



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS DIFERENCIADAS DE EXTRACTOS
VEGETALES COMO ESTRATEGIA POTENCIAL PARA LA
PREVENCIÓN, MANEJO Y CONTROL DEL “MOHO VERDE”
(*Trichoderma* spp.) EN EL CULTIVO DE LOS HONGOS COMESTIBLES
(*Lentinula*, *Pleurotus*)**

CLAUDIA KATIA REYES QUINTANAR

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2013



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE- 43-2-03

CAMPUS PUEBLA

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Claudia Katia Reyes Quintanar** alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Propiedades antifúngicas diferenciadas de extractos vegetales como estrategia potencial para la prevención, manejo y control del "moho verde" (*Trichoderma spp.*) en el cultivo de los hongos comestibles (*Lentinula, Pleurotus*)** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, a 9 de diciembre del 2013

Claudia Katia Reyes Quintanar
Estudiante

Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera
Vo. Bo. Profesor Consejero

La presente tesis, titulada: **Propiedades antifúngicas diferenciadas de extractos vegetales como estrategia potencial para la prevención, manejo y control del “moho verde” (*Trichoderma* spp.) en el cultivo de los hongos comestibles (*Lentinula*, *Pleurotus*)**, realizada por la alumna: **Claudia Katia Reyes Quintanar**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:


DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESORA:


DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:


DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

Puebla, Puebla, México, a 9 de diciembre del 2013

PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS DIFERENCIADAS DE EXTRACTOS VEGETALES
COMO ESTRATEGIA POTENCIAL PARA LA PREVENCIÓN, MANEJO Y CONTROL DEL
“MOHO VERDE” (*Trichoderma* spp.) EN EL CULTIVO DE LOS HONGOS COMESTIBLES
(*Lentinula*, *Pleurotus*)

Claudia Katia Reyes Quintanar, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2013

En la actualidad, se utilizan agroquímicos como el benomil para el control de *Trichoderma* en el cultivo de hongos comestibles; sin embargo, su uso es cada vez más restringido por la sociedad debido a su potencial toxicidad y persistencia en el ambiente. Los alimentos producidos con productos naturales son cada vez más demandados, debido a esto, el objetivo del presente estudio fue el obtener extractos vegetales con propiedades antifúngicas diferenciadas para el control del “moho verde” (*Trichoderma*) en el cultivo de los hongos comestibles *Pleurotus* y *Lentinula*. Se obtuvieron extractos por maceración con diversos solventes de las plantas de ajo (*Allium sativum*), cempasuchil (*Tagetes lucida*), col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), hoja sen (*Flourensia cernua*), cebolla blanca (*Allium cepa*), ruda (*Ruta graveolens*), cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*). Se evaluó la velocidad de crecimiento micelial *in vitro* de tres hongos comestibles (*Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus*, *Lentinula edodes*), así como de cuatro cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y una cepa de *T. koningii*, en presencia de diferentes concentraciones de los extractos estudiados. Se observó que, en general, las cepas de *Trichoderma* evaluadas mostraron un alto nivel de tolerancia a bajas concentraciones de los extractos vegetales (2 mg, 6 mg, 8 mg/sensidisco). Los mejores resultados de inhibición de la velocidad de crecimiento fueron con los extractos en el medio de cultivo. Con la ruda (*R. graveolens*) se observó una inhibición del 50% para *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (4 mg/ml), con la cebolla morada (*A. cepa*) una inhibición del 100% las primeras 24 h para *T. aggressivum* f. *europaeum* CMP-109 (4 mg/ml), y con la sábila (*A. vera*) una inhibición del 84% las primeras 24 h para la cepa *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (4 mg/ml). Se encontró que el extracto de cebolla morada (*A. cepa*) tuvo un efecto de estimulación en el desarrollo micelial de los hongos comestibles evaluados hasta del 100% para *P. ostreatus*, CP-50. Así mismo, se observó una mayor velocidad de crecimiento y una mejor textura con respecto al testigo en las tres cepas estudiadas de hongos comestibles. La presente investigación generó información novedosa de la respuesta de las cepas de hongos comestibles seleccionadas ante los extractos utilizados, por lo que se recomienda mayor investigación para la aplicación en campo de los extractos obtenidos. Se presenta una estrategia que permite el desarrollo de innovaciones a partir del presente trabajo para la prevención, manejo y control del moho verde en el cultivo de los hongos comestibles.

Palabras clave: Control, extractos, *Lentinula*, plantas antifúngicas, *Pleurotus*, *Trichoderma*.

DIFFERENTIAL ANTIFUNGAL PROPERTIES OF PLANT EXTRACTS AS A POTENTIAL STRATEGY FOR THE PREVENTION, MANAGEMENT AND CONTROL OF THE “GREEN MOLD” (*Trichoderma* spp.) IN THE CULTIVATION OF EDIBLE MUSHROOMS (*Lentinula*, *Pleurotus*)

Claudia Katia Reyes Quintanar, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

A common problem in mushroom cultivation is contamination by the green mold *Trichoderma*, which can be controlled using chemicals (*e.g.*, benomyl). However, the use of chemicals is decreasing due to their potential toxicity and negative effects in the environment. By contrast, organic foods show increasing demand. The objective of this study was to obtain plant extracts showing differential antifungal properties to control the green mold (*Trichoderma*) in the cultivation of edible fungi *Lentinula* and *Pleurotus*. Plant extracts were made by maceration using several solvents. *Allium sativum*, *Tagetes lucida*, *Brassica oleracea*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Flourensia cernua*, *Allium cepa* (white onion), *Ruta graveolens*, *Allium cepa* (red onion) and *Aloe vera* were studied. *In vitro* mycelial growth was assessed using differing concentrations of plant extracts for the edible mushrooms *Pleurotus pulmonarius*, *Lentinula edodes*, and *P. ostreatus*, as well as four strains of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* and one strain of *T. koningii*. In general, the strains of *Trichoderma* showed tolerance at low concentrations of plant extracts (2 mg, 6 mg, 8 mg per sensi-disc). Mycelial growth was inhibited in culture medium using *R. graveolens* extracts, 50% inhibition of *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 at 4 mg/ml. In the case of *A. cepa* (red onion) extracts, the inhibition was 100% during the first 24 h for *T. aggressivum* f. *europaeum* CMP-109 at 4 mg/ml, while 84% for *A. vera* extracts against *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (4 mg/ml). The extracts from *A. cepa* (red onion) promoted mycelial growth and colony morphology of edible mushrooms studied, particularly *P. ostreatus*, CP-50. Further research is needed for studying the effects of plant extracts on the cultivation of edible mushrooms using different substrates. A potential strategy for the prevention, management and control of green molds in mushroom cultivation is proposed.

Key words: Antifungal effect, plant extracts, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Trichoderma*.

Dedicatoria

A mi madre, la Sra. Josefina Quintanar Hernández por ser una gran fortaleza en mi interior y mi mejor amiga de toda la vida.

A mi esposo, Alán Helios Escudero Uribe por apoyarme en mis proyectos y estar junto a mí siempre que lo necesito.

A mi hija, Atenea Karina Escudero Reyes, por tener su amor, su apoyo y compartir nuestras vidas todos los días.

A mi hermana Mónica Reyes Quintanar, mi primo José Anibal Torres Quintanar, mi cuñado Roberto Avalos González y mi tía la Sra. Agustina Quintanar Hernández por tener siempre su apoyo, amor y comprensión incondicionales.

A mi padre, José H. Antonio Reyes Manrique, porque desde donde esté se sienta orgulloso[†].

Agradecimientos

A Dios, por haberme permitido culminar ésta etapa.

Agradezco profundamente a mi pequeña familia Helios y Karina que ha estado conmigo en todo momento a lo largo de este proceso.

A mi madre, la Sra. Josefina Quintanar Hernández por todas las palabras de aliento para seguir adelante y su amor incondicional.

A mis amigos Helios Escudero, Patricia Ramírez, Myrna Bonilla, Willy Martínez, Maricela Cayetano, Teodoro Bernabé, Alma Hernández, Roberto Reyes, Javier Esquivel, María de la Luz Martínez, y a todos mis compañeros que alguna vez me impulsaron a continuar para terminar éste proyecto.

A los miembros de mi consejo particular, el Dr. Daniel Martínez, Dr. Porfirio Morales y Dra. Mercedes Sobal por contribuir con sus conocimientos en este trabajo de investigación.

Al Dr. José Guillermo Ávila Acevedo por abrirme las puertas de su laboratorio de fitoquímica, los conocimientos brindados y estar siempre dispuesto a ayudarme en éste proceso.

A mis sinodales, el Dr. Francisco Calderón y el Dr. Juan Contreras por su paciencia en este proceso y su buena disponibilidad y comentarios en la revisión de éste escrito.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal expreso mi más sincero agradecimiento, por brindarme parte de los insumos y el bagazo de caña de azúcar que utilicé durante la realización de este trabajo de investigación.

Contenido

Introducción	
I. El desarrollo sustentable y la biotecnología.....	3
1.1. La producción de hongos comestibles en México.....	4
1.2. <i>Lentinula edodes</i> , “shiitake”, en el mercado internacional.....	7
1.3. <i>Pleurotus</i> , “Setas”, en el mercado internacional.....	10
II. Características de los hongos comestibles estudiados.....	11
2.1. Generalidades de los hongos.....	11
2.1.1. Biología de los géneros <i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i>	12
2.1.1.1. Clasificación.....	12
2.1.1.2. Hábitat.....	14
2.1.1.3. Ciclo de vida.....	14
2.2. Caracterización de <i>Lentinula edodes</i>	15
2.2.1. El género <i>Lentinula</i>	15
2.2.2 <i>Lentinula edodes</i>	16
2.3. El cultivo de <i>Lentinula edodes</i>	16
2.3.1. Características nutricionales.....	17
2.3.2. Propiedades medicinales.....	17
2.4. Caracterización del género <i>Pleurotus</i>	18
2.4.1. Especies estudiadas del género <i>Pleurotus</i>	18
2.4.1.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50.....	18
2.4.1.2. <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267.....	18
2.4.2. Substratos para el cultivo de <i>Pleurotus</i>	18
2.4.3. El cultivo de <i>Pleurotus</i>	19
2.4.4. Propiedades nutricionales.....	20
III. Prevención, manejo y control de contaminantes en el cultivo de hongos comestibles.....	21
3.1. Cuidados esenciales para evitar contaminación en el proceso de cultivo.....	21
3.2. Principales plagas y enfermedades en el cultivo de hongos comestibles.....	22
3.2.1. Insectos.....	23
3.2.2. Bacterias.....	24
3.2.3. Roedores.....	25
3.2.4. Mohos.....	25
3.2.5. El “moho verde” del género <i>Trichoderma</i>	26
3.2.5.1. Biología del género <i>Trichoderma</i>	27
3.2.5.2. Clasificación.....	28
3.2.5.3. Hábitat.....	28
3.3. El “moho verde” como competidor en el cultivo de hongos comestibles.....	28
3.4. Caracterización de <i>Trichoderma aggressivum</i>	30
3.4.1. Fungicidas.....	31

IV. Potencial de los extractos vegetales y sus propiedades antifúngicas.....	33
4.1 Los extractos vegetales como alternativa en el control de enfermedades.....	33
4.1.1. Metabolitos secundarios.....	34
4.1.2. Alelopatía.....	36
4.1.3. Aceites esenciales.....	37
4.1.4. Propiedades antifúngicas de las plantas.....	37
4.2. Extractos y preparados vegetales.....	42
4.2.1. Preparación tradicional de extractos.....	42
4.2.1.1. Fermentación.....	42
4.2.1.2. Infusión.....	42
4.2.1.3. Esencias.....	42
4.2.1.4. Cocimientos.....	43
4.2.2. Métodos de extracción en laboratorio.....	43
4.2.2.1. Maceración.....	43
4.2.2.2. Soxhlet.....	44
V. Problema de investigación.....	45
VI. Hipótesis y objetivos.....	47
6.1. Hipótesis general.....	47
6.1.1. Hipótesis particulares.....	47
6.2. Objetivo general.....	48
6.2.1. Objetivos particulares.....	48
VII. Materiales y métodos.....	49
7.1. Material biológico.....	49
7.1.1. Medios de cultivo.....	49
7.2. Procedencia del material vegetal.....	49
7.2.1. Preselección de plantas.....	50
7.2.2. Cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) cultivada en campo.....	53
7.2.3. Sábila (<i>Aloe vera</i>) proveniente de Atlixco, Puebla.....	53
7.3. Procesamiento del material vegetal.....	53
7.3.1. Preselección de plantas procedentes del Jardín Etnobotánico.....	53
7.3.2. Manejo de la cebolla morada.....	53
7.3.3. Manejo de la sábila.....	54
7.4. Obtención de los extractos con diversos solventes.....	54
7.4.1. Selección de los solventes.....	54
7.4.2. Extractos acuosos.....	55
7.4.3. Elaboración de sensidiscos.....	55
7.4.4. Estimación de la dosis para la prueba en sensidiscos.....	56
7.4.5. Elaboración de extractos etanólicos de ruda (<i>Ruta graveolens</i>), cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (Experimentos 2, 3 y 4).....	57
7.5. Estudio de las cepas y extractos en medios de cultivos semisólidos.....	59
7.5.1. Propiedades diferenciadas de cada extracto vegetal.....	59
7.5.1.1. Prueba de propiedades antifúngicas con la técnica de los sensidiscos y el hongo <i>Trichoderma</i>	59

7.5.1.2. Prueba de las propiedades antifúngicas de ruda (<i>Ruta graveolens</i>), cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>).....	60
7.5.1.3. Evaluación <i>in vitro</i> de una mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) con una dosis de 1.2 % de extracto (Experimento 5).....	61
7.5.1.4. Elaboración del testigo.....	62
7.6 Variables estudiadas.....	64
7.6.1. Velocidad de crecimiento lineal	64
7.6.2. Efecto de inhibición (%)	64
7.6.3. Efecto de estimulación (%).....	64
7.6.4. Medición de la esporulación de las cepas de <i>Trichoderma</i>	64
7.6.5. Caracterización morfológica del micelio.....	66
7.7. Efecto de los extractos de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) sobre la germinación de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (Experimentos 2 y 3)...	67
7.8. Estudio de los extractos vegetales en sustratos sólidos.....	67
7.8.1. Evaluación de una mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) al 1.2 % de extracto en sustrato sólido (Experimento 6).....	67
7.8.1.1. Preparación del sustrato de paja de cebada.....	69
7.8.1.2. Preparación de la formulación COLPOS-17.....	72
7.8.1.3. Inoculación con <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 vs el hongo comestible.....	72
7.8.1.4. Inoculación de los extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>).....	72
7.8.1.5. Evaluación de las variables estudiadas en sustrato sólido.....	73
7.9. Análisis estadístico.....	73
VIII. Resultados y Discusión.....	74
8.1 Efecto de los extractos vegetales con propiedades antifúngicas sobre la velocidad de crecimiento micelial de cuatro cepas de <i>Trichoderma</i> con la técnica de sensidiscos (Experimento 1).....	74
8.1.1. Conclusiones.....	91
8.2. Evaluación del efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial (Experimento 2).....	92
8.2.1. Velocidad de crecimiento micelial de los hongos comestibles.....	92
8.2.2. Caracterización morfológica a partir del crecimiento micelial de los hongos comestibles.....	95
8.2.3. Velocidad de crecimiento micelial de los mohos <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> en las diferentes cepas estudiadas.....	98
8.2.4. Esporulación de <i>Trichoderma</i> a partir del crecimiento micelial.....	101
8.2.5. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) sobre la germinación de esporas de <i>Trichoderma</i> y su esporulación.....	103
8.2.6. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) sobre la morfología de las colonias de <i>Trichoderma</i> sembradas con inóculo	111
8.2.7. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) sobre la caracterización morfológica de las colonias de <i>Trichoderma</i> sembradas con una solución de esporas.....	114
8.2.8 Conclusiones.....	118

8.2.9. Recomendación para la aplicación de un extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) en el cultivo de hongos comestibles en condiciones de sustrato sólido.....	119
8.3. Evaluación del extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial (Experimento 3).....	121
8.3.1. Velocidad de crecimiento micelial de los hongos comestibles <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> y <i>Lentinula edodes</i>	121
8.3.2. Caracterización morfológica de los hongos comestibles.....	124
8.3.3. Velocidad de crecimiento micelial de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	126
8.3.4. Efecto del extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) sobre la esporulación de las cepas de <i>Trichoderma</i>	129
8.3.5. Caracterización morfológica.....	133
8.3.6. Conclusiones.....	136
8.4.Efecto del extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial (Experimento 4).....	136
8.4.1.Velocidad de crecimiento micelial de los hongos comestibles <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50, <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267 y <i>Lentinula edodes</i> CP-7.....	136
8.4.2. Velocidad de crecimiento micelial de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	138
8.4.3. Conteo de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	142
8.4.4. Prueba de germinación de esporas de <i>Trichoderma</i>	144
8.4.5. Conteo de esporas a partir de la prueba de germinación de esporas para tres cepas de <i>Trichoderma</i>	148
8.4.6. Conclusiones.....	151
8.5. Efecto de una mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) sobre el cultivo dual <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> vs hongos comestibles (<i>Pleurotus</i> , <i>Lentinula</i>) con una dosis de 1.2% de extracto (Experimento 5).....	152
8.5.1. Cultivo dual <i>Lentinula edodes</i> vs <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	152
8.5.2. Cultivo dual <i>Pleurotus ostreatus</i> vs <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	156
8.5.3. Cultivo dual <i>Pleurotus pulmonarius</i> vs <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	160
8.5.4. Efecto de la mezcla de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) sobre la esporulación de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	165
8.5.5. Conclusiones.....	171
8.6. Efecto de la mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) en el cultivo de hongos comestibles (<i>Pleurotus</i> , <i>Lentinula</i>) en sustrato sólido en condiciones de módulo experimental (Experimento 6).....	172
8.6.1. Descripción general del experimento.....	172
8.6.2. Evaluación de las variables.....	174
8.6.3. Colonización de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 en sustrato de paja.....	174
8.6.3.1. Colonización del sustrato.....	174
8.6.3.2. Producción de biomasa fresca en los tratamientos.....	175
8.6.3.3. Eficiencia biológica (%)......	178

8.6.3.4. Caracterización de los basidiocarpos.....	179
8.6.3.5. Evaluación del sustrato.....	181
8.6.3.6. Conclusiones.....	182
8.6.4. Colonización de <i>Lentinula edodes</i> CP-7 con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM- 113 en sustrato de aserrín.....	183
8.6.4.1. Colonización del sustrato.....	183
8.6.4.2. Producción de biomasa fresca en los tratamientos.....	184
8.6.4.3. Eficiencia biológica.....	186
8.6.4.4. Caracterización de los basidiocarpos.....	187
8.6.4.5. Caracterización del sustrato.....	188
8.6.5. Conclusiones.....	189
8.6.6. Recomendación para la aplicación de una mezcla de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) en el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> en sustrato sólido.....	190
IX. Conclusiones.....	192
X. Estrategia para el control del “moho verde” en el cultivo de hongos comestibles funcionales y medicinales con extractos de origen vegetal.....	194
10.1. Actores de la Estrategia.....	194
XI. Literatura citada.....	198
XII. Anexos.....	209

Índice de Figuras

Fig. 1. Algunos ejemplos de hongos saprófitos, simbiotes y parásitos.....	12
Fig. 2. Tipo de basidiocarpos de dos basidiomicetos.	13
Fig. 3. Ejemplo del ciclo de vida de un basidiomiceto típico (<i>Pleurotus ostreatus</i>).....	14
Fig. 4. Planta del Quino (<i>Cinchona officinalis</i>), árbol del cual se obtiene la quinina, con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas.....	35
Fig. 5. Imágenes de las plantas con propiedades antifúngicas utilizadas en este trabajo.....	51
Fig. 6. Diagrama de flujo de la metodología para la prueba de los sensidiscos (Experimento 1).....	52
Fig. 7. Metodología de extracción por maceración con solventes consecutivos de hexano, acetona, etanol y agua.....	55
Fig. 8. Esquema de colocación de los sensidiscos con extractos vegetales en el medio de cultivo.....	56
Fig. 9. Metodología para la elaboración de tratamientos con las plantas preseleccionadas para la evaluación de los extractos en sensidiscos.....	57
Fig. 10. Evaluación del efecto de los extractos de ruda (<i>Ruta graveolens</i>), cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>), con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial, n=10 (Experimentos 2, 3 y 4).....	58
Fig. 11. Metodología para la elaboración de los medios de cultivo con los extractos de las plantas trabajadas en este estudio.....	61
Fig. 12. Efecto de una mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) sobre el cultivo dual <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> -hongos comestibles (<i>Pleurotus</i> , <i>Lentinula</i>) con una dosis de 1.2% de extracto (Experimento 5).....	63
Fig. 13. Diagrama de la retícula de la cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas por ml.	65
Fig. 14. Toma de muestra para el conteo de esporas de <i>Trichoderma</i> a partir de los 4 días de inoculado.....	66
Fig. 15. Efecto de la mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6 %) en el cultivo de hongos comestibles (<i>Pleurotus</i> , <i>Lentinula</i>) en sustrato sólido en condiciones de módulo experimental (Experimento 6).....	68
Fig. 16 Diagrama de flujo de la metodología para la preparación del sustrato sólido.....	67

Fig. 17. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente agua, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109. B: <i>Trichoderma koningii</i> CPM-110.....	76
Fig. 18. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente agua, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-111. B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	77
Fig 19. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente etanol, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109. B: <i>Trichoderma koningii</i> CPM-110.....	78
Fig 20. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente etanol, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-111. B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	79
Fig. 21. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente hexano, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109. B: <i>Trichoderma koningii</i> CPM-110.....	82
Fig. 22. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente hexano, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-111. B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	83
Fig. 23. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente acetona, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109. B: <i>Trichoderma koningii</i> CPM-110.....	84
Fig. 24. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> evaluadas con solvente acetona, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-111. B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	87
Fig. 25. Efecto promedio de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> evaluadas a los 4 días de inoculación, en presencia de extractos de diversas plantas obtenidos con diferentes solventes (acetona y hexano), en medio de cultivo PDA.....	88

Fig. 26. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) en medio EMA, sobre la velocidad de crecimiento de A: <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 con 4 mg/ml y B: <i>Lentinula edodes</i> CP-7 con 1 mg/ml.....	93
Fig. 27. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con 4 mg/ml en medio EMA, sobre la velocidad de crecimiento de <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267.....	94
Fig. 28. Efecto promedio de inhibición (%) sobre la velocidad de crecimiento micelial de las cepas estudiadas de hongos comestibles por el extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>).....	94
Fig. 29. Efecto promedio de la estimulación (%) sobre la velocidad de crecimiento de las cepas de <i>Pleurotus</i> con el extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	95
Fig. 30. Colonias miceliales de las cepas de hongos comestibles evaluadas a los 7 días de incubación.....	97
Fig. 31. Velocidad de crecimiento micelial promedio de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> en presencia del extracto etanólico de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con dosis de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	99
Fig. 32. Velocidad de crecimiento micelial promedio de las cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109, en presencia del extracto etanólico de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con dosis de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	100
Fig. 33. Efecto promedio de inhibición (%) sobre la velocidad de crecimiento micelial de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> por el extracto etanólico de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) 4 mg/ml en medio de cultivo PDA con respecto al testigo.....	100
Fig. 34. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	102
Fig. 35. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113.....	103
Fig. 36. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la germinación <i>in vitro</i> de esporas de <i>Trichoderma</i> A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM- 109 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	104
Fig. 37. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la germinación <i>in vitro</i> de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113.....	105
Fig. 38. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo	

PDA sobre la producción de esporas de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 a partir de la prueba de germinación.....	106
Fig. 39. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de las cepas de <i>Trichoderma</i> a partir de la prueba de germinación. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113.....	107
Fig. 40. Efectos de inhibición y estimulación (%) en la esporulación de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	109
Fig. 41. Efecto del extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) sobre la germinación de esporas al 6° día de la inoculación.....	110
Fig. 42. Caracterización morfológica de las colonias de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación.....	113
Fig. 43. Caracterización morfológica de las colonias de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> a los 3 días de inoculación con solución de esporas después del efecto del extracto de ruda en la germinación de esporas.....	116
Fig. 44. Caracterización morfológica de las colonias de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> a los 10 días de inoculación con solución de esporas después del efecto del extracto de ruda en la germinación de esporas.....	117
Fig. 45. Diagrama de prevención, manejo y control del moho verde <i>Trichoderma</i> usando el extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) en el proceso de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	120
Fig. 46. Velocidad de crecimiento micelial de <i>Lentinula edodes</i> CP-7 con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>), con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA.	122
Fig. 47. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>), con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA. A: <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 y B: <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267.....	122
Fig. 48. Efecto promedio de la estimulación sobre la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de hongos comestibles (<i>Lentinula edodes</i> CP-7, <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 y <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267) en medio EMA, con extracto etanólico de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) con 4 mg/ml.....	123
Fig. 49. Colonias de las cepas comestibles evaluadas a los 10 días de incubación, A y B: <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50, C y D: <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267, E y F: <i>Lentinula edodes</i> CP-7. La serie A, C y E son los tratamientos con 4 mg/ml de extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) en medio de cultivo EMA. La serie B, D y F son los testigos sin extracto.....	125

Fig. 50. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>), con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	127
Fig. 51. Velocidad de crecimiento micelial de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>), con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA	128
Fig. 52. Efecto promedio de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> cultivadas en medio PDA con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) en una concentración de 4 mg/ml	128
Fig. 53. Efecto promedio de estimulación de la velocidad de crecimiento micelial (%) de la cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 expuesta al extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) en una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	129
Fig. 54. Efecto del extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) con 4 mg/ml de extracto en medio de cultivo PDA, sobre la producción de esporas de las colonias de <i>Trichoderma</i> . A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	130
Fig. 55. Efecto del extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) con 4 mg/ml de extracto en medio de cultivo PDA, sobre la producción de esporas de las colonias de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113.....	131
Fig. 56. Efecto promedio de la estimulación sobre la producción de esporas de las colonias de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109, <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113, por efecto del extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) a una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	132
Fig. 57. Efecto promedio de la inhibición (%) de la producción de esporas de las colonias de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113, por efecto del extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) a una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	133
Fig. 58. Colonias de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> evaluadas, A y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109, C y D: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y E y F: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación. La serie B, D y F son los testigos sin extracto.....	135
Fig. 59. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA. A: <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Lentinula edodes</i> CP-7 y B: CP-50	137

Fig. 60. Velocidad de crecimiento micelial de <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267 con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA.....	138
Fig. 61. Velocidad de crecimiento micelial de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	139
Fig. 62. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113.....	140
Fig. 63. Efecto de inhibición (%) sobre la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> por efecto del extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) en una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	142
Fig. 64. Efecto del extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>), en el conteo de esporas de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	143
Fig. 65. Efecto del extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>), en el conteo de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	144
Fig. 66. Prueba de germinación de esporas de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112	145
Fig. 67. Prueba de germinación de esporas de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	146
Fig. 68. Efecto de inhibición y estimulación en la germinación de esporas de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, A: Efecto de inhibición de germinación con respecto al testigo y B: Efecto de estimulación de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	147
Fig. 69. Producción de esporas de las cepas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, A: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 y B: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112.....	149
Fig. 70. Producción de esporas de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 con extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.....	150

Fig. 71. Efecto de inhibición en el conteo de esporas (%) de <i>Trichoderma</i> por el extracto de sábila (<i>Aloe vera</i>) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, para <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109, <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113.....	150
Fig. 72. Efecto de estimulación de producción de esporas (%) para la cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> CPM-109, en medio de cultivo PDA.....	151
Fig. 73. Velocidad de crecimiento micelial promedio en cultivo dual de la cepa de <i>Lentinula edodes</i> en presencia de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 cultivada en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%).....	153
Fig. 74. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 en cultivo dual con <i>Lentinula edodes</i> CP-7 con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) en medio de cultivo EMA.....	154
Fig. 75. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 en cultivo dual con <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%).....	158
Fig. 76. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 y efecto de inhibición en la velocidad de crecimiento (%) en cultivo dual con <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%).....	159
Fig. 77. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267 y proporción de estimulación en la velocidad de crecimiento en cultivo dual con <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%).....	161
Fig. 78. Efecto de inhibición en la velocidad de crecimiento micelial (%) de la cepa de <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267 con el extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) al 1.2 % y al fungicida benomil a una concentración de 1.47 mg/L en medio de cultivo EMA.....	162
Fig. 79. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 y efecto de inhibición en la velocidad de crecimiento (%) en cultivo dual con <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%).....	163

Fig. 80. Desarrollo de las colonias de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 con hongos comestibles en cultivo dual <i>in vitro</i> en medio de cultivo EMA, con una mezcla de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) a los 10 días de crecimiento.....	164
Fig. 81. Efecto de la mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) en medio de cultivo EMA sobre la esporulación de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113, en cultivo dual con <i>Lentinula edodes</i> CP-7.....	166
Fig. 82. Efecto de la mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) en medio de cultivo EMA sobre la producción de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113, en cultivo dual con el hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50.....	167
Fig. 83. Efecto de inhibición y estimulación de producción de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 en crecimiento dual con <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50, por efecto de la mezcla de extractos de sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) y cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) en medio de cultivo EMA.....	168
Fig. 84. Producción de esporas de la cepa de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 en cultivo dual con la cepa comestible <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267 expuesta al extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) al 1.2 %, así como benomil con 1.47 mg/L en medio de cultivo EMA.....	169
Fig. 85. Efecto de estimulación en la producción de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 con <i>Pleurotus pulmonarius</i> CP-267 en cultivo dual con extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) al 1.2%, así como benomil con 1.47 mg/L en medio de cultivo EMA.....	170
Fig. 86. Proporción promedio de la colonización del sustrato por el micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> en las diferentes condiciones experimentales estudiadas, incluyendo la inoculación de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113. Se agregó una mezcla de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) a la condición correspondiente.....	175
Fig. 87. Producción total de los basidiocarpos cosechados de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas.....	177
Fig. 88. Producción promedio por tratamiento de los basidiocarpos cosechados de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas.....	178
Fig. 89. Eficiencia biológica de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas.....	179
Fig. 90. Basidiocarpos de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 producidos en las diferentes condiciones experimentales evaluadas.	180

Fig. 91. Proporción promedio de la colonización del sustrato de aserrín por el micelio de <i>Lentinula edodes</i> CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas, incluyendo la inoculación de esporas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113. Se agregó una mezcla de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) (0.6%) y sábila (<i>Aloe vera</i>) (0.6%) a la condición correspondiente.....	184
Fig. 92. Producción total de los basidiocarpos cosechados de <i>Lentinula edodes</i> CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas.....	185
Fig. 93. Producción promedio de los basidiocarpos cosechados de <i>Lentinula edodes</i> CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas.....	186
Fig. 94 Eficiencia biológica de <i>Lentinula edodes</i> CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas.....	187
Fig. 95. Basidiocarpos de <i>Lentinula edodes</i> CP-7 producidos en diferentes condiciones experimentales evaluadas.....	188
Fig. 96. Recomendación para la aplicación de la mezcla de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>) al 1.2% sobre sustrato sólido para el cultivo de hongos comestibles.....	191
Fig. 97. Diagrama que muestra a los actores de la estrategia para el control del “moho verde” <i>T. trichoderma</i> con extractos de origen vegetal.....	195
Fig. 98. Recomendación para un análisis de costos de producción de extractos de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>) y sábila (<i>Aloe vera</i>).....	197
Fig. 99. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50, con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo EMA con solvente etanol 96°Gl.	211
Fig. 100. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Lentinula edodes</i> CP-7 con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo EMA con solvente etanol 96°Gl.	212
Fig. 101. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo PDA con solvente etanol 96°Gl.	213
Fig. 102. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo PDA con solvente etanol 96°Gl.	214
Fig. 103. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50, con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo EMA.	216

Fig. 104. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa, <i>Lentinula edodes</i> CP-7, con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo EMA.	217
Fig. 105. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo PDA.	217
Fig. 106. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo PDA.	218
Fig. 107. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 expuesta al extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) a 6 mg/ml en medio de cultivo EMA con diferentes metodologías de esterilizado del extracto.	220
Fig. 108. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 cultivadas en extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) a 6 mg/ml en medio de cultivo PDA con diferentes metodologías de esterilizado del extracto.	221
Fig. 109 Velocidad de crecimiento micelial de las cepas <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 y <i>Lentinula edodes</i> CP-7 por efecto de dos dosis de extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) filtrado en resuspensión acuosa con dosis de 3 y 5 mg/ml en medio de cultivo EMA.	223
Fig. 110. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109 por efecto de dos dosis de extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) filtrado en resuspensión acuosa con dosis de 3 y 5 mg/ml en medio de cultivo PDA.	224

Índice de Tablas

Tabla 1. Producción anual estimada de hongos comestibles cultivados comercialmente en México, incluyendo cantidades y proporciones en el periodo 2005-2009.....	4
Tabla 2. Importancia de los hongos comestibles cultivados en México, en la relación con los volúmenes de producción (toneladas) de algunos productos agrícolas y orgánicos, durante el periodo 1995-2007.....	5
Tabla 3. Etapas históricas fundamentales de la biotecnología aplicada y moderna de los hongos comestibles en México.....	6
Tabla 4. Productos importados a base de hongos en supermercados Chinos.....	8
Tabla 5. Productos a base de hongos hechos por empresas extranjeras en China.....	9
Tabla 6. Clasificación de los géneros <i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i>	13
Tabla 7. Características nutricionales de los hongos <i>Lentinula</i> y <i>Pleurotus</i> en 100 g.....	20
Tabla 8. Principales insectos que atacan en el cultivo de hongos comestibles.....	23
Tabla 9. Bacterias que atacan en el cultivo de hongos comestibles	24
Tabla 10. Mohos que atacan en el cultivo de hongos comestibles	25
Tabla 11. Clasificación del género <i>Trichoderma</i>	28
Tabla 12. Listado de algunas plantas con propiedades alelopáticas y su uso en la medicina tradicional.....	38
Tabla 13. Plantas de uso común con propiedades antifúngicas.....	41
Tabla 14. Selección de cepas de <i>Trichoderma</i> y hongos comestibles utilizadas en la evaluación de diversos extractos vegetales.....	49
Tabla 15. Selección de plantas con propiedades antifúngicas, nombre común y la parte utilizada para este estudio.....	50
Tabla 16. Relación de los sensidiscos colocados en las cajas de petri según el solvente.....	59
Tabla 17. Caracterización de la morfología macroscópica del crecimiento micelial en medio de cultivo.....	66

Tabla 18. Condiciones experimentales estudiadas en sustratos inoculados con <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> y los hongos comestibles <i>Pleurotus</i> y <i>Lentinula</i> , empleando sustratos estériles.....	69
Tabla 19. Rendimiento de las extracciones por maceración a partir de las plantas estudiadas con solventes de hexano, acetona y etanol.....	75
Tabla 20. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas estudiadas de <i>Trichoderma</i> en los tratamientos con solvente hexano en 10 mg/sensidisco hasta los 6 días de incubación.....	89
Tabla 21. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de <i>Trichoderma</i> en los tratamientos estudiados con solvente acetona en 10 mg/disco hasta los 6 días de incubación	90
Tabla 22. Caracterización morfológica de las colonias de las cepas comestibles en medio EMA cultivadas en 4 mg/ml de extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>), a los 10 días de inoculación.....	96
Tabla 23. Caracterización morfológica de las colonias de CPM-109 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> , CPM-112 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> y CPM-113 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> cultivadas en medio PDA con extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) al 0.4%, a los 10 días de crecimiento.	111
Tabla 24. Caracterización morfológica de las colonias de CPM-109 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> , CPM-112 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> y CPM-113 <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> , a los 10 días a partir de la germinación de esporas cultivadas en medio PDA con extracto de ruda (<i>Ruta graveolens</i>) al 0.4%.	114
Tabla 25. Caracterización morfológica de las cepas comestibles cultivadas en medio de cultivo a 4 mg/ml de extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>).....	124
Tabla 26. Caracterización morfológica de las colonias de las cepas evaluadas de <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-109, <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-112 y <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> CPM-113 cultivadas en agar PDA con 4 mg/ml de extracto de cebolla morada (<i>Allium cepa</i>).....	134
Tabla 27. Condiciones experimentales estudiadas en sustratos inoculados con <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> y hongos comestibles (<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i>), empleando sustratos estériles.....	173
Tabla 28. Caracterización morfológica de la producción de <i>Pleurotus ostreatus</i>	180
Tabla 29. Determinaciones de pH y porcentajes de humedad de sustrato de paja.....	181
Tabla 30. Caracterización morfológica de los hongos <i>Lentinula edodes</i>	188
Tabla 31. Determinaciones de pH y porcentajes de humedad de sustrato de aserrín.....	189

Tabla 40. Selección de cepas de <i>Trichoderma</i> utilizadas en la evaluación de diversos extractos vegetales.....	209
Tabla 41. Selección de plantas para la evaluación en medio de cultivo.....	210
Tabla 42. Rendimientos obtenidos para 1 kg de planta en fresco con extracto de etanol.....	210
Tabla 43. Concentración real de los extractos utilizados para 10 mg/ml.....	211
Tabla 44. Selección de cepas en estudio.....	216

Introducción

El cultivo del género *Pleurotus* se ha incrementado desde sus inicios debido a que es capaz de crecer en una amplia diversidad de sustratos, usualmente provenientes de subproductos agrícolas. Su aceptación también se debe a su rápido crecimiento y fácil cultivo en comparación con otros hongos, así como su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas (Sánchez y Royse, 2002).

En el caso del hongo *shiitake* (*Lentinula edodes*) existen diversas investigaciones relacionadas a su cultivo, donde se muestran el uso de una amplia diversidad de sustratos, desde el cultivo tradicional en troncos hasta mezclas de aserrín de diversas maderas y suplementos (Stamets y Chilton, 1983; Morales y Martínez-Carrera, 1990; Morales *et al.*, 1991; Morales y Martínez-Carrera, 1991; Guzmán *et al.*, 2002). Existe un creciente interés en su cultivo debido a su sabor característico diferente a otros hongos, así como sus múltiples propiedades medicinales (Hobbs, 1995).

Entre los problemas de contaminación frecuentes y de gran importancia en el proceso de cultivo de la mayoría de los hongos comestibles, se encuentran los mohos que proliferan por las condiciones ambientales de humedad y temperatura necesarias para el desarrollo y fructificación de los hongos comestibles. La mayoría de los mohos que atacan al cultivo de hongos comestibles provocan diferentes tipos de fermentación del sustrato, principalmente los del género *Trichoderma* (Oei, 1991). Es muy común encontrarlo en el compost o sustrato, inhibiendo y/o reduciendo la fructificación, así como parasitando los carpóforos cultivados. Muchas especies de *Trichoderma* se desarrollan en tejidos leñosos, son abundantes en la turba y se les localiza frecuentemente en los cajones de madera que contienen el compost que sirve de cama para el cultivo comercial de hongos. Hoy día, sin embargo, este último hecho es poco frecuente debido a los avances tecnológicos de cultivo, al difundirse cada vez más el uso de anaqueles metálicos (hierro galvanizado o aluminio). Si existen puntos de contaminación en el lugar de cultivo de hongos comestibles, el moho *Trichoderma* suele diseminarse fácilmente por vía aérea a través de la vestimenta de los cultivadores durante las labores de cosecha y limpieza de las camas de sustrato o bien por vía húmeda mediante las labores de riego (Stamets y Chilton, 1983). Se han realizado diversos estudios para el control del “moho verde” en el cultivo de los hongos comestibles (Stamets, 2000; Przybylowicz y Donoghue, 1990), encontrándose entre otras

estrategias utilizadas el control ambiental. Sin embargo, a pesar del estricto manejo de los factores físicos, la presencia del “moho verde” continúa causando daño a diversos cultivos de hongos comestibles alrededor del mundo. Actualmente, se aplican prácticas de manejo y control con fungicidas tradicionales, los cuales son tóxicos para la salud humana, no obstante, existen alternativas naturales que podrían llegar a controlar estos problemas. Diversas plantas con propiedades antifúngicas representan un gran potencial que podría ser aprovechado en el cultivo de los hongos comestibles. A pesar de lo anterior, existen muy pocas investigaciones sobre la aplicación de productos vegetales naturales con propiedades antifúngicas durante el cultivo de hongos comestibles (Baars *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto de extractos de diversas plantas con propiedades antifúngicas para inhibir el desarrollo del “moho verde” (*Trichoderma*), empleando una dosis con efecto no significativo para el desarrollo de hongos comestibles cultivados (*Lentinula* y *Pleurotus*). En el caso del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con una dosis de 4 mg/ml en el medio de cultivo, se observó una inhibición en la velocidad de crecimiento micelial de las tres cepas de *Trichoderma* evaluadas. El mayor porcentaje de inhibición se observó a las 24 h, siendo de 66.6% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, 81.4% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y de 53.6% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. También se observó una inhibición en la cantidad de esporas cultivadas en el medio desde su germinación, con una inhibición entre el 40% y 50% hasta el decimo día. En el caso del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), se observó a las 24 h una inhibición del 100% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, 65% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y de 57.6% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Sin embargo, para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 se observó una estimulación de la velocidad de crecimiento a partir del día 3; así como una mayor producción de esporas para las tres cepas evaluadas. En el caso de los hongos comestibles *Lentinula* y *Pleurotus* también se observó una estimulación en la velocidad de crecimiento micelial significativamente mayor con respecto al testigo a partir del día 2. En el caso de *Pleurotus ostreatus* la estimulación de la velocidad de crecimiento fue de hasta el 100% del sexto al noveno día, a diferencia del testigo; en el caso de *Lentinula edodes* la estimulación en la velocidad de crecimiento disminuyó de un 53% al día 2 a valores menores del 20% hasta el final del experimento.

I. El desarrollo sustentable y la biotecnología

El desarrollo sustentable se ha definido como las prácticas humanas que utilizan los recursos bióticos para obtener un beneficio social o económico sin comprometer la disponibilidad del recurso para las generaciones futuras (Escobar, 2007). En el caso del cultivo de hongos comestibles, el uso de rastrojos o pajas como un subproducto de los cultivos anuales y/o de temporal para la obtención de un alimento rico en proteína, es un beneficio a corto plazo para las personas interesadas en el cultivo; además de los beneficios de autoconsumo se adquiere un ingreso económico con la venta de los hongos en mercados locales (Bernabé-González y Cayetano-Catarino, 2010).

La adquisición de los conocimientos en la transferencia de tecnología para el cultivo de hongos desde la adaptación de las instalaciones, la siembra, el mantenimiento del cultivo, las enfermedades existentes y la cosecha, ha sido aplicada con éxito en diversas zonas y se ha adaptado a climas y regiones muy diversas del país (Sánchez *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010; Bernabé-González y Cayetano-Catarino, 2010). Esto ha contribuido a realizar actividades productivas diferentes y complementarias a ciertos sectores de la sociedad dedicados al campo e interesados en el uso de los subproductos de sus cosechas para el cultivo de hongos comestibles. La adaptación de este tipo de tecnologías requiere de poca inversión e infraestructura, por lo que es una alternativa atractiva para diversos sectores de la sociedad. Esta transferencia de tecnología se ha llevado a cabo gracias a investigaciones aplicadas en biotecnología, las cuales han podido manipular a diversas cepas de hongos comestibles adaptados a diferentes climas (Morales *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2010) para poder ofrecer un producto que garantizará un beneficio a la sociedad con buenos rendimientos del cultivo. El conocimiento transferido a los campesinos para el uso de rastrojos y subproductos agrícolas ha sido resultado de años de trabajo e investigación en el cultivo de los hongos comestibles. Estas investigaciones continúan para ofrecer cada vez mejores alternativas de cultivo y control de enfermedades a los campesinos que deseen diversificar sus actividades del campo, así como para diversos sectores de la sociedad interesados en el cultivo de los hongos comestibles.

1.1. La producción de hongos comestibles en México

En la producción de hongos comestibles, México es el mayor productor de hongos cultivados en América Latina, con aproximadamente una producción de 46,533 toneladas anuales de hongos frescos para el año 2009 (Martínez-Carrera *et al.*, 2007; Martínez-Carrera y López-Martínez de Alva, 2010) (Tabla 1). En el caso de los champiñones, siguen siendo los mayormente cultivados con una proporción de 93.6% de la producción. En el caso de las “Setas” su producción va en aumento ya que en proporción subió de un 4.6 a un 6.2 % en la producción del 2005 al 2009.

Tabla 1. Producción anual estimada de hongos comestibles cultivados comercialmente en México, incluyendo cantidades y proporciones en el periodo 2005-2009 (Martínez-Carrera *et al.*, 2007; Martínez-Carrera y López-Martínez de Alva, 2010).

Nombre científico	Nombre comercial	Producción nacional			
		2005	2005	2009	2009
		Volumen (Toneladas)	Proporción (%)	Volumen (Toneladas)	Proporción (%)
<i>Agaricus bisporus</i> (J. E. Lange) Pilát	Champiñones	42,260	95.35	43,595	93.69
	Champiñón blanco	44,931.5	99.27	42,482	97.4
	Champiñón café	328.5	0.73	1,113	2.6
<i>Pleurotus</i> spp.	“Setas” (blanca, gris, café)	2,190	4.62	2,920	6.28
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	<i>Shiitake</i>	18.2	0.038	18.2	0.039
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	Reishi	PC	-	PC	-
<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray	Maitake	PC	-	PC	-
Total		47,468.2	100	46,533.2	100

PC=Nivel de pruebas a escala comercial.

En México, el cultivo de hongos comestibles se considera como un producto de importancia socioeconómica intermedia a nivel nacional, ya que puede compararse con otros productos agrícolas de importancia, e incluso también con los productos denominados orgánicos (Tabla 2) (Martínez-Carrera y López-Martínez de Alva, 2010).

Tabla 2. Importancia de los hongos comestibles cultivados en México, en la relación con los volúmenes de producción (toneladas) de algunos productos agrícolas y orgánicos, durante el periodo 1995-2007, de acuerdo con las estadísticas de SIACON (2009), SAGARPA (Martínez-Carrera *et al.*, 2007; Martínez-Carrera y López-Martínez de Alva, 2010).

Producto	Año			
	1995	2001	2004	2007
Hortalizas	59,183	83,527	62,487	-
Hortalizas (orgánico)	-	113	7.5	-
Tomate cherry	5,761	28,589	54,592	-
Tomate cherry (orgánico)	-	4,487	683	-
Tomate rojo (jitomate orgánico)	-	-	3,800	-
Chícharo	39,894	48,014	53,717	-
Chícharo (orgánico)	-	385	336	-
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	43,761	55,558	47,917	56,968
Ajo (<i>Allium sativum</i>) (orgánico)	-	206	107	-
Hongos comestibles cultivados	27,825	38,708	47,468	46,533
Cacao	49,425	46,737	43,974	29,909
Café cereza	1,725,960	1,645,821	1,665,406	1,458,803
Café cereza (orgánico)	-	-	31,571	-

Por otro lado, se sabe que el mercado de los hongos comestibles cultivados evolucionó con el tiempo (Tabla 3) de un sistema monopólico con la empresa Hongos de México, S. A., desde 1949 a un sistema oligopólico con el surgimiento de la empresa Hongos Leben S. de R.L. de C.V. en 1975. Así como también la aparición de otras empresas productoras de hongos comestibles: Productora Rural de hongos comestibles en Cuetzalan, Puebla, Plantas Productoras en el D. F., y otros Estados (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

En 1991, la empresa Hongos de México, S. A. produjo un 45% de la producción comercial de champiñón con aproximadamente 20 toneladas diarias. La empresa Hongos Leben, S. A., con un 76% de la producción de “Setas” y la Central de Abastos del D.F., comercializó un 30% de hongos comestibles de pequeños productores y recolectores (Martínez-Carrera *et al.* 1991). Para el año 2007, la producción a nivel nacional era de un 95.35% de champiñón

(champiñón blanco: 44,931.5 ton/año; champiñón café: 328.5 ton/año), seguido por las “Setas” con un 4.62% (blanca, gris, café: 2,190 ton/año) y el hongo *shiitake* con un 0.038% (18.2 ton/año) (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

Tabla 3. Etapas históricas fundamentales de la biotecnología aplicada y moderna de los hongos comestibles en México (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

Biotecnología	Procesos	Año	Lugar	Sectores involucrados
Aplicada	Producción de inóculo, “semilla”	1954	Primer laboratorio, Cuajimalpa, D. F.	Privado: Hongos de México, S. A.
		1974	Segundo laboratorio, Guadalupe Victoria México	Privado: Hongos Leben
		1992	Primer laboratorio rural, Cuetzalan, Puebla	Académico-Social: CP-Cooperativa indígena
		1994	Desarrollo de microempresas en la región central del país	Privado y Social
		1994	Establecimiento de la industria transnacional	Privado: Industria transnacional (<i>Amycel, Sylvan</i>)
	Producción de hongos	1933	Primeros ensayos, Texcoco, México	Privado
		1939	Primeras plantas productoras, D. F.	Privado
		1949	Establecimiento de la empresa “Hongos de México, S. A.”, Cuajimalpa, D. F.	Privado
		1975	Establecimiento de la empresa “Hongos Leben, S. A.”, Guadalupe Victoria, México	Privado
		1989	Establecimiento de la producción rural de hongos, Cuetzalan, Puebla	Académico-Social: CP-Cooperativa indígena
	Procesamiento de hongos	1947	Salmuera doméstica de hongos, Azcapotzalco, D.F.	Privado
		1955	Primeros enlatados de hongos, Cuajimalpa, D. F.	Privado: “Monteblanco, S. A.”

