VHMIfiSYr9eU4T/14iI2FU+i83pj9/fysKH/MQLoBtD05EgxHk67AdCkbhTAdJAfLRPtJalCnOWXgLYsDBqFISRoD/7qM+08GL0PyNZchxfggGZum7J2g14BB9oqhwNT3KugMXUHTPzRqX+GDS45EXGL3MDqkFtlxrvn0jetUUVUtJfZzLRw9v8qDu4wMqfvelqssvMWW33PtRvkADxYGL/JsPxm0kujEJK0Zx1uiWNUdbVZEg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**MSZ8sh**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/opoQosHMarvuu80jpssvID9eUM0yvkM6>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DIRECCIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES  
Escuela de Estudios Superiores del Jicarero

Dirección

El Jicarero, Jojutla, Morelos, 11 Marzo 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Licenciado en Biología: **C. ERENDIRA GONZALES ESTRADA**, con el título del trabajo: **“INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE Rhizopus stolonifer POR EFECTO DE COMPUESTOS VOLATILES DE Trichoderma harzianum”**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**A T E N T A M E N T E**

\_\_\_\_\_  
**M. EN C. ELIZUR MONTIEL ARCOS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

ELIZUR MONTIEL ARCOS | Fecha:2021-03-12 12:24:29 | Firmante

ljxnTSncFtPF0r8/Y7/xz48vBG2cEr0s4z5Tx0B+M0MT3qxoH8ASeJX4qxVQVoU2f6rjcxzHGQRXZXwMblhNteHJBLh+2N3YIRWdn0BukjuzBOzBDLzQuh+ct4fD2SsbX+j/dGqsk14SmKPy5j/LfjLSbPacDzKOKdN8QHTqJOgpsEwP3GmVzluu01sLLm4BU8oowPTXJTcEA3yGhFDDeSSKPC410I2+tkcelUIHGxW+SDzU3Mf43Z6P1ChadkLmJK19EJDPi3bOimBRSrhqb2l/mNRYhVt04OH+IC7BH9ik/MBTWrr7RGEpRFMyF44ZK+dI8jHwDTqbA3heJaV8X/g==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[lbgz7M](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wUd1mq53r1byN9eseKowCdDnfmfMPwf9>







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DIRECCIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES  
Escuela de Estudios Superiores del Jicarero

Dirección

El Jicarero, Jojutla, Morelos, 11 Marzo 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES  
PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Licenciado en Biología: **C. ERENDIRA GONZALES ESTRADA**, con el título del trabajo: **“INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE Rhizopus stolonifer POR EFECTO DE COMPUESTOS VOLATILES DE Trichoderma harzianum”**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
**Dr. ISAAC TELLO SALGADO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

ISAAC TELLO SALGADO | Fecha:2021-03-12 12:21:50 | Firmante

kGtAll5yWxIDUr/bDqIGPDy2I2zKthrk8ec4NYHDWCmFruCyBWPgkUZSamX6qazcDEul7AoRYgD3h0IhTwJkkb0WHjsytm+Y4BjYVWVFGCAw7Qr/yF3y2KdkG3pmJ38mBZa03jsK  
r5ZhtWPG0pfezhewbQwsUFf+Z0oRl8Yl7aniGXCnU/gnhj/75RvMNj/lxjS0PS5LLHR7HBXdTCLWlz1b9wBucCxeJTISOGZQvKCNvrl3V3bEUfGh4YH0QrDdF2YOZ1PUUV/98+rh  
q+5CefrVb0ONiEvjOAAq3FWs8kTnQv/GmMuZ8NKbUL9JfkzJ8kzwH3e2IRluwsyVt9AWDg==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[XzATjR](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/X8WjIZMFaJHj46aRjHsSztUMCzV2LcLx>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DIRECCIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES  
Escuela de Estudios Superiores del Jicarero

Dirección

El Jicarero, Jojutla, Morelos, 11 Marzo 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Licenciado en Biología: **C. ERENDIRA GONZALES ESTRADA**, con el título del trabajo: **“INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE Rhizopus stolonifer POR EFECTO DE COMPUESTOS VOLATILES DE Trichoderma harzianum”**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: \_\_\_\_\_ SI \_\_\_\_\_

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**A T E N T A M E N T E**

\_\_\_\_\_  
**Dr. JUAN MANUEL RIVAS GONZÁLEZ**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**JUAN MANUEL RIVAS GONZALEZ** | Fecha:2021-03-12 14:53:24 | Firmante

tfvmjk16HWVqg23MOXwDz+UCJtbJyhEvXG7OVjrU01ZYo3tBqKv+VXnry06oz7QvJkqa6XqJl9R/6sQ4nTXBfrMesioa5XXJroQoi8r/GPBhoDjo4SRQMUePKTdZTMPV3MNekSuDzJURL4lQHzCnxMnvweMrceEjsDUJKsn0bH9U3ssY1P7s0Fd/n0ipPTfJ7ye8Ua/ZfnPszod7lDsc8utVqeqs+x5z5FJQvw8m0dFZTkKy7vA5oZ09ng/ztLh//6i3lW3jnJknTFodvgLnHaFMarxEI6w1jOePxDmsHGbc982tSUYGfVAmQYQB+smZZZAoP+nBl96ygOmbub8DDQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



fUysxj

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BF2sGJFQ24Mxs4E5JbyGXUwLGBYuZDxz>