Continúa ...

		1972	Enlatado comercial de hongos a gran escala, Cuajimapla, D.F.	Privado: "Monteblanco, S. A."
		1996	Envasado rural de hongos, Cuetzalan, Puebla	Académico-Social: CP-Cooperatia indígena
	Productos de hongos	2005	Elaboración de cápsulas, extractos, suplementos alimenticios, jarabes, licores y cremas. Veracruz y Michoacán	Privado: "Laboratorios Fungi Cap, S. A." y "Garcifer, S. A."
Moderna	Conservación del germoplasma nativo	2003	Establecimiento del Centro sobre recursos genéticos de hongos comestibles	Académico: CP, <i>Campus Puebla</i>
	Caracterización del germoplasma nativo y mejoramiento genético	2003	Diversidad genética y mejoramiento genético mediante el uso de marcadores moleculares y caracterización de genes	Académico: CP, <i>Campus Puebla</i>

1.2. *Lentinula edodes*, "shiitake", en el mercado internacional

El hongo *Lentinula edodes* es originario de Japón y China; está presente en otros países asiáticos con climas templados, así como también hay especies silvestres similares en Costa Rica y México (Hobbs, 1995). En Argentina, se llevaron a cabo pruebas en la elaboración de troncos sintéticos hecho a base de aserrín y suplementados con salvado de trigo y semillas de mijo para el cultivo del shiitake, logrando obtener eficiencias biológicas para una producción comercial y rentable (Albertó *et al.*, 2010).

Existen documentos antiguos con más de un milenio de años donde mencionaron el consumo de este hongo, sin embargo, su cultivo se remonta a sólo 200 años atrás. Su cultivo se expandió en la segunda mitad del siglo pasado y a principios de éste siglo se inició la práctica de laboratorio para la obtención de micelio mejorado para siembras en substrato. La naturaleza del substrato para el cultivo del hongo *shiitake* es diferente a la de otros hongos (Ferrán, 1969) ya que está hecho principalmente a base de aserrín o troncos de encino.

El hongo *shiitake* es apreciado en diversos mercados extranjeros por el sabor característico que ofrece en la cocina oriental donde es un ingrediente básico en platillos de

consumo cotidiano; así como también en la comida occidental, ya que en la ciudad de San Francisco, en Estados Unidos, la comida china y japonesa es muy apreciada (Ferrán, 1969; Martínez- Carrera *et al.*, 2004).

En China, el valor de las importaciones anuales de hongo *shiitake* para el año 2007 fluctuó entre 1.5 y 3 millones de dólares desde 1995. Un grupo consultor de Boston, menciona que, en el año 2015, China se convertirá en el segundo consumidor más grande del mundo, incluyendo el consumo de hongos. Se sabe que China en 1940's importaba cientos de toneladas de *shiitake* seco desde Japón, y en 1980's importaba enoki fresco desde Japón y Corea del Sur. Más recientemente, en 1990 comenzó a importar grandes cantidades de matsutake de Corea del Norte y lo re-exportaba a Japón, al mismo tiempo, China importa hongos enlatados, en salmuera y trufas desde Europa y Norte América (Huang, 2007).

En el año 2007, China importó anualmente cientos de toneladas de hongos en fresco dirigidas al área de alimentos, es líder mundial en producción y exportación de hongos, sin embargo, en supermercados sólo se encuentran procesados y no frescos (Tablas 4-5).

El cultivo del hongo *shiitake* en México se realizó a un nivel experimental por primera vez en 1984 por la empresa Hongos Leben en el Estado de México. Este cultivo se llevó a cabo en bolsas de plástico usando aserrín de encino mezclado con suplementos como sustrato. En este estudio, se obtuvo una eficiencia biológica del 53.97% en una sola cosecha (Morales y Martínez-Carrera, 1990).

Tabla 4. Productos importados a base de hongos en supermercados Chinos (Huang, 2007).

Objeto	Precio	Marca	Presentación	Productor	País de origen
Crema de maíz con hongos	12–13 RMB	Campbell	300 g/lata	Compañía Sopa Campbell	Estados Unidos
Sopa de hongos con pollo	12–13 RMB	Campbell	300 g/lata	Compañía Sopa Campbell	Estados Unidos
Crema de hongos	12–13 RMB	Campbell	300 g/lata	Compañía Sopa Campbell	Estados Unidos
Salsa de hongos para espagueti	18.5–20 RMB	Del Monte	751g / lata	Alimentos del Monte	Estados Unidos
Salsa de hongos con pimienta verde	18.5–20 RMB	Del Monte	751g / lata	Alimentos del Monte	Estados Unidos

Continúa...

Salsa de hongo para espagueti	18.5–20 RMB	Hunt´s	751g / lata	Alimentos ConAga Inc.	Estados Unidos
Hongos suaves a la boloñesa	34.5–36 RMB	Dolmio	550 g/lata	Masterfoods Australia y Nueva Zelanda	Australia
Salsa de hongos y hierbas para pastas	34.5–36 RMB	Dolmio	550 g/lata	Masterfoods Australia y Nueva Zelanda	Australia
<i>Shiitake</i> en salsa de especias	10–12 RMB	Singrong	190 g /caja	Compañía Singrong	Corea del Sur

RMB: Yuan chino o renminbi (unidad monetaria de la Republica Popular de China)

El cultivo del hongo *shiitake* en México se considera un hongo con buen potencial, ya que las condiciones ambientales y substratos están disponibles en varias regiones del país (Morales y Martínez-Carrera, 1990). Existen diversas investigaciones relacionadas al cultivo del *shiitake*, donde se muestran una amplia diversidad de substratos para su cultivo en México, desde el cultivo tradicional en troncos hasta mezclas de aserrín de diversas maderas y suplementos (Stamets y Chilton, 1983; Morales *et al.*, 1991; Morales y Martínez-Carrera, 1991; Guzmán *et al.*, 2002).

Tabla 5. Productos a base de hongos hechos por empresas extranjeras en China (Huang, 2007).

Producto	Precio	Marca	Presentación	Productor
Sopa de pollo y hongos	2.8 – 3.2 RMB	Maggi	35 g / bolsa	Nestlé
Caldo de hongo <i>shiitake</i> (esencia)	20 – 22 RMB	Maggi	310 g / botella	Nestlé
Sopa de pollo y hongos	2.8 – 3.2 RMB	Jiale	41 g/bolsa	Unilever
Sopa de pollo y hongos	2.8 – 3.2 RMB	Jumbo	35 g /bolsa	Gallina Blanca

RMB: Yuan chino o renminbi (unidad monetaria de la Republica Popular de China)

El hongo *shiitake* también es producido en países latinoamericanos, se sabe que la empresa y planta productora de hongos comestibles “Ocox” en Guatemala produce *shiitake* implementando un sistema de buenas prácticas de manejo y surte a restaurantes y supermercados dentro del país; así como también a la comunidad japonesa que reside en Guatemala. Su principal mercado son personas de nivel económico alto que han degustado el *shiitake* en otros países (De León, 2010).

En Perú, actualmente existe la empresa “Mundo Fungi” la cual cultiva comercialmente *shiitake*. Se sabe que la introducción del cultivo de *shiitake* es reciente ya que fue a partir del 2008 donde se introdujo el proceso de cultivo en bloque esterilizado a base de aserrín de eucalipto. Se tiene registrado que ya en el 2007 se implementó la técnica de cultivo de *shiitake* en tronco con apoyo de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), implementando asesoría y capacitación, sin embargo, esta técnica de cultivo aún no ha logrado llegar a un nivel comercial (Chimey y Holgado, 2010).

En el caso de Brasil, también se tiene registrado como un país productor del hongo *shiitake*. Su cultivo inició con inmigrantes japoneses que cultivaron el hongo sobre troncos de eucalipto. Actualmente, existen productores brasileños utilizando la técnica de cultivo en aserrín de eucalipto esterilizado y sembrado en bolsa, ésta técnica agiliza el cultivo en cuestión de tiempo y se obtienen mayores rendimientos que los cultivos en tronco. El aserrín es fácilmente adquirido a partir de las industrias madereras de la zona. Existen productores que debido al costo de la implementación tecnológica para la pasteurización del sustrato solo se dedican a la compra de las bolsas inoculadas, y a la producción de los hongos en condiciones rústicas y menos controladas (Bueno, 2010).

1.3. *Pleurotus*, “Setas”, en el mercado internacional

España se considera el segundo país europeo productor de *Pleurotus* spp., después de Italia. España inició su cultivo en los años ochenta en dos regiones, la región La Rioja-Navarra y la región de Castilla-La Mancha, en ambos sitios se utilizó la paja de trigo como sustrato; en 1998 produjo 11,640 ton de *Pleurotus* spp. para ese año.

Otro de los países que ha cultivado *Pleurotus* spp. es Estados Unidos, donde se iniciaron cultivos desde los años setenta, sin embargo, debido a la falta de un mercado constante para 1998 su producción fue sólo de 908 ton. La mayoría de su producción se obtiene la paja de trigo y cáscara de semilla de algodón o con mezclas de ambos.

En Canadá, se tiene registrado que se cultivan entre 600 y 900 ton de diferentes especies del género *Pleurotus*, principalmente en las zonas de Ontario y Columbia Británica. Se utilizan como sustrato aserrín suplementado, rastrojo de trigo u olote de maíz, la siembra se realiza en bolsas o en cajones que anteriormente se utilizaban para la siembra de *Agaricus bisporus* (Sánchez y Royse, 2002).

Martínez-Carrera *et al.* (1991) estableció que en México se inició su cultivo comercial en 1974, con cepas y tecnología europea bajo el nombre comercial de “Setas”, *Pleurotus ostreatus* y afines. Fue seleccionada por su fácil adaptación, manejo y bajos costos en el cultivo; actualmente, se cultiva más comercialmente y poco a poco se compara o desplaza a los mercados internacionales de las especies competitivas, como el champiñón y el *shiitake*.

En el caso de Guatemala también se tiene registrada la producción de *Pleurotus* por la planta productora de hongos comestibles “Ocox”, la cual obtiene entre 900-1,200 kg de hongos frescos al mes. El 85% de su producción se comercializa en Guatemala en supermercados y restaurantes, y el resto de la producción se exporta con vendedores intermediarios a El Salvador y Honduras (De León, 2010).

En Perú, también se realiza el cultivo de *Pleurotus* sobre subproductos del cultivo de maíz y rastrojo de amaranto. Existen varias empresas dedicadas a su cultivo, entre ellas se encuentran “Apaka Foods”, “FungiPro” y “San Gabriel”. Cada empresa elabora su “semilla”, su substrato y lleva a cabo la distribución y comercialización del producto (Chimey y Holgado, 2010).

II. Características de los hongos comestibles estudiados

2.1. Generalidades de los hongos

El reino Fungi está constituido por cuatro phyla: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota, así como el grupo Deuteromycota o Fungi Imperfecti (Hongos Imperfectos). Para distinguir estos grupos se comparan las características de su morfología, patrones moleculares realizando análisis de secuencias del ADN y comparando algunos patrones de reproducción, particularmente de reproducción sexual.

Los organismos del reino Fungi, se consideran como un grupo aparte de plantas y animales, sin embargo comparten características químicas con ambos grupos. En relación con los animales, la pared celular de los hongos está compuesta de quitina, el mismo compuesto presente en el exoesqueleto de los insectos y almacena glucógeno el cual lo utilizan los animales para almacenar energía. En su relación con las plantas se basa en que ambos cuentan con una pared celular rígida. Sin embargo, los hongos carecen de clorofila, pueden ser unicelulares o multicelulares y microscópicos o macroscópicos. Su alimentación es por absorción a través de la

producción de enzimas que degradan el sustrato en sustancias simples y absorben los nutrientes que requieren para su crecimiento (Alexopolus y Mims, 1979). Se reproducen sexual o asexualmente y se nutren a expensas de la materia orgánica. La mayoría son terrestres, algunos son saprófitos ya que habitan en suelos sobre la materia orgánica muerta (Fig. 1) y desempeñan una actividad crucial en la mineralización del carbono orgánico. Muchos otros son parásitos de vegetales y ocasionan diversas enfermedades económicamente significativas de plantas cultivadas; algunos son parásitos de animales incluyendo el hombre. Los parásitos penetran las células animales o vegetales y obtienen sus nutrientes a expensas de éste. Otros son lignícolas o descomponedores de madera muerta y otros son simbiontes micorrízicos ya que forman una asociación mutualista con las raíces de plantas superiores, otros se asocian con algas unicelulares y dan origen a los líquenes (Alexopolus y Mims, 1979).

El cuerpo del hongo está conformado por un conglomerado de filamentos llamados hifas, dichos filamentos unidos en su conjunto se les denomina micelio. El micelio se clasifica como profundo o vegetativo cuando se encuentra sumergido en el sustrato y se encarga de la absorción de nutrientes y sostén. También existe un micelio denominado aéreo o reproductivo, el cual emerge del sustrato diferenciándose en los basidiocarpos que formarán posteriormente las esporas (Alexopolus y Mims, 1979).



Fig. 1. Algunos ejemplos de hongos saprófitos, simbiontes y parásitos. A: *Flamulina velutipes*, crece en madera. B y C: *Amanita muscaria* y *Amanita caesarea* ambos son micorrízicos y se asocian con raíces en bosques de pino. D: *Claviceps purpurea*, es un parásito conocido comúnmente como cornezuelo de centeno.

2.1.1. Biología de los géneros *Lentinula* y *Pleurotus*

2.1.1.1. Clasificación

Los hongos basidiomicetos más conocidos son los Agaricales (Tabla 6), ya que tienen la forma típica de sombrilla con un pie central (Fig. 2). Debajo del píleo o sombrero se encuentran

las láminas llamadas himenio, las cuales contienen billones de esporas que son liberadas al ambiente para la formación de nuevos individuos. Las esporas pueden ser de distintos tamaños, colores, formas y ornamentaciones, éstas características son particulares de cada especie por lo que son una herramienta para su identificación taxonómica.

Tabla 6. Clasificación de los géneros *Lentinula* y *Pleurotus* (Alexopolus y Mims, 1979).

Reino	Fungi	Fungi
Clase	Basidiomycetes	Basidiomycetes
Subclase	Holobasidiomycetidae	Holobasidiomycetidae
Orden	Agaricales	Agaricales
Género	<i>Lentinula</i>	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.)Sing.	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm. <i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél.

Actualmente, la taxonomía moderna utiliza la biología molecular para diferenciar entre especies afines o con estructuras muy parecidas las cuales causan cierta confusión en su identificación y clasificación con la taxonomía tradicional.

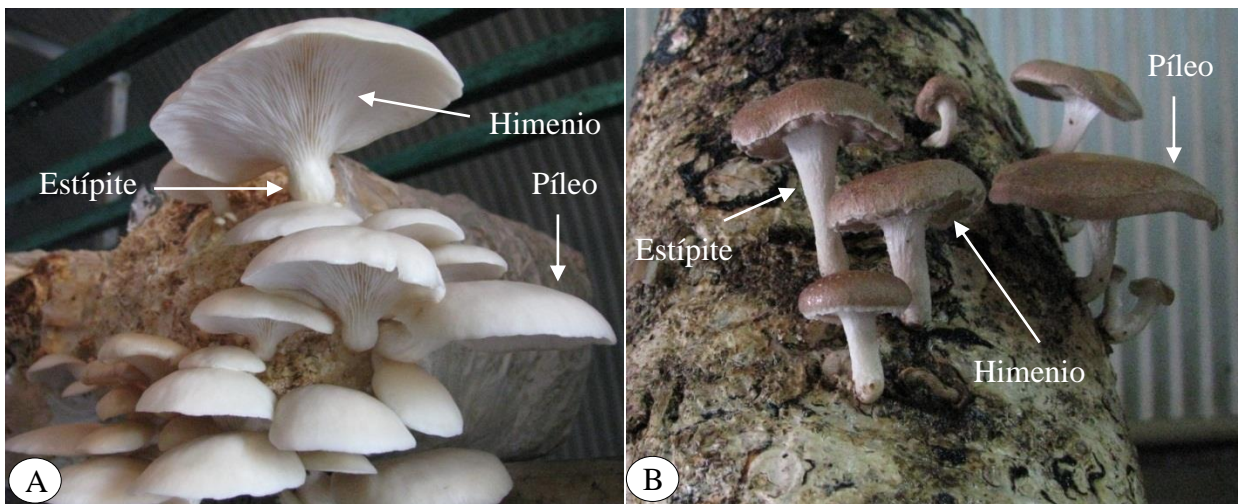


Fig. 2. Tipo de basidiocarpos de dos basidiomicetos. A: *Pleurotus ostreatus*. B: *Lentinula boryana*.

2.1.1.2. Hábitat

Los hongos del género *Lentinula* y *Pleurotus* son descomponedores de madera, típicamente lignícolas, en la naturaleza, en el caso de *Lentinula* el substrato más común es el encino. Estas especies son originarias de países de temperaturas templadas. En el caso del género *Pleurotus*, tiene una amplia variedad de substratos desde maderas de roble, aliso, maple, haya, abedul, olmo, sauce y álamo hasta subproductos agrícolas como rastrojos, pajas, pulpas y bagazos (Stamets y Chilton, 1983; Hobbs, 1995).

2.1.1.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de los basidiomicetos (Fig. 3), comienza cuando la espore liberada al ambiente, tiene contacto con un substrato con pH, temperatura y humedad adecuada para la germinación, dando origen a un micelio primario. Este micelio se conoce como homocarión, ya que sólo contiene núcleos haploides. En algunas especies sólo se encuentra un núcleo por segmento hifal, dicho micelio se denomina monocarión.

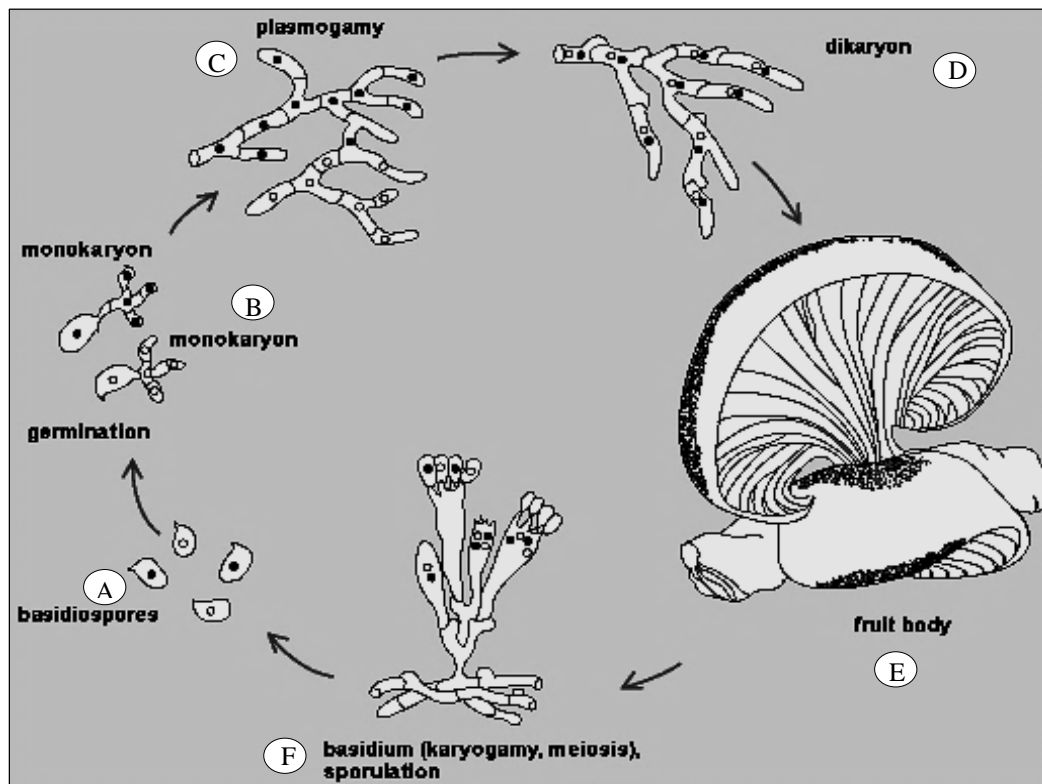


Fig. 3. Ejemplo del ciclo de vida de un basidiomiceto típico (*Pleurotus ostreatus*).

A: Basidiosporas. B: Formación del micelio monocarión. C: Fusión de micelios compatibles. D: Formación del micelio dicarión. E: Formación de basidiocarpo. F: Formación de las basidias (Martínez-Carrera, 1998).

Con la fusión de dos micelios homocarióticos compatibles se forma el micelio secundario, también llamado dicarion, el cual contiene ya dos tipos de núcleos diferentes en cada compartimento hifal. Este micelio se multiplica en forma vegetativa de manera indefinida, hasta que se presentan las condiciones favorables de temperatura, humedad, oxígeno y bióxido de carbono para la formación de los basidiocarpos (Fig. 3).

Una vez que el hongo se desarrolla y llega a la madurez, comienza una nueva liberación de esporas. Estas pueden ser diseminadas por el viento, insectos, animales y otros factores para dar origen a hifas somáticas uninucleadas. Cuando las esporas se establecen en un lugar con las condiciones necesarias para su desarrollo, de cada una de ellas sale una hifa que comienza a crecer y ramificarse (García, 2006) comenzando un nuevo ciclo de vida.

2.2. Caracterización de *Lentinula edodes*

El hongo comestible *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. es comúnmente conocido como “hongo negro del bosque”. Su nombre en chino es “shiang-gu”, y en japonés “shiitake”. Es el hongo más popularmente cultivado en países orientales como China, Japón y otros países Asiáticos (Chang y Miles, 2004).

2.2.1. El género *Lentinula*

El género *Lentinula* cuenta con 3 especies provenientes de Asia *Lentinula edodes* (Berk y Mont), *Lentinula lateritia* (Berk.) Pegler y *Lentinula novaezelandiae* (Stev.) Pegler y 4 especies originarias de América, *Lentinula boryana* (Berk & Mont) Pegler, *Lentinula guarapiensis* (Speg.) Pegler, *Lentinula raphanica* (Murrill) Mata & RH, Petersen) y *Lentinula aciculospora* Mata & R.H. Petersen. Las especies del género *Lentinula*, son especies coriáceas, con pie a menudo excéntrico láminas generalmente decurrentes y esporada blanca o blanquecina, la mayoría suelen crecer sobre madera. Actualmente, las evidencias generadas por los marcadores moleculares han ayudado a entender con mayor claridad las relaciones filogenéticas entre éstos géneros (Ulrike, 2005).

2.2.2 *Lentinula edodes*

El hongo *Lentinula edodes* (*shiitake*) tiene un sombrero convexo y abierto, casi aplanado salvo en la periferia, con diámetro de 4 a 10 cm, con color variable del ocre parduzco a pardo-rojizo; después se pone rojizo por el centro y suele agrietarse viéndose la carne más clara en el fondo. Algunos varían de rojizo a varias tonalidades de marrón blancuzco al oscuro. Los hongos más jóvenes son claros alrededor del centro, son frecuentes las escamas claras y varían en tamaño, sobre todo hacia el margen que está enrollado de joven. Debajo se observan láminas adherentes o casi libres, sinuosas, numerosas, relativamente estrechas, blancas, luego gris-parduscas pálidas y a veces con manchas pardo rojizas de viejas; con filo desigual y denticulado con la edad. En la madurez, la superficie se agrieta formando grietas radiales, cuyo interior permanece blanco. La esporada es blanca con esporas alargadas de 5.5 a 6.5 x 2.5 a 3.5 μm . El pie es a menudo excéntrico de color blanquecino por arriba y pálido y escamoso por abajo, es fibroso y se observan restos de una cortina blanca y abundante que se aprecia cuando es joven. La carne es blanquecina de sabor agradable y olor típico (Ferrán, 1969; Hobbs, 1995; García, 2006).

2.3. El cultivo de *Lentinula edodes*

El hongo *shiitake* se produce sobre madera de troncos recién cortados con la tecnología convencional. Existen diversas especies de árboles de climas templados capaces de dar producciones, entre ellos están el encino, castaño y arce (Hobbs, 1995). Para el cultivo del hongo es importante la época en la que se cortan los árboles, si la inoculación se hace en un mal momento el micelio del *shiitake* se encontrará con numerosos hongos competidores (Ferrán, 1969).

Existe confusión en la literatura de cuando fue el primer cultivo exitoso de *Lentinula edodes* (Chang y Miles, 2004). Sin embargo, actualmente *Lentinula edodes* se cultiva con dos métodos distintos, como cultivo tradicional donde taquetes de madera invadidos de micelio son inoculados en troncos recién cortados y el cultivo moderno, donde el micelio es inoculado sobre viruta o aserrín esterilizado como substrato, en bolsas de plástico. El primer tipo de cultivo se inició en la década de 1930 (García, 2006). El cultivo con la técnica de bolsas plásticas y el uso de materiales de subproducto de la industria maderera, así como subproductos agroindustriales disponibles en las regiones de cultivo, son factores que han incentivado la producción de

Lentinula en países donde antes no se realizaba dicho cultivo. Este método acelera el proceso de producción de la primera cosecha, así como el tiempo total de la producción, acortándolo desde 1.5 hasta 2 años. Sin embargo, la calidad de los hongos obtenidos por éste método es menor en comparación con los de troncos naturales, y el proceso de pasteurización y esterilizado lo convierten en un método más demandante para el productor (Chang y Miles, 2004).

2.3.1. Características nutricionales

El hongo *shiitake* tiene un valor nutricional importante, contiene proteínas (2.22-2.60% fresco y 25.9% peso seco), aminoácidos, lípidos (principalmente ácido linoleico), carbohidratos hidrosolubles (0.45-0.72 g/100 peso seco), carbohidratos totales 67.0%, fibra insoluble (41.6%), fibra soluble (3.4%), minerales (especialmente calcio), vitaminas B₂ y C. Altas cantidades de ergosterol, precursor de la vitamina D (Hobbs, 1995; Martínez-Carrera *et al.*, 2004).

Como muchos vegetales, el contenido de minerales es altamente variable dependiendo del substrato donde crece el hongo. El micelio del hongo contiene 30 tipos de enzimas y más de 10 aminoácidos, mientras que el basidiocarpo contiene todos los aminoácidos, de los cuales lisina y arginina son los más abundantes (Hobbs, 1995).

Estudios de laboratorio han encontrado que la cantidad de aminoácidos, glicógeno, lípidos, ácido ascórbico y el contenido de cenizas aumenta en los basidiocarpos maduros, los cuales alcanzan un máximo valor nutricional. Se sabe que la concentración de nutrientes es mayor en el píleo que en el estípite del hongo. El potasio se encuentra entre los elementos más abundantes, seguido del fósforo (Hobbs, 1995).

2.3.2. Propiedades medicinales

El hongo *shiitake* tiene interesantes propiedades medicinales y es apreciado por su sabor intenso, por lo que su consumo se ha extendido por América y Europa (García, 2006).

Diversas investigaciones avalan múltiples beneficios a la salud por el consumo del hongo *shiitake*, entre ellos se encuentran la estimulación del sistema inmunológico, causa efectos hipotensores, disminuye el contenido de azúcar y colesterol en sangre, tiene efectos benéficos cardiovasculares, disminuye los efectos colaterales de quimioterapias y promueve la recuperación, promueve efectos antitumorales, refuerza el sistema inmune contra el virus del VIH y otras enfermedades víricas, tiene efectos antivirales contra la gripe, reduce la inflamación

de bronquios, mejora las funciones del hígado y actúa contra infecciones bacterianas y por parásitos (Hobbs, 1995; Martínez-Carrera *et al.*, 2004).

2.4. Caracterización del género *Pleurotus*

El basidiocarpo del hongo *Pleurotus ostreatus* es carnoso, ya sea blanco, café o gris, crece en grupos en árboles caídos por todo Norte América, Asia, Europa y otros países. Se conoce generalmente como “hongo ostra”, debido a que su píleo tiene la forma de una concha, cuenta con el estípite desarrollado de forma lateral, se puede encontrar en diversas tonalidades, desde azul grisáceo, blanco, crema a café, amarillo y rosa. La intensidad de su coloración varía según los cambios ambientales como temperatura y luz. Su textura es suave y de buen sabor, tiene un olor agradable y su carne es blanca, el tallo usualmente es pequeño o no lo tiene (Fig. 2) (Hobbs, 1995; Chang y Miles, 2004).

2.4.1. Especies estudiadas del género *Pleurotus*

2.4.1.1. *Pleurotus ostreatus* CP-50

Su tamaño se encuentra en un rango de 5 a 30 cm de diámetro, su cultivo en troncos produce basidiocarpos pequeños y grandes con substratos de subproductos agrícolas. Las láminas son blancas o grises (Chang y Miles, 2004).

2.4.1.2. *Pleurotus pulmonarius* CP-267

Es un hongo de sabor agradable, es grande y blanco con un estípite delgado y casi central (Alexopolus y Mims, 1979). Se conoce como “white *Pleurotus*”, “white oyster mushroom”, se diferencia de *Pleurotus ostreatus* por ser más blanquecino (Guzmán *et al.*, 2002). Otros autores también lo describen con un estípite lateral, corto o nulo, blancuzco, vellosa, dilatado en la parte superior, cenizo o pardo. Carne blanca y suave, láminas largas, pálidas y decurrentes. Crece solo o en grupos sobre troncos, es comestible (Quélet, 1872).

2.4.2. Substratos para el cultivo de *Pleurotus*

Los hongos del género *Pleurotus* son lignocelulolíticos, y tienen la capacidad de degradar diversos substratos, entre ellos se encuentran los esquilmos y los subproductos agroindustriales.

El principal componente de los substratos son polimeros como la celulosa, hemicelulosa y lignina, éstos se degradan en formas solubles que pueden ser absorbidas por el micelio del hongo para sus diversos procesos metabólicos. Los polimeros presentes en los substratos pueden variar ampliamente en estructura y ramificaciones, las cuales deben ser degradadas por las enzimas producidas por los hongos. Se sabe que dependiendo del tipo de hongo y su capacidad de degradación del substrato se obtendrá como consecuencia un aumento en el rendimiento (Chang y Miles, 2004).

Para la adquisición de los materiales que pueden utilizarse para el cultivo de *Pleurotus* se deben tener en consideración la fácil disponibilidad en cantidad, conocer sus características fisicoquímicas, un buen precio de adquisición, de localización cercana y tener facilidad de transporte y manejo (Sánchez y Royse, 2002).

Como substrato para el cultivo se pueden utilizar esquilmos de diferentes pajas, como son: de ajonjolí, arroz, cártamo, cebada, trigo, sorgo, pulpa de café, bagazo de caña, cebada, centeno, avena, maíz, entre otros, son una buena opción para su cultivo. También se utilizan rastrojos, pulpas y bagazos de diferentes tipos, residuos forestales y de la industria papelera y textil (Guzmán *et al.*, 2002; Sánchez y Royse, 2002).

2.4.3. El cultivo de *Pleurotus*

Para el cultivo de *Pleurotus* uno de los substratos más comunes es la paja de trigo, la cual se debe picar y someterla a un remojo con agua caliente y limpia a una temperatura de entre 70° y 80°C. Los tiempos de inmersión suelen oscilar entre los 30 y 60 minutos. Posteriormente, se escurre y se enfría para su siembra en bolsas de plástico, las cuales pueden ser transparentes u oscuras y de medidas varias.

Una vez fría la paja se procede a la siembra, la cual debe realizarse en un ambiente extremadamente limpio para evitar posibles contaminaciones por mohos competidores. Una vez sembradas las bolsas se llevan a un cuarto de incubación donde se quedarán por un periodo de 15 a 20 días, tiempo suficiente para la aparición de los primeros primordios. Con la aparición de los primordios las bolsas deben pasar al área de producción, donde deberá controlarse la ventilación y riego para mantener una humedad relativa del 80%.

Una vez crecidos los hongos se procederá a la cosecha, y empaque o embalaje para su distribución y venta (Kurtzman, 2010).

2.4.4. Propiedades nutricionales

Se tiene registrado que *Pleurotus ostreatus* contiene 8 tipos de aminoácidos diferentes, así como también vitaminas B1 y B2 (Tabla 7).

Tabla 7. Características nutricionales de los hongos *Lentinula* y *Pleurotus* en 100 g (Hobbs, 1995).

Nutriente	<i>Shiitake (Lentinula edodes)</i>	“Setas” (<i>Pleurotus</i>)
Proteína	9.6-17%	10.5-30%
Carbohidratos totales	54-82%	60-81.8%
Calorías (Kcal)	296-375	80.8-367
Fibra cruda	6.5-8.5%	7.5%
Grasa total	0.6-8.0%	1-7.2%
Vitaminas (mg/100 g)		
C	40-60	36-58
Pro-vitamina D ^d (ergosterol)	0.06-0.27	0.13
Tiamina	0.07-0.4	4.8
Riboflavina	0.2-1.3	4.3-4.7
Niacina	11.9-18.9	108.7
Minerales (mg/100 g)		
Aluminio	182	-
Calcio	11-126	5-292.9
Cloro	73	-
Cobre	-	1.6
Hierro	1.7-30	5.0-19.2
Magnesio	130-247	174-292.9
Manganeso	-	1.3-36.4
Fosforo	171-650	1212-1406
Potasio	380-1530	2130-3793
Selenio (µg)	-	30.3
Silicio	262	-
Sodio	13-1079	158-837
Azufre	237	-
Zinc	-	9.1

Por otro lado, el micelio deshidratado contiene vitaminas B1, B2, B5 (niacina), B6 y B7 (biotina), así como un alto contenido de proteínas.

El hongo crecido en paja de trigo contiene 7.9% de minerales, 12.0% de fibra cruda, 4.2% de lípidos, 15.7% de proteína, y 54.4% de carbohidratos. También contiene ácidos grasos, de los cuales el principal es el oléico. Los ácidos orgánicos del hongo también incluyen ácido fórmico, málico, acético y cítrico (Hobbs, 1995).

III. Prevención, manejo y control de contaminantes en el cultivo de hongos comestibles

3.1. Cuidados esenciales para evitar contaminación en el proceso de cultivo

Para lograr obtener cosechas rentables de hongos comestibles es importante tener una serie de cuidados que eviten la entrada de plagas, enfermedades y competidores en la planta productora de hongos. El productor, frecuentemente se enfrenta a diversos problemas para controlar y manejar las plagas y enfermedades comunes en el cultivo de hongos.

Las recomendaciones (Fletcher *et al.*, 1986) a seguir como medidas de prevención de contaminantes son:

1. **Higiene de la planta.** La higiene es la recomendación de mayor importancia, es un método esencial para el control de contaminantes, y se considera la base del éxito de las otras técnicas de control. Cada parte de la planta deberá tener una limpieza periódica de pisos, mesas y utensilios. Semanalmente, se deberá tener limpieza y desinfección de paredes, ventanas, techos, anaqueles y equipo. Es recomendable colocar en la entrada de cada módulo una charola o tapete con una solución desinfectante para limpieza del calzado. Hay que desechar de la planta restos de hongos caídos después de la cosecha y restos de paja sin inocular para evitar la proliferación de contaminantes.
2. **Acceso a la planta.** El acceso debe ser controlado, evitar visitas ajenas al personal principalmente en las áreas de cultivo. A su vez, el personal que esté encargado de las áreas de preparación de substrato no deben tener acceso al área de siembra.
3. **Diseño de la planta.** El diseño de una planta productora de hongos es crucial para controlar cualquier tipo de plaga o contaminante que amenace el cultivo. La distribución de planta debe ser planeada de tal manera que haya comunicación entre las áreas de trabajo, pero que a su vez estén aisladas, evitando problemas de diseminación de contaminantes. Es de gran importancia evitar el flujo de materiales, personal y desechos desde áreas que puedan generar contaminación hacia las zonas más limpias del cultivo. Es recomendable que las áreas de tratamiento del substrato, enfriamiento y producción de los hongos sean independientes en términos del personal.
4. **Pasteurización.** El proceso de pasteurización del substrato debe llevarse a cabo con una rigurosa estandarización de la técnica, respetando los tiempos y temperaturas adecuadas para asegurar la eliminación de competidores presentes en el substrato.

5. **Filtración de aire.** Es recomendable tener un sistema de filtración de aire, el cual disminuirá la presencia de paquetes de esporas de hongos competidores que puedan llegar a establecerse en el cultivo.
6. **Extracción de aire.** Este sistema de intercambio de aire disminuirá la concentración de esporas producidas por los hongos comestibles, las cuales se tiene registrado que pueden llegar a causar alergias en la salud de trabajadores hipersensibles.
7. **Revisiones periódicas.** Deben monitorearse periódicamente las partes de la planta donde pudiera llegar a surgir algún foco de contaminación o plaga. Es importante la revisión en el área de producción, donde pueda encontrarse algún indicio de contaminación y resolverlo de manera temprana para evitar diseminación y poner en riesgo toda la producción. También deben revisarse con periodicidad las áreas de almacenamiento de paja para controlar en lo más posible la proliferación de ratones. En caso de existir túneles de ventilación deben limpiarse periódicamente para evitar la acumulación y distribución de polvo.
8. **Personal.** Cada trabajador, deberá realizar sus actividades asignadas con equipo y ropa limpia, y tratar de concientizarlo de las graves consecuencias de un mal manejo en el proceso a su cargo para el cultivo, responsabilizándolos así de su zona de trabajo. En plantas de cultivo grandes vale la pena contratar personal capacitado cuya actividad exclusiva sea detectar y eliminar plagas y enfermedades de manera temprana.
9. **Desinfectantes.** Es esencial el uso de diferentes desinfectantes para eliminar o prevenir contaminantes ya que algunos son particularmente efectivos en contra de algunos tipos de microorganismos. Sin embargo, hay que tener cuidado en su aplicación, ya que pueden llegar a ser nocivos para el buen desarrollo del cultivo.

3.2. Principales plagas y enfermedades en el cultivo de hongos comestibles

Existe una amplia gama de factores que pueden intervenir en los diversos pasos del cultivo de los hongos comestibles. Entre los más comunes se encuentran la aparición de insectos, nemátodos, bacterias y mohos dentro de la planta de cultivo (Oei, 1991). Se deben tomar medidas precautorias para cada uno de estos casos.

3.2.1. Insectos

Uno de los insectos más comunes que se presentan en el cultivo de hongos es una especie de mosca del género *Lycoriella* (Tabla 8), la cual podemos encontrar en su hábitat natural cerca de diversas especies de hongos silvestres, ya que los utiliza para depositar sus huevecillos. Estos insectos tienen una amplia distribución geográfica, ya que es posible localizarlos tanto en cultivos de *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula* en México. Se desarrollan más frecuentemente en la etapa de incubación, ya que al entrar en la bolsa dejan sus huevecillos dentro y las larvas se alimentan del micelio. En la etapa de fructificación, las larvas penetran los hongos y forman túneles, lo cual disminuye la aceptación comercial de los hongos.

Las moscas son pequeñas de 3 a 4 mm de largo, su ciclo de vida se desarrolla en un período entre 2 a 3 semanas. Las bolsas de micelio contaminado se observan con escaso crecimiento, granos de inóculo desnudo y abundantes puntos negros, las cuales deben desecharse inmediatamente (Fletcher *et al.*, 1986).

Tabla 8. Principales insectos que atacan en el cultivo de hongos comestibles (Stamets y Chilton, 1983).

Insectos		
Nombre común	Géneros y especies	Cultivos afectados
Mosca de los hongos	<i>Lycoriella</i>	<i>Pleurotus</i> y <i>Lentinula edodes</i>
Otra mosca de hongos	<i>Megselia</i>	<i>Pleurotus</i>
Mosca del vinagre	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diversos cultivos En substratos fermentados
Catarinas	<i>Mycotretus</i> <i>Pseudyschirus</i>	Diversos cultivos
Escarabajos	Fam. Scolytidae	<i>Lentinula edodes</i>
Cécidos	<i>Heteropeza pigmaea</i>	Diversos cultivos
Mosca grande	<i>Lycoriella solani</i> <i>L. mali</i> <i>L. auripila</i>	<i>Agaricus</i>

Los daños ocasionados por estos insectos varían desde la reducción del rendimiento debido a la pérdida de micelio hasta la decoloración y mutilación de los hongos que fueron atacados por los insectos (Fletcher *et al.*, 1986). Como medida precautoria, en las ventanas, deben colocarse marcos con malla antiáfida, ya que el mosquitero común no las detiene debido a su tamaño. Existen otros tipos de insectos que pueden atacar los cultivos (Tabla 8), los cuales podrán o no estar presentes dependiendo en parte del clima y la zona donde se establezca la planta productora.

3.2.2. Bacterias

Las bacterias son cosmopolitas, por lo que están presentes a lo largo de todo el proceso de producción (Tabla 9). Se propagan por aire, agua, insectos o utensilios sucios. Para evitar su desarrollo, es recomendable tener cuidado en mantener los tiempos de esterilización y presión indicados ya que algunas pueden llegar a sobrevivir hasta los 80 °C. El material esterilizado debe ser manipulado correctamente para evitar su posterior contaminación; deben evitarse corrientes de aire no filtrado. El material contaminado debe desecharse lo más pronto posible lejos de las instalaciones de la planta, así como lavar material y equipo después de ser utilizado.

Tabla 9. Bacterias que atacan en el cultivo de hongos comestibles (Stamets y Chilton, 1983).

Bacterias		
Géneros	Especies	Cultivos afectados
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas tolasii</i>	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Psilocybe</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pleurotus</i> spp. y <i>Volvariella</i> , <i>Lentinula edodes</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Lentinula edodes</i>
<i>Rickettsia</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Lentinula edodes</i>
Actinomicetos	<i>Actinomyces bovis</i> <i>A. israelii</i>	Diversos cultivos
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. megaterium</i>	Diversos cultivos
<i>Clostridium</i>	<i>C. botulinum</i>	Diversos cultivos

Algunas enfermedades como el “goteo de láminas” y la “momificación” son producidas por bacterias u organismos similares presentes en el micelio, algunas bacterias causan decoloraciones y deformaciones. Existen algunas bacterias presentes en el micelio que no causan síntomas hasta la producción del basidiocarpo (Fletcher, 1986).

En la etapa de producción (Tabla 9), debe evitarse el exceso de humedad en los hongos, ya que promueven la proliferación de bacterias en los basidiocarpos (Guzmán *et al.*, 2002).

Los síntomas observados en basidiocarpos afectados por bacterias van desde manchas de color amarillo, beige o naranja hasta causar deformidad de los hongos desde los primordios, así como también la superficie del hongo tendrá una apariencia viscosa y desprenderá un olor desagradable.

3.2.3. Roedores

Las ratas y ratones son atraídos usualmente por la paja, la cual contaminan antes de ser utilizada para el cultivo. Están presentes en plantas de cultivo expuestas al campo abierto o en construcciones rústicas donde la paja está expuesta. Es importante controlar estas poblaciones para evitar una plaga, el método recomendado son las trampas ya que los venenos pueden ser diseminados por los mismos roedores dentro de la planta.

3.2.4. Mohos

Los mohos son competidores del sustrato donde se desarrolla el cultivo del hongo comestible, se diseminan fácilmente por una mala pasteurización del sustrato o contaminantes externos. Su rápido crecimiento es influenciado por la humedad y temperatura del proceso del cultivo del mismo hongo comestible. Son de diversos tipos y llegan a producir pudrición, deformación y desecación de basidiocarpos, así como la muerte del micelio. La mayoría de los mohos que atacan al cultivo de hongos comestibles (Tabla 10) producen la pudrición del sustrato, esta pudrición puede llegar a ser blanda provocadas por *Mycogone pemiciosa* Magn. o pudrición seca provocada por *Verticillium* spp.; también se han observado desecaciones por *Fusarium oxysporum* Schl.; y colonias mohosas con diversas tonalidades, desde pardas, verdes y amarillentas (*Botrytis* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., y *Myceliophthora* spp., respectivamente). Todas estas enfermedades atacan al micelio (parte vegetativa), deformando y destruyendo los basidiocarpos (Oei, 1991).

Tabla 10. Mohos que atacan en el cultivo de hongos comestibles (Stamets y Chilton, 1983).

Mohos		
Nombre común	Géneros y especies	Cultivos afectados
Moho verde	<i>Trichoderma aggressivum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. harzanum</i> , <i>T. aureoviride</i> , <i>T. koenigii</i> y <i>T. pseudokoenigii</i>	<i>Pleurotus</i> y <i>Lentinula edodes</i>
Moho azul-gris	<i>Penicillium chermesinum</i>	<i>Pleurotus</i> spp.
<i>Hypoxylon</i>	<i>Hypoxylon truncatum</i>	<i>Lentinula edodes</i>
<i>Gliocadium</i>	<i>Gliocadium</i> , <i>G. deliquescens</i>	<i>Lentinula edodes</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> y <i>A. flavus</i>	Diversos cultivos
<i>Neurospora</i>	<i>N. crassa</i>	Diversos cultivos
<i>Mycogone</i>	<i>M. pernicioso</i>	<i>Pleurotus</i> spp.
<i>Coprinus</i>	<i>C. lagopus</i>	<i>Pleurotus</i> spp. y <i>Volvariella volvacea</i>

Continúa...

<i>Didymocladium</i>	<i>D. ternatum</i>	<i>Lentinula edodes</i>
Moho amarillo	<i>Sepedonium</i>	Diversos cultivos
Levadura negra	<i>Torula nigra</i>	Diversos cultivos
Moho rosa	<i>Trichotecium roseum</i>	Diversos cultivos

3.2.5. El “moho verde” del género *Trichoderma*

Dentro del grupo de mohos que se presentan en las plantas productoras de hongos comestibles usualmente se observan manchas de color verde ocasionadas por mohos en la superficie del substrato y en la base del pie de los hongos. Es muy común encontrarlo en el compost y en menor grado en granos almacenados. Suele tratarse de hongos del género *Trichoderma* que acidifican el substrato y dificultan el crecimiento del micelio, disminuyendo la producción. El hongo *Trichoderma* suele parasitar a hongos cultivados y tiene la capacidad de inhibir y/o reducir las fructificaciones. *Trichoderma* es un hongo muy extendido que suele dar problemas en el cultivo de cualquier especie de hongos comestibles. Suele aparecer como un moho que primero es blanco, pero en un lapso de 2 a 9 días, cambia su color a verde debido a las esporas. Crece bien en un rango entre 22° y 27°C y su crecimiento se ve favorecido por diversos factores como son: una humedad mayor al 70% en el compost o substrato ya preparado, por un pH menor de 6 y por un compost con poco N, así como demasiados carbohidratos disponibles y una relación C/N de 22-23.

Otro problema de la contaminación del substrato por *Trichoderma* es que sus esporas son alimento de ácaros, los cuales son otra forma de dispersión de las mismas esporas que se adhieren a los ácaros al estar en contacto con ellos. Así mismo, si no hay un control en la contaminación del *Trichoderma*, habrá una plaga de ácaros que se reproducirá rápidamente agravando el problema (Stamets, 2000; Przybylowics y Donoghue, 1990).

Diversas especies de *Trichoderma* crecen en madera o tejidos leñosos, son abundantes en la turba y se encuentran frecuentemente en los cajones de madera o bolsas de plástico que contienen el compost o substrato para el cultivo de hongos comestibles.

Este moho es un contaminante que se disemina a través del aire, si existen puntos de contaminación en el lugar de cultivo puede ser dispersado fácilmente durante la cosecha, la limpieza de las camas de substrato, las ropas de los trabajadores o a través del sistema de ventilación.

Las especies de este género generalmente prefieren un pH ácido con un rango de 4 a 5.5. Entre las medidas de control para evitar su dispersión, se llevan a cabo diversos procedimientos, como son: una colecta cuidadosa de la cosecha, desechar los hongos muertos y enfermos, regular los niveles de humedad y disminuir la concentración de CO₂ aumentando la circulación de aire para eliminar paquetes de esporas suspendidos en el aire. También deben utilizarse los utensilios limpios para la elaboración del substrato como ayuda para disminuir la incidencia de contaminación por *Trichoderma* (Stamets y Chilton, 1983).

Entre los diversos estudios que se han realizado para el control del “moho verde” en el cultivo de los hongos comestibles se encuentran el control ambiental y un estricto manejo de los factores físicos. Sin embargo, la presencia del *Trichoderma* persiste en diversos lugares, causando daño a cultivos de hongos comestibles alrededor del mundo (Stamets, 2000; Przybylowics y Donoghue, 1990).

3.2.5.1. Biología del género *Trichoderma*

Al género *Trichoderma* se le conoce comúnmente como “moho verde” del bosque, “moho verde” y manchas de *Trichoderma*. La raíz griega de la especie proviene de “trichos” que significa peludo y “derma” que significa piel (Stamets y Chilton, 1983). Pertenece al grupo de los ascomicetos, los cuales integran el mayor número de especies del reino de los hongos. Entre los ascomicetos podemos encontrar las levaduras y los mildius pulverulentos, diversos mohos negros y mohos verde-azulados, así como también colmenillas y trufas.

Algunos miembros de los ascomicetos son fitopatógenos; otros son productores de micotoxinas, pero también se encuentran algunos que son fuente de antibióticos. Sus hifas están divididas por paredes transversales o septos, cada sección entre septos generalmente contiene un núcleo, pero los septos tienen poros a través de los cuales el citoplasma y los núcleos pueden moverse. El ciclo de vida de un ascomiceto incluye tanto la reproducción asexual como la sexual, las esporas asexuales se forman aisladas, o en cadenas, en el ápice de una hifa especializada. Se caracterizan por ser muy pequeñas y numerosas, y se les denomina conidios, (del griego konis: "polvo").

La reproducción sexual en los ascomicetos implica la formación de un pequeño saco llamado asca. En la mayoría de los ascomicetos, las ascas se forman en estructuras llamadas

ascocarpos. Cuando el hongo llega a la madurez, las ascas se vuelven turgentes y estallan liberando a las ascosporas explosivamente al aire.

3.2.5.2. Clasificación

La palabra “moho” se refiere a cualquier hongo que produce esporas de manera asexual por mitosis; esto se conoce como el estado anamorfo. Algunos de estos mohos están clasificados dentro de los deuteromicetos, una categoría reservada para hongos de los cuales no es conocido su estado sexual. Muchos mohos son el estado asexual de miembros del phylum Ascomycota, de los cuales se conoce el estado sexual (meiótico, teleomorfo) donde las ascosporas se producen internamente en el asca. Para cambiar la clasificación de un hongo de los deuteromicetos a los ascomicetos, sólo debe encontrarse la fase sexual y unir ambos. El hongo *Trichoderma* está ubicado en dos clasificaciones, la primera (Tabla 11), lo ubica en el grupo de los Ascomicetos (Przybylowicz y Donoghue, 1990), la segunda en el grupo de los Deuteromicetos (Stamets y Chilton, 1983). En el presente trabajo se aplica la primera clasificación.

Tabla 11. Clasificación del género *Trichoderma* (Przybylowicz y Donoghue, 1990).

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
División	Ascomycetes
Clase	Hongos Imperfectos
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

3.2.5.3. Hábitat

Al hongo *Trichoderma*, es común encontrarlo en el compost, en granos almacenados y cultivos masivos con residuos agro-industriales (Stamets y Chilton, 1983).

3.3. El “moho verde” como competidor en el cultivo de hongos comestibles

Trichoderma cuenta con una alta eficiencia competitiva y adaptación a diferentes substratos (Mohammed *et al.*, 2004), la cual resulta ser negativa para el crecimiento micelial de los hongos comestibles desde la etapa de incubación.

El micelio de *Trichoderma* produce una amplia variedad de enzimas, incluyendo celulasas y quitinasas que degradan celulosa y quitina, respectivamente. Debido a esto, *Trichoderma* puede crecer directamente sobre la madera, la cual está compuesta principalmente por lignocelulosa. También, debido a su producción de quitinasas puede parasitar a otros hongos como lo hace con hongos fitopatógenos, ya que las paredes celulares de los hongos están compuestas de quitina. Tiene la capacidad de atacar a hongos macromicetos desde su fase de micelio hasta los basidiocarpos, debido a esto, es particularmente un problema en el cultivo industrial de hongos comestibles. La contaminación por *Trichoderma* en el cultivo de hongos comestibles es comúnmente conocida como el “moho verde”.

En el cultivo industrial de hongos comestibles es frecuente encontrar diferentes especies y cepas del género *Trichoderma*, algunas de ellas son inofensivas, en cambio otras son muy agresivas y por tanto dañinas. Sin embargo, su relación antagónica aún no es completamente conocida y varía entre especies y cepas. Las especies más conocidas asociadas al cultivo de hongos comestibles son *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma pseudokoningii*. Las esporas se dispersan por diversos vectores, entre ellos: aire, insectos, se adhieren a la ropa del personal o equipo utilizado en la planta. En general, los hongos cultivados son más susceptibles cuando *Trichoderma* se establece antes de la propagación del micelio del hongo cultivado. Su proliferación y establecimiento se acentúa cuando se presentan condiciones de humedad relativa arriba del 90%, después de haber cambiado las condiciones ideales de crecimiento, como son cambios en la temperatura, humedades extremas, luz directa, substratos mal preparados, una mala pasteurización, un pH inadecuado del substrato y/o bajos niveles de nitrógeno.

Cuando un basidiocarpo es parasitado, se observan sobre él manchas verdes causadas por *Trichoderma* creciendo en su superficie. Cuando el hongo comestible es parasitado en la etapa de micelio, la capacidad de crecimiento del hongo cultivado es severamente inhibida, debido a que el moho lo debilita y se beneficia de las exoenzimas secretadas para degradar el substrato. Cuando las camas de substrato del hongo comestible *Agaricus bisporus* (champiñón) son infestadas con *Trichoderma*, las áreas invadidas dejan de ser productivas, lo que ocasiona pérdidas serias en la producción. Se encuentra usualmente en el compost, formando manchas verdes en la superficie del compost o directamente sobre los basidiocarpos. Se caracteriza por el crecimiento de un micelio blanco y denso, seguido por una esporulación verde extensa, lo que

ocasiona la formación de manchas extendidas sobre el sustrato. Las pérdidas en producción ocasionadas por *Trichoderma* son variables, y afecta desde cultivos de *Agaricus*, hasta cultivos de *Lentinula* y *Pleurotus*.

3.4. Caracterización de *Trichoderma aggressivum*

Dentro de la amplia diversidad de cepas que existen dentro del género *Trichoderma*, se encuentran aquellas asociadas a los sustratos de los hongos comestibles. Algunas de ellas son altamente agresivas y competitivas con el micelio de los hongos cultivados, dichas cepas ocasionaron serios daños en cultivos y provocaron fuertes pérdidas económicas en plantas de cultivo de Irlanda, en 1985. A partir de ahí la enfermedad se convirtió en epidemia propagándose hacia Inglaterra, Escocia y posteriormente a diversas zonas de Norte América y España. En todos estos casos el hongo coloniza el compost ocasionando la pérdida de la producción, la cual se tiene registrado que ha sido desde un 30% hasta un 100%.

A mediados de los años ochenta se asoció la epidemia con la cepa clasificada como *Trichoderma harzianum* Rifai, sin embargo, estudios genéticos han demostrado que existen cuatro biotipos genéticamente diferentes de esta cepa llamados Th1, Th2, Th3 y Th4, todos ellos asociados a los locales de cultivo de hongos comestibles. Los biotipos Th1 (*Trichoderma harzianum*) y Th3 (*Trichoderma atroviride*) se han clasificado como inofensivos en el cultivo de hongos, o al menos no son responsables de cuantiosas pérdidas en la producción. En cambio, los biotipos agresivos se clasificaron como Th2 (*Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*) y Th4 (*Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*), los cuales están asociados directamente a las pérdidas económicas del cultivo de hongos comestibles (Samuels *et al.*, 2002).

Trichoderma harzianum. Incluye el ex-neotipo de la cepa *Trichoderma harzianum*, así como el ex-tipo *Trichoderma inhamatum*. Este grupo también incluye las cepas utilizadas para el control biológico contra hongos fitopatógenos. Ninguna de las cepas de este biotipo causa pérdidas considerables en el cultivo de hongos comestibles a pesar de poder estar presente en las plantas productoras, por lo que no son responsables de las epidemias por el “moho verde” registradas en la literatura en el cultivo de hongos comestibles.

El biotipo Th1, es una cepa de rápido crecimiento y crece bien en temperaturas altas. Los conidios se observan con un crecimiento denso y forman anillos concéntricos hacia el borde, no

forma pústulas, su crecimiento colonial primero es color amarillo, transformándose a un color verde amarillento, produce un color amarillento difundido en el medio. Según estudios de biología molecular, éste biotipo es el ancestro filogenético más reciente de los biotipos agresivos Th2 y Th4 (Samuels *et al.*, 2002; Chang y Miles, 2004).

Trichoderma aggressivum f. europaeum. Crece a una temperatura óptima de 25-30°C, se pueden observar apariencias diversas en la colonia, con micelio aéreo algodonoso, los conidios se forman tanto en medio como alrededor del margen, no hay tendencia a formar pústulas, ni existen pigmentos amarillos. Este biotipo es una cepa agresiva de rápido crecimiento originaria de Europa, fue la responsable de grandes pérdidas de producción en las Islas Británicas (Samuels *et al.*, 2002; Chang y Miles, 2004).

Trichoderma atroviridae. Se caracteriza por ser de lento crecimiento a 35 °C en medio PDA, forma conidios en medio de la colonia dispersos de manera uniforme, no se observa la formación de pústulas. Se observan conidios con formas subglobosas a ovoides con clamidosporas abundantes (Samuels *et al.*, 2002).

Trichoderma aggressivum f. aggressivum. Es la cepa más rápida en crecimiento sobre medio de cultivo con una temperatura de 25 a 30 °C, con una formación restringida de conidios al centro, así como una línea marginal de color verde adyacente al plástico de la caja petri. La cantidad de conidios puede variar según el medio de cultivo utilizado para su crecimiento, no se observa un color amarillento difuso en el medio. La formación de los conidios comienza con un anillo de pústulas blancas que después se tornan de color verde. El desarrollo de este biotipo Th4 es el responsable de la epidemia del moho verde en Pensilvania (Samuels *et al.*, 2002; Chang y Miles, 2004).

3.4.1. Fungicidas

Para el control del *Trichoderma*, la mayoría de los estudios coinciden en la aplicación de algún fungicida preventivo en el sustrato e indicaciones de asepsia en el proceso del cultivo. Se deben desinfectar las superficies con formalina al 2% o con fungicidas indicados contra *Dactylium*. El fungicida benomyl puede aplicarse de 40 a 80 mg por kg de sustrato como

preventivo, pero el moho contaminante suele hacerse resistente (García, 2003). Este fungicida debe manejarse con precaución y siguiendo las indicaciones de uso. Actualmente, su uso es cada vez menor ya que se considera tóxico y es nocivo para la salud.

También se utilizan diferentes productos menos tóxicos para el control del *Trichoderma* como son el hipoclorito de sodio, formol comercial y cal en diferentes concentraciones (Tu y Liao, 1989; Przybylowicz y Donoghue, 1990).

A pesar de que los productos químicos logran ser efectivos en el control de plagas, no se recomienda su uso debido a que en el caso de los hongos comestibles se presentan como un alimento orgánico con propiedades nutricionales y medicinales peculiares, motivo por el cual son más atractivos para su consumo (Martínez-Carrera *et al.*, 2004).

IV. Potencial de los extractos vegetales y sus propiedades antifúngicas

4.1 Los extractos vegetales como alternativa en el control de enfermedades

Desde tiempos ancestrales se han generado conocimientos sobre los recursos naturales, en particular sobre el uso de plantas con fines curativos y preventivos de enfermedades. Usualmente, los campesinos tienen acceso a una gran diversidad de plantas de acuerdo a las características ecológicas de la zona, de las cuales conocen sus usos y aplicaciones.

Los principios activos de las plantas promueven una acción integral, cada una de ellas tiene diversas propiedades que pueden ser utilizadas en nuestro beneficio. El interés por el uso de las plantas se ha mantenido por generaciones y se ha incrementado debido a la versatilidad de sus aplicaciones y usos. El conocimiento adquirido de estas plantas se va transmitiendo de generación en generación, donde se intercambia la información de forma detallada sobre preparaciones y usos de cada una de ellas, hasta formar un acervo del uso tradicional de plantas con propiedades curativas.

Actualmente, existe información especializada de expertos que se encuentra a disposición de la población para favorecer la recuperación y producción de especies de plantas investigadas con propiedades benéficas (Figuroa y Martínez, 2004).

Las plantas contienen metabolitos secundarios los cuales han revolucionado la medicina, por lo que la etnobotánica y la fitoterapia están tomando una importancia relevante en el mundo actual, tanto en el ámbito de la medicina aplicada así como en la investigación experimental (Martínez, 2000). Se sabe que los extractos vegetales son una opción viable para el control y la prevención contra organismos patógenos, esto se aplica desde su uso en la medicina tradicional hasta en agricultura, ya que son una fuente abundante de compuestos bioquímicos con actividad contra bacterias, hongos e insectos (Rodríguez y Lira, 2006).

Existen muy pocas referencias del uso de extractos vegetales con propiedades antifúngicas dirigidas para el control de mohos contaminantes en el cultivo de hongos comestibles. Se han realizado algunos ensayos con resultados interesantes de inhibición, donde en una sola aplicación de extractos la contaminación de *Verticillium fungicola* se vió reducida hasta en un 77%, un resultado aún mayor que el obtenido con el control fungicida Sporgon con un 73% (Baars *et al.*, 2008).

4.1.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios forman parte de los compuestos químicos de los cuales están compuestas todas las plantas. Aún no se conoce bien la función de todos estos compuestos, incluso los presentes en la amplia variedad de alimentos de origen vegetal que consumimos de manera cotidiana. No se sabe que alguno de ellos sea esencial para la vida a pesar de ser comunes en diversas plantas. Algunos de ellos se clasifican como productos de desecho o productos de excreción y se sabe que algunos son peligrosos si se consumen en altas concentraciones, los cuales son llamados tóxicos naturales. Si estos compuestos se sometieran a evaluaciones de toxicidad es probable que fueran calificados como peligrosos. Esto hace que el consumo de éste tipo de sustancias sea considerado tan bajo como sea posible, a pesar de estar presentes de manera natural algunos de los alimentos (Astiasarán *et al.*, 2003; Izco *et al.*, 2004).

A pesar de lo anterior, está demostrado que a mayor consumo de frutas y verduras se disminuye el riesgo de padecer diversas enfermedades de gran importancia para la sociedad incluyendo el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Aunque los nutrientes que aportan estos alimentos, como son los carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas están presentes en otras fuentes alimenticias, los metabolitos secundarios sólo son aportados por las plantas (Fig. 4). Esto hace pensar que sean estos compuestos los que de alguna manera estén implicados en el efecto positivo de los alimentos sobre la salud.

Los metabolitos secundarios se forman dentro de las plantas a partir de adaptaciones de su sistema de defensa contra diversos microorganismos, así como también como una respuesta en contra de herbívoros, disuasión de insectos, atracción de insectos polinizadores, adaptaciones a diferentes situaciones climáticas como en zonas desérticas, etc. (Izco *et al.*, 2004).

Por otro lado, es difícil comparar la cantidad de metabolitos secundarios presentes entre los productos orgánicos y los cultivados con agroquímicos de manera convencional, ya que se ha observado que las diferencias nutricionales entre cultivos son mayores dependiendo de las condiciones de producción para un mismo cultivo. A pesar de ello, se estima que los niveles de metabolitos secundarios en los vegetales orgánicos son del 10% al 50% mayor que en los mismos vegetales obtenidos de manera convencional (Astiasarán *et al.*, 2003).

Se ha observado que la única diferencia significativa en la composición de los alimentos vegetales orgánicos frente a los convencionales se encuentra en el contenido de metabolitos relacionados con el sistema de defensa de las plantas. Si estos compuestos tuvieran una función

importante desde el punto de vista nutricional, y si las diferencias en su contenido pueden ser consideradas desde el punto de vista funcional, se podría afirmar que la agricultura orgánica si tiene ventajas saludables frente a la tradicional (Astiasarán *et al.*, 2003).

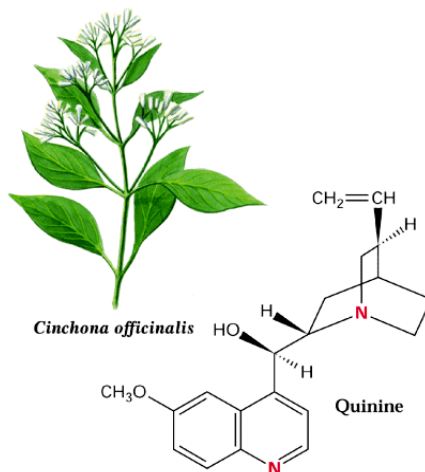


Fig. 4. Planta del Quino (*Cinchona officinalis*), árbol del cual se obtiene la quinina, con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas (Anaya, 2003).

Los metabolitos secundarios pueden llegar a ser tóxicos para las mismas plantas que los producen, debido a esto las plantas han evolucionado de tal forma que han desarrollado estrategias diversas para mantenerlos alejados de zonas con importancia metabólica. Entre estas estrategias se encuentran el inactivar los metabolitos o volverlos inocuos por combinación con diferentes tipos de radicales o por la formación de polímeros. Otras estrategias importantes de aislamiento es el almacenarlos en vacuolas, depositarlos en células muertas como cortezas, espacios intercelulares o en pelos glandulares de la superficie de las plantas y/o descargarlos al exterior. Si la planta almacena este tipo de metabolitos usualmente los utiliza como repelentes de herbívoros o microorganismos patógenos, al ser liberados también pueden inhibir a diversos competidores de su alrededor. Este tipo de estrategias ayuda a la planta a no autointoxicarse con este tipo de metabolitos, así como también adquiere un sistema de defensa contra herbívoros y patógenos; a su vez puede lograr una manipulación de su entorno inhibiendo potenciales competidores o atrayendo organismos benéficos.

La liberación al medio de estos compuestos alelopáticos ocurre a través de diversos medios, como son la volatilización a través de las hojas, lixiviación o lavado por lluvia, niebla o

rocío, exudación a través de las raíces y por liberación en los restos orgánicos y su posterior descomposición por los microorganismos.

Todos estos compuestos al ser liberados a la atmósfera y son absorbidos por plantas vecinas o retenidos por partículas del suelo donde tienen contacto directo con raíces de plantas o con microorganismos (Anaya, 2003).

4.1.2. Alelopatía

El fenómeno de alelopatía es una interacción de compuestos bioquímicos producidos por las plantas que tienen la capacidad de beneficiar o perjudicar a otras plantas y microorganismos. En 1996 en el primer congreso mundial de alelopatía se concluyó que la definición correcta de alelopatía se refiere a: “Cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, algas, bacterias, virus y hongos, que influyan sobre el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos, ya sea con efectos positivos o negativos” (Anaya, 2003; Lux-Endrich y Hock, 2005).

El fenómeno de alelopatía es un proceso de gran complejidad dentro del área de la ecología química y comienza con la liberación de compuestos químicos en el medio circundante de la planta, desde las raíces hasta las hojas y flores. Estos compuestos causan un efecto positivo o negativo en los organismos que la rodean y que comparten un mismo hábitat, desde microorganismos, otras plantas, insectos y otros tipos de animales. Este tipo de compuestos son tan variados que incluyen diferentes tipos de repelentes que pueden ser tóxicos para algunos organismos o simplemente disuasivos para otros, atrayentes de polinizadores o simplemente inocuos. Los procesos alelopáticos de las plantas son altamente complicados debido a que deben considerarse varios aspectos en el proceso, desde la diversidad de la naturaleza química de las sustancias que están siendo involucradas hasta la complejidad de las reacciones en las cuales intervienen. En la actualidad se requieren de bioensayos específicos para conocer su origen y efecto en los organismos determinados (Anaya, 2003). Para evaluar un proceso alelopático, se deben tener en cuenta dos cuestiones, la primera será demostrar que la planta en cuestión contiene un inhibidor, así como también dilucidar el mecanismo por el cual libera sus fitotoxinas al ambiente. Esto nos lleva a definir como se transporta la fitotoxina dentro del medio y cómo se acumula dentro del ambiente del organismo que inhibe, ya sea planta, microorganismo o animal. Se sabe que la distribución de estos compuestos dentro de las comunidades vegetales puede ser

un factor limitante para la distribución de las especies, influyendo en el crecimiento y salud de cualquier comunidad natural, artificial o manipulada.

Entre los diversos tipos de interacciones alelopáticas se pueden encontrar diversos compuestos clasificados según su efecto en diversas comunidades. Entre estos compuestos se encuentran las kolinas, las cuales están involucradas en efectos alelopáticos entre plantas superiores. También se encuentran las fitoncidas las cuales son producidas por plantas y afectan a microorganismos, las marasminas que son producidas por microorganismos y afectan a las plantas y los antibióticos producidos por microorganismos e involucrados en efectos alelopáticos entre ellos (Anaya, 2003). Los compuestos alelopáticos también pueden ser clasificados según su estructura química como son: ácidos orgánicos solubles en agua, alcoholes de cadena lineal, aldehídos alifáticos, quetonas, lactonas simples insaturadas, ácidos grasos de cadena larga y poliactenos, naftoquinonas, antraquinonas, fenoles simples, ácido benzoico y sus derivados, ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, flavonoides, taninos, terpenoides y esteroides, aminoácidos y polipéptidos, alcaloides y cianohidrininas, sulfuros y glicósidos de aceite de mostaza, purinas y nucleósidos (Lux-Endrich y Hock, 2005). El modo de acción de estos compuestos alelopáticos puede variar según el compuesto, sin embargo, se sabe de diferentes sitios y procesos de ataque, los cuales incluyen: aspectos estructurales sobre la integridad y permeabilidad de la membrana, aspectos citológicos y ultraestructurales. También pueden generar cambios bioquímicos, como son: influyen en la síntesis de proteínas, síntesis de leghemoglobina y fijación de nitrógeno, interfieren en la actividad enzimática específica, y en la síntesis de pigmentos. También pueden influir en aspectos fisiológicos como la germinación de granos de polen y esporas, producción y balance de fitohormonas, respiración, relaciones hídricas en plantas, absorción de minerales, fotosíntesis, y cambio en el comportamiento de los estomas. Se sabe que el aleloquímico cumarina producido por las Rutaceas, tiene la capacidad de inhibir el ciclo celular y/o promover la senescencia en los tejidos (Lux-Endrich y Hock, 2005).

Debido a que estos compuestos son producidos por las plantas como un sistema de defensa, son utilizados por ellas de manera natural contra diversas plagas. Estos compuestos también son aprovechados por el hombre para su beneficio ya que algunos contienen propiedades curativas. Algunos de estos usos se observan en la Tabla 12.

Tabla 12. Listado de algunas plantas con propiedades alelopáticas y su uso en la medicina tradicional.

Nombre científico	Nombre común	Propiedades	Referencia
<i>Chrysanthemum</i>	Crisantemo	Protección contra diversas plagas	Cotton, 1996.
<i>Azadirachta indica</i>	Neem	Protección contra diversas plagas	Cotton, 1996.
<i>Malaleuca alternifolia</i>	-	Para tratamiento de cortadas y heridas; aceite con actividad de amplio espectro antimicrobiano; usado como antiséptico	Cotton, 1996.
<i>Tagetes erecta</i>	Flor de muerto	Para tratamiento de infecciones en piel	García y Vázquez, 2002.
<i>Citrus cinensis</i>	Naranja agrio	Para tratamiento de infecciones en mucosas	García y Vázquez, 2002.
<i>Solanum</i>	Puxte, Sosa	Contra hongos y heridas	García y Vázquez, 2002.
<i>Artemisa ludoviciana</i> subsp. <i>Mexicana</i>	Estafiate	Contra hongos en la piel	García y Vázquez, 2002.
<i>Diospyros digyna</i>	Zapote negro	Contra la sarna y hongos en la piel	García y Vázquez, 2002.
<i>Cestrum nocturnum</i>	Huele de noche	Contra hongos	Hernández-Albiter <i>et al.</i> , 2007.
<i>Allium cepa</i>	Cebolla	Propiedades antibióticas	García y Vázquez, 2002.
<i>Allium sativum</i>	Ajo	Propiedades antibióticas y fungicidas	García y Vázquez, 2002; Mahmoud <i>et al.</i> , 2004.
<i>Artemisa absintium</i>	Ajenjo	Propiedades antifúngicas	Figuroa y Martínez, 2004.
<i>Cymbopogon citratus</i>	Té limón	Propiedades antisépticas	Hernández-Albiter <i>et al.</i> , 2007.
<i>Psidium guajava</i>	Guayaba	Propiedades antimicrobianas	García y Vázquez, 2002; Hernández-Albiter <i>et al.</i> , 2007.
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalipto	Propiedades fungicidas	Pinto <i>et al.</i> , 1998; Mahmoud <i>et al.</i> , 2004.
<i>Ipomea carnea</i>		Propiedades fungicidas	Mahmoud <i>et al.</i> , 2004.
<i>Flourensia cernua</i>		Propiedades fungistáticas	Guerrero <i>et al.</i> , 2007.
<i>Larrea tridentata</i>		Propiedades fungicidas	Suárez-Jiménez <i>et al.</i> , 2007.
<i>Annona cherimola</i>	Chirimoya	Propiedades fungicidas	Hernández-Albiter <i>et al.</i> , 2007.
<i>Olea europea</i>	Olivo	Hipertensión, vasodilatador, diurético, espasmolítico	Salazar, 2008.
<i>Coriandrum sativum</i>	Cilantro	Antihelmíntico, antifúngico, antibacterial, analgésico, antiespasmódico, entre otros	Salazar, 2008.
<i>Teloxys ambrosioides</i>	Epazote	Infecciones intestinales y parásitos	Salazar, 2008.
<i>Ruta chalepensis</i>	Ruda	Infecciones intestinales y parásitos	Salazar, 2008.
<i>Aloe vera</i>	Sábila	Propiedades antifúngicas e infecciones contra hongos en la piel	Zapata <i>et al.</i> , 2013; Nidiry <i>et al.</i> , 2011; Narváez y Martínez, 2004.

4.1.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son ricos en terpenoides y monoterpenoides, están presentes en las plantas aromáticas y pueden tener una liberación continua a la atmósfera, entre ellos podemos encontrar al alcanfor, canfeno y cineol, los cuales tienen un efecto inhibitorio sobre otras plantas. A pesar de que diversas plantas aromáticas pueden expresar propiedades antifúngicas y antimicrobianas por volatilización de sus compuestos, no todas las plantas aromáticas deben clasificarse como alelopáticas. Diversas especies de la familia Brassicaceae (Cruciferae) también han sido reportadas como plantas con propiedades antifúngicas y antimicrobianas, como la col (*Brassica oleraceae*) y el nabo (*Brassica campestris*), este tipo de plantas producen glucosinalatos que no tienen efectos autotóxicos, sin embargo, cuando se hidrolizan forman isotiocianatos que si tienen propiedades tóxicas, los cuales en su estructura contienen glucosa, nitrógeno y azufre. Estos compuestos están estrechamente relacionados con los glucósidos cianogénicos y están presentes en diversas familias de plantas, entre ellas plantas comestibles comunes como la col, el brócoli y el nabo (Anaya, 2003).

4.1.4. Propiedades antifúngicas de las plantas

La diversidad de sistemas de hojas y raíces de diferentes plantas han sido explotadas particularmente en la agricultura tradicional, ya que son una herramienta para el control biológico contra ciertos patógenos. Entre los patógenos más comunes se encuentran los hongos, los cuales están bien adaptados para utilizar una amplia variedad de sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, debido a esto surge la dificultad que presenta su control (Davicino *et al.*, 2007).

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales está directamente asociada a la presencia de los metabolitos secundarios, por lo que las plantas son una fuente importante de nuevas moléculas biológicamente activas. Entre los metabolitos secundarios existen algunos que presentan actividad antifúngica, entre los compuestos más conocidos con estas propiedades se encuentran los flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, entre otros (Davicino *et al.*, 2007).

Se sabe que en algunas ocasiones la acumulación de los metabolitos secundarios en las plantas disminuye su calidad nutricional o se vuelven tóxicas para parásitos potenciales o competidores. Este es el caso de las plantas aromáticas, cuyos aceites volátiles han demostrado

una actividad biocida contra un amplio rango de bacterias, hongos, insectos y otras plantas, mientras que ciertos alcaloides con características psicoactivas han inducido comportamientos agresivos en animales experimentales (Deans y Waterman, 1993).

El efecto de la fracción fenólica de aceites esenciales de diversas plantas aromáticas ha mostrado ser tóxica contra algunos hongos filamentosos, entre ellos se encuentran: *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici*. Los aceites esenciales combinados de *Ocimum canum*, *Chenopodium ambrosioides* y *Limpia alba* se tiene registrado que son tóxicos contra un amplio rango de hongos fitopatógenos, entre los que se encuentran *R. solana*, *Alternaria solana*, *A. alternaria*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum* (Zapata *et al.*, 2003). Se sabe también que extractos metanólicos de *B. glutinosa* y *L. tridentata* tienen un efecto inhibitorio mayor al 92% en germinación de esporas y mayor al 90% en la velocidad de crecimiento radial del hongo *Fusarium verticillioides*. Dichos extractos se consideran una fuente de productos naturales alternativos y efectivos para el control de *F. verticillioides* en sus diferentes fases de crecimiento, germinación de esporas y la velocidad de crecimiento micelial (Suárez-Jiménez *et al.*, 2007).

Se sabe que el extracto de la planta *Larrea divaricata*, tiene efectos inhibitorios sobre la velocidad de crecimiento de los hongos como *Saccharomyces cereviceae*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* en concentraciones de 2.5, 20 y 120 mg/ml, respectivamente, no así en la velocidad de crecimiento del hongo *Penicillium notatum*. La comprensión de los mecanismos de inhibición de los extractos vegetales podrían encaminar las investigaciones hacia la obtención de productos biofungicidas provenientes de diversos tipos de plantas (Davicino *et al.*, 2007).

Dentro de las plantas de uso común y de amplia disponibilidad, se sabe que contienen diversos compuestos químicos ya identificados con propiedades antifúngicas (Tabla 13). Estas plantas fueron consideradas para la realización del presente trabajo.

Tabla 13. Plantas de uso común con propiedades antifúngicas.

Nombre científico	Nombre común	Compuesto antifúngico	Hongo inhibido	Referencia
<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla blanca	Allicin, tiosulfatos, saponinas, flavonoides	<i>Aspergillus niger</i>	García y Vázquez, 2002; Irkin y Korukluoglu, 2007; Lanzotti, 2006.
<i>Allium sativum</i> L.	Ajo	Ajoene, saponinas, flavonoides	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium culmorum</i> ,	García y Vázquez, 2002; Mahmoud <i>et al.</i> , 2004; Irkin y Korukluoglu, 2007; Lanzotti, 2006.
<i>Tagetes lucida</i> Cv.	Cempasúchil	Umbeliferona, scoparona, coumarinas y flavonoides	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	García y Vázquez, 2002; Céspedes <i>et al.</i> , 2006.
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	Carvacrol, thymol	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. solani</i> , <i>Botrytis</i> sp., <i>Fusarium culmorum</i>	Vellunti <i>et al.</i> , 2003; García-Camarillo <i>et al.</i> , 2006; Kordali <i>et al.</i> , 2008.
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	Thymol, carvacrol	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Lizcano, 2007; Tajkarimi <i>et al.</i> , 2010.
<i>Flourensia cernua</i> L.	Hoja sen	Componentes – α pinene, β -eudesmol y 3- δ -carene	<i>Colletotrichum gloesporoides</i> , <i>C. accutatum</i> , <i>C. fragariae</i>	Guerrero <i>et al.</i> , 2007; Téllez <i>et al.</i> , 2001.
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>	Col	Sulfuros, disulfuros, mercaptanos	<i>Botrytis alli</i> , <i>Colleotrichum circinans</i> , <i>C. gloesporoides</i>	Pinto <i>et al.</i> , 1998; Anaya, 2003; Hernández, <i>et al.</i> , 2007.
<i>Ruta graveolens</i> L.	Ruda	Coumarinas	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Phomopsis viticola</i>	Oliva <i>et al.</i> , 1999; Ojala <i>et al.</i> , 2000.
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Sábila	Aloine, aloe-emodin	<i>P. digitatum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. italicum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>F. solani</i> , <i>C. capsici</i> , <i>C. gloesporoides</i>	Zapata <i>et al.</i> , 2013; Nidiry <i>et al.</i> , 2011; Saks y Barkai-Golan, 1995; Reynolds and Dweck, 1999.
<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla morada	Aceites esenciales	<i>F. oxysporum</i>	Benkeblia, 2004.

En el caso de la col (*Brassica oleraceae*) se han encontrado más de 20 compuestos volátiles con azufre, dentro de los cuales contienen isotiocianatos, sulfuros, disulfuros, trisulfuros y mercaptanos. Estos compuestos son tóxicos para algunos hongos filamentosos como *Colleotrichum circinans* y *Botrytis alli*, así como también los mercaptanos previenen la germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* y los isotiocianatos inhiben el crecimiento del micelio, la formación, germinación y movilidad de las zoosporas del hongo *Aphanomyces euteiches* (Anaya, 2003).

4.2. Extractos y preparados vegetales

Los extractos son productos a base de sustancias producidas por las plantas, su eficacia depende de muchos factores, es por ello que los resultados pueden ser variables en función a la calidad de la planta de la cual se extrae la sustancia, así como también del proceso de extracción y el tipo de solvente utilizado.

4.2.1. Preparación tradicional de extractos

Las propiedades benéficas de las plantas pueden ser obtenidas a partir de metodologías sencillas, las cuales se preparan como bebidas o infusiones.

4.2.1.1. Fermentación

Se colocan las partes de las plantas en un saco permeable, dentro de un recipiente con agua. Se cubre dejando circular el aire y removiéndose diariamente. Está listo en una o dos semanas cuando deja de fermentar, se aplica diluido.

4.2.1.2. Infusión

Es una forma sencilla de preparar extractos a partir de hojas, tallos y las flores de las plantas; puede ser con un solo tipo de hierba o de varias. Se vierte agua hirviendo sobre las plantas frescas o secas dejándolas reposar por 24 h.

4.2.1.3. Esencias

Se obtienen a partir de la extracción de los aceites esenciales, se seleccionan plantas con compuestos aromáticos, las partes que se desean procesar se ponen a hervir en agua, se recoge el

vapor con una campana de extracción y al pasar por un alambique se irá concentrando. Mediante decantación podemos separar el aceite esencial del agua.

4.2.1.4. Cocimientos

A partir de las partes más duras de la planta como raíces, ramas, cortezas y bayas, se colocan en agua fría y se calientan hasta que empiece a hervir. Las partes utilizadas deben cortarse en trozos pequeños antes de cocer, como medicinal el té puede beberse frío o caliente (Figuroa y Martínez, 2004). Para uso agrícola, los extractos pueden tener propiedades repelentes, las plantas de ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) producen sustancias que repelen a las plagas, la cola de caballo o las ortigas confieren fortaleza a la planta frente al ataque de hongos o insectos, o al ataque de plantas venenosas como el tanaceto, el ajeno, la cuasia, el neem, etc. El aceite vegetal, como el de menta, de pino, de alcaravea, o de diversas plantas puede usarse como, insecticida, fungicida, acaricida o inhibidor de la germinación de algunas semillas. También tienen efectos físicos sobre los patógenos, ya que actúan por asfixia al cubrir la piel por donde respiran diversos insectos, pueden tener efectos fitotóxicos contra otras plantas, aunque en menor grado que los aceites minerales (Rosellói, 2006).

4.2.2. Métodos de extracción en laboratorio

Para llevar a cabo un proceso de extracción de compuestos de interés, usualmente se encuentran distribuidos entre una fase sólida y una líquida. Estos procedimientos usualmente se utilizan para obtener extractos de productos vegetales. Para obtener los compuestos solubles de un sólido se emplean diferentes métodos.

4.2.2.1. Maceración

Primero, un material sólido y seco, se pone en contacto con un disolvente orgánico en frío con el fin de lograr que los compuestos de interés del sólido pasen a la fase líquida, se deja reposar por 24 h, se filtra y se repite este proceso de tres a cuatro veces. Es conveniente iniciar este proceso con los disolventes que tengan una polaridad afin a los compuestos de interés, así como un menor punto de ebullición, con la finalidad de evitar modificaciones estructurales de los productos que habrán de separarse. Se destila el disolvente y se recuperan los productos deseados. Para realizar la extracción debe haber un contacto superficial directo entre ambas fases

y es conveniente que el sólido este finamente fraccionado o molido y que el proceso de extracción se repita varias veces para incrementar su eficiencia. Es un procedimiento rápido pero requiere un volumen grande de disolvente (Valencia, 1995; Figueroa y Martínez, 2004).

4.2.2.2. Soxhlet

Cuando se realiza este tipo de extracción, suelen utilizarse aparatos de extracción continua o semicontinua que optimizan la extracción con un mínimo de disolvente. El equipo de extracción soxhlet está diseñado para realizar extracciones a partir de mezclas sólidas diversas. En este tipo de extracción se utiliza el disolvente caliente por lo que es importante no extraer compuestos termolábiles ya que se desnaturalizarán y perderán su función. El equipo está conformado por un refrigerante, una cámara de extracción y un matríz de bola de fondo plano, el cual contendrá el solvente y estará depositado sobre una parrilla de calentamiento. El solvente del matríz se calienta hasta su punto de ebullición, el cual se evapora y se condensa en el refrigerante, el solvente cae sobre la muestra contenida en un sobre de papel filtro dentro de la cámara de extracción. La cámara comienza a llenarse hasta la parte superior del sifón, donde fluye hacia el matríz que contiene el disolvente. La muestra es lavada repetidas veces por el solvente dejando en el matríz los compuestos solubles en el solvente (Valencia, 1995).

V. Problema de investigación

La forma más utilizada de prevención, manejo y control del “moho verde” (*Trichoderma*) es el uso de fungicidas comerciales, entre ellos se encuentran el benomil y carbendazim, los cuales al utilizarlos por períodos prolongados promueven que los organismos patógenos o competidores desarrollen resistencia a dichos productos químicos y ocasionan efectos dañinos a la salud (Kredics, 2010). Actualmente, existe una tendencia mundial por el consumo de alimentos libres de agroquímicos, por lo que la obtención de alimentos cultivados con productos naturales con propiedades antifúngicas de efecto diferenciado es una alternativa libre de agroquímicos. El uso de plantas con propiedades antifúngicas diferenciadas e inócuas para el consumo humano, son alternativas con un gran potencial que pueden colaborar en el manejo, control y prevención del *Trichoderma* en el cultivo rural e industrial de hongos comestibles.

Los problemas de contaminación por el “moho verde” *Trichoderma*, competidor y parásito de los hongos comestibles, han sido de gran importancia para los productores, ya que su aparición en las plantas de cultivo reduce los rendimientos en la producción de manera importante. Como consecuencia, esto ha provocado grandes pérdidas económicas a los productores alrededor del mundo, siendo en la actualidad una enfermedad frecuente y difícil de manejar y controlar. Estos problemas de contaminación suelen estar relacionados con un mal manejo en los procesos de cultivo, desde una deficiente pasteurización del substrato hasta la falta de limpieza de cuartos y utensilios utilizados en la producción. Cuando una mancha de *Trichoderma* es localizada en el cuarto de cultivo, rápidamente puede ser diseminada a través del sistema de ventilación, las ropas de los trabajadores, o algún insecto presente que llegue a tener contacto con las esporas. Para evitar estas contaminaciones dentro de la planta, actualmente se toman medidas de prevención, manejo y control constante principalmente de higiene, temperatura, humedad ambiental, limpieza de utensilios y adecuada ventilación en los cuartos de producción. Además de los cuidados ya mencionados de acceso y diseño de la planta, pasteurización adecuada y filtración de aire, así como capacitación del personal y uso de desinfectantes.

A pesar de existir diversos productos de origen natural dirigidos al combate de microorganismos nocivos en el campo, no existen investigaciones ni productos disponibles de

esta naturaleza específicos para el combate de “mohos verdes” competidores en el cultivo de hongos comestibles. Asimismo, las pérdidas económicas ocasionadas por el ataque de *Trichoderma* en la producción comercial de hongos comestibles en México son significativas, sobre todo en productores rurales. En el presente trabajo de investigación, se estudió el efecto de diversos extractos vegetales seleccionados con propiedades antifúngicas en la velocidad de crecimiento micelial y producción de esporas de diversas cepas de *Trichoderma*. Asimismo, se obtuvieron extractos con propiedades antifúngicas diferenciadas que inhiben el desarrollo de *Trichoderma*, sin afectar significativamente la velocidad de crecimiento de los hongos comestibles evaluados.

VI. Hipótesis y objetivos

6.1. Hipótesis general

Los extractos de algunas plantas medicinales tienen propiedades antifúngicas diferenciadas que inhiben la velocidad de crecimiento micelial y la producción de esporas del “moho verde” *Trichoderma*, y estimulan el crecimiento micelial de los hongos comestibles *Lentinula* y *Pleurotus*.

6.1.1. Hipótesis particulares

1. Existen plantas medicinales con propiedades antifúngicas capaces de inhibir la velocidad de crecimiento micelial, la producción y germinación de esporas del moho verde *Trichoderma* y que, a su vez, permiten el crecimiento micelial de los hongos comestibles *Lentinula* y *Pleurotus*.
2. Algunos extractos no tendrán un efecto negativo en el desarrollo de los basidiocarpos de los hongos comestibles en cultivo experimental.
3. A partir de los resultados obtenidos se podrá proponer una estrategia sugerida para la prevención, manejo y control de la velocidad de crecimiento micelial del “moho verde” *Trichoderma* con potencial de aplicación en la producción de hongos comestibles.

6.2. Objetivo general

Evaluar diversos extractos vegetales con propiedades antifúngicas diferenciadas para la prevención, manejo y control de la velocidad de crecimiento micelial y la producción de esporas del “moho verde” (*Trichoderma*) en el cultivo de los hongos comestibles (*Lentinula*, *Pleurotus*).

6.2.1. Objetivos particulares

1. Evaluar los extractos vegetales seleccionados en la inhibición de la velocidad de crecimiento micelial, la producción y germinación de esporas de cepas de *Trichoderma*, sin afectar de manera significativa el desarrollo micelial de las cepas de hongos comestibles *Lentinula* y *Pleurotus*.
2. Analizar el efecto de los extractos vegetales seleccionados en el cultivo experimental de los hongos comestibles como estrategia de control del “moho verde” (*Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*).
3. Desarrollar una estrategia de prevención, manejo y control del “moho verde” con potencial de aplicación en la producción de hongos comestibles.

VII. Materiales y métodos

7.1. Material biológico

Para las pruebas de propiedades antifúngicas de los extractos, se seleccionaron diversos “mohos verdes” del género *Trichoderma*, así como tres especies de hongos comestibles (Tabla 14), provenientes de la colección del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla* (Sobal *et al.*, 2007).

Tabla 14. Selección de cepas de *Trichoderma* y hongos comestibles utilizadas en la evaluación de diversos extractos vegetales.

Registro	Especie	Origen del aislamiento	Procedencia
CPM-109	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> Samuels & W. Gam	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal, Xalapa, Ver.
CPM-110	<i>Trichoderma koningii</i> Oud	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal Xalapa, Ver.
CPM-111	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> Samuels & W. Gam	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal Xalapa, Ver.
CPM-112	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> Samuels & W. Gam	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal Xalapa, Ver.
CPM-113	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> Samuels & W. Gam	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal, Xalapa, Ver.
CP-50	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm	Híbrido	Cepa comestible comercial
CP-267	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quéf	Colección, UANL	Cepa nativa comestible, Nuevo León, México
CP-7	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler		Hong Kong

CP=Colegio de Postgraduados. CPM=Colegio de Postgraduados sección competidores.

7.1.1 Medios de cultivo

Las cepas de hongos comestibles se crecieron en medio de cultivo de agar con extracto de malta (EMA), marca Difco, en tanto que para las cepas de mohos *Trichoderma* se empleó medio de cultivo de agar con dextrosa y papa (PDA), marca Bioxon.

7.2. Procedencia del material vegetal

Con base en las propiedades antifúngicas ya documentadas por diversos autores (García-Camarillo *et al.*, 2006; Lizcano, 2007; Guerrero *et al.*, 2007; Jasso de Rodríguez *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 1998; Oliva *et al.*, 1999; Saks y Barkai-Golan, 1995; Reynolds y Dweck, 1999;

Benkeblia, 2004), se realizó una selección de plantas con base en sus propiedades, comestibilidad y fácilmente cultivables.

7.2.1 Preselección de plantas

Se comenzó por una preselección de plantas en el del Jardín Etnobotánico Francisco Peláez R. de San Andrés Cholula, Puebla (Tabla 15), (<http://jardinetnobotanico.org/site/>). Las plantas se obtuvieron en fresco, cultivadas en maceta con suelo de compost, elaborado en el mismo lugar, libres de plagas y cualquier tipo de enfermedad (Fig 5). En el caso de la planta hoja sen (*Flourensia cernua* L.), se adquirió de forma deshidratada, ya que es una especie arbórea y la parte vegetal utilizada fueron las vainas. El diagrama de la metodología seguida en esta investigación para la técnica de sensidiscos se muestra en la figura 6.

Tabla 15. Selección de plantas con propiedades antifúngicas demostradas, nombre común y la parte utilizada para este estudio.

Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada	Referencia
<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla blanca	Hojas, bulbo, flor	García y Vázquez, 2002.
<i>Allium sativum</i> L.	Ajo	Hojas, bulbo	García y Vázquez, 2002; Mahmoud <i>et al.</i> , 2004.
<i>Tagetes lucida</i> Cv.	Cempasúchil	Hojas, tallos	García y Vázquez, 2002; Céspedes <i>et al.</i> , 2006.
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	Hojas, tallos	Vellunti <i>et al.</i> , 2003; García-Camarillo <i>et al.</i> , 2006.
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	Hojas, tallos	Lizcano, 2007.
<i>Flourensia cernua</i> L.	Hoja sen	Vainas	Guerrero <i>et al.</i> , 2007; Jasso de Rodríguez <i>et al.</i> , 2007.
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Capitata</i>	Col	Hojas	Pinto <i>et al.</i> , 1998.
<i>Ruta graveolens</i> L.	Ruda	Ramas, hojas	Oliva <i>et al.</i> , 1999.
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Sábila	Hojas	Saks y Barkai-Golan, 1995; Reynolds and Dweck, 1999.
<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla morada	Bulbo	Benkeblia, 2004.

Las plantas cebolla (*Allium cepa*), Ajo (*Allium sativum*), cempasúchil (*Tagetes lucida*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) se adquirieron frescas en maceta, cultivadas en condiciones de invernadero con suelo de compost (Fig. 5). En el caso de la col (*Brassica oleracea*) se adquirió de un predio cultivado sin agroquímicos a cielo abierto, propiedad del Jardín Etnobotánico. En cuanto a las vainas de hoja sen (*Flourensia cernua*), se adquirieron ya deshidratadas en la tienda Rosmarinus, ubicada dentro del Jardín Etnobotánico.

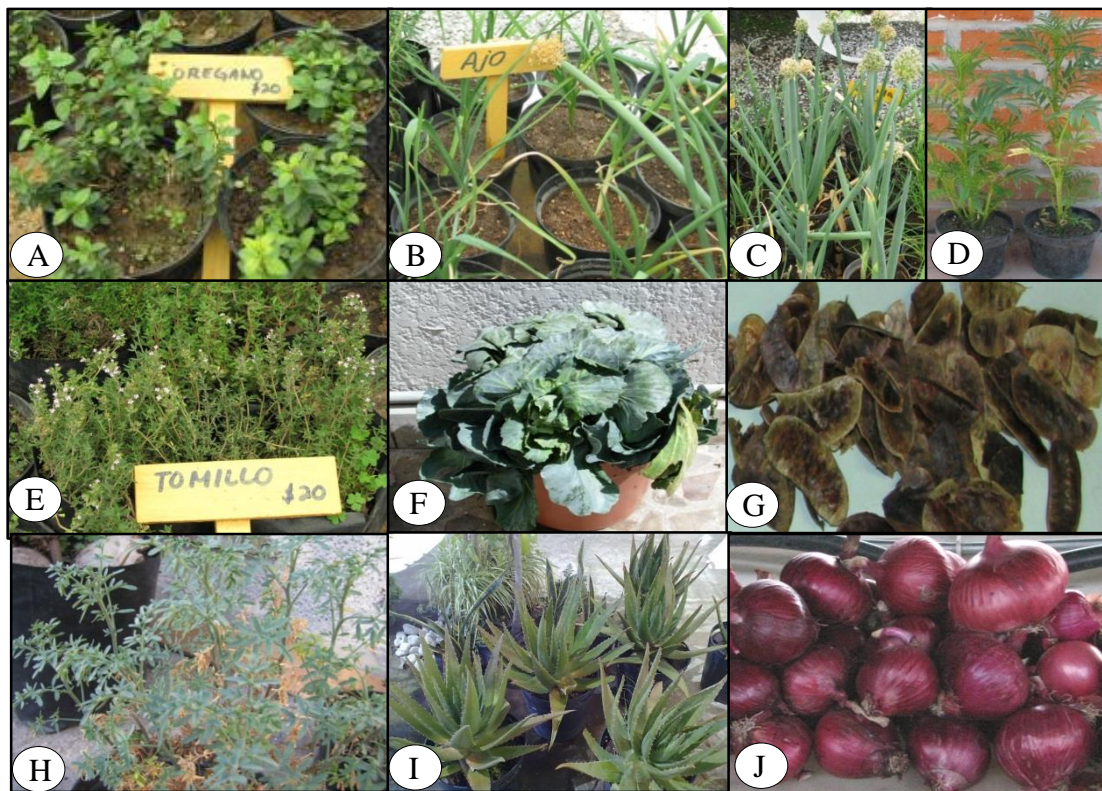


Fig. 5. Imágenes de las plantas con propiedades antifúngicas utilizadas en este trabajo. A: Orégano (*Origanum vulgare*). B: Ajo (*Allium sativum*). C: Cebolla blanca (*Allium cepa*). D: Cempasúchil (*Tagetes lucida*). E: Tomillo (*Thymus vulgaris*). F: Col (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), G: Hoja sen (*Flourensia cernua*). H: Ruda (*Ruta graveolens*). I: Sábila (*Aloe vera*) y J: Cebolla morada (*Allium cepa*).

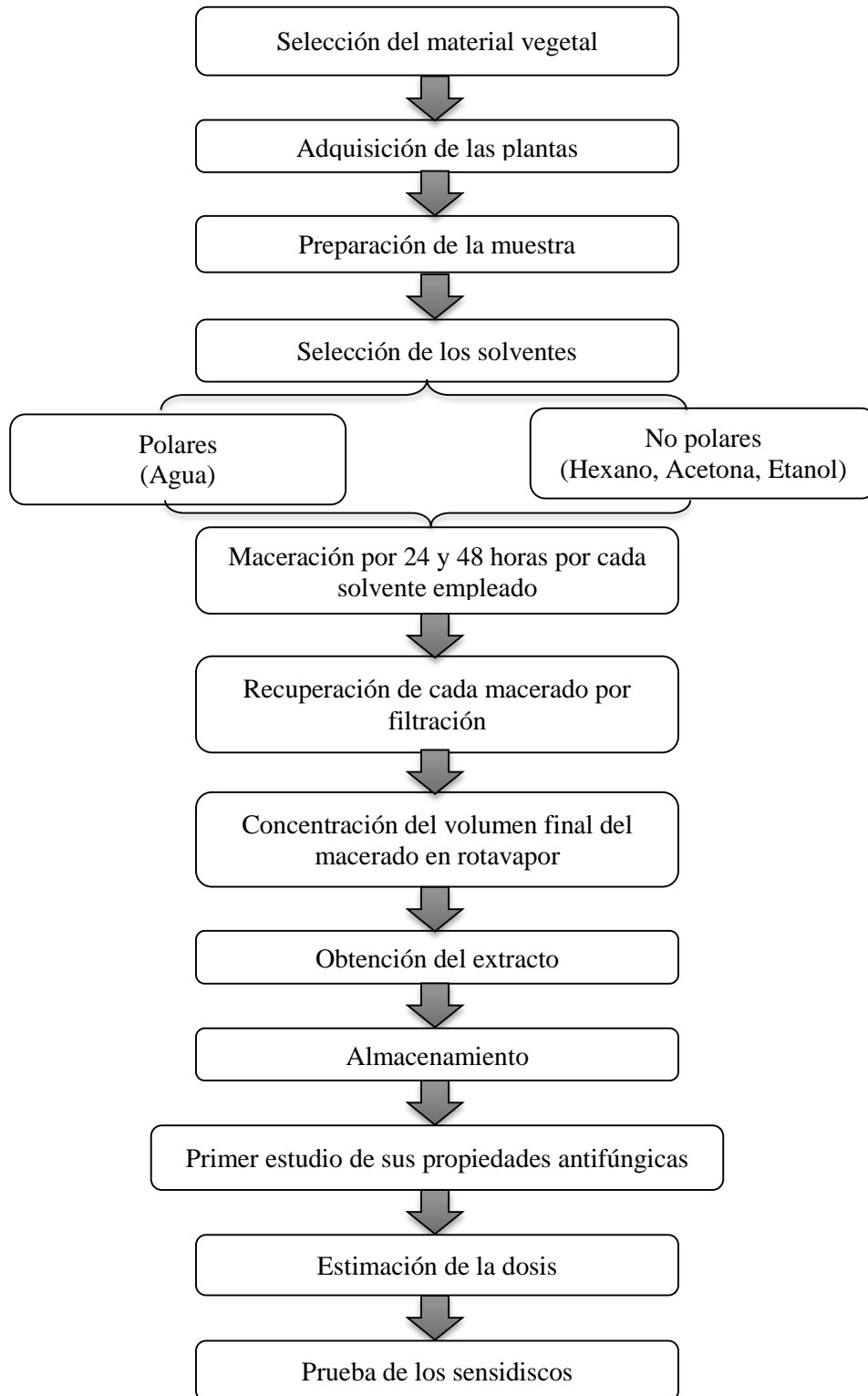


Fig 6. Diagrama de flujo de la metodología para la prueba de los sensidiscos (Experimento 1).

7.2.2 Cebolla morada (*Allium cepa*) cultivada en campo

Para las pruebas antifúngicas independientes y diferenciadas en medio de cultivo y substrato sólido, el material vegetal se obtuvo de la comunidad de San Cristóbal Hidalgo, en el municipio de Acatzingo, Puebla. El material fue proporcionado por el Sr. Raúl Barrales Álvarez, productor de cebolla de la región. El tipo de cebolla utilizada fue la morada llamada de tipo “Matahari”, cultivada desde almácigo con semilla proveniente de Estados Unidos (Fig. 5). La edad del cultivo fue de 7 meses, cosechada en el mes de agosto del 2011.

7.2.3 Sábila (*Aloe vera*) proveniente de Atlixco, Puebla

Para las pruebas antifúngicas independientes y diferenciadas en medio de cultivo y substrato sólido el material vegetal se obtuvo del vivero “Bulbos, Flores y Plantas de Atlixco” ubicado en el municipio de Atlixco, Puebla. Las plantas son originarias de Tepoztlán, en el Estado de Morelos, la edad de las plantas adquiridas fue de 2 años y 3 meses, con flores de color amarillo y crecimiento en maceta con suelo de compost (Fig. 5).

7.3. Procesamiento del material vegetal

7.3.1 Preselección de plantas procedentes del Jardín Etnobotánico

Una vez adquirido el material vegetal se procesó en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala-UNAM, bajo la asesoría y dirección del Dr. José Guillermo Ávila Acevedo.

Se obtuvo el peso fresco de cada planta y con ayuda de tijeras se fraccionó cortando hojas y ramas juntas en trozos de 10 cm de largo, aproximadamente. En el caso de las plantas de cebolla (*Allium cepa*) y ajo (*Allium sativum*), antes de pesarlas, se limpiaron con un paño seco para eliminar restos de tierra y posibles insectos. Posteriormente, se separaron los catáfilos para una deshidratación más eficiente. Todo el material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente promedio de 28°C, a la sombra, en un lugar ventilado, por 7 días.

7.3.2 Manejo de la cebolla morada

A partir de 10 kg frescos de cebolla morada (*Allium cepa*), se inició el proceso de deshidratación del material. Los bulbos se separaron de las hojas y se partieron en cuartos, se separaron los catáfilos y se esparcieron en una superficie de vidrio. Se colocaron ventiladores

para acelerar el proceso de deshidratado del material, por un periodo de 15 días a la sombra, en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del *Campus Puebla*, a una temperatura promedio de 28°C.

7.3.3 Manejo de la sábila

Se procesaron 15 kg frescos de sábila (*Aloe vera*), iniciando con la deshidratación del material. Las hojas más maduras fueron cortadas desde su base con navaja, se limpiaron con trapo húmedo para eliminar tierra y posibles insectos. Las hojas se cortaron de manera transversal en cortes de aproximadamente 3 mm de grosor y se esparcieron en una superficie de vidrio desinfectado con alcohol. Se colocó un ventilador para acelerar el deshidratado del material por un período de 48 h, a la sombra, a temperatura ambiente (28 °C). Una vez deshidratado se separó de la superficie de vidrio con navaja para recuperar la mayor cantidad de material posible.

7.4. Obtención de los extractos con diversos solventes

7.4.1. Selección de los solventes

Para la realización de estos extractos se utilizaron de manera consecutiva los solventes hexano, acetona y etanol para la misma muestra vegetal. El objetivo de utilizar diversos solventes fue el obtener las fracciones de los compuestos no polares (hexano), y de polaridad intermedia (acetona y etanol). Esto se realizó para fraccionar los compuestos presentes en cada planta y facilitar el análisis de posibles resultados positivos.

Se utilizó la técnica de maceración, la cual consistió en pesar el material vegetal deshidratado y cortarlo en trozos pequeños de aproximadamente medio centímetro. Se colocaron en matraces de bola con fondo plano de 250 ml y se agregaron 150 ml de solvente hasta cubrir la muestra; se dejó en maceración (reposo) por 24 h (Fig. 7). Posteriormente, el macerado se filtró con papel filtro Wathman No. 40 y se concentró en un rotavapor marca Heidolph Laborota 4000 efficient, WBeco, a 100 rpm., en un rango de temperatura de 40° a 60 °C según el solvente empleado. Se agregaron nuevamente 150 ml del solvente y se dejó reposar por otras 24 h para extraer la mayor cantidad de extracto de la muestra. El extracto final obtenido del rotavapor se llevó a sequedad a temperatura ambiente, con ayuda de un ventilador para acelerar la

evaporación. Una vez deshidratados los extractos, se recuperaron y almacenaron en frascos ámbar a 4°C hasta su uso.

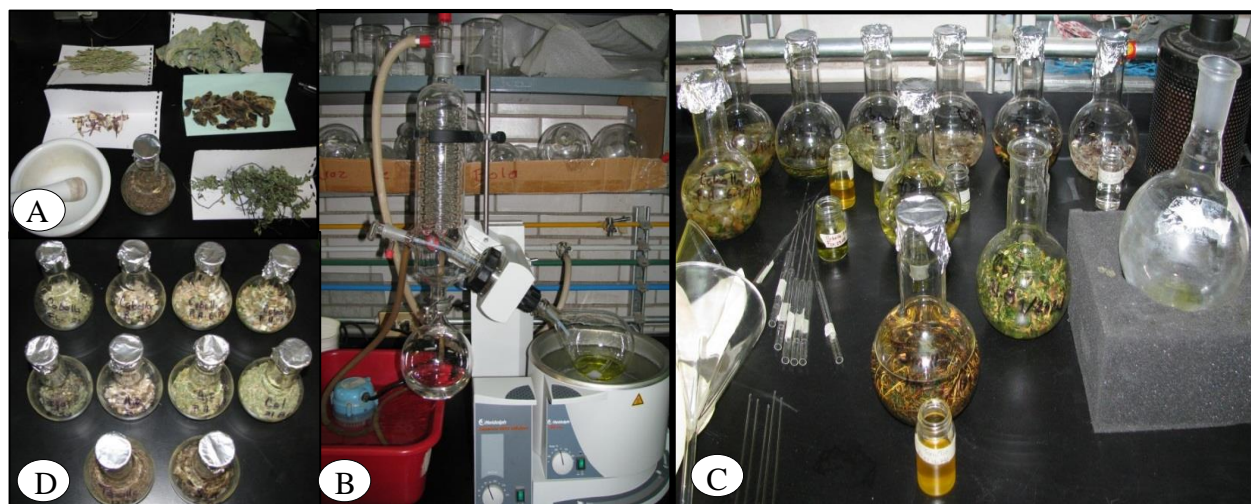


Fig. 7. Metodología de extracción por maceración con solventes consecutivos de hexano, acetona, etanol y agua. A: Material deshidratado a la sombra por 7 días. B: Filtrado y evaporación en un rotavapor con vacío. C: Cada extracto se colocó en viales para su evaporación final. D: El material se cortó en trozos de 0.5 cm y se colocó en matraces de 250 ml.

7.4.2. Extractos acuosos

Para la realización de los extractos acuosos se utilizó la técnica de molido en mortero con la muestra vegetal fresca (Dere *et al.*, 1998), con una relación de 15 ml de agua por gramo de planta en fresco. Se pesó un gramo de planta en fresco, se enjuagó con agua destilada estéril para disminuir posibles contaminaciones por bacterias, se maceró en mortero con 15 ml de agua destilada estéril y se homogenizó en Vortex a 1000 rpm por un minuto. Posteriormente, se filtró con papel filtro Whatman no. 40, se recuperó el material vegetal. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Se redujo la cantidad de agua con evaporación a baja temperatura en una parrilla de calentamiento a menos de 40°C, con la ayuda de un ventilador para acelerar el proceso.

7.4.3. Elaboración de sensidiscos

Para la elaboración de los sensidiscos se cortaron discos de papel filtro wathman del No. 40 con 0.5 cm de diámetro con ayuda de una perforadora y se esterizaron en autoclave a 121°C por 20 min. Se impregnaron con la dosis calculada de extracto y se colocaron sobre el medio de cultivo (Fig. 8).

7.4.4. Estimación de la dosis para la prueba en sensidiscos

Cada extracto fue resuspendido con el solvente correspondiente a su proceso de extracción hasta disolverlo para tomar la alícuota de 20 µl. Una vez esterilizados se humedecieron con 10µl de cada extracto con concentraciones de 2, 6, 8 y 10 mg por sensidisco.

En el caso de los extractos acuosos, el extracto se utilizó en el momento para la prueba de los sensidiscos y el resto se desechó.

Para obtener la dosis requerida, se obtuvo el rendimiento total del extracto y se resuspendió en una cantidad conocida de su solvente correspondiente (Fig. 9). Se tomaron la cantidad de 10 µl de extracto para la obtención de las dosis de 2, 6, 8 y 10 mg para cada sensidisco, utilizando la fórmula:

$$C1 V1 = C2 V2$$

Donde:

C1: Concentración inicial (mg/ml)

V1: Volúmen inicial (ml)

C2: Concentración requerida (mg/ml)

V2: Volúmen final requerido (µl)

Se despejó V1 de la fórmula para determinar el volumen a tomar del extracto con concentración inicial conocida, para ajustar a la concentración final requerida

$$V1 = \frac{C2 V2}{C1}$$

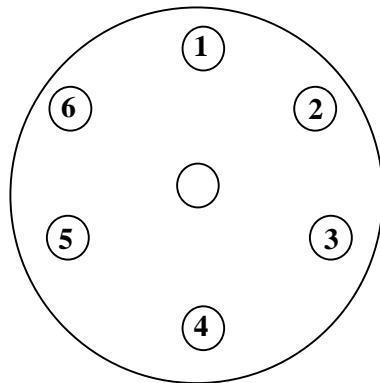


Fig. 8. Esquema de colocación de los sensidiscos con extractos vegetales en el medio de cultivo. Los sensidiscos numerados del 1 al 6 representan el tratamiento de seis de los diferentes extractos evaluados. Extractos evaluados: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), cempasúchil (*Tagetes lucida*), col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. El círculo central es la cepa de *Trichoderma* a evaluar. Las dosis evaluadas en los sensidiscos fueron de 2, 4, 6, 8 y 10 mg de extracto, en cada caja se colocaron sensidiscos con diferentes extractos vegetales evaluando la misma dosis. n=4.

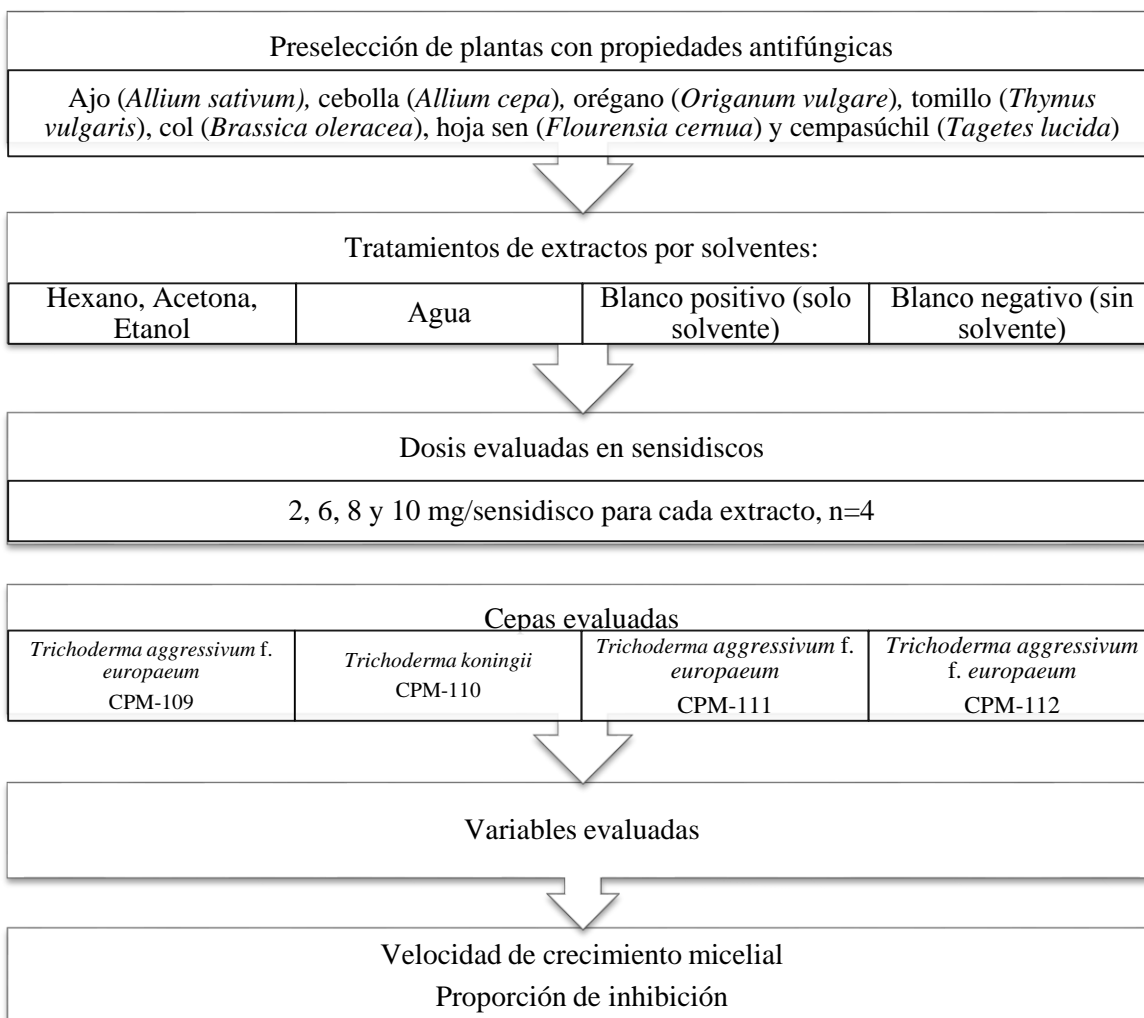


Fig. 9 Metodología para la elaboración de tratamientos con las plantas preseleccionadas para la evaluación de los extractos en sensidiscos (Experimento 1).

7.4.5. Elaboración de extractos etanólicos de ruda (*Ruta graveolens*), cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) (Experimentos 2, 3 y 4)

Para cada planta por separado se utilizó la técnica de maceración en matraces de 1 L de capacidad, en donde se colocó el material deshidratado y fragmentado en trozos de 0.5 cm, y se agregaron 900 ml de solvente etanol al 96 °GL. Después de 24 h se decantó y filtro con papel filtro Whatman no. 40, este procedimiento se realizó por triplicado. Todos los filtrados se concentraron en un frasco de vidrio de 3 L de capacidad, donde se homogenizaron con un magneto en rotación por 5 minutos. El extracto homogenizado se evaporó en un rotavapor marca Heidolph Laborota 4000 efficient, WBeco, a 100 rpm, a una temperatura máxima de 40 °C. El

extracto final obtenido se llevó a sequedad a temperatura ambiente con ayuda de un ventilador para acelerar la evaporación y se mantuvo en cajas de petri tapadas en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

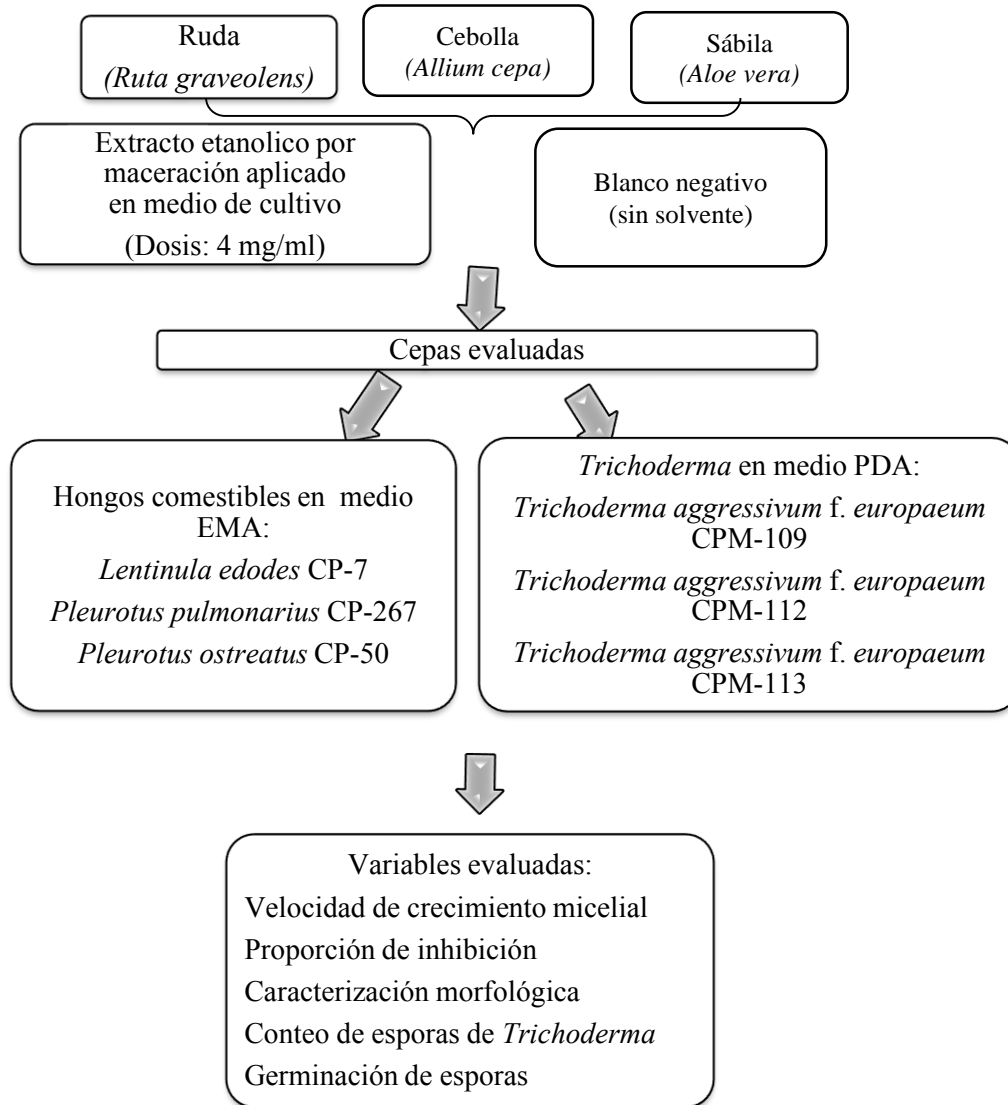


Fig. 10 Evaluación del efecto de los extractos de ruda (*Ruta graveolens*), cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*), con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial, n=10 (Experimentos 2, 3 y 4)

7.5 Estudio de las cepas y extractos en medios de cultivo semisólidos

7.5.1. Propiedades diferenciadas de cada extracto vegetal

7.5.1.1 Prueba de propiedades antifúngicas con la técnica de los sensidiscos y el hongo *Trichoderma*

Una vez obtenidos los sensidiscos con las dosis seleccionadas, se procedió a realizar la prueba de propiedades antifúngicas modificando la metodología de Chang *et al.* (2008). En una caja de petri con medio de cultivo de agar con dextrosa y papa (PDA), se colocaron 6 discos de papel filtro estéril con una dosis conocida de 6 extractos vegetales diferentes (Fig. 8). En el centro se colocó la cepa de *Trichoderma* a evaluar, se incubó a temperatura ambiente promedio de 28°C y se evaluó su desarrollo micelial de forma radial hacia cada uno de los sensidiscos. Los sensidiscos se dividieron en dos tratamientos por cantidad de plantas seleccionadas al azar, los cuales se colocaron 6 por caja sobre el medio de cultivo, con cuatro réplicas.

Los sensidiscos con extracto de plantas se dividieron en dos grupos y se distribuyeron al azar en el medio de cultivo con base en el solvente utilizado (Tabla 16). A dichos grupos de plantas se les asignó el nombre de tratamientos:

Tabla 16. Relación de los sensidiscos colocados en las cajas de petri según el solvente.

Solvente	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Hexano	1. Cebolla (<i>Allium cepa</i>) 2. Ajo (<i>Allium sativum</i>) 3. Hoja sen (<i>Flourensia cernua</i>) 4. Orégano (<i>Origanum vulgare</i>) 5. Cempasúchil (<i>Tagetes lucida</i>)	6. Col (<i>Brassica oleracea</i>) 7. Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) 8. Sólo solvente (testigo)
Acetona	1. Cebolla (<i>Allium cepa</i>) 2. Ajo (<i>Allium sativum</i>) 3. Hoja sen (<i>Flourensia cernua</i>) 4. Orégano (<i>Origanum vulgare</i>) 5. Cempasúchil (<i>Tagetes lucida</i>)	6. Col (<i>Brassica oleracea</i>) 7. Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) 8. Sólo solvente (testigo)
Etanol	1. Cebolla (<i>Allium cepa</i>) 2. Ajo (<i>Allium sativum</i>) 3. Cempasúchil (<i>Tagetes lucida</i>) 4. Col (<i>Brassica oleracea</i>)	5. Orégano (<i>Origanum vulgare</i>) 6. Hoja sen (<i>Flourensia cernua</i>) 7. Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) 8. Sólo solvente (testigo)
Agua	1. Cebolla (<i>Allium cepa</i>) 2. Ajo (<i>Allium sativum</i>) 3. Cempasúchil (<i>Tagetes lucida</i>) 4. Col (<i>Brassica oleracea</i>)	5. Orégano (<i>Origanum vulgare</i>) 6. Hoja sen (<i>Flourensia cernua</i>) 7. Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) 8. Sólo solvente (testigo)

7.5.1.2. Prueba de las propiedades antifúngicas de ruda (*Ruta graveolens*), cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*)

Se evaluaron los extractos de ruda (*Ruta graveolens*), cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) por separado en dosis de 4 mg/ml en el medio de cultivo (Figs 10 y 11).

Cada extracto fue resuspendido en agua destilada estéril, centrifugado a 10,000 rpm y filtrado con acrodisco hidrofílico Dismic-25 AS, (Advantec) de 0.20 µm, en condiciones de esterilidad. El extracto se incorporó al medio de cultivo tibio (30 ml por cada 1000 ml de medio), se homogenizó por agitación magnética y se vació a las placas de petri (Fig. 9). Se midió la velocidad de crecimiento micelial en cajas de petri de 4.5 cm de diámetro con 10 repeticiones de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y las cepas de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* CP-50, *Lentinula edodes* CP-7 y *Pleurotus pulmonarius* CP-267.

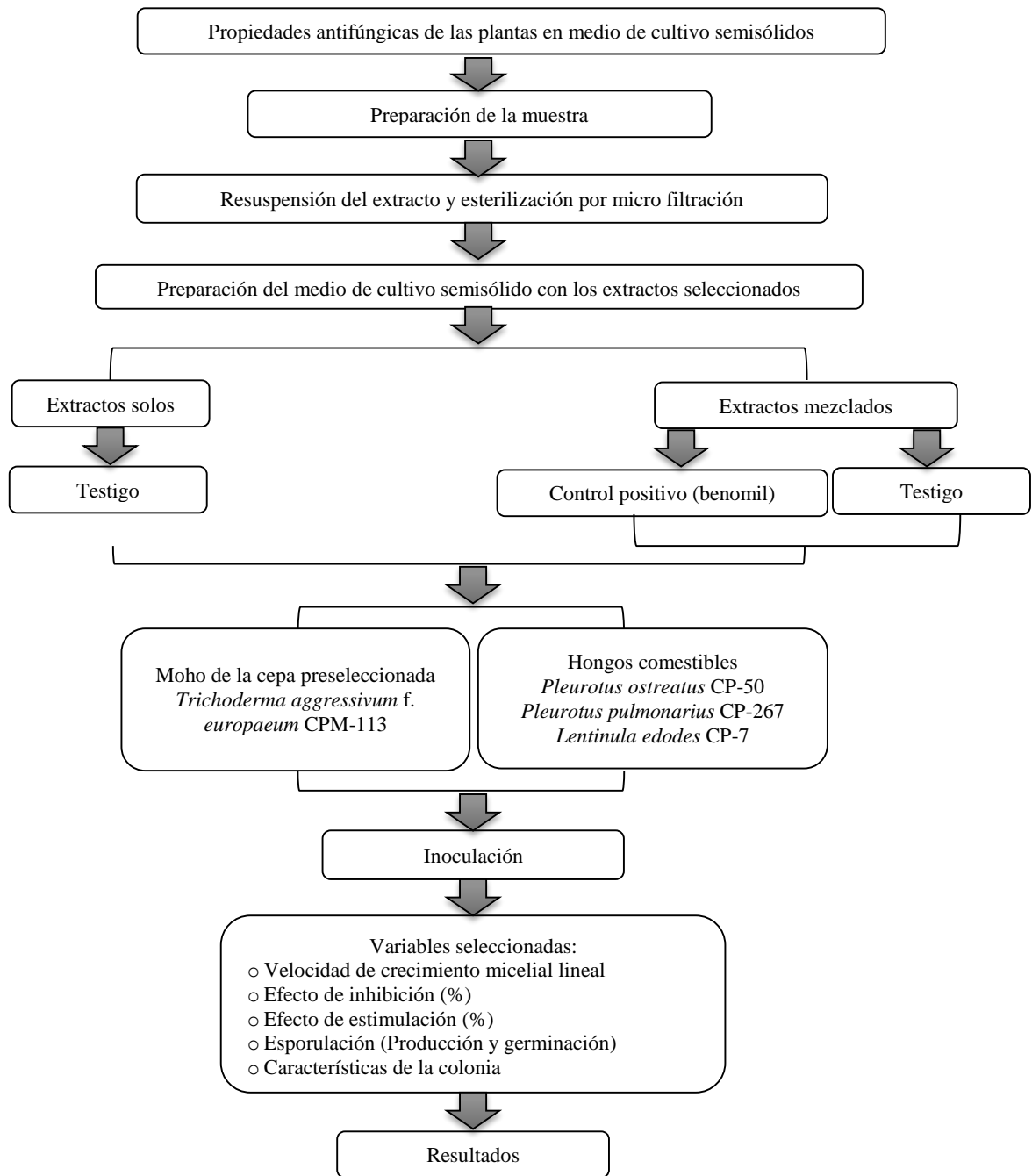


Figura 11. Metodología para la elaboración de los medios de cultivo con los extractos de las plantas trabajadas en este estudio.

7.5.1.3 Evaluación *in vitro* de una mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) y cebolla morada (*Allium cepa*) con una dosis de 1.2 % de extracto (Experimento 5)

Para la realización de esta prueba, se utilizaron los extractos ya elaborados de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*), evaluados previamente de forma independiente.

Con base en pruebas preliminares para la determinación de la dosis, se elaboró medio de cultivo de agar con extracto de malta (EMA, Difco) con una concentración más elevada y combinada de extractos la cual fue de 0.6% de sábila (*Aloe vera*) y 0.6% de cebolla morada (*Allium cepa*), con una concentración final de 1.2% de extractos cada 1.8 g de extracto se resuspendieron en 30 ml de agua destilada estéril en un agitador rotatorio (MaxQ4000) a 150 rpm y 35 °C por una hora. Se centrifugó (Ependorff, 5415C) para eliminar sólidos suspendidos a 10,000 rpm por 5 min. El extracto se decantó y filtro en condiciones de esterilidad con acrodisco hidrofílico Dismic-25 AS, (Advantec), de 0.20 µm para su esterilización (60 ml por cada 1000 ml de medio), se incorporó al medio de cultivo tibio, se homogenizo por agitación magnética y vació antes de solidificar.

En cuanto al material biológico (Fig. 12) se seleccionó una de las tres cepas de *Trichoderma* que se estuvo evaluando previamente y fue considerada como la más agresiva en velocidad de crecimiento micelial, la cepa seleccionada fue *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. En cuanto a las cepas comestibles, se mantuvieron las tres cepas seleccionadas previamente, las cepas *Pleurotus ostreatus* CP-50, *Lentinula edodes* CP-7 y *Pleurotus pulmonarius* CP-267. Para evaluar la velocidad de crecimiento micelial, las cajas de petri se inocularon en condiciones estériles en cultivo dual con un inóculo de micelio de 0.5 cm de diámetro de la cepa CPM-113 de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y con aquellos de cada una de las cepas de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus* CP-50, *Lentinula edodes* CP-7 o *Pleurotus pulmonarius* CP-267) de manera independiente en la periferia de la caja. Las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y de hongos comestibles, a partir de las cuales se obtuvo el inóculo, tenían 4 y 9 días de desarrollo, respectivamente. Se midió el desarrollo micelial de forma lineal cada 24 h.

7.5.1.4 Elaboración del testigo

Como control positivo se usó el fungicida benomil en el medio de cultivo. Se realizó una solución de 0.5 g de benomil en 500 ml de agua destilada estéril, se colocó en una parrilla de

agitación por 20 min. Se tomó una alícuota para una concentración de 1.47 mg/L en el medio de cultivo EMA y se esterilizó a 121°C por 25 min.

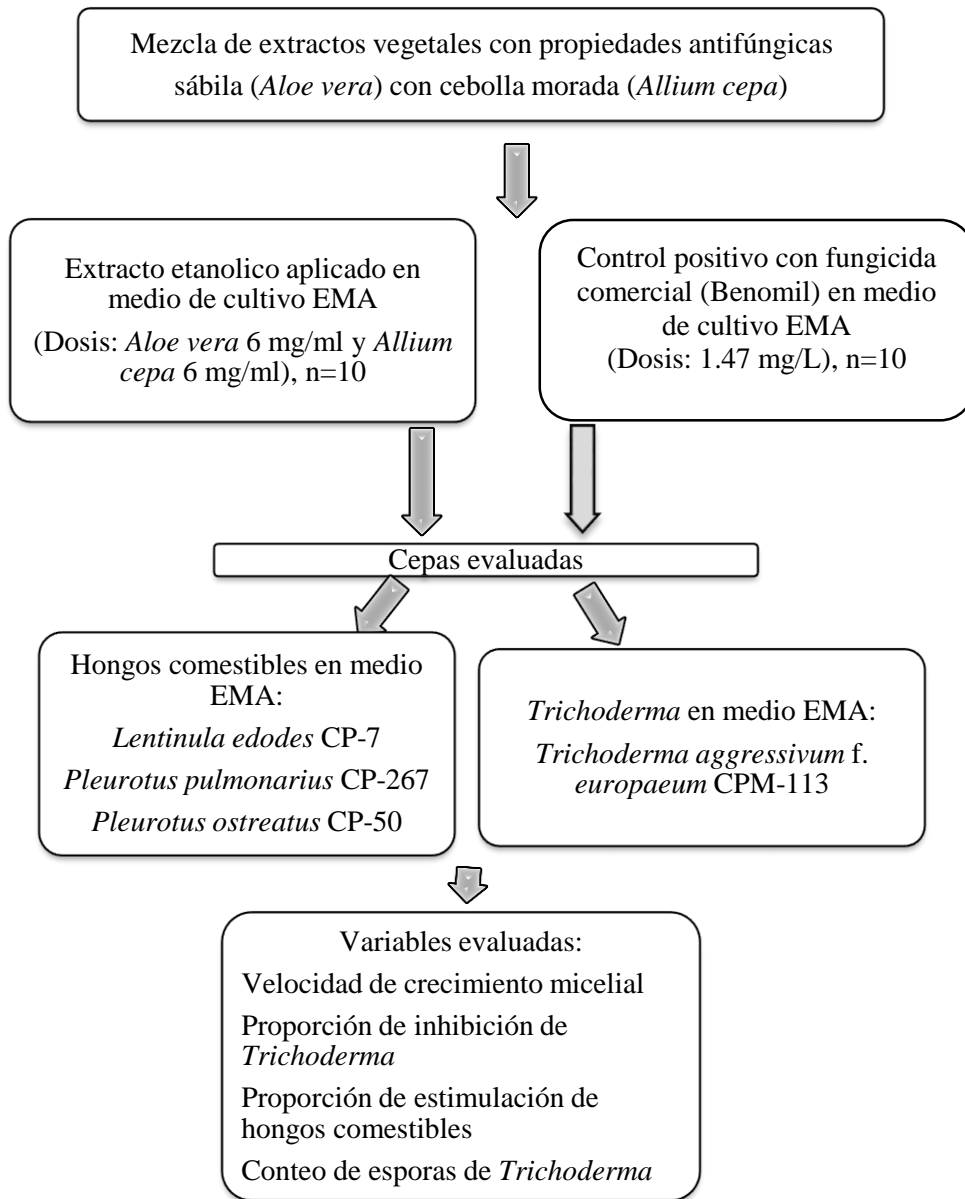


Fig. 12 Efecto de una mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) y cebolla morada (*Allium cepa*) sobre el cultivo dual *in vitro* de *Trichoderma*–hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*) con una dosis de 1.2% de extracto (Experimento 5).

7.6. Variables estudiadas

7.6.1. Velocidad de crecimiento lineal

Se midió el diámetro en centímetros del crecimiento micelial desde el centro (punto del inóculo) al borde de la colonia cada 24 h hasta que la colonia cubrió la totalidad de la caja de petri.

7.6.2. Efecto de inhibición (%)

La inhibición, tanto de la velocidad de crecimiento micelial como de germinación de esporas, se calculó en base a Kordali *et al.* (2008) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde

C = promedio de cinco réplicas del crecimiento micelial (cm) de los controles.

T = promedio de cinco réplicas del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos con extracto.

7.6.3. Efecto de estimulación (%)

Derivado de la fórmula anterior se infirió la estimulación en la velocidad de crecimiento micelial, la cual se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Proporción de estimulación} = \frac{[(\text{crecimiento del control} - \text{crecimiento del tratamiento}) / (\text{crecimiento del control}) \times 100] \times -1}{1}$$

7.6.4. Medición de la esporulación de las cepas de *Trichoderma*

Se realizó un conteo de esporas en una cámara de Neubauer (Fig. 13) doble a partir del día tres, empleando la técnica descrita previamente (Martínez-Carrera, 1995; Ramírez, 2006), para los extractos de ruda (*Ruta graveolens*), sábila (*Aloe vera*) y cebolla (*Allium cepa*). El conteo comenzó cuando el micelio de *Trichoderma* llegó al límite de las cajas de petri, desde antes de la esporulación. Los resultados del conteo se reportaron en producción de esporas/ml, en el caso del extracto de sábila se determinó el conteo por área en esporas/cm².

Para el conteo se realizó una suspensión de esporas tomando 12 muestras con sacabocados de 0.5 cm de diámetro de agar colonizado homogéneamente por el micelio de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. Las muestras se tomaron de la caja en series de cuatro inóculos muestreando periferia y centro de la colonia (Fig. 14). Los cuatro inóculos se colocaron en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril con tween al 0.05% (Saxena *et al.*,

2001), se agitaron mecánicamente con un vortex por 1 min y se tomó una alícuota de 0.1 ml para el llenado de cada retícula de la cámara de Neubauer. El conteo se realizó en ambas retículas con un microscopio óptico en aumento de 10X, se obtuvo el promedio de la cantidad de esporas encontradas en 5 cuadrantes de la retícula central de la cámara de Neubauer, la cual esta estandarizada con la capacidad de 0.0001 ml; dicho procedimiento se repitió por triplicado para cada caja muestreada (Fig. 14). Se realizaron los siguientes cálculos para determinar la cantidad de esporas por ml:

Volumen del cuadro: 0.1 mm^3 , 1 mm^3 es equivalente a 0.0001 ml. Si 100 esporas están contenidas en 0.0001 ml, entonces:

$$\begin{aligned}
 100 \text{ esporas} & \text{ --- } 0.0001 \text{ ml} \\
 X \text{ esporas} & \text{ --- } 1 \text{ ml} \\
 X & = 1,000,000 \text{ esporas/ml}
 \end{aligned}$$

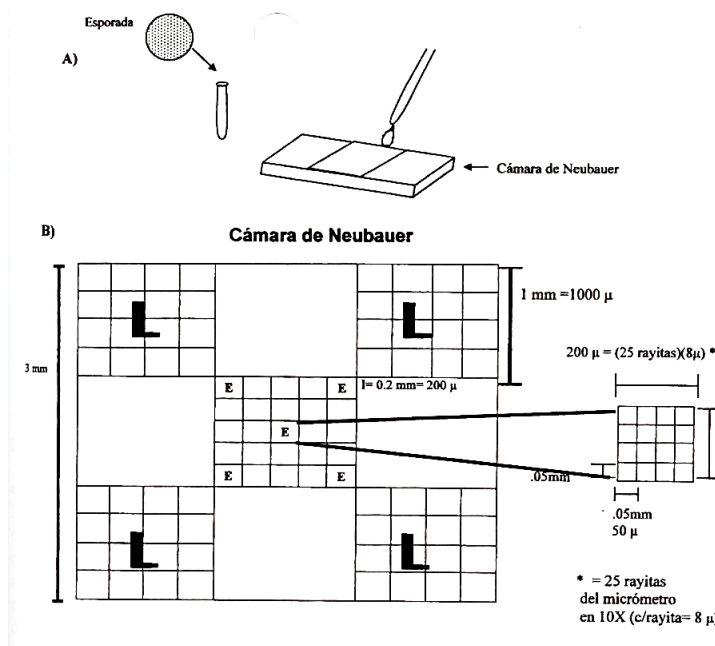


Fig. 13. Diagrama de la retícula de la cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas por ml. A: Suspensión de esporas. B: cuadrantes (E) donde se realizó el conteo (Ramírez, 2006).

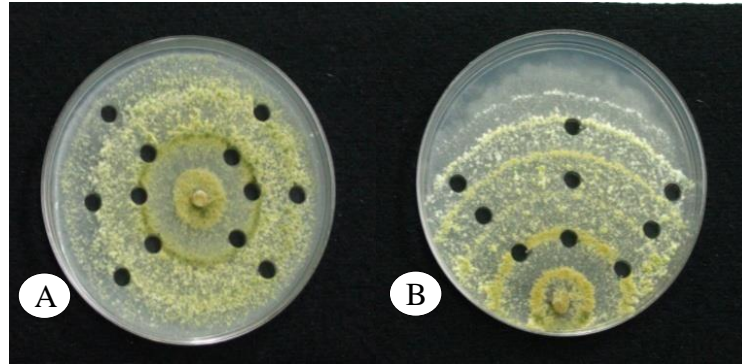


Fig. 14. Toma de muestra para el conteo de esporas de *Trichoderma* a partir de los 4 días de inoculado. A: El círculo central es la cepa de *Trichoderma* a evaluar. B: El inóculo se colocó en un extremo para las pruebas con con ambos extractos y ambas cepas en la misma caja.

7.6.5. Caracterización morfológica del micelio (Experimentos 2, 3 y 4)

Se realizó una caracterización macroscópica de la morfología micelial de las cepas evaluadas para observar alguna diferencia de la velocidad de crecimiento de acuerdo a los extractos evaluados. Las variables morfológicas evaluadas se basaron en la Tabla 17, para el color en el caso de *Trichoderma* se tomó como referencia la tabla de colores Pantone Formula Guide Solid Coated Colors por Fiery (Pantone, Inc., 2001, E.U.A. http://www.pantone.com/pages/pantone/color_xref.aspx). Los colores clasificados pueden consultarse en la pag: <http://www.pantone.com/pages/pantone/colorfinder.aspx>.

Tabla 17. Caracterización de la morfología macroscópica del crecimiento micelial en medio de cultivo.

Variable	Característica
Color	
Color código pantone	Tabla de colores (Pantone 2001, Fiery, E.U.A. www.pantone.com)
Textura	Lanosa, aterciopelada, algodonosa, pulverulenta
Densidad del micelio	Abundante, regular, escaso
Micelio aéreo	Escaso, abundante
Borde de la colonia	Regular, irregular

7.7. Efecto de los extractos de ruda (*Ruta graveolens*) y sábila (*Aloe vera*) sobre la germinación de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Experimentos 2 y 3)

A partir de una suspensión de esporas de cada una de las cepas de *Trichoderma* se realizó su conteo en cámara de Neubauer, así como diluciones, para obtener una concentración de 100 esporas por cada 50 µl. Esta alícuota se distribuyó sobre la placa de agar con una varilla de vidrio estéril con ángulo de 90°. El medio de cultivo se preparó por separado agregando 4 mg/ml de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) y sábila (*Aloe vera*). El conteo de esporas germinadas fue individual por caja, con tres repeticiones mediante observaciones al microscopio estereoscópico marca ZEISS cada 24 h.

7.8 Estudio de los extractos vegetales en sustratos sólidos

7.8.1 Evaluación de una mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) y cebolla morada (*Allium cepa*) al 1.2 % de extracto en sustrato sólido (Experimento 6)

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos previos, se realizó un experimento en sustrato sólido (Figs. 15 y 16). Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* CP-50 se utilizó paja picada y en el caso de la cepa *Lentinula edodes* CP-7 se utilizó una mezcla de aserrín. La dosis de extracto utilizada fue equivalente a aquella del medio de cultivo de los ensayos anteriores. Se utilizó el mismo extracto del experimento para el cultivo dual *Trichoderma*-hongo comestible previamente mencionado.

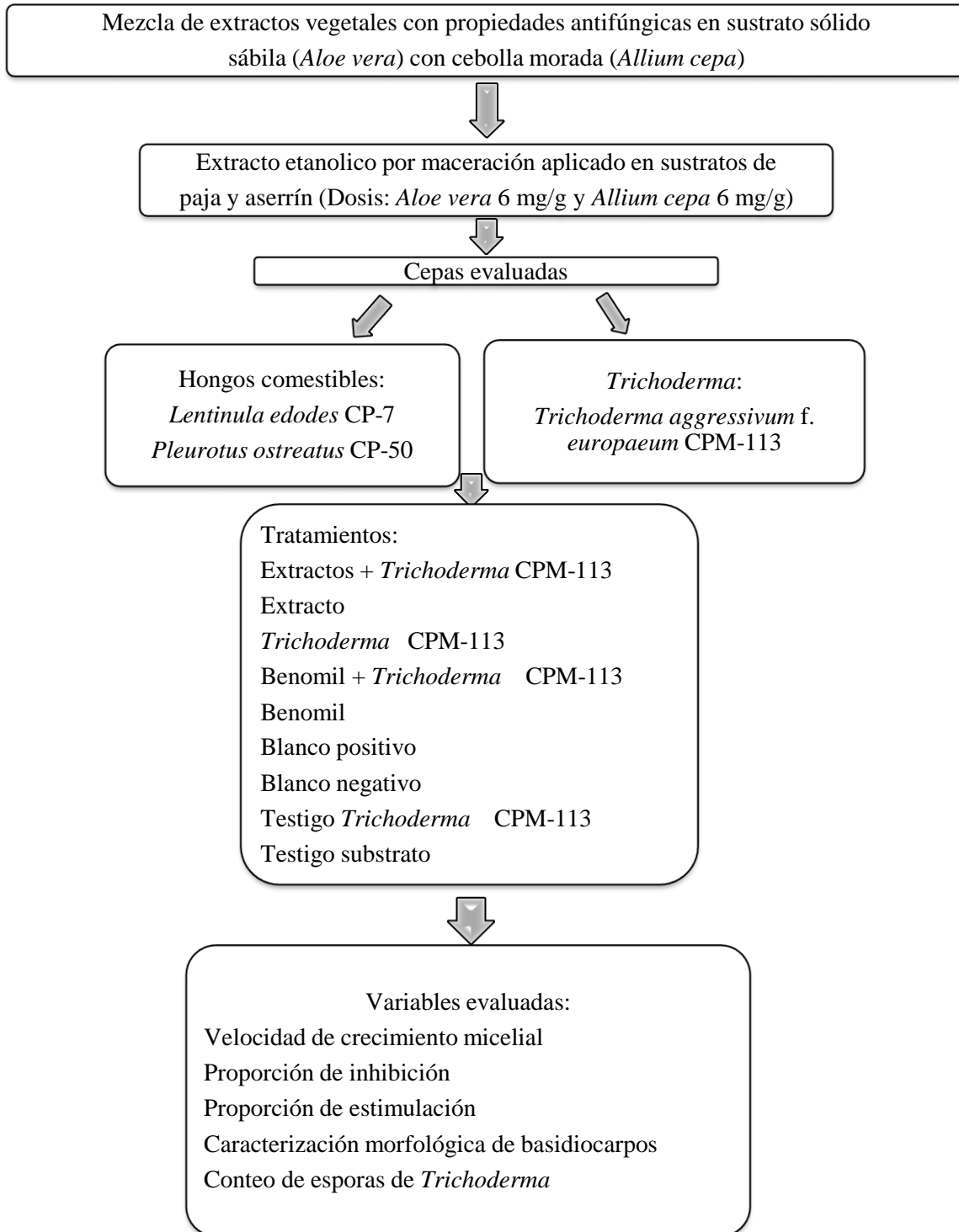


Fig. 15 Efecto de la mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) en el cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*) en sustrato sólido en condiciones de módulo experimental (Experimento 6).

7.8.1.1. Preparación del sustrato de paja de cebada

El sustrato de paja de trigo seca se pasó por un molino de martillos (marca Mapusa modelo CFM1800) con criba de una pulgada. La paja se pasteurizó por una hora en agua caliente (60° a 70 °C), se enfrió y escurrió por un lapso de 4 h. Se agregaron 500 g de paja húmeda a bolsas esterilizables con filtro (marca Unicorn, E.U.A.) y se esterizaron por 1 h a 121°C. Para el tratamiento control con benomil, se agregó una concentración de 1.47 mg de benomil /L de agua donde se pasteurizó la paja. Las bolsas se dejaron enfriar por 12 h para proceder a su inoculación. Las bolsas se inocularon en una cámara de flujo laminar con los siguientes tratamientos (Tabla 18):

Tabla 18. Condiciones experimentales estudiadas en sustratos inoculados con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7, empleando sustratos estériles.

Condición	Clave	Réplicas	Tratamientos del sustrato		
1	Extractos + <i>Trichoderma</i> CPM-113	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Extracto (10 ml)	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)
2	Extractos	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Extracto (10 ml)	Agua (10 ml)
3	<i>Trichoderma</i> CPM-113	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)	Agua (10 ml)
4	Benomil + <i>Trichoderma</i> CPM-113	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Benomil	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)
5	Benomil	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Benomil	Agua (10 ml)
6	Control positivo	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Agua (20 ml)	-
7	Control negativo	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Cultivo convencional en la región central de México	-
8	Testigo <i>Trichoderma</i> CPM-113	5	Sin "semilla" de hongo comestible	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)	-
9	Testigo sustrato	5	Sin "semilla" de hongo comestible	Sin Tratamiento	-

Extractos= Extracto mezclado de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2 %.

CPM-113= *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 /10 ml. Adición de benomil (1.47 mg/L).

Condición 1: 10 ml de mezcla de extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2% con 10 ml de una suspensión de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, a una concentración de $1 \times 10^6/10$ ml, con 25 g de semilla de hongo comestible.

Condición 2: 10 ml de mezcla de extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2% con 10 ml de agua destilada estéril, con 25 g de semilla de hongo comestible.

Condición 3: 10 ml de una suspensión de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, a una concentración de $1 \times 10^6/10$ ml con 10 ml de agua destilada estéril, con 25 g de semilla de hongo comestible.

Condición 4: 10 ml de una solución de benomil (1.47 mg/L), con 10 ml de una suspensión de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, a una concentración de $1 \times 10^6/10$ m, con 25 g de semilla de hongo comestible.

Condición 5: 10 ml de una solución de benomil (1.47 mg/L), con 10 ml de agua destilada estéril, con 25 g de semilla de hongo comestible.

Condición 6: 20 ml de agua destilada estéril, con 25 g de semilla de hongo comestible.

Condición 7: No se agregó ningún complemento, solo se sembró como un cultivo convencional en la región central de México, con 25 g de semilla de hongo comestible.

Condición 8: 10 ml de una suspensión de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, a una concentración de $1 \times 10^6/10$ ml, sin semilla de hongo comestible.

Condición 9: No se agregó ningún tratamiento, como prueba de esterilidad del sustrato, sin semilla de hongo comestible.

Una vez esterilizado el sustrato e inoculado con los tratamientos descritos (Tabla 18), se agregaron 25 g de “semilla” de *Pleurotus ostreatus* CP-50. La cual, fue proporcionada por el laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados.

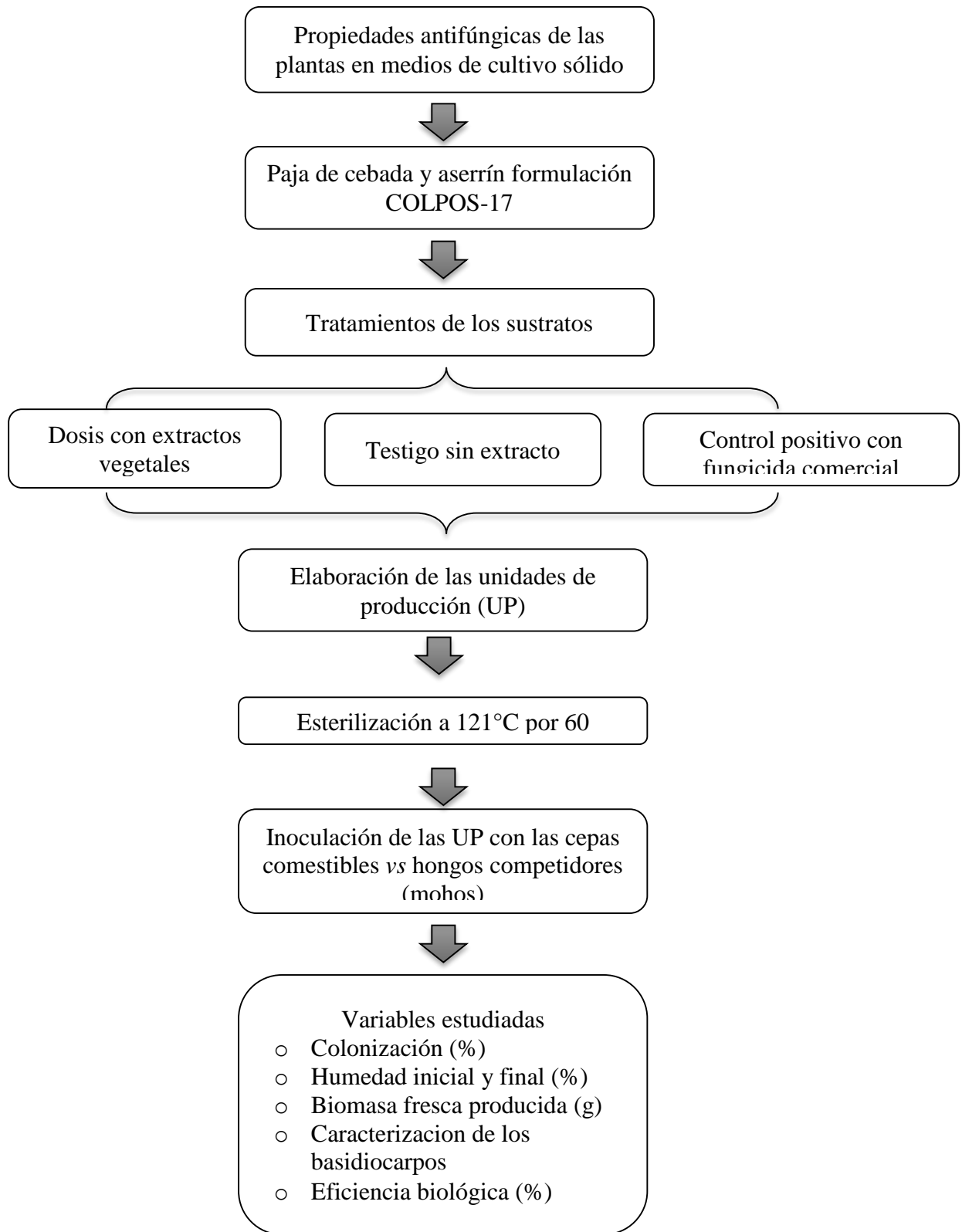


Fig. 16. Diagrama de flujo de la metodología para la preparación del sustrato sólido

7.8.1.2. Preparación de la formulación COLPOS-17

Para el sustrato de aserrín, se utilizó la fórmula COLPOS-17 desarrollada y estandarizada por el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Se humedeció con agua hasta obtener un porcentaje de humedad del 80%. Para el tratamiento control con benomil, se agregó una concentración de 1.47 mg de benomil/L en el agua con la que se hidrató el aserrín, previo a la esterilización. Por cada kilo de aserrín seco, se agregaron 1.370 litros de agua con benomil

Para las unidades de producción, se agregaron 500 g de aserrín húmedo a bolsas esterilizables con filtro (marca Unicorn, E.U.A.) y se esterilizaron por 1 h a 121°C. Las bolsas se dejaron enfriar por 12 h para su inoculación. Una vez inoculados los tratamientos (Tabla 18), se agregaron 25 g de “semilla” de *Lentinula edodes* CP-7. La cual, fue proporcionada por el laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados.

7.8.1.3. Inoculación con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 vs el hongo comestible

Con la finalidad de inocular una cantidad conocida de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, a partir de una colonia con 7 días de crecimiento en medio de agar con extracto de malta (EMA), se tomaron tres muestras de agar de 0.5 cm de diámetro colonizadas por micelio en plena esporulación. Se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril con ayuda de un Vortex por un lapso de un minuto de agitación, se contó en cámara de Neubauer para determinar la cantidad de esporas por ml. En un frasco Schott de 500 ml se realizó una solución de esporas para obtener 1×10^6 esporas/10 ml.

7.8.1.4. Inoculación de los extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*)

Para la inoculación de ambos extractos en el sustrato sólido, previamente reservados a 4°C, se llevaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendieron por separado en agua destilada estéril, tomando 1.8 g de extracto por 10 ml de agua en un matr az erlenmeyer de 250 ml, el cual se colocó en un agitador rotatorio (MaxQ4000), a 150 rpm y 35 °C por una hora. Se centrifugó para eliminar sólidos suspendidos en una centrifuga a 10, 000 rpm por 10 min (Sigma

4K15). El extracto se decantó, se tomo con una jeringa estéril y se filtró en cámara de flujo laminar con acrodisco hidrofílico Dismic-25 AS, (Advantec), de 0.20 µm para su esterilización. Los extractos se prepararon el mismo día de la inoculación para evitar pérdida de compuestos activos o contaminación en su almacenamiento después de la resuspensión.

7.8.1.5. Evaluación de las variables estudiadas en sustratos sólidos

Se estimó el porcentaje de colonización del sustrato de las cepas de *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7, así como aquella de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en los tratamientos hasta la colonización total de cada unidad de producción. Se determinó el porcentaje de humedad y pH de los sustratos al inicio y al final de los experimentos, por quintuplicado. Asimismo, se caracterizaron morfológicamente los basidiocarpos cosechados en cuanto al diámetro de píleo, largo y diámetro de estípite, el rendimiento (g) y la eficiencia biológica (peso fresco de basidiocarpos cosechados/peso seco del sustrato utilizado x 100) (Gaitán-Hernández *et al.*, 2009).

7.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en todos los experimentos se procesaron con un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey, a un $\alpha = 0.05\%$ y 10 repeticiones. Todos los análisis se realizaron con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

VIII. Resultados y discusión

8.1 Efecto de los extractos vegetales con propiedades antifúngicas sobre la velocidad de crecimiento micelial de cuatro cepas de *Trichoderma* con la técnica de sensidiscos

(Experimento 1)

Con los extractos obtenidos a partir de la técnica por maceración con solventes de hexano, acetona y etanol, se calculó el rendimiento final (Tabla 19). En el caso de la extracción de la flor de cebolla (*Allium cepa*), el rendimiento fue muy bajo por lo que no se obtuvo el material suficiente para las pruebas. Los extractos con solvente agua se obtuvieron por maceración en mortero con material fresco y se utilizaron al momento, por lo que no se obtuvo un rendimiento en peso seco como en el caso de los extractos alcohólicos (Tabla 19).

Los extractos obtenidos con todos los solventes (hexano, acetona, etanol y agua) en las dosis de 2, 6 y 8 mg por sensidisco no fueron efectivos en la inhibición de la velocidad de crecimiento de las 4 cepas evaluadas de *Trichoderma*, ni tampoco la dosis de 10 mg en agua y etanol. Prácticamente todas las cajas de petri del testigo y tratamientos fueron colonizadas a la par entre el segundo y cuarto día.

En el caso del solvente agua (Fig. 17), la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 llegó a su máximo crecimiento al día 3, mientras que la cepa de *Trichoderma koningii* CPM-110 mostró una velocidad de crecimiento menor ya que cubrió toda la caja hasta el día 5, observándose un retraso en el inicio del crecimiento de 24 hrs en todos los tratamientos. En el caso de las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, (Fig. 18) mostraron una mayor velocidad de crecimiento micelial, ya que llegaron a su máximo crecimiento al día 2.

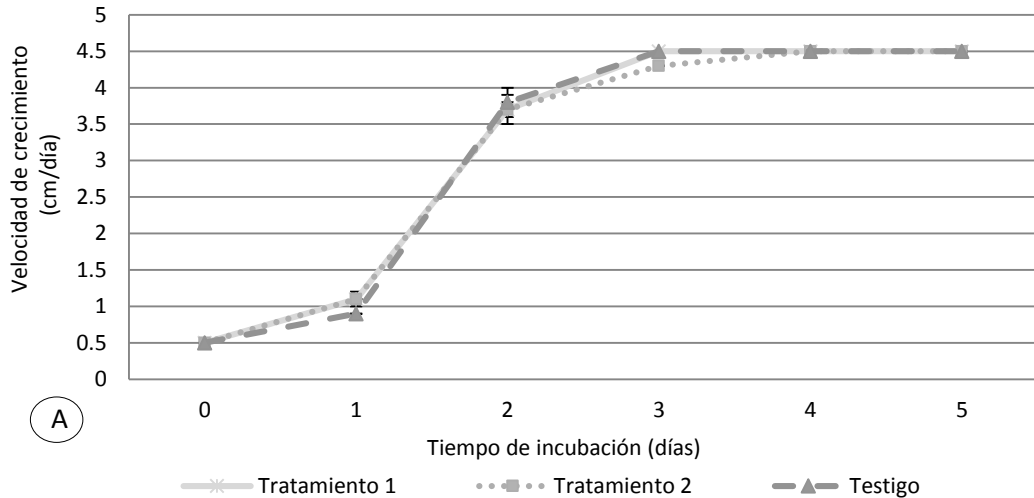
Para el solvente de etanol (Figs. 19-20), se observó que la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma koningii* CPM-110 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111, no tuvieron un comportamiento diferente con respecto al testigo en la velocidad de crecimiento micelial. La velocidad de crecimiento micelial de ambas cepas tuvo el mismo comportamiento que el observado con solvente agua. En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, se observó una inhibición en la velocidad de crecimiento para los días 1 y 2, sin embargo, no hubo una diferencia estadística en los datos con respecto a la velocidad de crecimiento del testigo. Esta falta de inhibición demostró un alto nivel de tolerancia de las cepas de *Trichoderma* ante los diferentes extractos, ya que existe referencia

de las propiedades antifúngicas de todas las plantas evaluadas contra diversas cepas de hongos filamentosos (García y Vázquez, 2002; Mahmoud *et al.*, 2004; Vellunti *et al.*, 2003; García-Camarillo *et al.*, 2006; Lizcano, 2007).

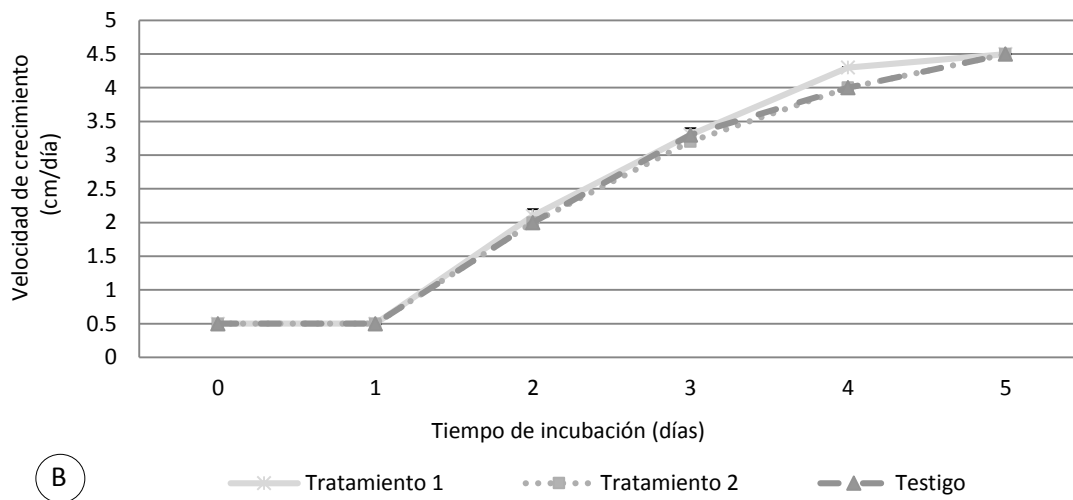
Tabla 19. Rendimiento total de las extracciones por maceración a partir de las plantas estudiadas con solventes de hexano, acetona y etanol, n=4.

Especie de la planta	Nombre común	Planta		Rendimiento por solvente		
		Peso fresco (g)	Peso deshidratado (g)	Hexano (g)	Acetona (g)	Etanol (g)
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Ajo (parte aérea)	32	4.7	0.09	0.14	0.6
	Ajo (bulbo)	18.7	3.7	0.04	-	0.25
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	Cebolla (parte aérea)	107	13.5	0.2	0.37	1.5
	Cebolla (bulbo)	23	4.5	0.03	0.10	0.26
	Cebolla (flor)	9	2	0.06	0.05	-
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Orégano	17.2	6.4	0.10	0.26	-
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	Tomillo	41.3	13.9	0.17	1.36	1.22
Col (<i>Brassica oleracea</i>)	Col	150	21.8	0.45	0.15	2.55
Hola sen (<i>Flourensia cernua</i>)	Hoja sen (vainas secas)	-	6.8	0.08	-	0.15
Cempasúchil (<i>Tagetes lucida</i>)	Cempasúchil	-	8	0.07	-	-

En el caso de los solventes como el hexano y la acetona, pertenecen al grupo de las cetonas, los cuales están clasificados como solventes penetrantes, con capacidades dipolares, ionizantes, disociantes, coordinantes y receptoras de protones. Tienen la capacidad de disolver grasas, aceites, ceras, resinas naturales y colorantes; cuentan con un alto nivel de retención en los cuerpos porosos con los que llegan a tener contacto. En el caso del solvente etanol, también tiene la capacidad de disolver resinas naturales, parafinas, grasas, ceras, colores naturales (carotenoides), cauchos naturales y copales (Masschelein-Kleiner, 2004).

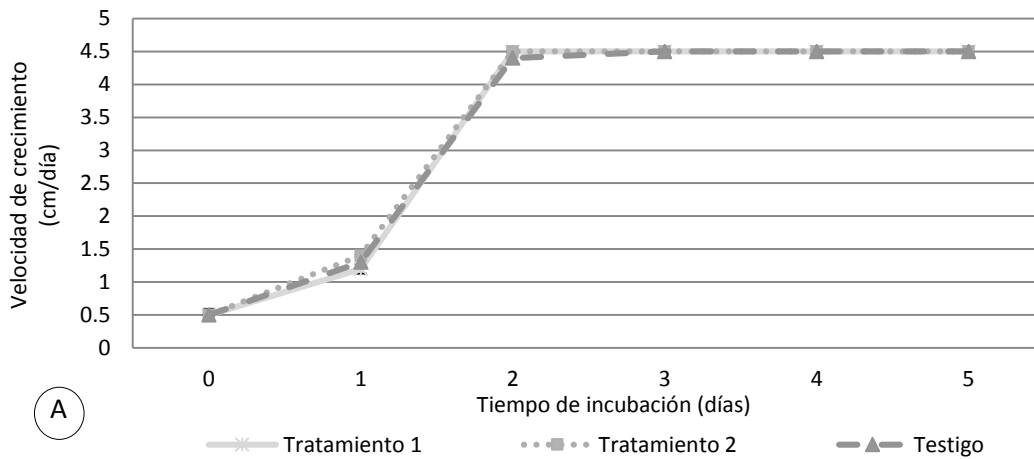


Tiempo de incubación		0	1	2	3	4	5
Tratamiento 1		0.5±0 ^a	1.1±0 ^a	3.7±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Tratamiento 2		0.5±0 ^a	1.2±0.2 ^a	3.7±0.3 ^a	4.3±0.3 ^b	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Testigo		0.5±0 ^a	1±0.2 ^a	3.9±0.4 ^a	4.5±0 ^b	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a

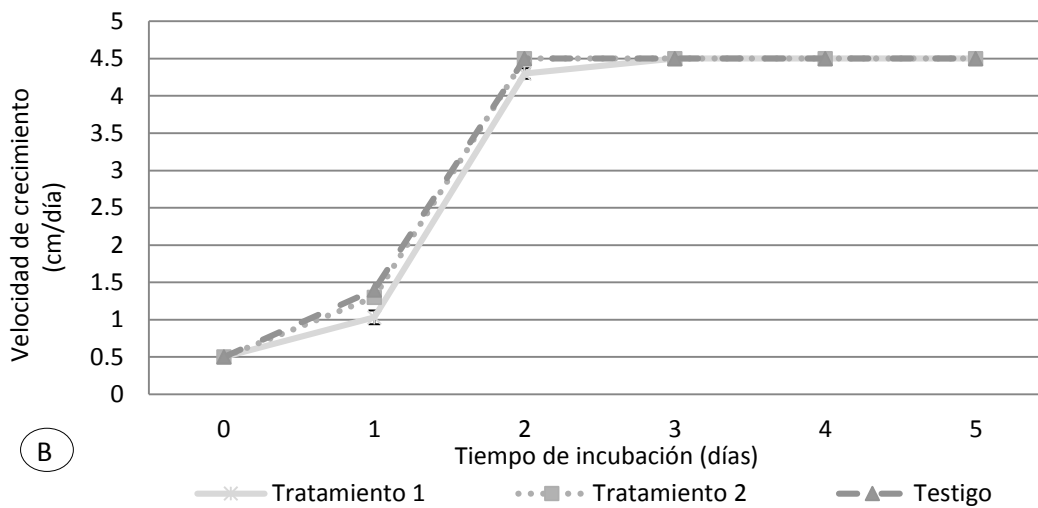


Tiempo de incubación		0	1	2	3	4	5
Tratamiento 1		0.5±0 ^a	0.5±0.1 ^a	a 2.2±0.2 ^a	3.4±0.2 ^a	4.3±0.2 ^b	4.5±0 ^a
Tratamiento 2		0.5±0 ^a	0.5±0.1 ^a	a 2.1±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	4.1±0.1 ^a	4.5±0 ^a
Testigo		0.5±0 ^a	0.6±0.1 ^a	a 2.1±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	4.1±0.2 ^a	4.5±0 ^a

Fig. 17. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente agua, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109. B: *Trichoderma koningii* CPM-110. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), compasúchil (*Tagetes lucida*), col (*Brassica oleracea*). Tratamiento 2: orégano (*Origanum vulgare*), hoja sen (*Flourensia cernua*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.

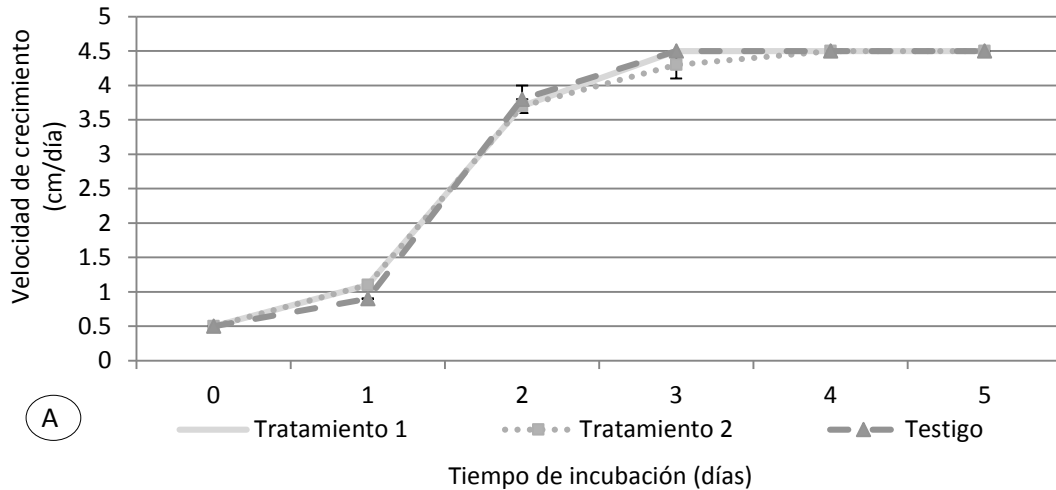


	Tiempo de incubación					
	0	1	2	3	4	5
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	1.3±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	1.4±0.3 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Testigo	0.5±0 ^a	1.4±0.2 ^a	4.4±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a

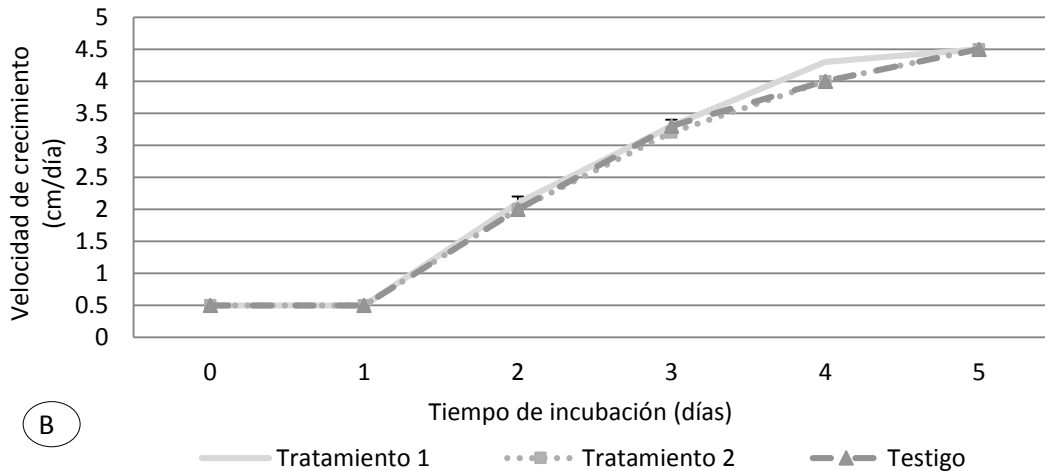


	Tiempo de incubación					
	0	1	2	3	4	5
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	1±0.2 ^a	4.4±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	1.3±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Testigo	0.5±0 ^a	1.4±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a

Fig. 18. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente agua, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111. B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), compasúchil (*Tagetes lucida*), col (*Brassica oleracea*). Tratamiento 2: orégano (*Origanum vulgare*), hoja sen (*Flourensia cernua*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.



	Tiempo de incubación					
	0	1	2	3	4	5
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	a 1±0.2	3.9±0.4 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	a 1.2±0.2	3.7±0.3 ^a	4.3±0.3 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Testigo	0.5±0 ^a	a 1±0.2	3.9±0.4 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a



	Tiempo de incubación					
	0	1	2	3	4	5
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	0.5±0.1 ^a	2.2±0.2 ^a	3.4±0.2 ^a	4.3±0.2 ^a	4.5±0 ^a
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	0.5±0.1 ^a	2.1±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	4.1±0.1 ^a	4.5±0 ^a
Testigo	0.5±0 ^a	0.6±0.1 ^a	2.1±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	4.1±0.2 ^a	4.5±0 ^a

Fig 19. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente etanol, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109. B: *Trichoderma koningii* CPM-110. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), cempasúchil (*Tagetes lucida*), col (*Brassica oleracea*). Tratamiento 2: orégano (*Origanum vulgare*), hoja sen (*Flourensia cernua*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.

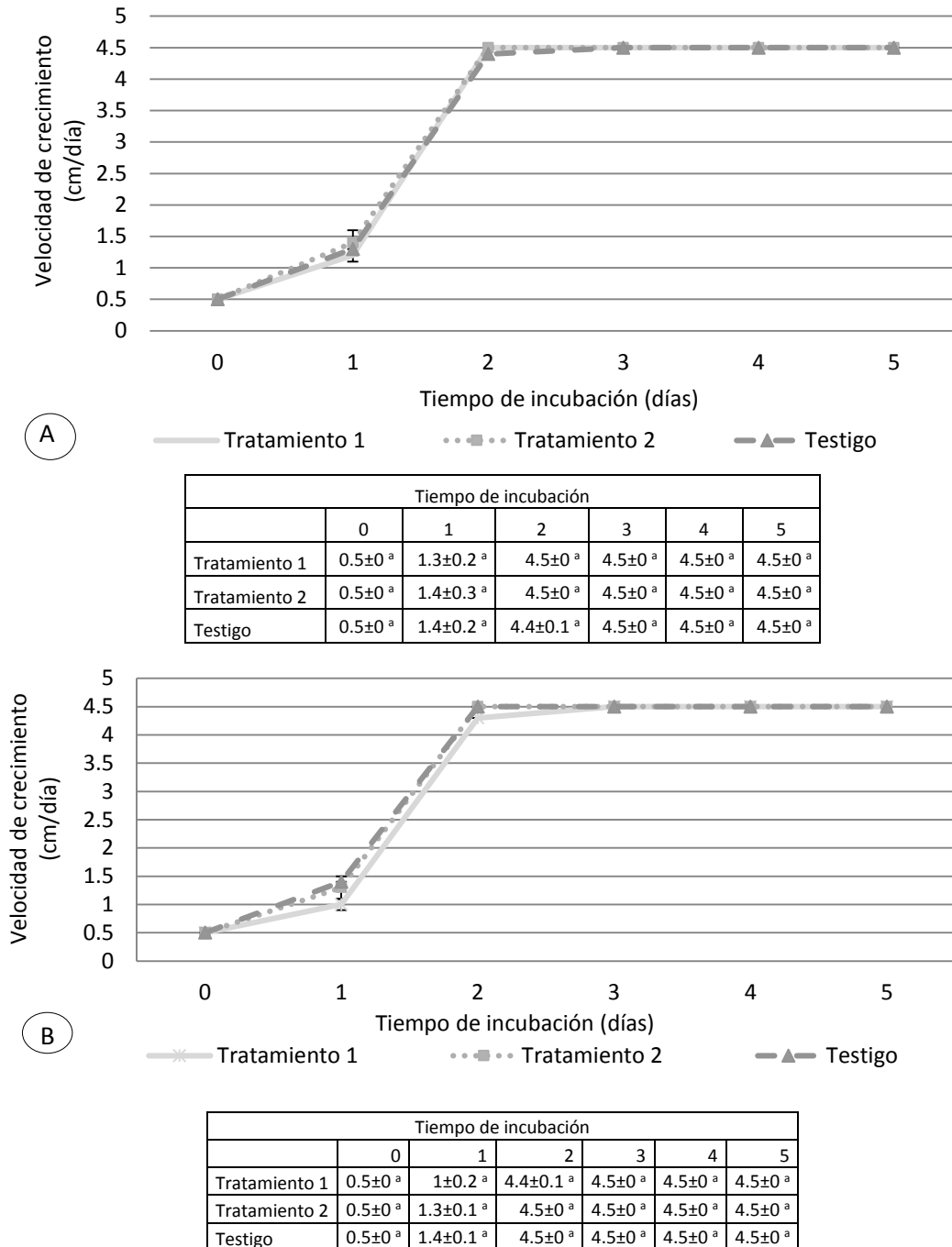


Fig 20. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente etanol, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111. B: *Trichoderma koningii* CPM-112. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), cempasúchil (*Tagetes lucida*), col (*Brassica oleracea*). Tratamiento 2: orégano (*Origanum vulgare*), hoja sen (*Flourensia cernua*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.

Los extractos obtenidos pueden tener una amplia gama de compuestos debido a la naturaleza de los solventes utilizados. Entre estos compuestos, se encuentran los mono y sesquiterpenos que están ampliamente distribuidos en diversas familias vegetales incluidas las rutáceas (Izco *et al.*, 2004). Se sabe que la planta de col (*Brassica oleracea*) contiene más de 20 compuestos volátiles con azufre, tales como isotiocianatos, sulfuros, disulfuros, trisulfuros y mercaptanos. Estos compuestos son tóxicos para algunos hongos filamentosos como *Colletotrichum circinans* y *Botrytis alli* (Anaya, 2003).

A pesar de que no se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento micelial con respecto al testigo, se sabe que plantas como orégano (*Origanum vulgare*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y ruda (*Ruta graveolens*) están clasificadas como plantas aromáticas que producen una alta cantidad de aceites esenciales, los cuales muestran una mayor actividad antifúngica que otros compuestos de origen vegetal (Zapata *et al.*, 2003; Bernal-Alcocer *et al.*, 2005; Tajkarimi *et al.*, 2010).

El bajo efecto inhibitorio observado también puede atribuirse al procesado del material vegetal, ya que los aceites esenciales son volátiles, por lo que gran parte de ellos pudieron perderse en el proceso de deshidratado del material vegetal disminuyendo su concentración en el extracto obtenido. Entre estos compuestos, se encuentran los mono y sesquiterpenos que están ampliamente distribuidos en diversas familias vegetales incluidas las rutáceas (Izco *et al.*, 2004). Este efecto también pudo deberse a que las concentraciones utilizadas no fueron bajas para tener un efecto inhibitorio en las cepas evaluadas.

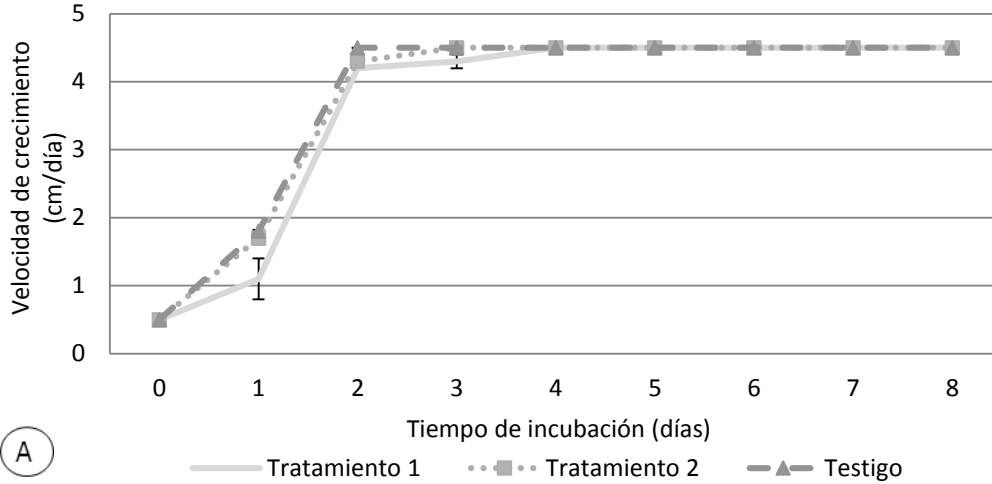
En el caso del solvente de hexano (Fig. 21), para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, sólo se observó inhibición en la velocidad de crecimiento micelial el día 1, sin embargo, a partir del día 2 ya no se observó ninguna diferencia con respecto al crecimiento del testigo. Para la velocidad de crecimiento de la cepa *Trichoderma koningii* CPM-110 para ambos tratamientos de plantas, se observó inhibición en la velocidad de crecimiento micelial a partir del día 2, entre los cuales no hubo diferencia significativa a partir de los 5 días. Sin embargo, su velocidad de crecimiento fue menor que el testigo a lo largo del experimento.

El tratamiento 2, conformado por col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y el disco con solvente, produjeron la mayor inhibición de la velocidad de crecimiento estadísticamente significativa desde las 24 h a los 4 días. Esto puede deberse a que se ha reportado que la planta de col (*Brassica oleracea*) contiene más de 20 compuestos volátiles con

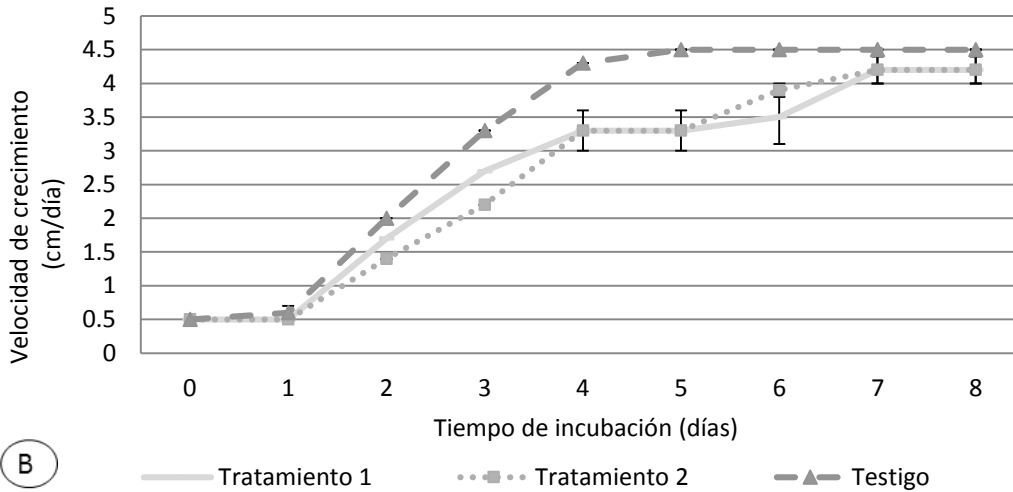
azufre, tales como isotiocianatos, sulfuros, disulfuros, trisulfuros y mercaptanos (Anaya, 2003). Estos compuestos son tóxicos para algunos hongos filamentosos como *Colleotrichum circinans* y *Botrytis alli* (Anaya, 2003). A su vez, en el caso del tomillo (*Thymus vulgaris*) se sabe que contiene aceites esenciales con una alta actividad fungicida (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005; Tajkarimi *et al.*, 2010). La presencia de ambos extractos pudo haber influido en que la cepa no alcanzara la velocidad de crecimiento del testigo a lo largo del experimento. Para las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 con solvente hexano (Fig. 22), tampoco se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento con respecto al testigo.

En cuanto al tratamiento con solvente de acetona (Figs. 23 - 24), se observó inhibición de la velocidad de crecimiento micelial en la presencia del tratamiento 1, conformado por cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Fluorencia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*) y cempasúchil (*Tagetes lucida*); el efecto inhibitorio pudo observarse en todas las cepas. En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, la inhibición fue significativamente diferente con respecto al testigo y pudo observarse desde los 2 hasta los 6 días, habiendo llegado el testigo a su total crecimiento desde los 3 días.

En el caso de la cepa *Trichoderma koningii* CPM-110 se observó una mayor inhibición que en las otras cepas de *Trichoderma* evaluadas con el tratamiento 1, a lo largo del experimento. La cepa se mantuvo siempre con velocidad de crecimiento significativamente menor que el testigo y detuvo su crecimiento a partir de los 8 días. Las colonias del testigo cubrieron toda la caja de Petri en seis días.



		Tiempo de incubación								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	1.2±0.6 ^b	4.3±0.1 ^a	4.3±0.3 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	1.8±0.1 ^a	4.3±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	
Testigo	0.5±0 ^a	1.9±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	



		Tiempo de incubación								
Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	0.5±0 ^a	1.7±0.1 ^a	2.8±0.1 ^a	3.3±0.6 ^a	3.3±0.6 ^a	3.5±0.8 ^a	4.3±0.4 ^a	4.3±0.4 ^a	
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	0.3±0 ^a	1.5±0.1 ^b	2.3±0 ^b	3.3±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	3.9±0.3 ^a	4.2±0.5 ^a	4.2±0.5 ^a	
Testigo	0.5±0 ^a	0.6±0.3 ^b	2.1±0.1 ^c	3.3±0.1 ^c	4.3±0 ^b	4.5±0 ^b	4.5±0 ^b	4.5±0 ^b	4.5±0 ^b	

Fig. 21. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente hexano, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109. B: *Trichoderma koningii* CPM-110. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), cempasúchil (*Tagetes lucida*). Tratamiento 2: col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.

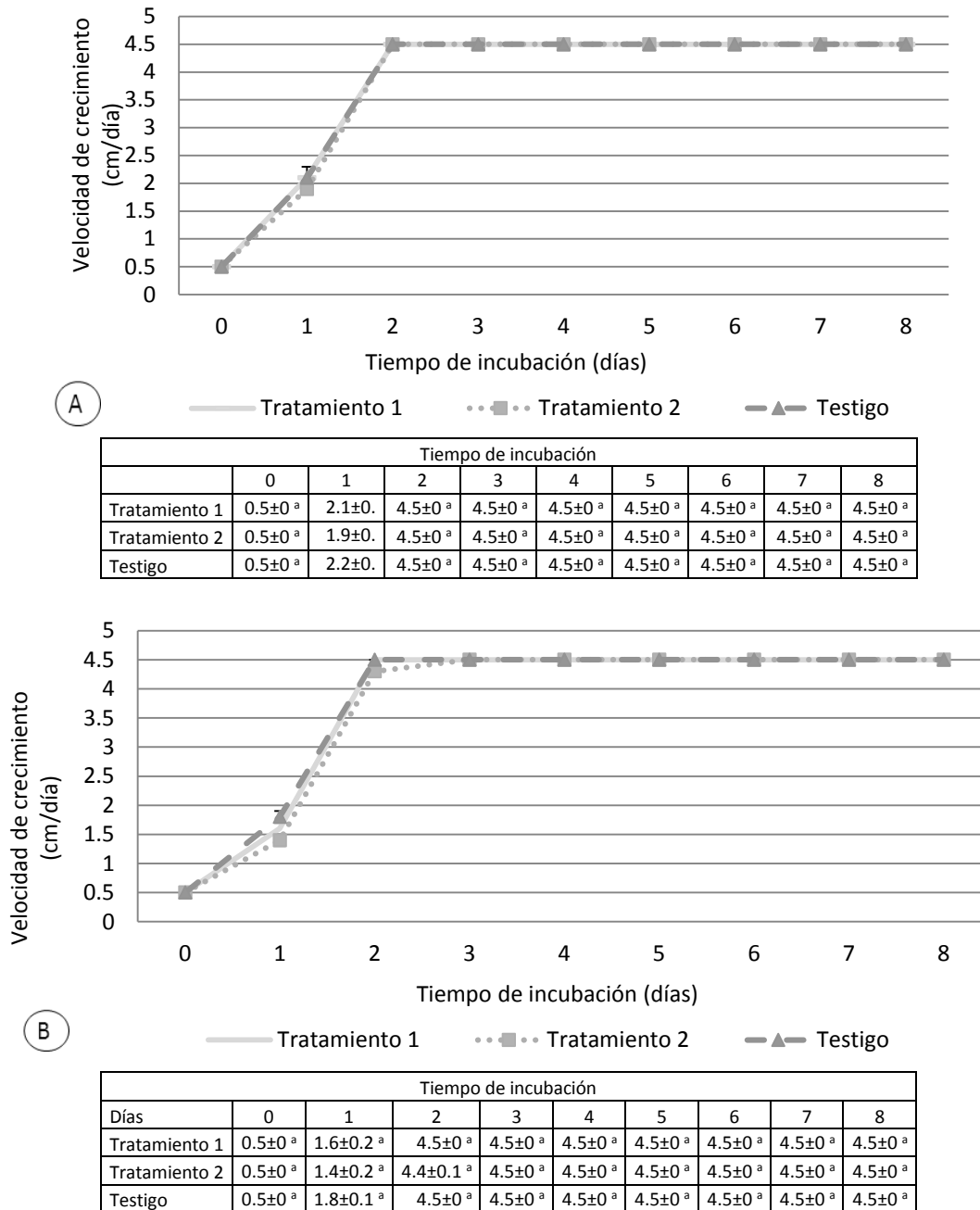
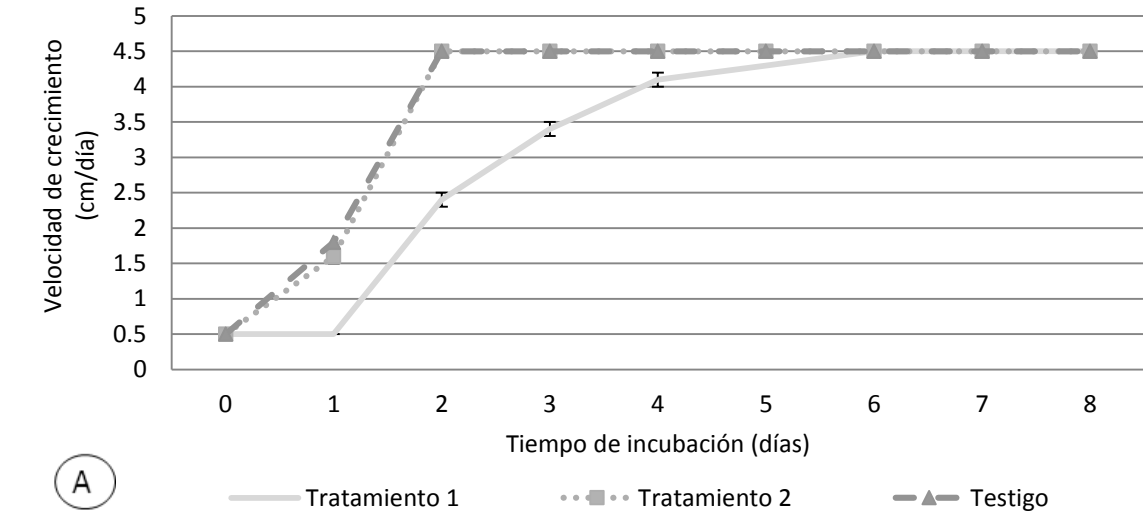
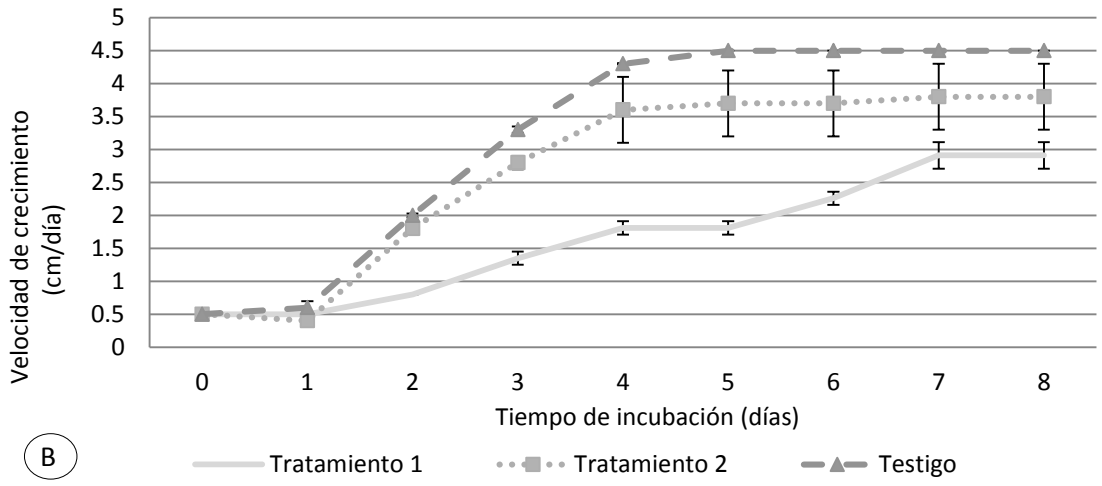


Fig. 22. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente hexano, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111. B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), cempasúchil (*Tagetes lucida*). Tratamiento 2: col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.



Tiempo de incubación		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Tratamiento 1		0.5±0 ^a	0.5±0.2 ^b	2.4±0.2 ^b	3.5±0.2 ^b	4.1±0.2 ^b	4.4±0.1 ^b	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Tratamiento 2		0.5±0 ^a	1.7±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Testigo		0.5±0 ^a	1.9±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a



Tiempo de incubación		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Tratamiento 1		0.5±0 ^a	0.5±0 ^a	0.8±0.2 ^b	1.4±0.2 ^b	1.8±0.3 ^b	1.8±0.3 ^b	2.2±0.2 ^b	2.9±0.4 ^b	2.9±0.4 ^b
Tratamiento 2		0.5±0 ^a	0.5±0.1 ^a	1.9±0 ^a	2.9±0.2 ^a	3.6±0.9 ^a	3.7±1 ^a	3.7±1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Testigo		0.5±0 ^a	0.6±0.3 ^c	2.1±0.1 ^c	3.3±0.1 ^c	4.3±0 ^c	4.5±0 ^c	4.5±0 ^c	4.5±0 ^c	4.5±0 ^c

Fig. 23. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente acetona, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109. B: *Trichoderma koningii* CPM-110. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), cempasúchil (*Tagetes lucida*). Tratamiento 2: col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.

En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111 (Fig. 24), el efecto inhibitorio fue estadísticamente diferente con respecto al testigo hasta los 5 días de crecimiento, cabe mencionar que el testigo llegó a su total crecimiento desde los 3 días. En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, la inhibición más relevante con este grupo de plantas se observó desde los 2 hasta los 4 días, llegando el testigo a su máximo crecimiento a los 3 días. Este comportamiento inhibitorio de las cuatro cepas puede atribuirse a que existen diversos registros de efectos antifúngicos y/o fungicidas en las plantas estudiadas de cebolla (*Allium cepa*), hoja sen (*Fluorencia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*) y cempasúchil (*Tagetes lucida*) (Guerrero *et al.*, 2007). Así mismo, se han identificado diversos compuestos activos, tales como el tiosulfonato presente en cebolla (*Allium cepa*), y diversas cumarinas como umbeliferona, scoparona y esculetina que han sido reportadas que están presentes en cempasúchil (*Tagetes lucida*) (Céspedes *et al.*, 2006). Este tipo de compuestos pudieron presentarse de manera parcial en los extractos obtenidos con acetona debido a la naturaleza del solvente de alta penetración capaz de arrastrar una amplia gama de compuestos. En el caso del tratamiento 2, la inhibición puede atribuirse a los compuestos con azufre que contiene la planta de col (*Brassica oleracea*), así como a la actividad fungicida producida por los aceites esenciales ya mencionados de la planta de tomillo (*Thymus vulgaris*) (Anaya, 2003; Bernal-Alcocer *et al.*, 2005; Tajkarimi *et al.*, 2010).

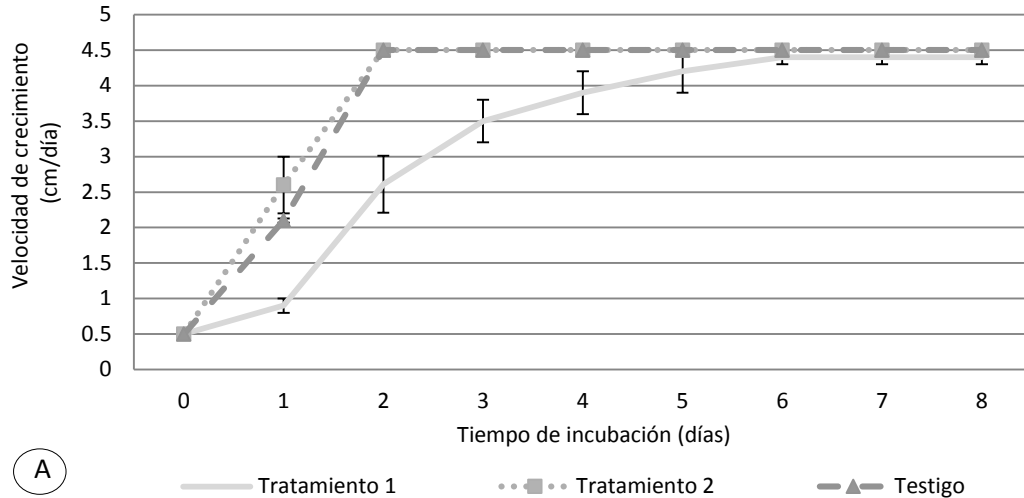
En cuanto a la proporción de inhibición de la velocidad de crecimiento (Fig. 25), se pudo observar que las plantas con mayor efecto sobre la cepa *Trichoderma koningii* CPM-110, con solvente de acetona, fueron el tomillo (*Thymus vulgaris*) con 42.3%, seguido por cebolla (*Allium cepa*) con 37.8%, col (*Brassica oleracea*) con 33.4%, y cempasúchil (*Tagetes lucida*) con 28.9%. Cabe mencionar que se observó una inhibición tanto en la velocidad de crecimiento micelial como en la esporulación. Esto puede deberse a que se tiene registrado que los aceites esenciales presentes en las plantas aromáticas tienen actividad fungicida (Zapata *et al.*, 2003), sin embargo, el mecanismo de acción aún no está completamente dilucidado. Se sabe que los compuestos lipofílicos de los aceites esenciales pueden interferir en la estructura de la membrana celular.

Una característica importante de estos aceites y sus componentes, es su hidrofobicidad, la cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular en bacterias, al igual que en las mitocondrias, haciéndolas más permeables (Aliviano y Aliviano, 2009). Esta misma

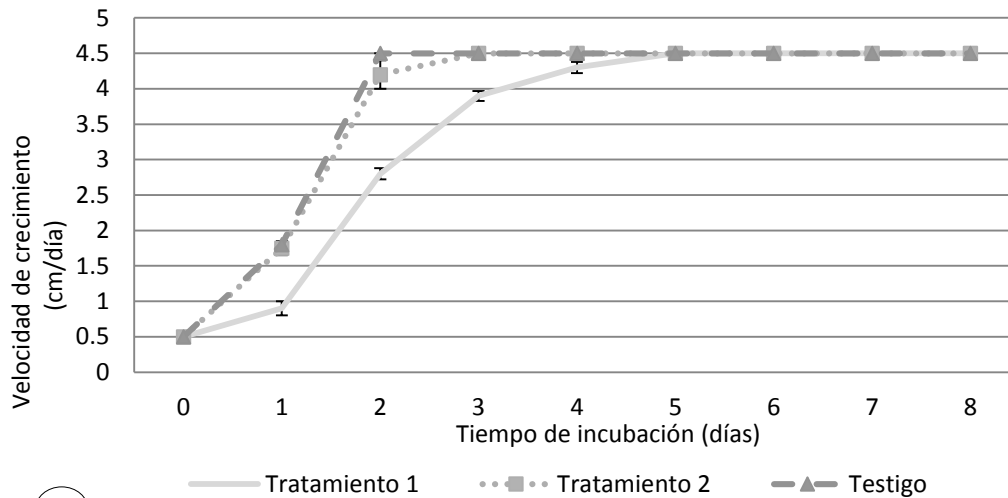
hidrofobicidad los convierte en compuestos no polares, capaces de ser arrastrados por los solventes alcohólicos como la acetona (Fig. 25). Esto puede traer consecuencias negativas en la velocidad de crecimiento y posterior reproducción de *Trichoderma koningii* CPM-110. En el caso de las cepas *Trichoderma koningii* CPM-110 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111 con solventes de hexano y acetona, la proporción de inhibición no fue mayor al 12.8%, lo cual no fue significativo para cumplir el objetivo del presente estudio. Esto pudo deberse a que no hubo una difusión adecuada de los extractos en el medio de cultivo alrededor del sensidisco, lo que dificultó la inhibición de velocidad de crecimiento micelial. Por su parte, la proporción de inhibición del resto de los extractos de las plantas fueron menores al 5%, incluyendo el uso de solvente agua. Este porcentaje de inhibición se debió a que la polaridad del agua extrajo compuestos hidrofílicos no tóxicos para las cepas evaluadas.

En el caso de la velocidad de crecimiento micelial con hexano (Tabla 20), sólo la cepa *Trichoderma koningii* CPM-110 se vio inhibida principalmente con los extractos de las plantas cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*) y cempasúchil (*Tagetes lucida*), incluidas en el tratamiento 1, con dosis de 10 mg/sensidisco. Este grupo mantuvo una velocidad de crecimiento micelial menor a lo largo del experimento con respecto al testigo sin solvente, hasta el sexto día de medición sin llegar a cubrir la caja; las colonias del testigo cubrieron la caja de Petri a los 5 días.

Además de los efectos antifúngicos de las plantas cebolla (*Allium cepa*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*) y cempasúchil (*Tagetes lucida*), también existen registros de la actividad antifúngica de la planta de ajo (*Allium sativum*). Se tiene registrado que esta planta ha podido inhibir a diversos hongos filamentosos causantes de enfermedades, tales como *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. y *Phytium* sp. Esta inhibición ha sido atribuida a la presencia de compuestos como el ajoene, saponinas y flavonoides, los cuales están reportados que son arrastrados por solventes no polares como el hexano (Mahmoud *et al.*, 2004; Irkin y Korukluoglu 2007; Celis *et al.*, 2008).



	Tiempo de incubación									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	1±0.3 ^b	2.6±0.8 ^b	3.5±0.7 ^b	3.9±0.7 ^b	4±0.7 ^a	4.3±0.3 ^a	4.4±0.2 ^a	4.4±0.2 ^a	
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	2.7±0.8 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	
Testigo	0.5±0 ^a	2.2±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	



	Tiempo de incubación									
Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tratamiento 1	0.5±0 ^a	1±0.2 ^b	2.8±0.2 ^b	3.9±0.1 ^b	4.3±0.2 ^b	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	
Tratamiento 2	0.5±0 ^a	1.8±0.2 ^a	4.3±0.4 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	
Testigo	0.5±0 ^a	1.8±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	

Fig. 24. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas con solvente acetona, a partir de los tratamientos con grupos de plantas en concentración de 10 mg por sensidisco, en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111. B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), compasúchil (*Tagetes lucida*). Tratamiento 2: col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Los testigos se desarrollaron sin solvente ni extractos. Promedio de cuatro réplicas. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa.

En este caso, la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* con ambos tratamientos de grupos de plantas evaluadas se detuvo a los 4 días y se registró crecimiento nuevamente hasta los 6 días. En éste tiempo es posible que *Trichoderma koningi*, pudo haberse adaptado a los diversos compuestos presentes en los extractos y comenzar a degradarlos para continuar su crecimiento. Se sabe que los hongos contienen un sistema enzimático altamente eficiente capaz de degradar desde compuestos polisacáridos hasta compuestos complejos como la lignina (Sánchez, 2009).

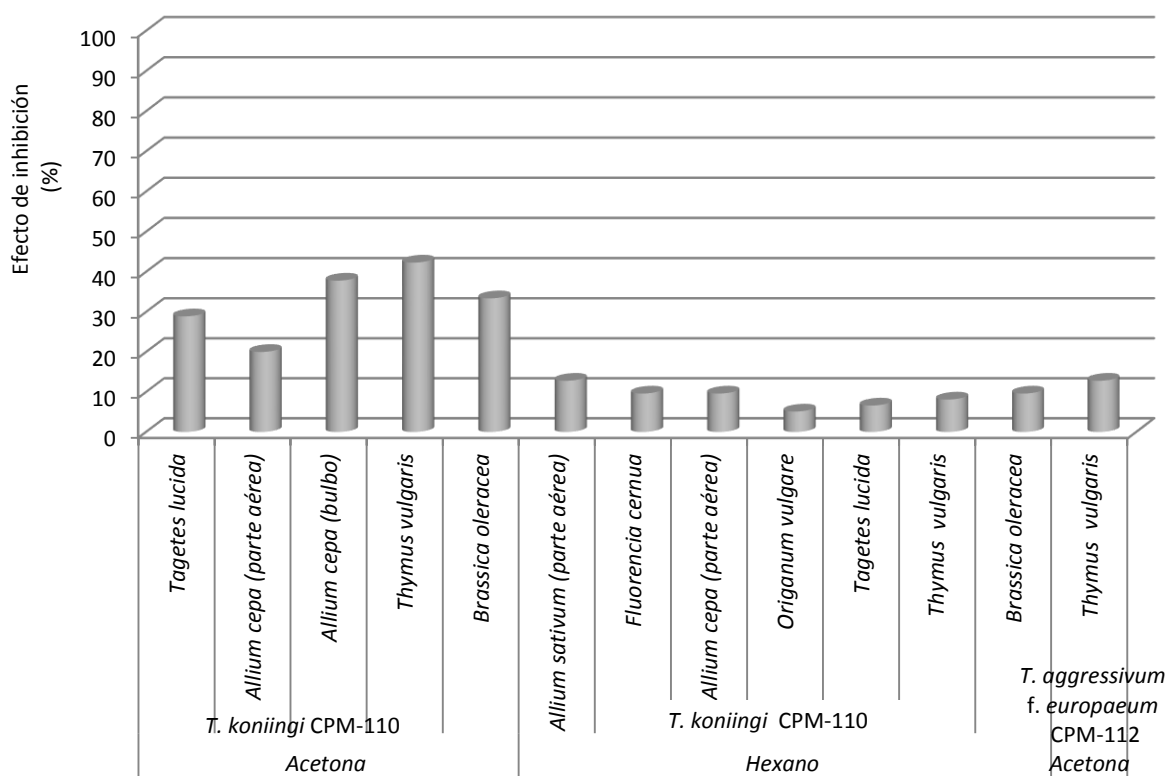


Fig. 25. Efecto de inhibición (%) sobre la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* evaluadas a los 4 días de inoculación, en presencia de extractos de diversas plantas obtenidos con diferentes solventes (acetona y hexano). Se evaluó una concentración de 10 mg de extracto con la técnica de sensidiscos, en medio de cultivo PDA.

Tabla 20. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas estudiadas de *Trichoderma* en los tratamientos con solvente hexano en 10 mg/sensidisco hasta los 6 días de incubación.

Especie (código)	Tratamiento	Velocidad de crecimiento micelial (cm/día)						
		0	1	2	3	4	5	6
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (CPM-109)	1	0.5±0 ^a	1.2±0.6 ^b	4.3±0.1 ^a	4.3±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	2	0.5±0 ^a	1.8±0.1 ^a	4.3±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	1.9±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
<i>Trichoderma koningii</i> (CPM-110)	1	0.5±0 ^a	0.5±0 ^a	1.7±0.1 ^a	2.8±0.1 ^a	3.3±0.6 ^a	3.3±0.6 ^a	3.5±0.8 ^a
	2	0.5±0 ^a	0.2±0 ^a	1.4±0.1 ^b	2.3±0 ^b	3.3±0.1 ^a	3.3±0.1 ^a	3.9±0.3 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	0.6±0.3 ^b	2.0±0.1 ^c	3.3±0.1 ^c	4.3±0 ^a	4.5±0 ^b	4.5±0 ^b
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (CPM-111)	1	0.5±0 ^a	2.1±0.3 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	2	0.5±0 ^a	1.9±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	2.2±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (CPM-112)	1	0.5±0 ^a	1.6±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	2	0.5±0 ^a	1.4±0.2 ^a	4.3±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	1.8±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a

Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), cempasúchil (*Tagetes lucida*). Tratamiento 2: col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), testigo solo con solvente. T: testigo sin solvente. Los datos analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 4.

En cuanto a los extractos obtenidos con acetona (Tabla 21), la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 fue inhibida en un 52% hasta los 2 días en el tratamiento 1, en este caso expuesta a extractos de cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*) hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*) y cempasúchil (*Tagetes lucida*), con las características antifúngicas ya mencionadas. En el caso de la cepa *Trichoderma koningii* CPM-110, ambos tratamientos de plantas tuvieron un efecto inhibitorio en el desarrollo micelial. En el tratamiento 1, la mayor inhibición fue del 100% en las primeras 24 h con respecto al testigo, terminando con una inhibición del 40% a los 5 días. En el caso de la cepa *Trichoderma koningii* CPM-110 con las plantas hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), y ajo

(*Allium sativum*) se observó una inhibición de 13.4% para el día 2 y de 15.1% para los 3 días, esta inhibición fue menor a pesar de que existen diversos registros de las propiedades antifúngicas del ajo (*Allium sativum*) (Alcalá de Marcano *et al.*, 2005; García y Vázquez, 2002; Mahmoud *et al.*, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010). En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111 el mayor porcentaje de inhibición fue en las 24 y 48 h con un 57.1% y 42%, respectivamente. En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, los mayores niveles de inhibición se observaron en las 24 y 48 h con un 50% y 37% de inhibición, respectivamente.

Tabla 21. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* en los tratamientos estudiados con solvente acetona en 10 mg/disco hasta los 6 días de incubación.

Especie (código)	Tratamiento	Velocidad de crecimiento micelial (cm/día)					
		0	1	2	3	4	5
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (CPM-109)	1	0.5±0 ^a	0.5±0.2 ^b	2.4±0.2 ^b	3.5±0.2 ^b	4.1±0.2 ^b	4.4±0.1 ^b
	2	0.5±0 ^a	1.6±0.2 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	1.8±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
<i>Trichoderma koningii</i> (CPM-110)	1	0.5±0 ^a	0.5±0 ^a	0.8±0.2 ^b	1.4±0.2 ^b	1.8±0.3 ^b	1.8±0.3 ^b
	2	0.5±0 ^a	0.4±0.1 ^a	1.9±0 ^a	2.9±0.2 ^a	3.6±0.9 ^a	3.7±1 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	0.6±0.3 ^b	2.1±0.1 ^c	3.3±0.1 ^c	4.3±0 ^c	4.5±0 ^c
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (CPM-111)	1	0.5±0 ^a	1±0.3 ^b	2.6±0.8 ^b	3.5±0.7 ^b	3.9±0.7 ^b	4±0.7 ^b
	2	0.5±0 ^a	2.7±0.8 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	2.2±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> (CPM-112)	1	0.5±0 ^a	1±0.2 ^b	2.8±0.2 ^b	3.9±0.1 ^b	4.3±0.2 ^b	4.5±0 ^a
	2	0.5±0 ^a	1.8±0.2 ^a	4.2±0.4 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
	Testigo	0.5±0 ^a	1.8±0.1 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a

Tratamiento 1: cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), hoja sen (*Flourensia cernua*), orégano (*Origanum vulgare*), cempasúchil (*Tagetes lucida*). Tratamiento 2: col (*Brassica oleracea*), tomillo (*Thymus vulgaris*), sólo solvente. Testigo: testigo sin solvente. Los datos analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 4.

Además de los diversos registros de las propiedades antifúngicas de ajo (*Allium sativum*), también se sabe que hoja sen (*Fluorencia cernua*) tiene la capacidad de inhibir la velocidad de crecimiento en un 91.9% de *Alternaria alternata*, así como a los hongos *Colletotrichum gloesporoides* y *Penicillium digitatum* en porcentajes de 93.4% y 94%, respectivamente (Guerrero *et al.*, 2007).

8.1.1 Conclusiones

1. Los extractos obtenidos de las plantas estudiadas con los solventes hexano, acetona, etanol y agua, las dosis de 2 mg, 6 mg y 8 mg no fueron efectivas para inhibir la velocidad de crecimiento de las cuatro cepas evaluadas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma koningii* CPM-110, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111, y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. La dosis de 10 mg en etanol y agua tampoco inhibió la velocidad de crecimiento. Esto demuestra el alto nivel de tolerancia de las cepas de *Trichoderma* a compuestos antifúngicos de origen vegetal en dosis bajas.
2. La dosis de 10 mg/ml en acetona fue efectiva para inhibir la velocidad de crecimiento micelial las cepas de *Trichoderma koningii* CPM-110 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111.
3. La proporción de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial, sobre la cepa *Trichoderma koningii* CPM-110, con solvente de acetona, fue con las plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*) con 42.3%, seguido por cebolla (*Allium cepa*) con 37.8%, col (*Brassica oleracea*) con 33.4%, y cempasúchil (*Tagetes lucida*) con 28.9%. Se observó una inhibición tanto en la velocidad de crecimiento micelial como en la esporulación.
4. El etanol utilizado en la resuspensión de extractos vegetales en dosis de 10 mg/ml resultó ser altamente tóxico para la velocidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma koningii* CPM-110, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-111, y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Así mismo, inhibió la velocidad de crecimiento de las cepas comestibles. Por ello, se recomienda no utilizarlo como disolvente del extracto en estudios de este tipo.

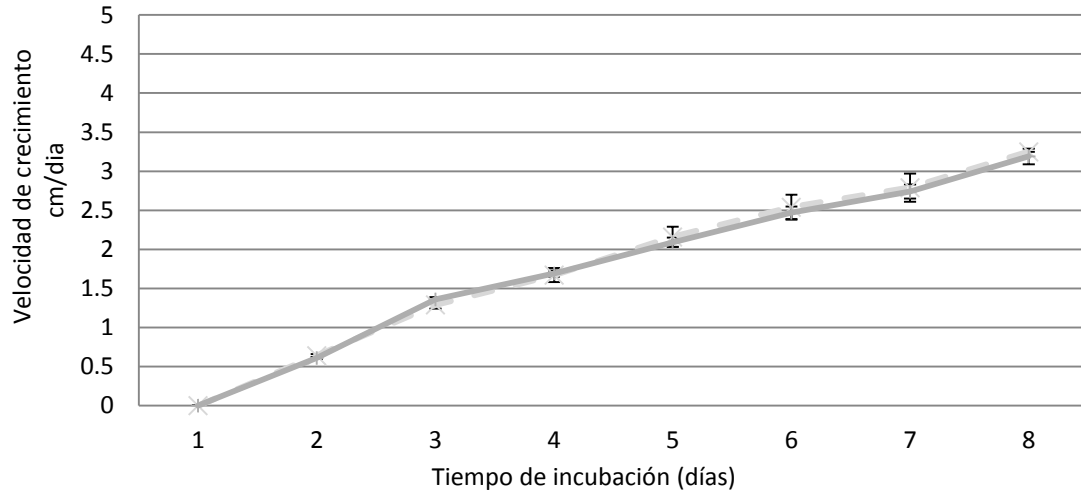
8.2 Evaluación del efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial (Experimento 2)

Se realizó un experimento con extracto etanólico de ruda (*Ruta graveolens*) a una dosis de 4 mg/ml. Esta dosis se seleccionó experimentalmente, ya que dosis superiores inhibieron significativamente la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma*, pero también afectó significativamente el desarrollo micelial de las cepas comestibles en estudio. En este caso, se evaluó la velocidad de crecimiento micelial de todas las cepas, así como la producción de esporas al colonizar completamente la caja de petri. También se realizó una prueba de germinación de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* sobre medio de cultivo con extracto.

8.2.1. Velocidad de crecimiento micelial de los hongos comestibles

En cuanto a las cepas de hongos comestibles, la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50 (Fig. 26A), el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) no tuvo ningún efecto negativo significativo en el desarrollo micelial, por lo que no se observó ninguna diferencia en la velocidad de crecimiento con respecto al testigo. Para la cepa *Lentinula edodes* CP-7 (Fig. 26B), se observó que fue más sensible al extracto de ruda (*Ruta graveolens*) ya que tuvo un efecto inhibitorio promedio del 23% en el desarrollo de la cepa a todo lo largo del experimento (Fig. 28), siendo al final del 14.6% a los 8 días.

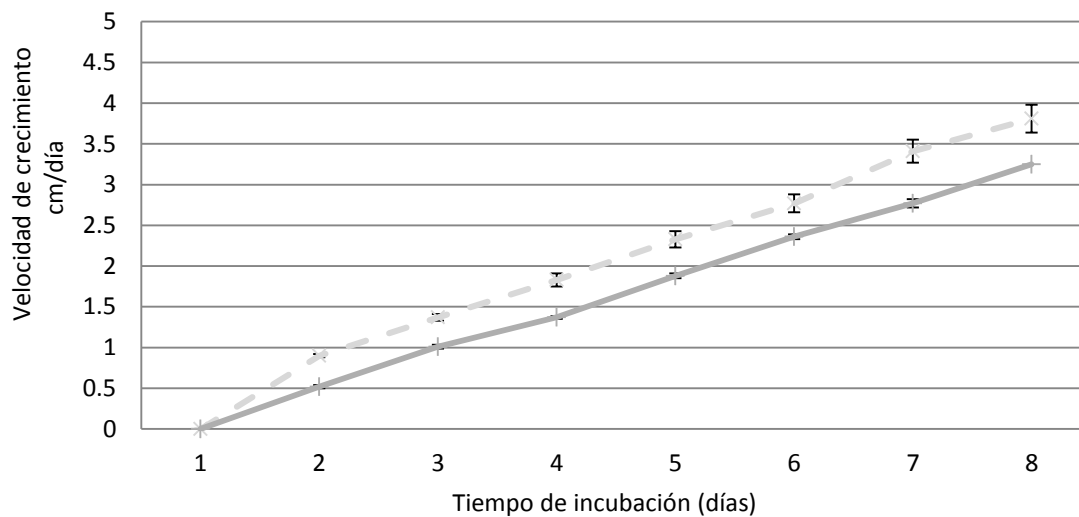
En cuanto a la cepa *Pleurotus pulmonarius* CP-267 (Fig. 27), el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) también tuvo un efecto negativo en el desarrollo del micelio conforme avanzó el experimento, obteniendo un porcentaje de inhibición del 35.8% y 37% a los 6 y 7 días respectivamente (Fig. 28). La cepa que mostró mayor tolerancia al extracto en la velocidad de crecimiento micelial fue la de *Pleurotus ostreatus* ya que su desarrollo mostró una estimulación en la velocidad del 5.4% al día dos (Fig. 29), no mostró diferencia estadística de inhibición en comparación con el testigo (Fig. 28) y obtuvo una proporción de inhibición no mayor al 3% al cuarto día (Fig. 30). Para la cepa *Pleurotus pulmonarius*, también se observó una estimulación en la velocidad de crecimiento en el primer día del 14.8%, sin embargo se observó un aumento en la inhibición e crecimiento micelial a lo largo del experimento (Fig 28).



A

—x— Testigo —+— Ruda

Tiempo de incubación		1	2	3	4	5	6	7	8
Testigo		0 ± 0 ^a	0.64 ± 0.02 ^a	1.29 ± 0.05 ^a	1.67 ± 0.09 ^a	2.16 ± 0.13 ^a	2.54 ± 0.16 ^a	2.79 ± 0.18 ^a	3.25 ± 0.19 ^a
Ruda		0 ± 0 ^a	0.61 ± 0.01 ^a	1.36 ± 0.03 ^a	1.69 ± 0.04 ^a	2.09 ± 0.06 ^a	2.47 ± 0.08 ^a	2.74 ± 0.09 ^a	3.19 ± 0.1 ^a

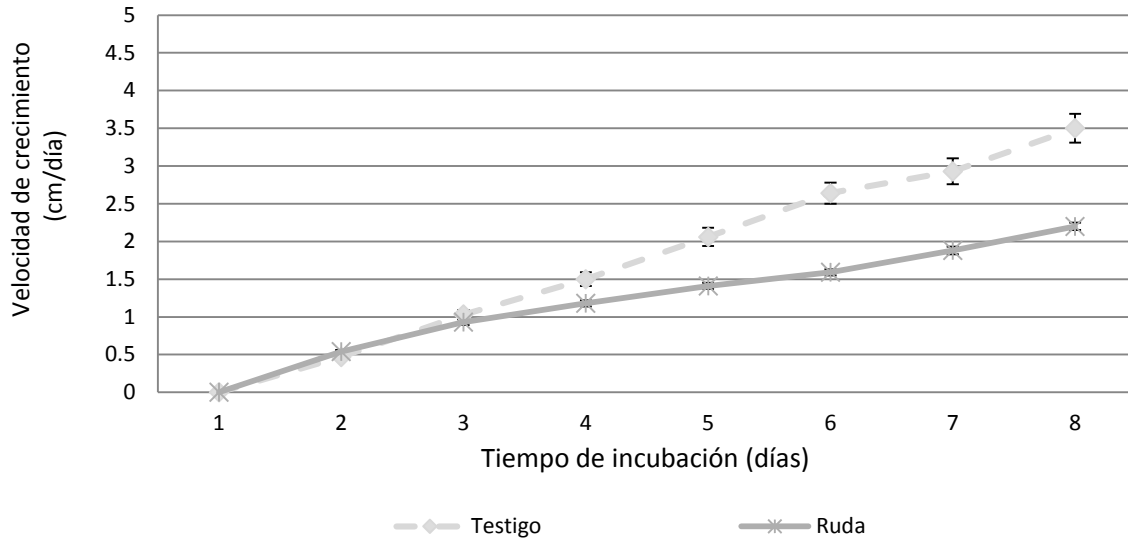


B

—x— Testigo —+— Ruda 1 mg/ml

Tiempo de incubación		1	2	3	4	5	6	7	8
Días		1	2	3	4	5	6	7	8
Testigo		0 ± 0 ^a	0.9 ± 0.02 ^a	1.37 ± 0.04 ^a	1.83 ± 0.08 ^a	2.33 ± 0.1 ^a	2.77 ± 0.11 ^a	3.41 ± 0.14 ^a	3.81 ± 0.17 ^a
Ruda 1 mg/ml		0 ± 0 ^b	0.52 ± 0.02 ^b	1.01 ± 0.022 ^b	1.37 ± 0.018 ^b	1.88 ± 0.03 ^b	2.36 ± 0.03 ^b	2.77 ± 0.05 ^b	3.25 ± 0.09 ^a

Fig. 26. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en medio EMA, sobre la velocidad de crecimiento de A: *Pleurotus ostreatus* CP-50 con 4 mg/ml y B: *Lentinula edodes* CP-7 con 1 mg/ml. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.



Tiempo de incubación								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ruda	0±0 ^a	0.54 ± 0.02 ^a	0.93 ± 0.04 ^a	1.18 ± 0.04 ^a	1.41 ± 0.03 ^b	1.59 ± 0.03 ^b	1.88 ± 0.05 ^b	2.2 ± 0.05 ^b
Testigo	0±0 ^a	0.47 ± 0.01 ^a	1.03 ± 0.06 ^a	1.5 ± 0.09 ^a	2.06 ± 0.12 ^a	2.64 ± 0.14 ^a	2.93 ± 0.17 ^a	3.5 ± 0.19 ^a

Fig. 27. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio EMA, sobre la velocidad de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* CP-267. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

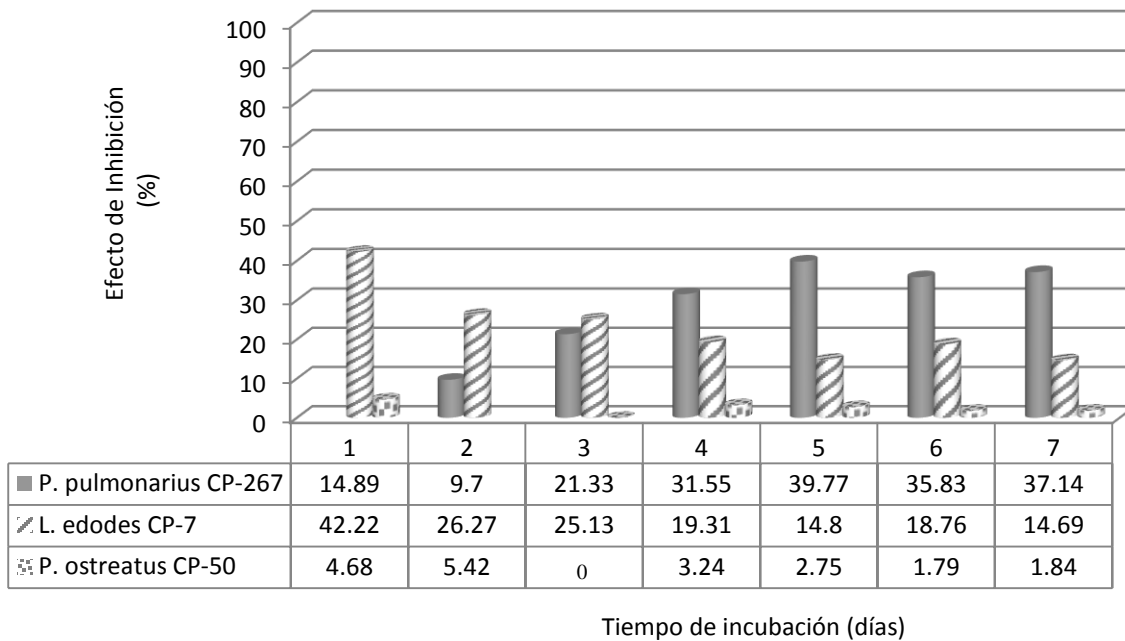


Fig. 28. Efecto promedio de inhibición (%) sobre la velocidad de crecimiento micelial de las cepas estudiadas de hongos comestibles por el extracto de ruda (*Ruta graveolens*).

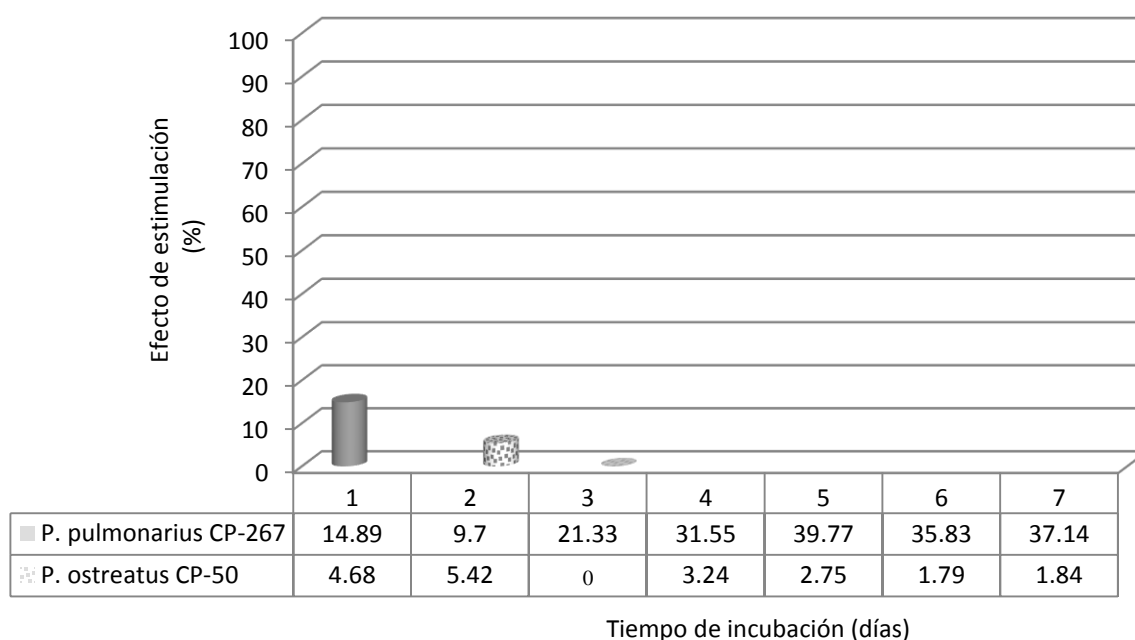


Fig. 29. Efecto promedio de la estimulación (%) sobre la velocidad de crecimiento de las cepas de *Pleurotus* con el extracto de ruda (*Ruta graveolens*).

8.2.2. Caracterización morfológica a partir del crecimiento micelial de los hongos comestibles

También se evaluó el crecimiento micelial de las cepas comestibles en presencia el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) para asegurarse que no tuviera un efecto negativo en su desarrollo. Posteriormente a la evaluación de su velocidad de crecimiento micelial, se realizó una caracterización morfológica de las cepas comestibles (Tabla 22, Fig. 30) a los 10 días del crecimiento. En la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50, no se observaron cambios en su morfología a lo largo del experimento, ni en coloración, densidad del micelio o presencia de micelio aéreo. En el caso de la cepa *Pleurotus pulmonarius* CP-267, se observó una marcada diferencia en crecimiento micelial irregular de las colonias con respecto al testigo (Fig. 30C), a pesar de esto, el crecimiento micelial continuó a lo largo del experimento hasta cubrir la caja. En el caso de la cepa *Lentinula edodes* CP-7, con dosis de 1 mg/ml de extracto en el medio de cultivo, se observó la formación de un halo alrededor del inóculo (Fig. 30E), el cual se cubrió con micelio al final del experimento. Se observó que hubo un mayor desarrollo micelial, ya que el micelio se observó más denso y lanoso que el testigo (Tabla 22). Esta estimulación de la velocidad de crecimiento

puede deberse al efecto de hormesis ya mencionado (Oliva *et al.*, 2003), por la presencia de compuestos potencialmente tóxicos para el micelio de la cepa comestible.

Tabla 22. Caracterización morfológica de las colonias de las cepas comestibles en medio EMA cultivadas en 4 mg/ml de extracto de ruda (*Ruta graveolens*), a los 10 días de inoculación. CP-50 *Pleurotus ostreatus*, CP-267 *Pleurotus pulmonarius* y CP-7 *Lentinula edodes*.

Características	Cepas					
	CP-50		CP-267		CP-7	
	Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	Testigo	Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	Testigo	Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)*	Testigo
Color	Blanca	Blanca	Blanco	Crema	Blanco	Blanco
Textura	Algodonosa	Algodonosa	Lanosa regular	Lanosa regular	Lanosa regular	Lanosa escaso
Densidad	Abundante	Abundante	Regular	Regular	Regular	Escaso
Micelio aéreo	Regular	Regular	Escaso	Escaso	Regular	Escaso
Borde	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Regular	Regular

*La concentración de ruda (*Ruta graveolens*) para la cepa *Lentinula edodes* CP-7 fue de 1 mg/ml en el medio de cultivo.

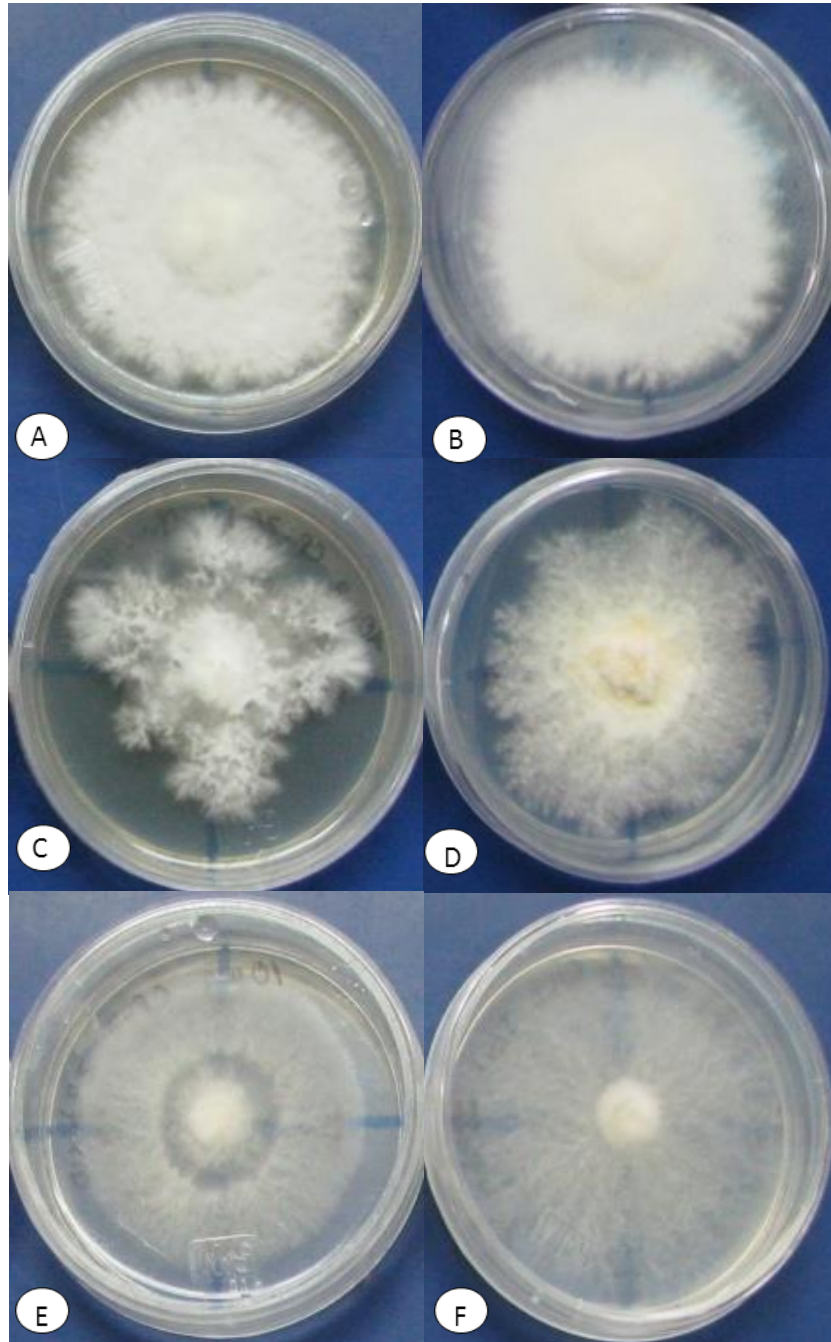
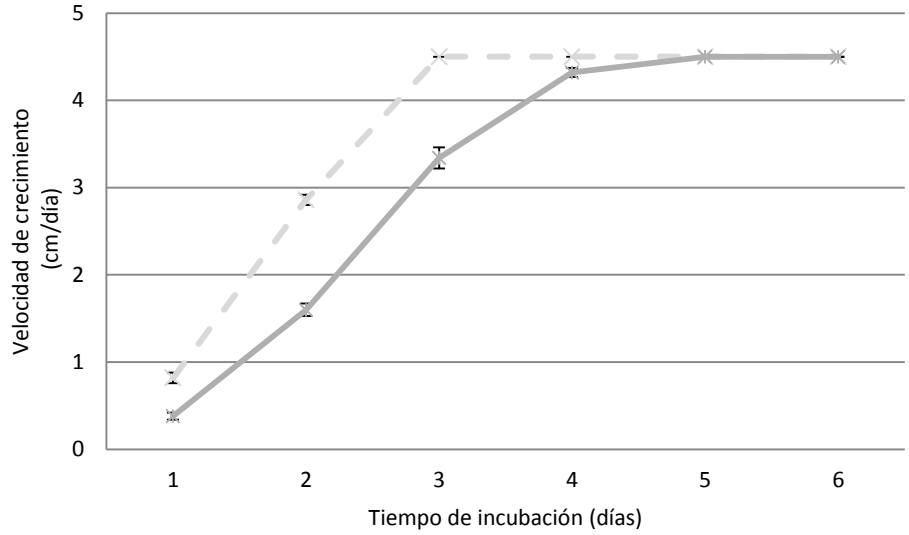


Fig. 30. Colonias miceliales de las cepas de hongos comestibles evaluadas a los 7 días de incubación. A y B: CP-50 *Pleurotus ostreatus*. C y D: CP-267 *Pleurotus pulmonarius*. E y F: CP-7 *Lentinula edodes*. *La concentración de ruda (*Ruta graveolens*) para la cepa *Lentinula edodes* CP-7 fue de 1 mg/ml en medio de cultivo EMA. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de ruda (*Ruta graveolens*). La serie B, D y F son los testigos sin extracto.

8.2.3. Velocidad de crecimiento micelial de los mohos *Trichoderma* en las diferentes cepas estudiadas

En la velocidad de crecimiento micelial (Fig. 31A), en la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, se observó un efecto significativo de inhibición del extracto de ruda sobre la velocidad de crecimiento en los días 1 y 2, siendo de 53.6% y 44%, respectivamente (Fig. 29). El punto máximo de crecimiento para el testigo se alcanzó a los 3 días. En cuanto a la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Fig. 31B), la inhibición de la velocidad de crecimiento micelial fue significativa con respecto al testigo desde el día 1 hasta el día 5 con una proporción del 81.4% al día uno y hasta un 51.9% al día 3, llegando a colonizar completamente la caja de Petri hasta los 6 días. En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Fig. 32), también se observó un efecto inhibitorio de la velocidad de crecimiento micelial por el extracto de ruda, principalmente las primeras 24 h con una inhibición del 66% (Fig. 33) sin embargo, el efecto no fue tan evidente como en las otras dos cepas evaluadas. Esta inhibición en el desarrollo micelial concuerda con estudios previos donde se comprobó que los compuestos antifúngicos 5- y 8-methoxypsoralen aislados de ruda (*Ruta graveolens*) mostraron un efecto inhibitorio en el desarrollo micelial de los hongos filamentosos *Rhizoctonia solanii*, *Fusarium* spp., y *Trichoderma viride* (Ojala *et al.*, 2000).

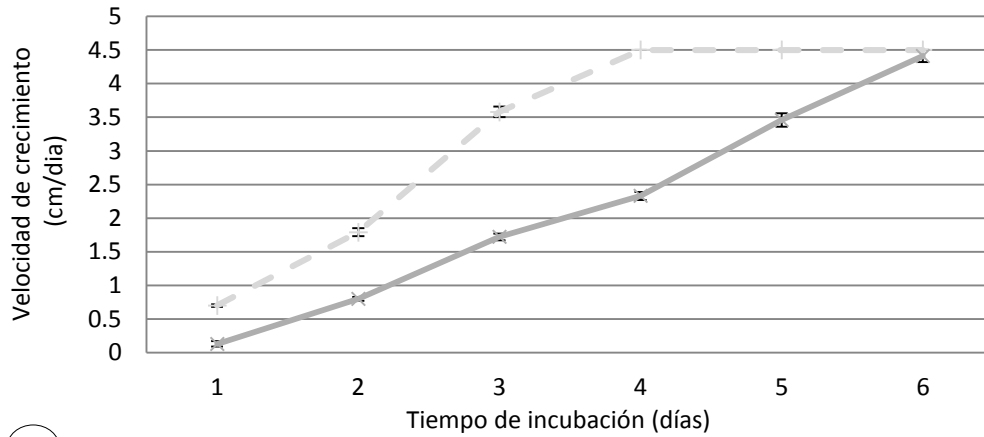
En general, se pudo observar un efecto inhibitorio de la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas cultivadas en el extracto de ruda (*Ruta graveolens*), en la concentración de 4 mg/ml, principalmente sobre la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeun* (CPM-112). Esto se debe a que la planta de ruda (*Ruta graveolens*) contiene diversos metabolitos secundarios como cumarinas, furanocumarinas y alcaloides con actividad fungicida (Oliva *et al.*, 2003; El-Sayed *et al.*, 2000). Existen registros de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial a partir de extractos de ruda (*Ruta graveolens*) y de sus compuestos puros contra hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea*, *Phomopsis viticola* y *Trichoderma viridae* (Oliva *et al.*, 1999; Ojala *et al.*, 2000).



(A)

—x— Testigo —*— Ruda

Tiempo de incubación		1	2	3	4	5	6
Testigo		0.82±0.06 ^a	2.86±0.06 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Ruda		0.38±0.04 ^b	1.6±0.07 ^b	3.34±0.12 ^b	4.32±0.05 ^b	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a

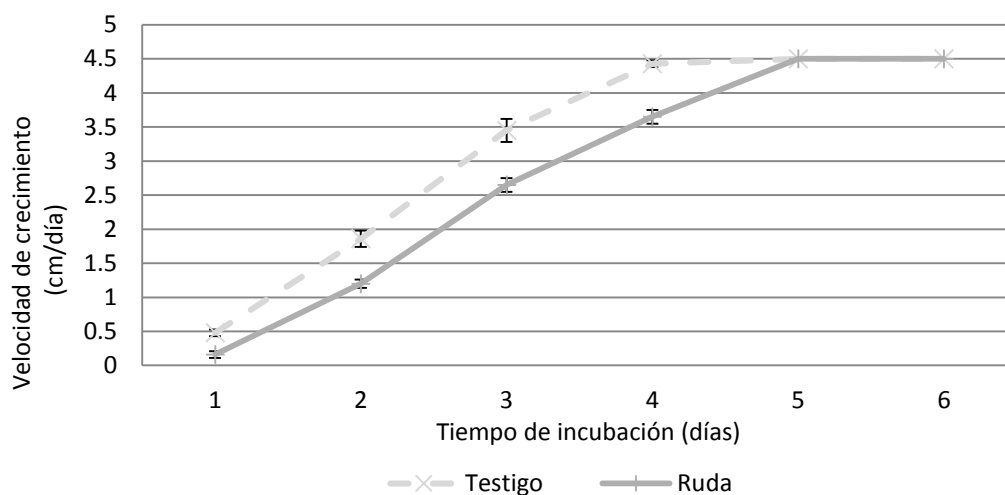


(B)

—+— Testigo —x— Ruda

Tiempo de incubación		1	2	3	4	5	6
Días		1	2	3	4	5	6
Testigo		0.7±0.02 ^a	1.79±0.06 ^a	3.58±0.08 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Ruda		0.13±0.04 ^b	0.8±0.03 ^b	1.72±0.05 ^b	2.33±0.05 ^b	3.46±0.1 ^a	4.41±0.09 ^a

Fig. 31. Velocidad de crecimiento micelial promedio de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en presencia del extracto etanólico de ruda (*Ruta graveolens*) con dosis de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-113), B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (CPM-112). Los datos analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n=10.



		Tiempo de incubación					
		1	2	3	4	5	6
Testigo		0.48±0.05 ^a	1.86±0.12 ^a	3.45±0.17 ^a	4.43±0.05 ^a	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a
Ruda		0.16±0.05 ^b	1.2±0.06 ^b	2.65±0.1 ^b	3.65±0.1 ^b	4.5±0 ^a	4.5±0 ^a

Fig. 32. Velocidad de crecimiento micelial promedio de las cepa *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-109, en presencia del extracto etanólico de ruda (*Ruta graveolens*) con dosis de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

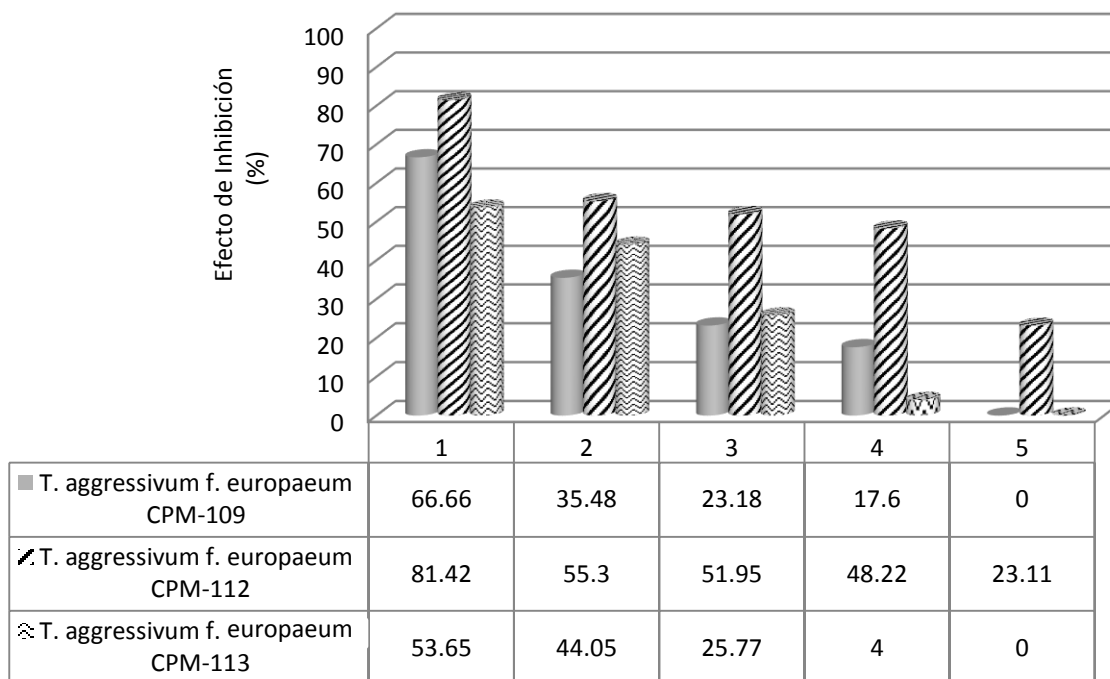
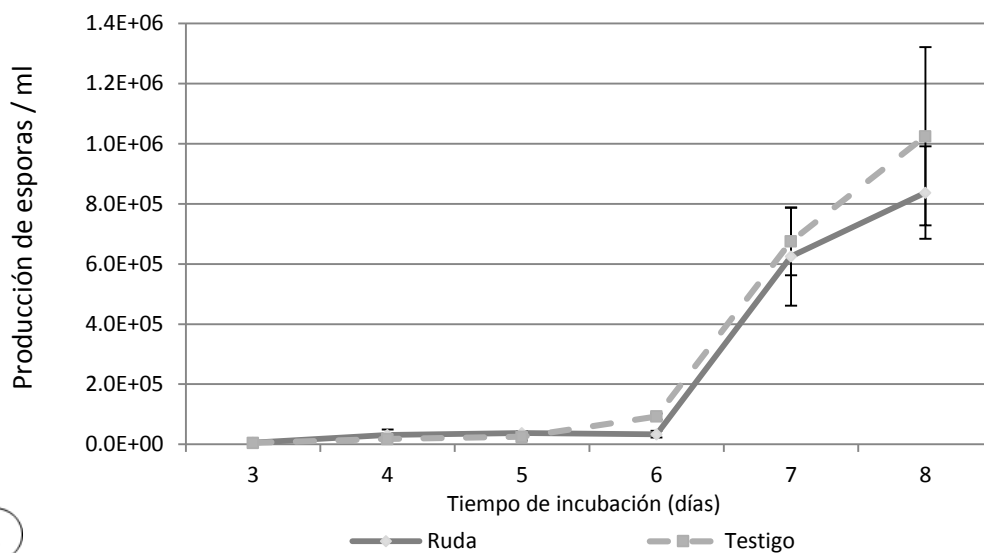


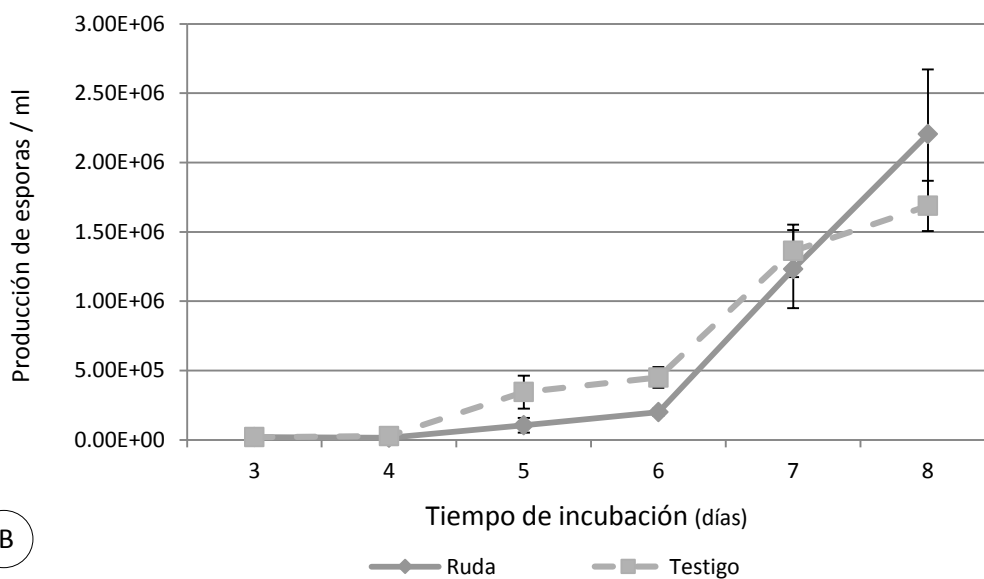
Fig. 33 Efecto promedio de inhibición (%) sobre la velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* por el extracto etanólico de ruda (*Ruta graveolens*) 4 mg/ml en medio de cultivo PDA con respecto al testigo.

8.2.4. Esporulaci3n de *Trichoderma* a partir del crecimiento micelial

El conteo de esporas se llev3 a cabo a partir de las cajas de Petri de donde se midi3 la velocidad de crecimiento micelial, donde las cajas ya contenían una concentraci3n de 4 mg/ml de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el medio de cultivo. Una vez que el micelio coloniz3 completamente la caja de Petri, antes de la esporulaci3n, comenz3 el conteo de esporas, a partir del tercer día. En las figuras 34A y 35, se observa que no hubo una diferencia estadística en la cantidad de esporas con respecto al testigo durante el experimento de ninguna de las dos cepas de *Trichoderma* evaluadas. Esto pudo deberse a que las cepas se mantuvieron cultivadas en medio con extracto de ruda (*Ruta graveolens*) y tuvieron tiempo suficiente para adaptarse a los compuestos del extracto, y a su vez, y recuperaron su desarrollo en cuanto a la producci3n de esporas. Se sabe que el género *Trichoderma* tiene una alta capacidad para degradar diversos compuestos del sustrato donde se desarrolla. Su metabolismo enzimático tiene la capacidad de degradar una amplia variedad de sustratos, que van desde celulosa hasta compuestos inorgánicos como diversos plaguicidas, incluidos herbicidas, organoclorados e insecticidas organofosforados (Colina *et al.*, 2009; Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Esta capacidad metab3lica pudo interferir en la rápida adaptaci3n de los componentes orgánicos del extracto evaluado. En el caso de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, el tratamiento de ruda (*Ruta graveolens*) redujo la velocidad de crecimiento en los días 5 y 6, en comparaci3n con la velocidad del crecimiento micelial del testigo. Entre las tres cepas evaluadas de *Trichoderma*, la cepa con mayor esporulaci3n a lo largo del experimento fue la de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, CPM-113 (Fig. 34). A pesar de la variabilidad de la cantidad de esporas para los últimos días del muestreo, se observ3 que la cinética de esporulaci3n el tratamiento con extracto de ruda se mantuvo por debajo del testigo al menos hasta el sexto día para las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y CPM-112.

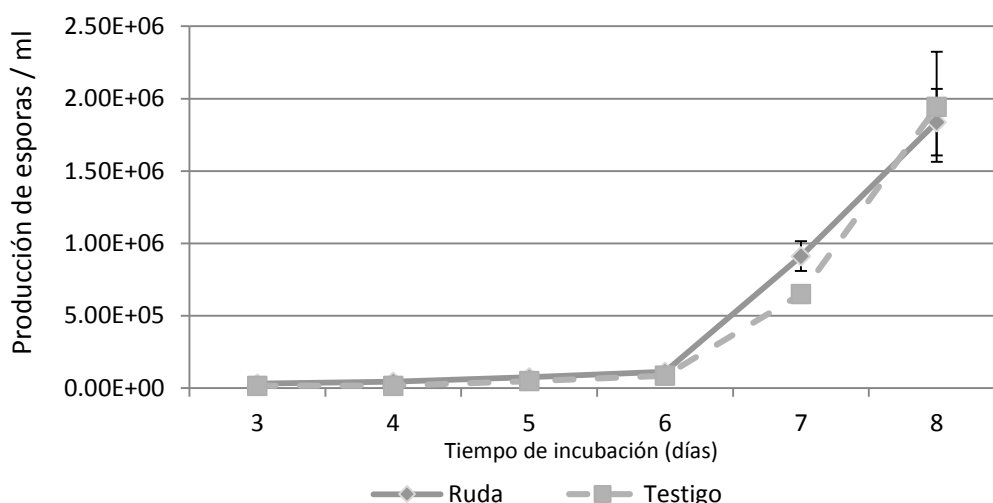


Tiempo de incubación						
	3	4	5	6	7	8
Ruda	5.94 E+03±1.39 E+03 ^a	3.16 E+04±1.80 E+04 ^a	3.72 E+04±6.32 E+03 ^a	3.38 E+04±1.13 E+04 ^a	6.25 E+05±1.64 E+05 ^a	8.38 E+05±1.54 E+05 ^a
Testigo	4.69 E+03±1.07 E+03 ^a	1.78 E+04±1.87 E+03 ^a	2.50 E+04±1.21 E+04 ^a	9.25 E+04±1.01 E+04 ^a	6.75 E+05±1.12 E+05 ^a	1.03 E+06±2.97 E+05 ^a



Tiempo de incubación						
	3	4	5	6	7	8
Ruda	1.94E+04±5.24 E+03 ^a	1.53 E+04±5.80 E+03 ^a	1.05E+05±5.35 E+04 ^a	2.00E+05±2.56 E+04 ^a	1.23E+06±2.81 E+05 ^a	2.21 E+06±4.66 E+05 ^a
Testigo	1.97E+04±5.51 E+03 ^a	2.75 E+04±9.74 E+03 ^a	3.45E+05±1.19 E+05 ^b	4.50E+05±7.47 E+04 ^b	1.36E+06±1.89 E+05 ^a	1.69 E+06±1.82 E+05 ^a

Fig. 34. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n= 10.



Tiempo de incubación						
	3	4	5	6	7	8
Ruda	3.22 E+04±7.56 E+03 ^a	4.44 E+04±1.05 E+04 ^a	7.69 E+04±2.77 E+04 ^a	1.14 E+05±2.11 E+04 ^a	9.13 E+05±1.03 E+05 ^a	1.84 E+06± 2.31 E+05 ^a
Testigo	1.72 E+04±3.04 E+03 ^a	1.72 E+04±5.58 E+03 ^a	4.94 E+04±2.65 E+04 ^a	8.69 E+04±2.28 E+04 ^a	6.50 E+05±5.10 E+04 ^b	1.94 E+06± 3.79 E+05 ^a

Fig. 35. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: $n = 10$.

8.2.5. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) sobre la germinación de esporas de *Trichoderma* y su esporulación

Para la prueba de germinación de esporas se realizó una solución con una cantidad conocida de esporas por mililitro, la cual, fue inoculada y dispersa sobre la placa de medio de cultivo agar papa dextrosa con extracto de ruda (*Ruta graveolens*), con la finalidad de observar el efecto del extracto sobre la germinación de las esporas con respecto al testigo. Posteriormente, se realizó un conteo del número de esporas producidas por las colonias que confluyeron y esporularon en el mismo medio de cultivo. El efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) sobre la germinación de las esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* sobre el medio de cultivo se muestra en las figuras 36 y 37. El conteo de las esporas germinadas se detuvo a los 4 días después de inoculadas, cuando las colonias de las esporas germinadas colonizaron completamente la caja de Petri. En la figura 36A se observa que para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 si hubo una diferencia significativa con respecto al testigo hasta el segundo día del experimento, sin embargo desde el tercer día la variabilidad del conteo no permitió una diferencia significativa con respecto al testigo.

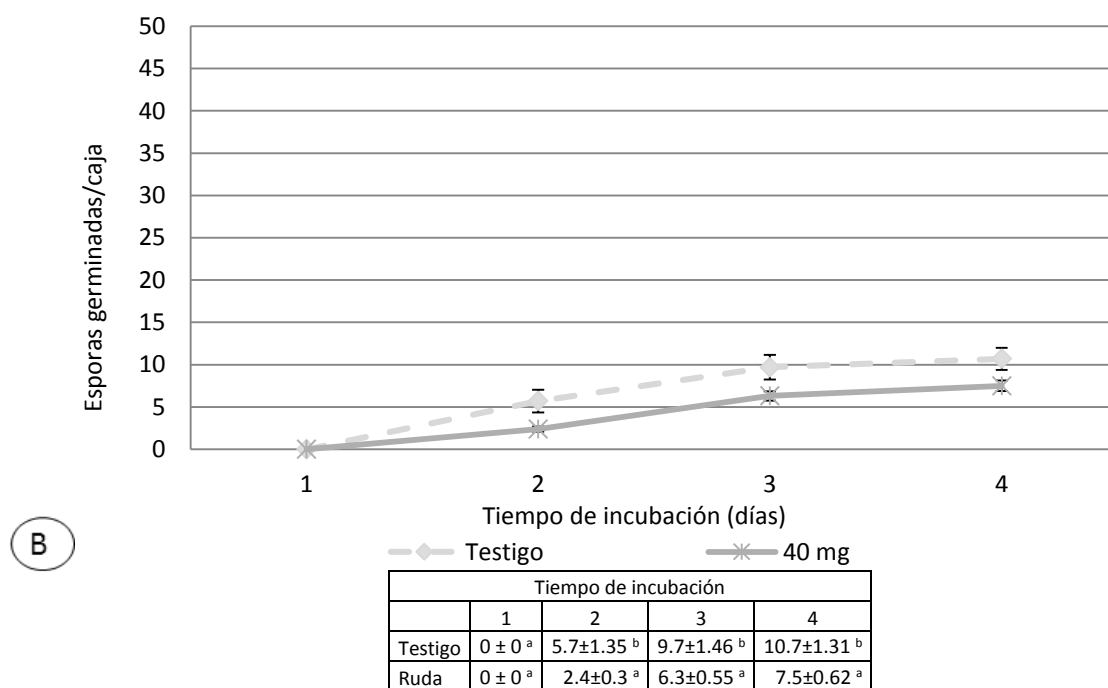
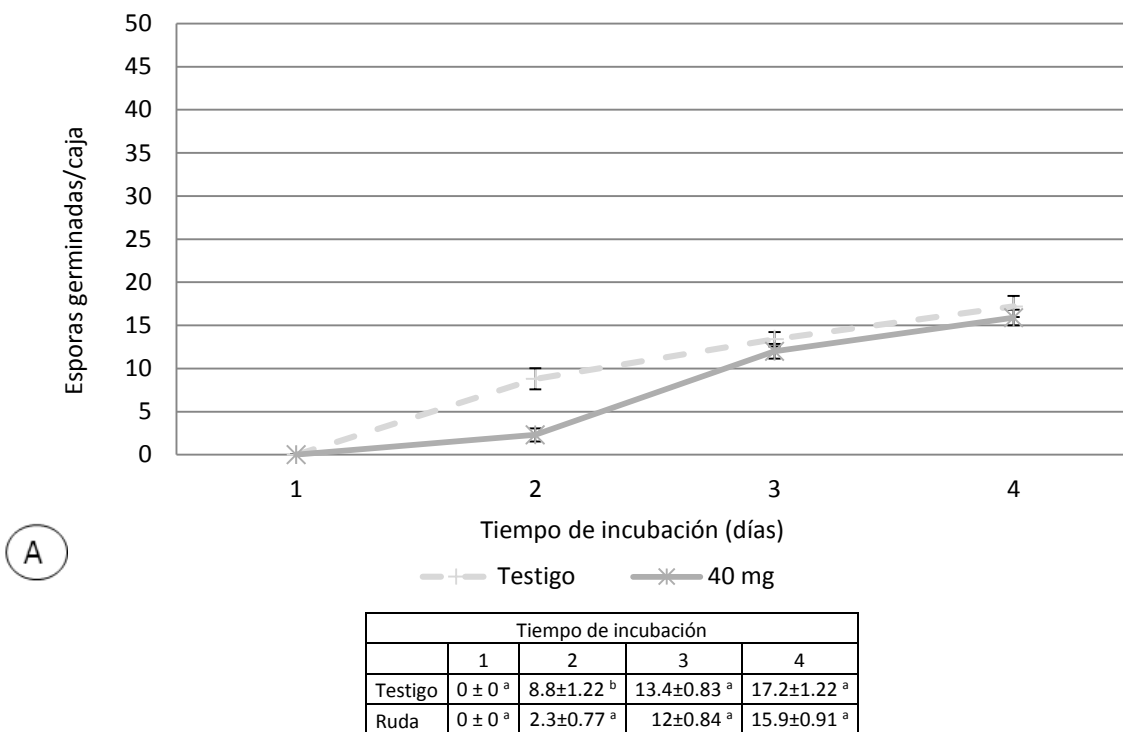


Fig. 36. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la germinación *in vitro* de esporas de *Trichoderma* A: *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM- 109 y B: *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-112. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

En cuanto a la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Fig. 32B), se observó un efecto significativo en la inhibición de la germinación de esporas con una inhibición del 42.1% para el día 2, 64.9% para el día 3 y 70% en el día 4. El efecto inhibitorio en la germinación de esporas puede deberse a que existen registros previos de la presencia de diferentes alcaloides con propiedades antifúngicas aislados de la planta de ruda (*Ruta graveolens*), como son la quinolina y quinolona los cuales han demostrado tener efectos significativos en contra de diversos hongos filamentosos (Oliva *et al.*, 2003).

En cuanto a la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Fig. 37), el mayor efecto inhibitorio se observó a los 2 días con un 66.4%, el cual se igualó con el testigo a partir del tercer día. En comparación con las cepas evaluadas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, la CPM-109 y CPM-112, la cepa CPM-113 resultó ser la más tolerante al extracto de ruda (*Ruta graveolens*), ya que no afectó su velocidad de crecimiento con respecto al testigo evaluado, así como tampoco disminuyó la cantidad de esporas germinadas en el medio de cultivo.

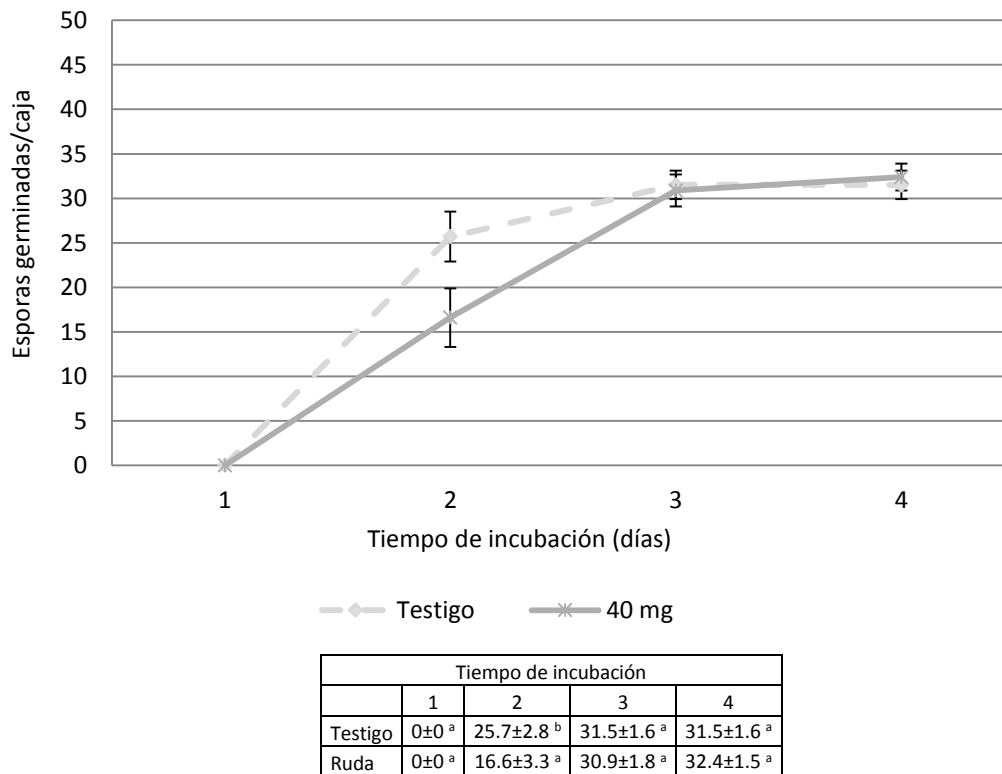
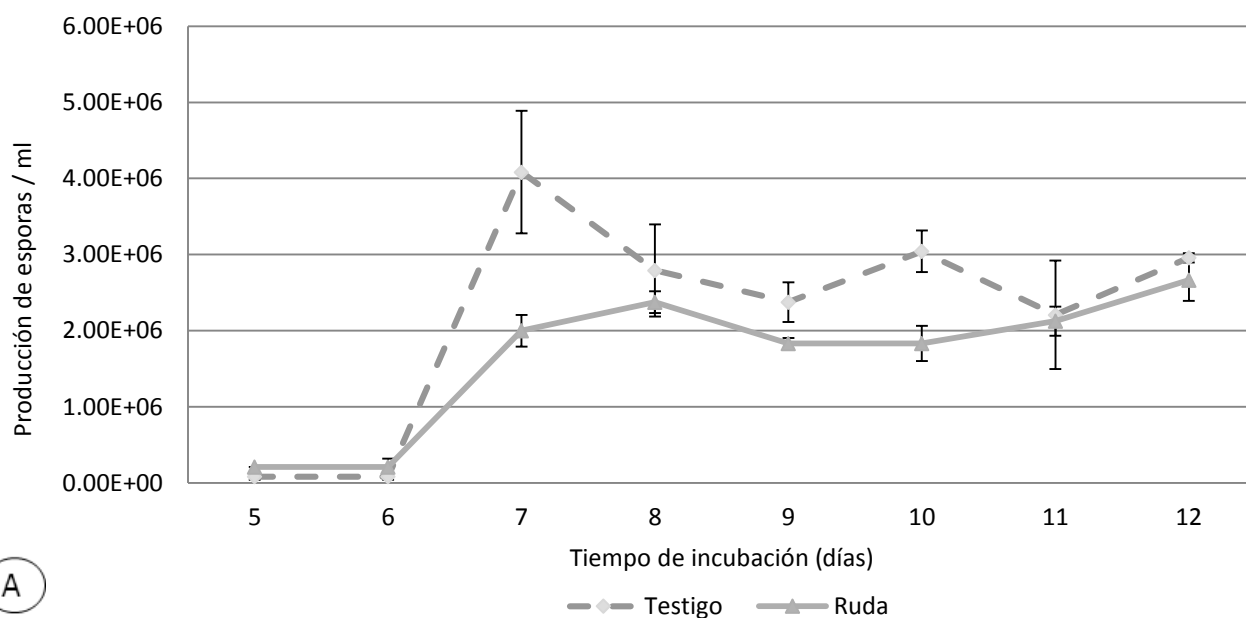


Fig. 37. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la germinación *in vitro* de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

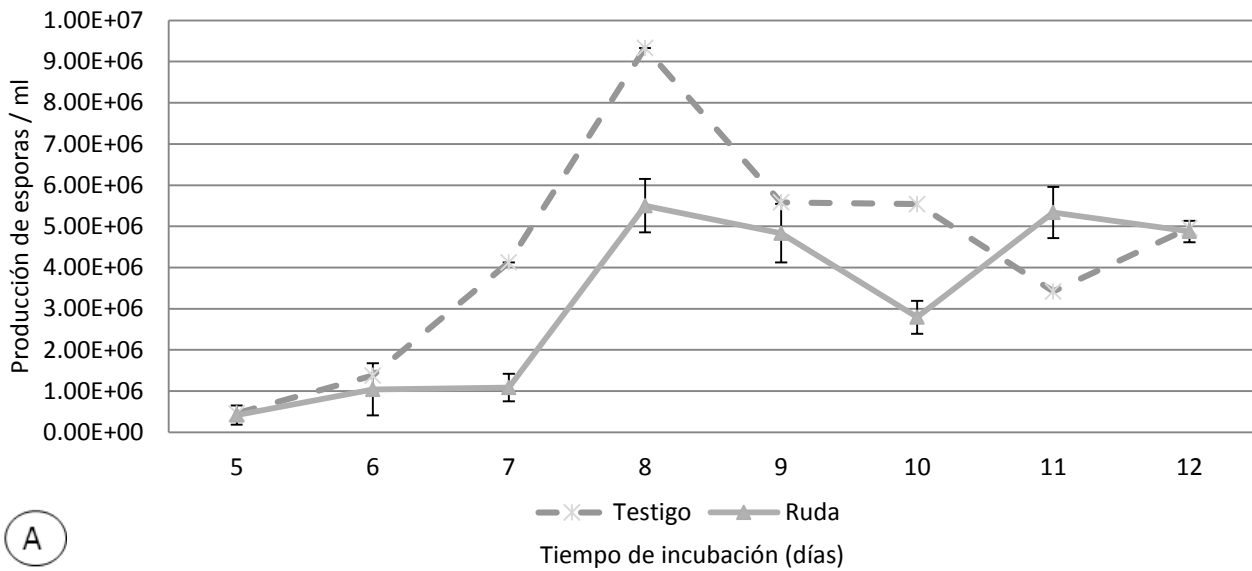
En el caso del conteo de esporas que se llevó a cabo a partir de las pruebas de germinación, donde se distribuyó un número conocido de esporas sobre el medio de cultivo. Una vez que las esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* germinaron y colonizaron completamente la caja de Petri (quinto día), se evaluó el efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml sobre la esporulación (Figs. 38A y 39). Para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Fig. 34A) con presencia del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) se observó una menor concentración del esporas del 7° al 10° día, el cual se igualó con el testigo a partir del día once. La variabilidad de los datos en los conteos, principalmente en el testigo, se debe a la heterogeneidad del crecimiento en la caja Petri, ya que el crecimiento desde diversos puntos de germinación por la distribución de las esporas no permitió el crecimiento radial característico de la cepa, influyendo en la zona de muestreo de cada caja.



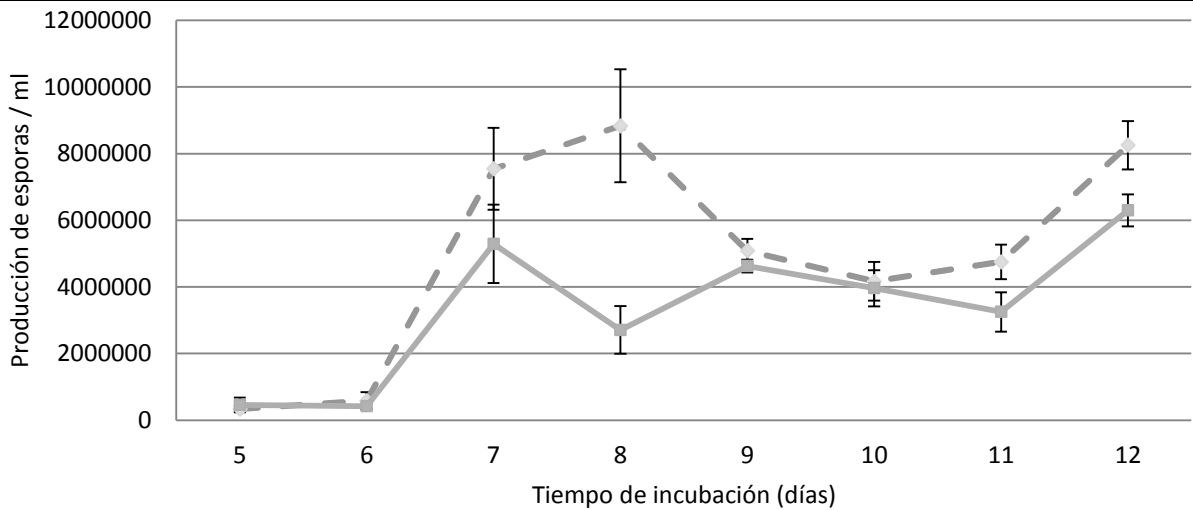
A

	Tiempo de incubación							
	5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	8.33E+04± 4.17 E+04 ^a	8.33E+04± 4.17 E+04 ^a	4.08E+06± 8.05 E+05 ^a	2.79E+06± 6.05 E+05 ^a	2.38E+06± 2.60 E+05 ^a	3.04E+06± 2.73 E+05 ^a	2.21E+06± 7.12 E+05 ^a	2.96E+06± 6.01 E+04 ^a
Ruda	2.08E+05± 0.00 E+00 ^a	2.08E+05± 1.10 E+05 ^a	2.00E+06± 2.08 E+05 ^b	2.38E+06± 1.44 E+05 ^a	1.83E+06 ± 7.22 E+04 ^a	1.83E+06± 2.32 E+05 ^b	2.13E+06± 1.91 E+05 ^a	2.67E+06± 2.73 E+05 ^a

Fig. 38. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 a partir de la prueba de germinación. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.



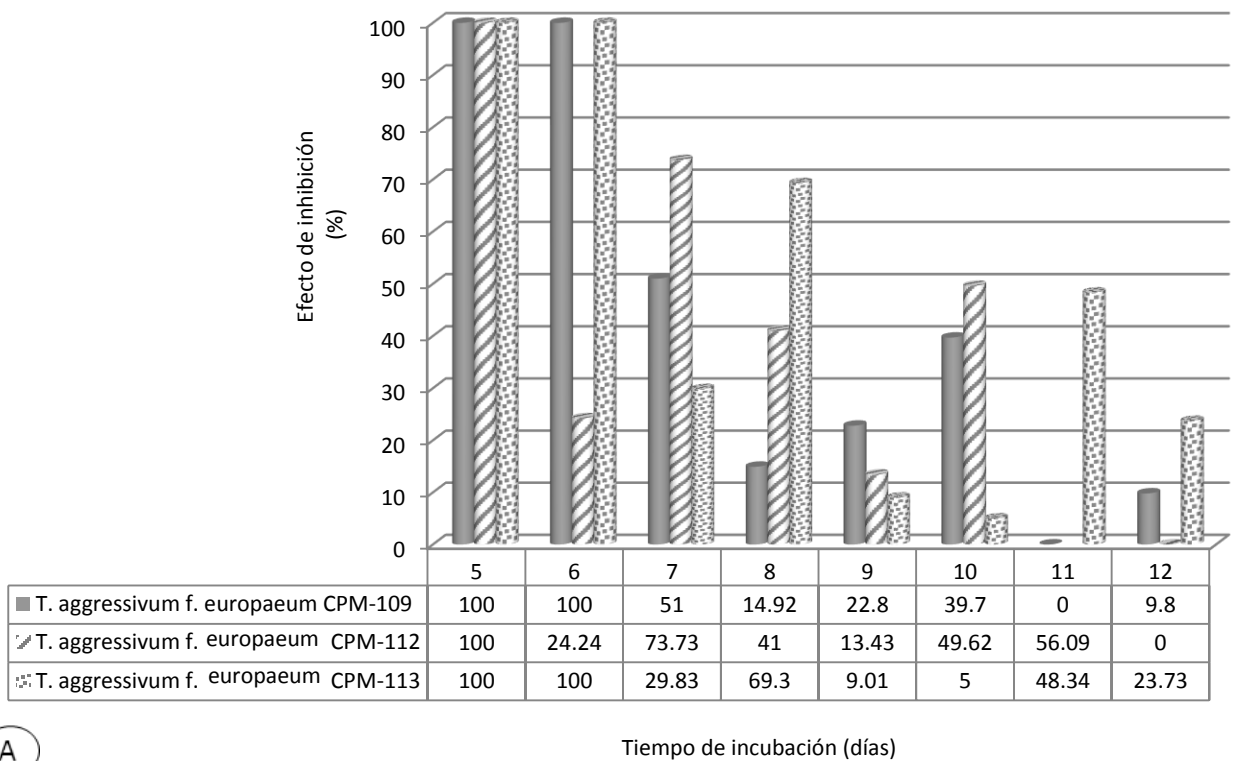
		Tiempo de incubación							
		5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo		4.58E+05± 2.32 E+05 ^a	1.38E+06± 1.91 E+05 ^a	4.13E+06± 2.60 E+05 ^a	9.33E+06± 1.08 E+06 ^a	5.58E+06± 1.03 E+06 ^a	5.54E+06± 1.06 E+06 ^a	3.42E+06± 1.10 E+05 ^a	4.96E+06± 4.17 E+04 ^a
Ruda		4.17E+05± 2.32 E+05 ^a	1.04E+06± 6.31 E+05 ^a	1.08E+06± 3.33 E+05 ^b	5.50E+06± 6.50 E+05 ^b	4.83E+06± 7.12 E+05 ^a	2.79E+06± 3.97 E+05 ^b	5.33E+06± 6.22 E+05 ^b	4.88E+06± 2.60E+05 ^a



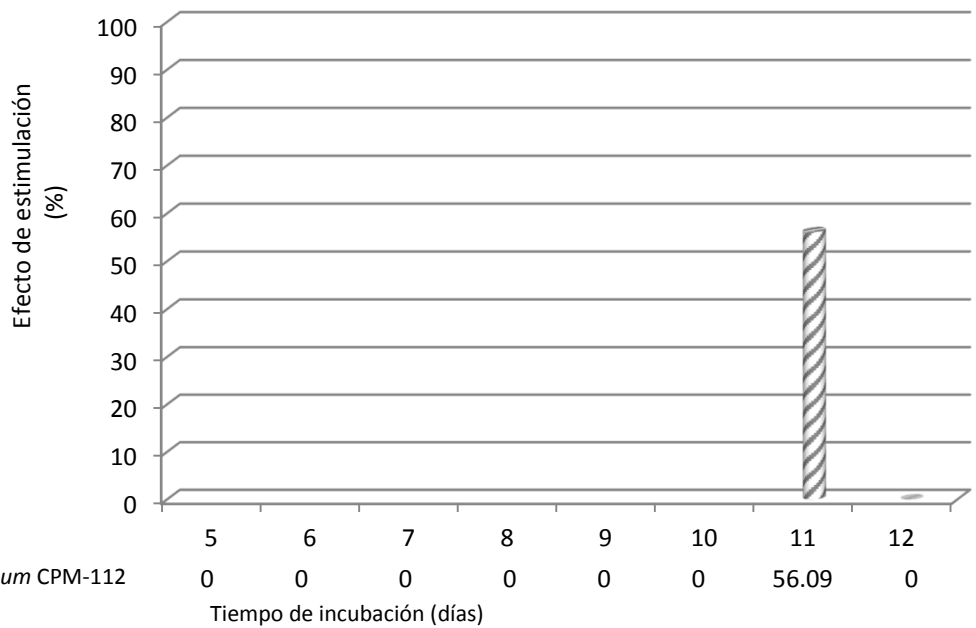
		Tiempo de incubación							
		5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo		4.58E+05± 2.32E+05 ^a	1.38E+06± 1.9 E+05 ^a	4.13E+06± 2.60 E+05 ^a	9.33E+06± 1.08 E+06 ^a	5.58E+06± 1.03 E+06 ^a	5.54E+06± 1.06 E+06 ^a	3.42E+06± 1.10 E+05 ^a	4.96E+06± 4.17 E+04 ^a
Ruda		4.17E+05± 2.32 E+05 ^a	1.04E+06± 6.3 E+05 ^a	1.08E+06± 3.33 E+05 ^a	5.50E+06± 6.50 E+05 ^b	4.83E+06± 7.12 E+05 ^a	2.79E+06± 3.97 E+05 ^a	5.33E+06± 6.22 E+05 ^b	4.88E+06± 2.60 E+05 ^b

Fig. 39. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA sobre la producción de esporas de las cepas de *Trichoderma* a partir de la prueba de germinación. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

En cuanto a la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Fig. 39A), el efecto del extracto sobre la disminución en el número de esporas fue más evidente los días 7 y 8 con porcentajes de inhibición de 73.7% y 41% respectivamente (Figs. 39A y 40A). En la cinética en la cantidad de esporas encontrada para esta cepa se observa que se mantuvo por debajo del testigo principalmente del día 7 al 10, con excepción del día 11 dónde se encontró mayor cantidad de esporas que en el testigo (Figs. 39A y 40B). En la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 (Fig. 39B), el efecto más evidente de la disminución del número de esporas en el tratamiento del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) se observó en el día 8 con un porcentaje del 63% de inhibición en el número de esporas (Fig. 41), a pesar de la variabilidad en los datos del testigo. Estos resultados inhibitorios se pueden atribuir a más de 15 compuestos registrados en la literatura con propiedades antifúngicas provenientes de la planta de ruda (*Ruta graveolens*), entre ellos se encuentran los alcaloides acridona, cumarinas, furanocumarinas, flavonoides, entre otros, así como también aceites esenciales los cuales también tienen el efecto de inhibir la germinación y la velocidad de crecimiento radical de diversas plantas (Hale *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2003).



A



B

Fig. 40. Efectos de inhibición y estimulación (%) en la esporulación de las cepas de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*. A: Efecto de inhibición en la esporulación de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*. B: Efecto de estimulación en la esporulación de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-112.

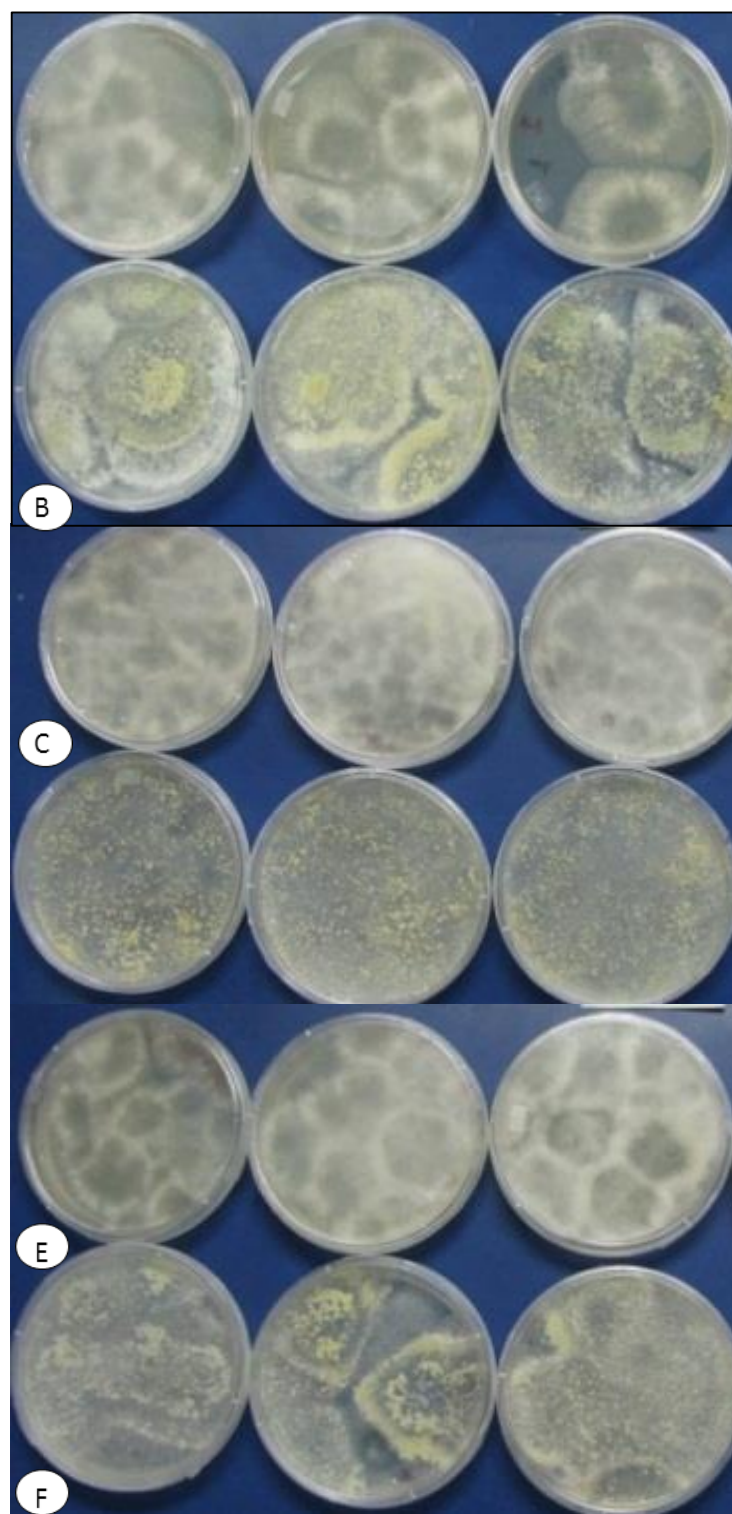


Fig. 41. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) sobre la germinación de esporas al 6° día de incubación. A: CPM-112 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*. B: CPM-113 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* y C: CPM-109 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de ruda (*Ruta graveolens*). La serie B, D y F son los testigos sin extracto.

8.2.6. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) sobre la morfología de las colonias de *Trichoderma* sembradas con inóculo

En cuanto a la morfología de las cepas de *Trichoderma* desarrolladas a partir de un inóculo de micelio central de 0.5 cm de diámetro (Tabla 23), se observó un efecto del extracto sobre el color de las colonias de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, ya que el testigo presentó esporas amarillas, a diferencia de aquellas observadas en el tratamiento con extracto de ruda (*Ruta graveolens*) que fueron verde olivo intenso. La cepa expuesta al extracto mostró una coloración más oscura pasando del blanco del micelio a un color verde olivo. En cambio, el testigo mostró una coloración que paso del blanco del micelio a un tono amarillo verdoso intenso para posteriormente tomar un color verde olivo. Esto contradice a la coloración registrada en la literatura ya que menciona que en su desarrollo no existen pigmentos amarillos. A pesar del color, la velocidad de crecimiento micelial coincide con los parámetros descritos en la literatura, ya que se observó micelio de textura algodonosa con bordes regulares, los conidios estuvieron presentes tanto en medio como alrededor del margen de la caja y no hubo tendencia a formar pústulas (Samuels *et al.*, 2002). A pesar de la maduración de las esporas, se observó que la densidad micelial fue menor en el tratamiento de ruda (*Ruta graveolens*) con respecto al testigo (Fig. 42) y el tipo de crecimiento micelial se observó postrado (Tabla 22).

Tabla 23. Caracterización morfológica de las colonias de CPM-109 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, CPM-112 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y CPM-113 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, cultivadas en medio PDA con extracto de ruda (*Ruta graveolens*) al 0.4%, a los 10 días de crecimiento.

Característica	Cepas					
	CPM-109		CPM-112		CPM-113	
	<i>R. graveolens</i>	Testigo	<i>R. graveolens</i>	Testigo	<i>R. graveolens</i>	Testigo
Color (código pantone)	Verde olivo (383)	Amarillo verdoso (388)	Verde olivo (383)	Verde olivo (383)	Verde grisáceo (367)	Verde limón (375)
Textura	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa	Algodonosa
Densidad	Regular	Muy abundante	Regular en el centro	Regular disperso	Abundante	Regular
Micelio aéreo	Postrado	Postrado	Postrado	Postrado	Postrado	Postrado
Borde	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular

En cuanto a la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, se observaron diferencias en la distribución de las esporas, donde el tratamiento con extracto de ruda (*Ruta graveolens*) presentó las esporas principalmente en el centro de la colonia, mientras que en el testigo se observaron conglomeraciones dispersas en la caja de Petri. En este caso, se observó una densidad abundante en la presencia del extracto con respecto al testigo. Esta estimulación se atribuye al efecto de hormesis ya mencionado.

En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 también se observó un cambio en la coloración de las esporas, así como en la densidad del micelio expuesto al extracto de ruda (*Ruta graveolens*), siendo abundante con el extracto y regular en el testigo. Este aumento en la densidad del micelio y la estimulación en la maduración de las esporas para ambas cepas cultivadas en medio con extracto, puede deberse a una adaptación al medio de cultivo y que se estén produciendo enzimas capaces de descomponer los compuestos del extracto para que el hongo continúe su crecimiento, ya que se tiene registrado que el género *Trichoderma* tiene la capacidad de degradar diferentes tipos de compuestos orgánicos (Colina *et al.*, 2009; Argumedo-Delira *et al.*, 2009).

También pudo observarse que la distribución de las esporas se modificó en la presencia del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) para las tres cepas evaluadas (Fig. 42). En el caso de las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, las esporas tuvieron una distribución homogénea en todo el medio de cultivo. En cambio, en la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 la distribución se observó de forma concéntrica en la colonia sin la formación de pústulas blancas que presentó el testigo.

Para ambas cepas catalogadas como *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, si se observaron las características descritas previamente en la literatura. Se observó que fueron cepas de rápido crecimiento, con una formación restringida de conidios al centro (Fig. 42). Se sabe que la cantidad de conidios puede variar según el medio de cultivo utilizado para su crecimiento, esto pudiera explicar la diferencia en la cantidad de esporas por la presencia del extracto. En ambas cepas no se observó un color amarillento difuso en el medio como cita la literatura, sin embargo, si se observó la formación de pústulas blancas que después cambiaron a color verde, cabe mencionar que el desarrollo de este biotipo Th4 fue el responsable de la epidemia de *Trichoderma* en Pensilvania (Samuels *et al.*, 2002; Chang y Miles, 2004).

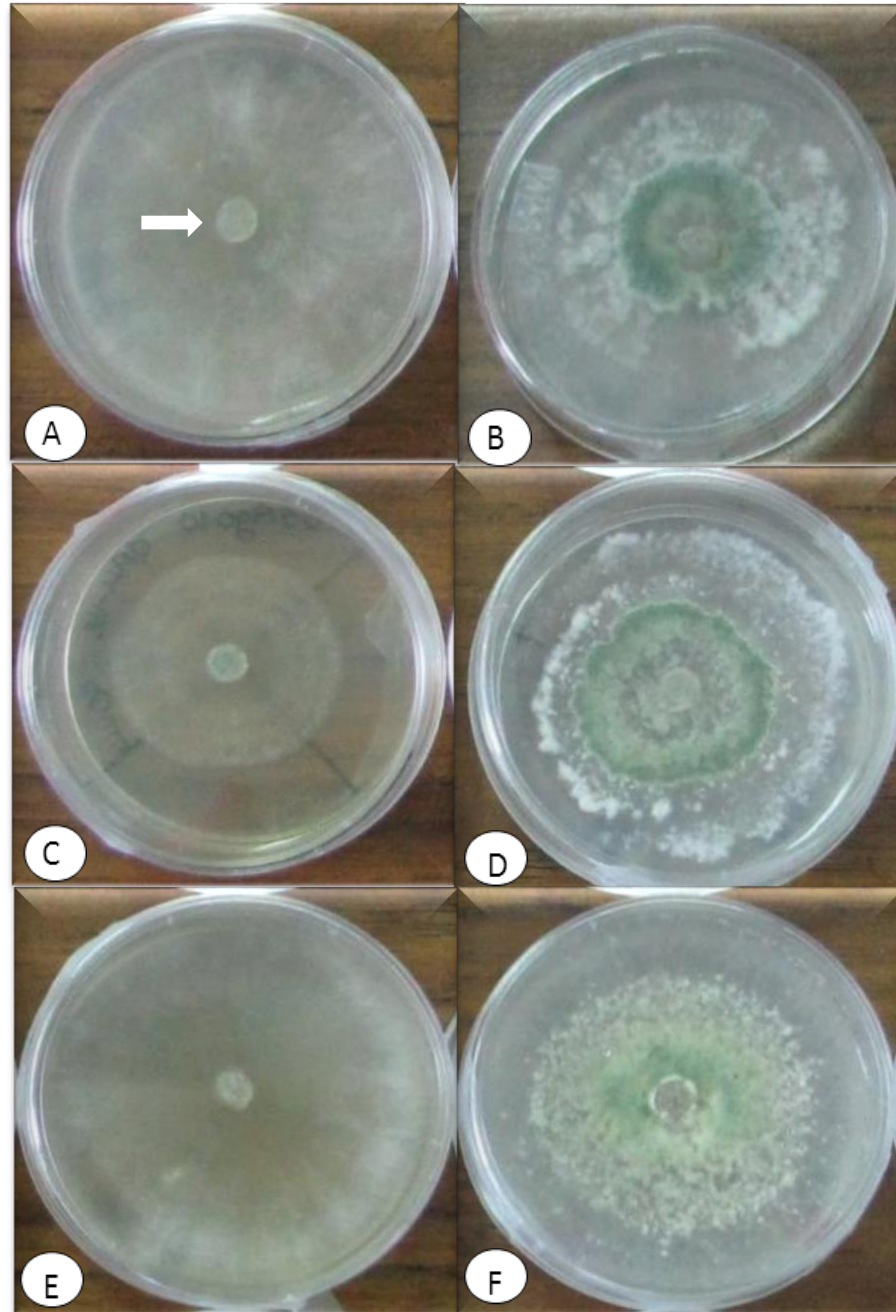


Fig. 42. Caracterización morfológica de las colonias de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación. A y B: CPM-109 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, C y D: CPM-112 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, E y F: CPM-113 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de ruda (*Ruta graveolens*). La serie B, D y F son los testigos sin extracto, la flecha indica el inóculo (\rightleftarrows).

8.2.7. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) sobre la caracterización morfológica de las colonias de *Trichoderma* sembradas con una solución de esporas

En la caracterización morfológica de las cepas de *Trichoderma* a partir esporas germinadas sobre medio de cultivo con extracto de ruda (*Ruta graveolens*), se observaron cambios en su morfología por la presencia del extracto (Tabla 24, Fig. 43). En el caso de la *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, el efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) ocasionó una menor cantidad de esporas (Fig. 43). Este efecto de inhibición nuevamente se atribuye a los compuestos procedentes de la planta de ruda (*Ruta graveolens*) identificados con actividad antimicrobiana y antifúngica, entre ellos están flavonoides, alcaloides, cumarinas entre otros (Oliva *et al.*, 1999; Hale *et al.*, 2004). En la coloración y el tipo de borde no se observaron cambios con respecto al testigo, sin embargo, en el tratamiento con extracto de ruda (*Ruta graveolens*), la textura se observó algodonosa y presencia de micelio aéreo (Tabla 24). En cuanto a la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 no se observaron cambios en la coloración de las esporas, el tipo de borde o la densidad del micelio por la presencia del extracto, sin embargo, la textura del micelio se observó de tipo algodonosa y presencia de micelio aéreo, en comparación con el testigo (Tabla 24).

Tabla 24. Caracterización morfológica de las colonias de CPM-109 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, CPM-112 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y CPM-113 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, a los 10 días a partir de la germinación de esporas cultivadas en medio PDA con extracto de ruda (*Ruta graveolens*) al 0.4%.

Característica	Cepas					
	CPM-109		CPM-112		CPM-113	
	4 mg/ml	Testigo	4 mg/ml	Testigo	4 mg/ml	Testigo
Color (código pantone)	Verde olivo (5777)	Verde olivo (5767)	Verde olivo (5757)	Verde olivo (5767)	Verde olivo (5777)	Verde amarillento (388)
Textura	Algodonosa	Aterciopelada	Algodonosa	Postrada	Algodonosa	Aterciopelada
Densidad	Regular	Escaso	Regular	Regular	Abundante	Abundante
Micelio aéreo	Aéreo	Postrado	Aéreo	Postrado	Postrado	Postrado
Borde	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular

En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, la presencia del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) produjo una variación en el color de la esporada pasando de un tono verde limón brillante en el testigo a un verde grisáceo en el tratamiento con extracto; esto indica que la planta de ruda (*Ruta graveolens*) tuvo un efecto de estimulación en la maduración de la esporada (Fig. 44). Este efecto de estimulación en la maduración de las esporas evidenciado por el cambio de coloración, está registrado en la literatura como un efecto a partir de los compuestos fitotóxicos presentes en la ruda (*Ruta graveolens*) (Hale *et al.*, 2004). Este efecto se relaciona con el fenómeno llamado “hormesis”, el cual consiste en la estimulación de la velocidad de crecimiento causado por bajos niveles de compuestos potencialmente tóxicos para el organismo expuesto a dichos compuestos (Oliva *et al.*, 2003). En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, también se observó una textura de tipo algodonosa con un borde de colonia regular. En cuanto a la densidad y crecimiento aéreo del micelio se observó abundante y postrado respectivamente, al igual que en el tratamiento testigo.

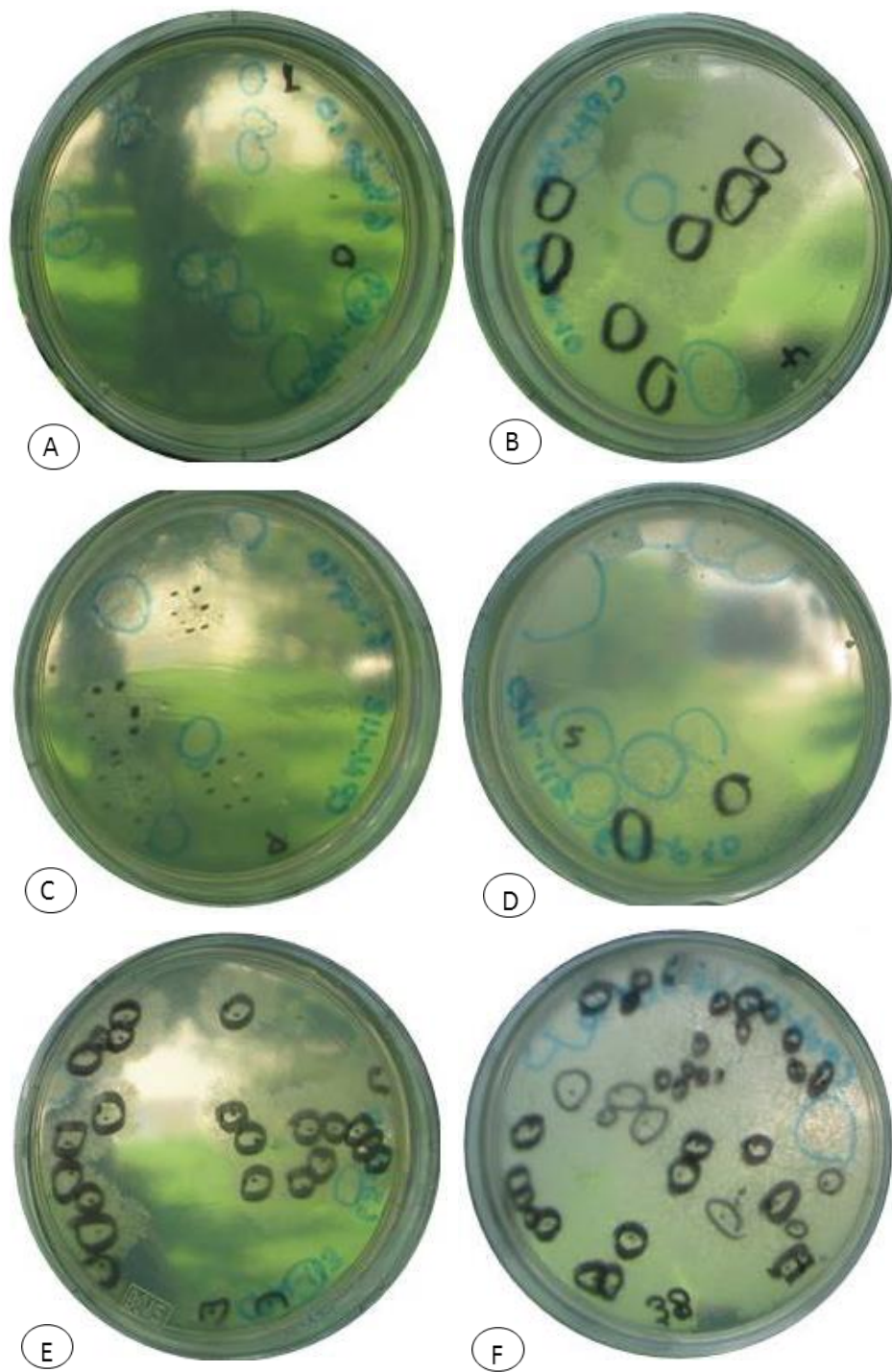


Fig. 43. Caracterización morfológica de las colonias de *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* a los 3 días de inoculación con solución de esporas después del efecto del extracto de ruda en la germinación de esporas. A y B: CPM-109 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*, C y D: CPM-112 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*, E y F: CPM-113 *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum*. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de ruda (*Ruta graveolens*). La serie B, D y F son los testigos sin extracto

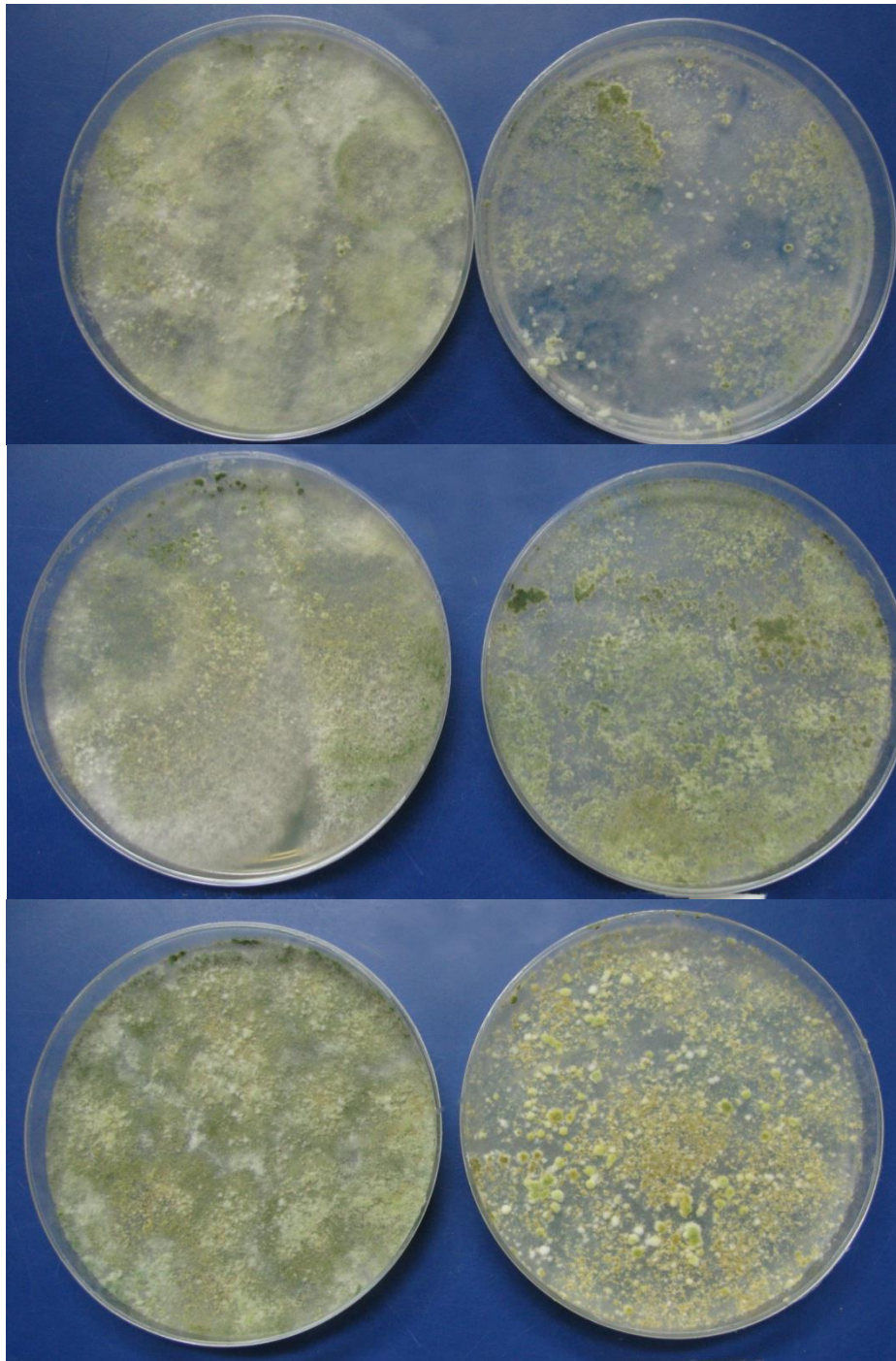


Fig. 44. Caracterización morfológica de las colonias de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* a los 10 días de inoculación con solución de esporas después del efecto del extracto de ruda en la germinación de esporas. A y B: CPM-109 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, C y D: CPM-112 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, E y F: CPM-113 *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de ruda (*Ruta graveolens*). La serie B, D y F son los testigos sin extracto.

8.2.8 Conclusiones

1. El extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en la concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo tuvo un efecto inhibitorio en la velocidad de crecimiento micelial al primer día de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 del 66%, del 81% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, y del 53% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113.
2. En el caso de los hongos comestibles, el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) no tuvo un efecto negativo en el desarrollo micelial de *Pleurotus ostreatus* CP-50. En el caso de la cepa *Lentinula edodes* CP-7, con dosis de 1 mg/ml de extracto en el medio de cultivo, se observó la formación de un halo alrededor del inóculo, el cual se cubrió con micelio al final del experimento. Se observó que hubo un mayor desarrollo micelial, ya que el micelio se observó más denso y lanoso que el testigo. En el caso de la cepa *Pleurotus pulmonarius* CP-267, se observó una un crecimiento micelial con borde irregular de las colonias con respecto al testigo.
3. El extracto de ruda (*Ruta graveolens*) no tuvo un efecto negativo en el conteo de esporas de la prueba de velocidad de crecimiento micelial, por el contrario en la prueba de germinación de esporas el extracto si tuvo un efecto inhibitorio. En cuanto a la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, el efecto del extracto sobre la disminución en el número de esporas fue más evidente a los días 7 y 8 con inhibición de 73.7% y 41%, respectivamente. En la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, el efecto más evidente sobre la esporulación en el tratamiento del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) se observó en el día 8 con una disminución del 63% en el número de esporas con respecto al testigo.
4. El extracto de ruda (*Ruta graveolens*) modificó algunos aspectos de la morfología del micelio tanto en las cepas de *Trichoderma* como en los hongos comestibles.

8.2.9. Recomendación para la aplicación de un extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el cultivo de hongos comestibles en condiciones de sustrato sólido

La presente recomendación está diseñada para el uso del extracto de ruda (*Ruta graveolens*), el cual además de los resultados de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial y germinación de esporas de *Trichoderma* en la presente investigación, está registrado previamente por la literatura con propiedades antifúngicas por la presencia de diversos metabolitos secundarios como cumarinas, furanocumarinas y alcaloides (Oliva *et al.*, 2003; El-Sayed *et al.*, 2000); así como también el aislamiento de sus compuestos puros contra diversos hongos filamentosos, incluyendo *Trichoderma viridae* (Oliva *et al.*, 1999; Ojala *et al.*, 2000).

Este extracto podría ser utilizado a lo largo del proceso del cultivo (Fig. 45), así como también, agregarlo a las prácticas convencionales de limpieza y desinfección de las instalaciones. El efecto antifúngico de este extracto contribuirá a mantener un ambiente más limpio y disminuirá el riesgo de contaminación ante la presencia de esporas dispersas en el aire dentro de los cuartos de incubación y producción de los hongos.

El proceso a seguir para la aplicación del producto comienza por preparar el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) por la técnica de maceación con solvente etanol, evaporar el solvente y llevarlo a sequedad por alto vacío. Una vez obtenido el extracto se resuspende en una solución acuosa de ruda (*Ruta graveolens*) en una concentración de 4 mg/ml, con la cual se humedecerá un paño limpio para realizar una limpieza externa de las bolsas ya inoculadas y listas para su proceso de incubación. También, con una bomba manual de aspersion se limpiaran paredes y pisos en el tiempo adecuado a lo largo del proceso del cultivo según el siguiente esquema:

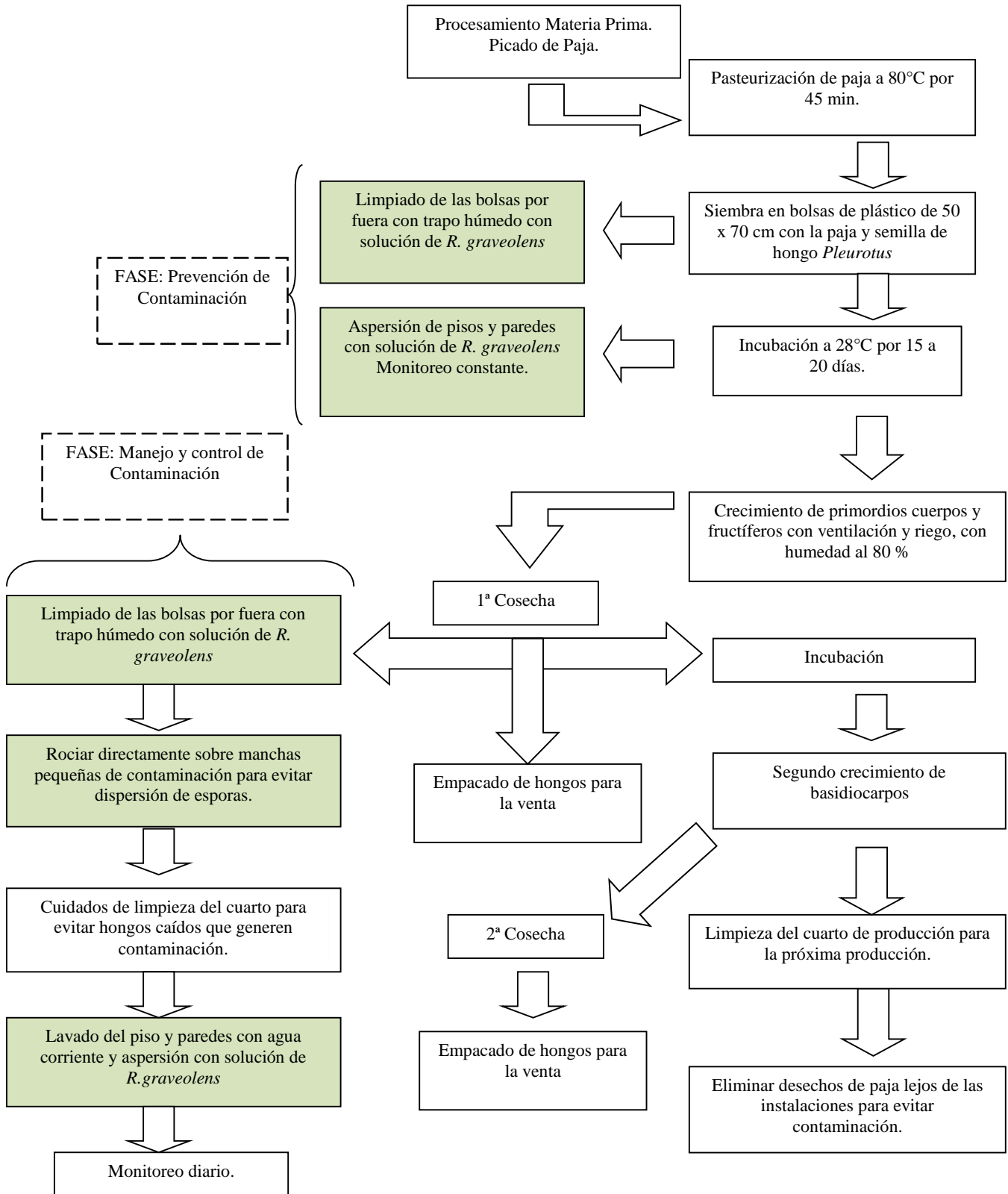
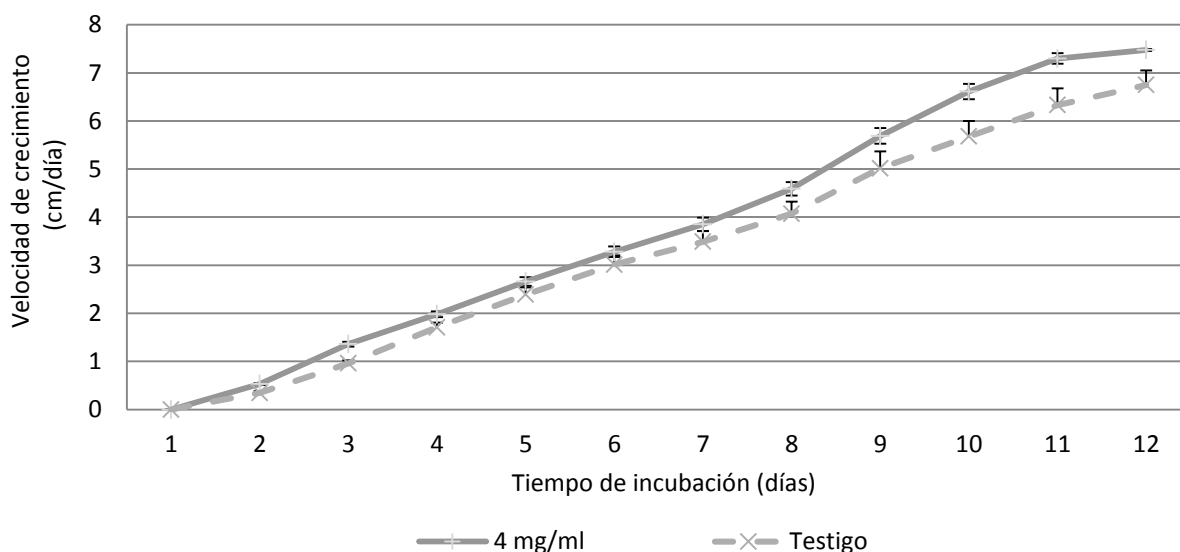


Fig. 45 Diagrama de prevención, manejo y control del moho verde *Trichoderma* usando el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el proceso de cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

8.3 Evaluación del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial (Experimento 3)

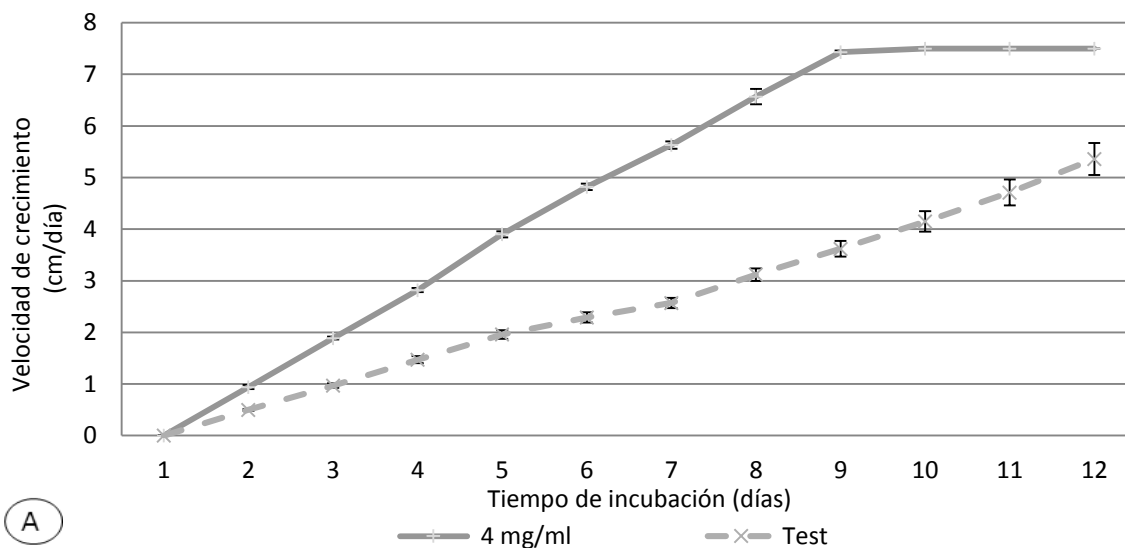
8.3.1 Velocidad de crecimiento micelial de los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*

El siguiente extracto a evaluar fue de bulbo de cebolla morada (*Allium cepa*), para el cual se utilizó la dosis estandarizada de 4 mg/ml en medio de cultivo. Se midió la velocidad de crecimiento micelial de tres cepas comestibles *Pleurotus ostreatus* CP-50, *Lentinula edodes* CP-7 y *Pleurotus pulmonarius* CP-267. En cuanto a la velocidad de crecimiento micelial, se pudo observar un efecto de estimulación, contrario a los efectos de inhibición reportados en la literatura debido a la presencia de compuestos con actividad antifúngica (Tajkarimi *et al.*, 2010), entre ellos el péptido allicepin (Wang y Ng, 2004). Para la cepa de *Lentinula edodes* CP-7, se observó un ligero efecto estimulador en la velocidad de crecimiento micelial a partir del día 2 y a lo largo del experimento; el efecto fue más evidente a partir del día 8 hasta el final del experimento (Fig. 46), la estimulación máxima fue del 16% (Fig. 48).

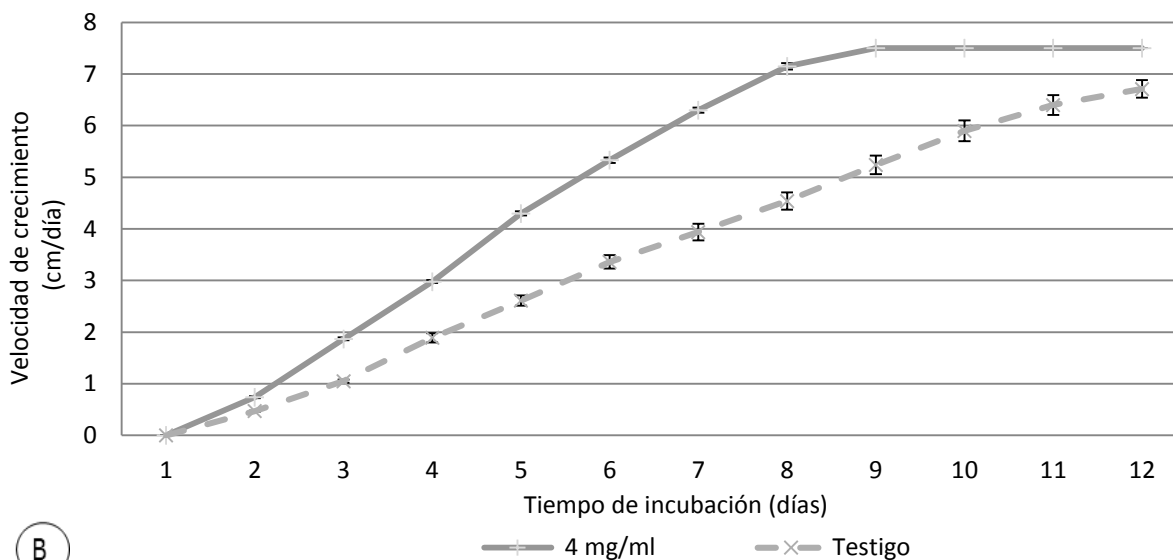


	Tiempo de incubación											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Allium cepa</i>	0±0 ^a	0.53±0.02 ^a	1.36±0.05 ^a	1.98±0.06 ^a	2.66±0.09 ^a	3.28±0.11 ^a	3.85±0.14 ^a	4.59±0.14 ^a	5.69±0.16 ^a	6.61±0.16 ^a	7.3±0.11 ^a	7.48±0.02 ^a
Testigo	0±0 ^a	0.34±0.04 ^a	0.96±0.06 ^a	1.71±0.1 ^a	2.39±0.15 ^a	3.01±0.19 ^a	3.49±0.22 ^a	4.07±0.25 ^b	5.01±0.35 ^b	5.68±0.32 ^b	6.33±0.35 ^b	6.75±0.3 ^b

Fig. 46. Velocidad de crecimiento micelial de *Lentinula edodes* CP-7 con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.



Tiempo de incubación												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Allium cepa</i>	0±0 ^a	0.94±0.04 ^a	1.89±0.03 ^a	2.82±0.04 ^a	3.9±0.06 ^a	4.82±0.06 ^a	5.63±0.07 ^a	6.57±0.15 ^a	7.43±0.03 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a
Testigo	0±0 ^a	0.5±0.01 ^b	0.97±0.04 ^b	1.47±0.068 ^b	1.96±0.08 ^b	2.29±0.1 ^b	2.57±0.1 ^b	3.12±0.12 ^b	3.62±0.15 ^b	4.1±0.2 ^b	4.7±0.25 ^b	5.36±0.31 ^b



Tiempo de incubación												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Allium cepa</i>	0±0 ^a	0.74±0.02 ^a	1.87±0.03 ^a	2.98±0.03 ^a	4.3±0.04 ^a	5.33±0.05 ^a	6.3±0.05 ^a	7.15±0.06 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a
Testigo	0±0 ^a	0.47±0.01 ^b	1.05±0.03 ^b	1.89±0.09 ^b	2.61±0.1 ^b	3.36±0.13 ^b	3.94±0.16 ^b	4.54±0.17 ^b	5.24±0.18 ^b	5.9±0.2 ^b	6.4±0.19 ^b	6.71±0.17 ^b

Fig. 47. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA. A: *Pleurotus ostreatus* CP-50 y B: *Pleurotus pulmonarius* CP-267. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

En el caso de la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50, el efecto del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) se observó desde el segundo día de medición de la velocidad de crecimiento micelial con una estimulación del 88% (Fig. 48) este efecto se mantuvo por arriba del testigo desde el inicio del experimento (Fig. 47A). La diferencia en crecimiento para esta cepa fue más evidente que en las otras dos evaluadas. Esta estimulación de la velocidad de crecimiento micelial puede deberse al contenido nutricional de la cebolla morada (*Allium cepa*). Se tiene registrado que la cebolla contiene diversas proteínas y vitaminas que incluyen B₁, B₂ y C, así como potasio. También contiene diversos polisacáridos como fructosa y sacarosa, péptidos, aceites esenciales y una alta cantidad de antioxidantes, antocianinas y flavonoides (Downes *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2004; Shon *et al.*, 2004). En el caso de la cepa *Pleurotus pulmonarius* CP-267, también se observó una estimulación en la velocidad de crecimiento micelial desde el inicio del experimento (Fig. 47B), con una proporción de estimulación del 59.8% al séptimo día de crecimiento (Fig. 48). La presencia del extracto en el medio de cultivo, estimuló visiblemente el desarrollo micelial de dos de las tres cepas de hongos comestibles evaluadas.

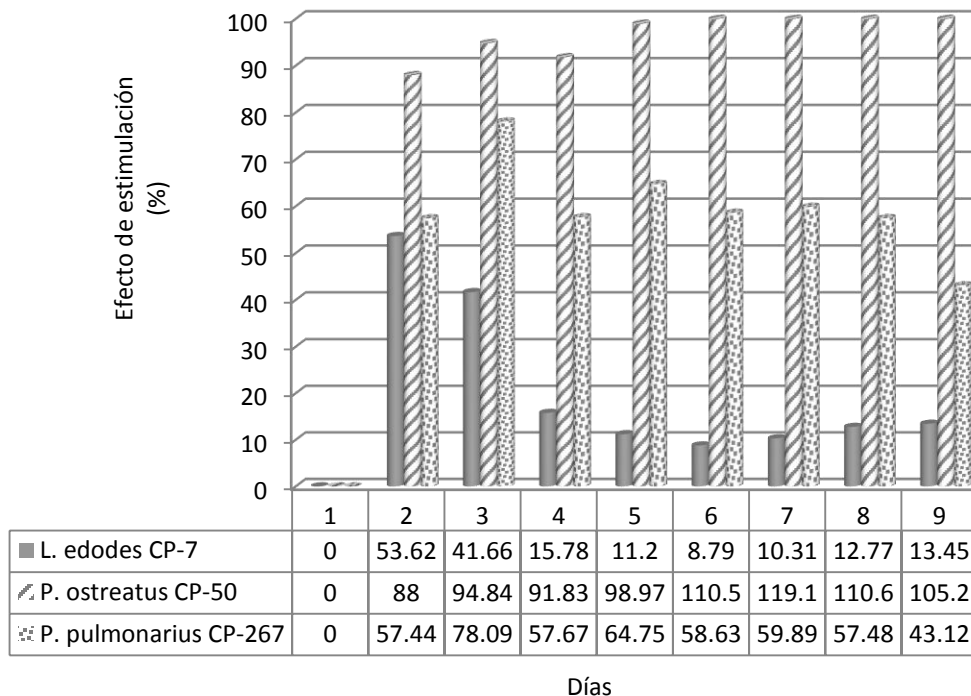


Fig. 48. Efecto promedio de la estimulación sobre la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de hongos comestibles (*Lentinula edodes* CP-7, *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Pleurotus pulmonarius* CP-267) cultivadas en medio de cultivo EMA con extracto etanólico de cebolla morada (*Allium cepa*) en una concentración de 4 mg/ml, n=10.

8.3.2 Caracterización morfológica de los hongos comestibles

En cuanto a la caracterización morfológica de las cepas comestibles (Tabla 25, Fig. 49), también se observó una estimulación por parte del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), ya que el micelio fue más denso y la velocidad de crecimiento fué mayor en las cepas cultivadas en medio con extracto. Esto al igual que en las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* anteriormente mencionadas puede deberse a algún alcaloide que actúe como un factor estimulante de la velocidad de crecimiento (Izco *et al.*, 2004) tanto para las cepas de los hongos comestibles como para las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. Además de tomar en cuenta la cantidad de nutrientes presentes en el extracto registrados por la literatura, como son los antioxidantes, diversos azúcares como glucosa y fructosa, fenoles y flavonoides, antocianinas y compuestos bioactivos (Thomas *et al.*, 2011; Downes *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2004).

Tabla 25. Caracterización morfológica de las cepas comestibles cultivadas en medio EMA con 4 mg/ml de extracto de cebolla morada (*Allium cepa*).

Característica	Cepas					
	CP-50		CP-7		CP-267	
	4 mg/ml	Testigo	4 mg/ml	Testigo	4 mg/ml	Testigo
Color (código pantone)	crema (475)	crema (7506)	blanco **	blanco **	crema (7507)	crema (7507)
Textura	lanosa	lanosa en el centro y algodonosa en la orilla	algodonosa	algodonosa	lanosa	Lanosa
Densidad	abundante	Abundante	abundante	regular	abundante	Abundante
Micelio aéreo	postrado	Postrado	aéreo	aéreo	aéreo	aéreo
Borde	regular	Irregular	regular	regular	regular	Regular

**Color blanco no clasificado en la tabla de colores.

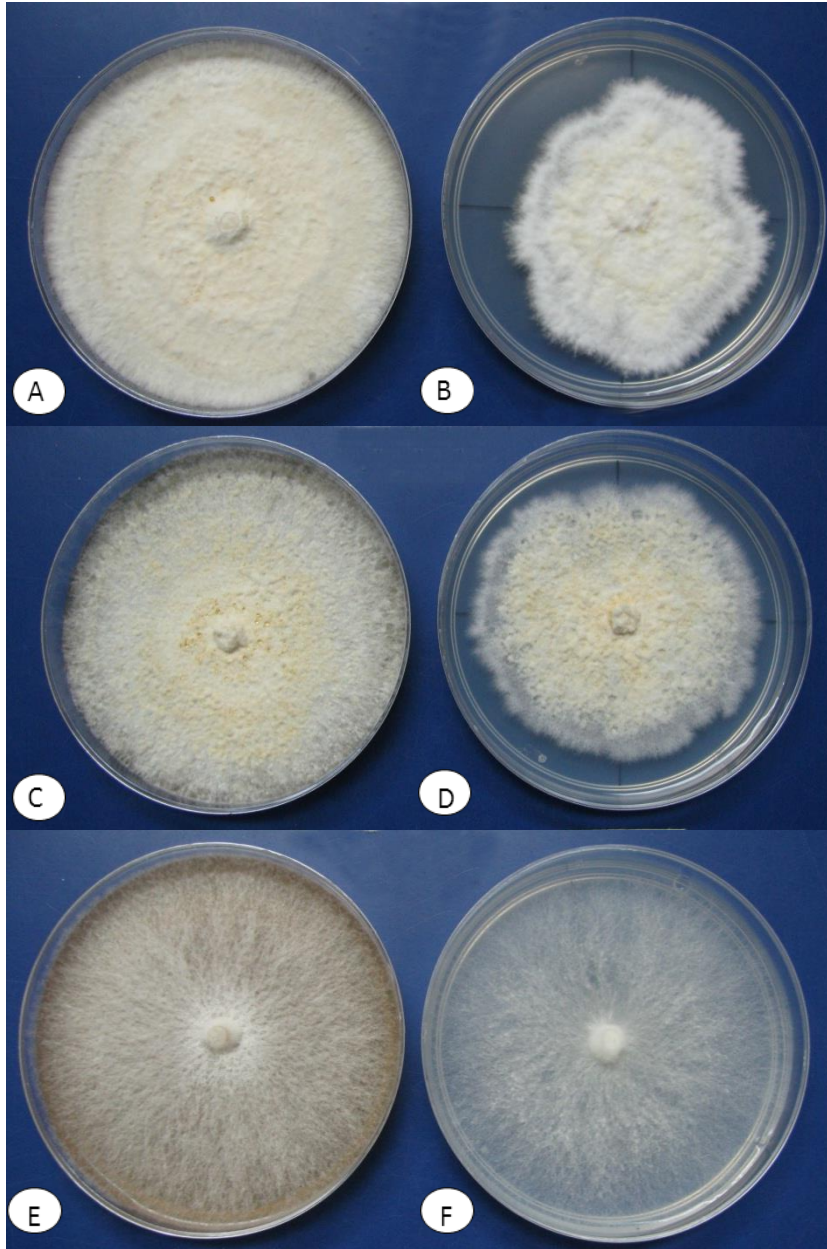
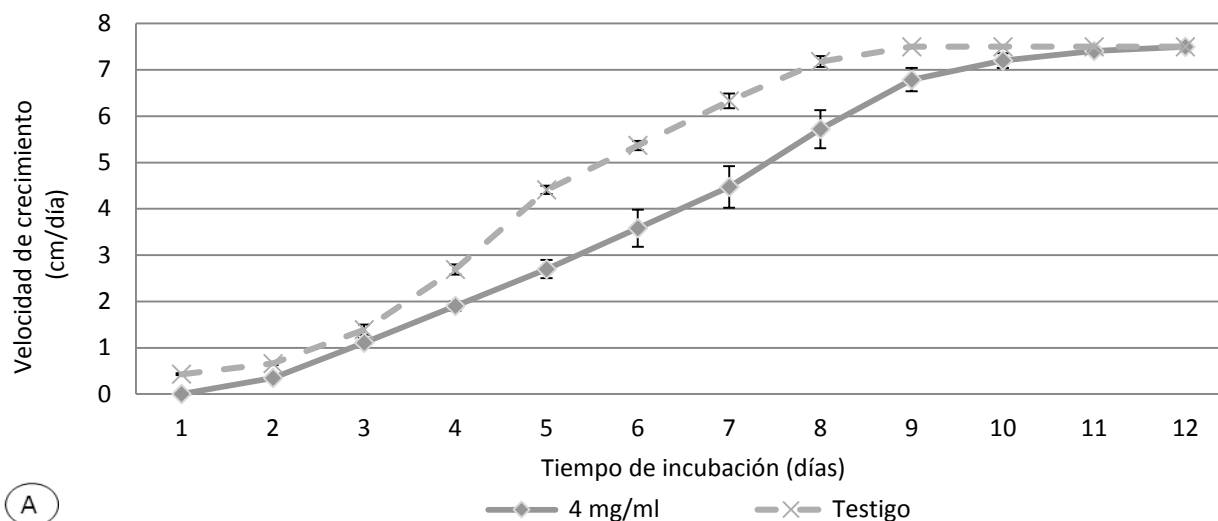


Fig. 49. Colonias de las cepas comestibles evaluadas a los 10 días de incubación, A y B: *Pleurotus ostreatus* CP-50, C y D: *Pleurotus pulmonarius* CP-267, E y F: *Lentinula edodes* CP-7. La serie A, C y E son los tratamientos con 4 mg/ml de extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) en medio de cultivo EMA. La serie B, D y F son los testigos sin extracto.

8.3.3 Velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*

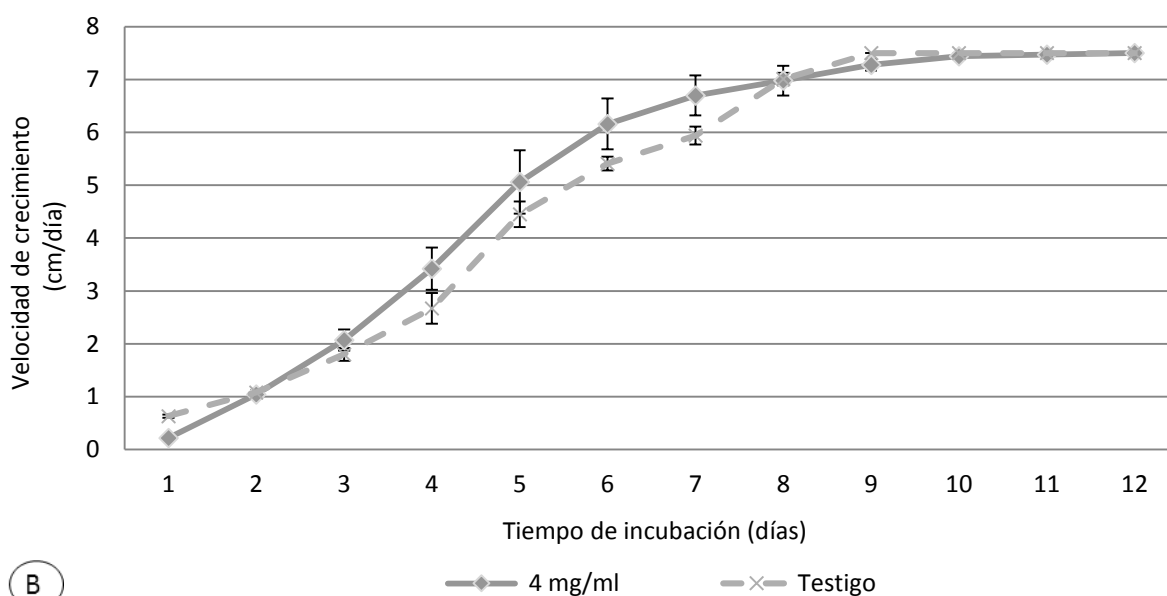
A partir del mismo extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) con dosis de 4 mg/ml en el medio de cultivo, se evaluaron tres cepas de hongos *Trichoderma*, las cuales fueron: *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-109, *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113.

Para la cepa *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-109 (Fig. 50A) se observó una inhibición en la velocidad de crecimiento micelial a lo largo del experimento. La mayor inhibición fue del 100% y 46% en 1 y 2 días respectivamente (Fig. 52), el tratamiento con extracto de *Allium cepa* se mantuvo por debajo del testigo hasta los 10 días. Sin embargo, para las cepas *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113 solo se observó inhibición del 65% y 57% las primeras 24 h respectivamente (Figs. 50B, 51 y 52), la cual fue disminuyendo a lo largo del experimento. En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-112 no se observó una diferencia significativa de inhibición en la velocidad de crecimiento micelial con respecto al testigo a partir de los 4 días de crecimiento (Figs. 50B y 51). En este caso se observó una ligera estimulación promedio del 17% del día 3 al 7 (Fig. 53). En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113, la velocidad de crecimiento micelial se mantuvo por debajo del testigo, sin embargo llegó a cubrir la caja el mismo día que el testigo a los 5 días (Fig. 51). La inhibición de la velocidad de crecimiento observado se debe a que se tienen registros de que la cebolla morada (*Allium cepa*) tiene actividad antimicrobiana, antibacterial, anti parasítica y antifúngica. Dentro de su acción antifúngica, tiene acción contra las levaduras *Microsporus canis* y *Microsporus gypseum*, así como también acción contra diversos hongos filamentosos, como son *Trichophyton simii*, *T. mentagrophytes*, *Chyso sporium queenslandicum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium rubrum*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Colleotrichum* sp., *Pythium* sp., *B. cinérea*, *Mycosphaerella arachidicola* y *Physalospora piricola* (Oliva *et al.*, 2003; Wang and Ng, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010). A pesar de estos registros previos fue evidente que las cepas se adaptaron rápidamente al extracto y su velocidad de crecimiento fue estimulada por la presencia del extracto en el medio de cultivo. Esto pudiera atribuirse a que tanto el hongo *Trichoderma aggressivum f. europaeum* como las cepas comestibles evaluadas tienen una amplia capacidad enzimática para degradar compuestos orgánicos en el medio donde se desarrollan (Mohammed *et al.*, 2004; Stamets y Chilton, 1983).



A

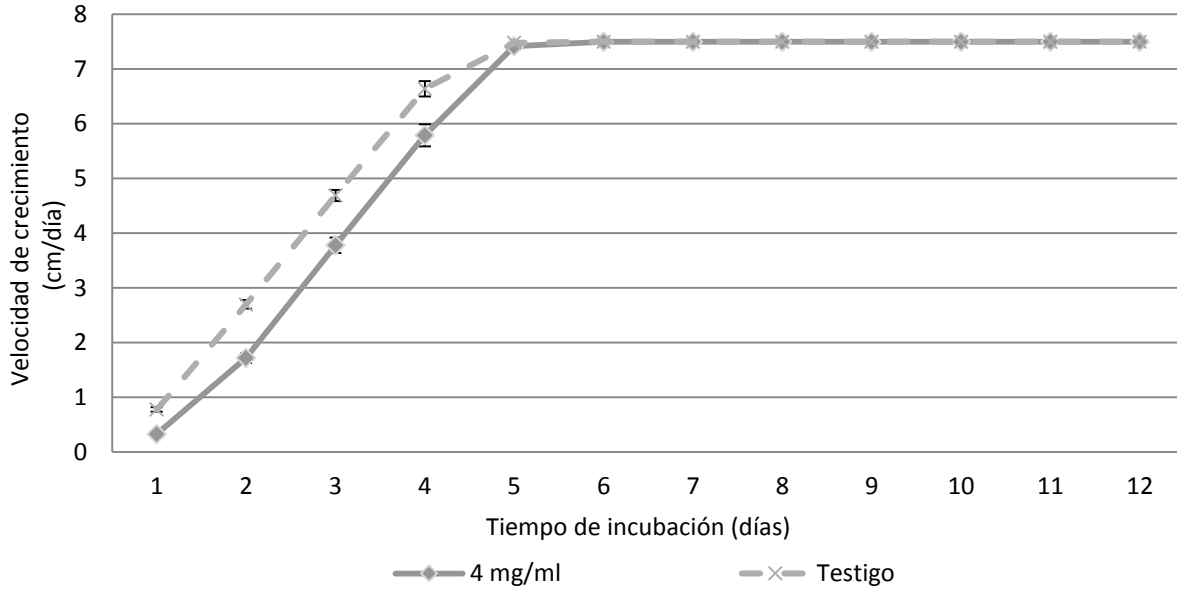
		Tiempo de incubación											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Allium cepa</i>		0±0 ^a	0.35±0.01 ^a	1.11±0.1 ^a	1.9±0.1 ^a	2.7±0.2 ^a	3.58±0.4 ^a	4.47±0.45 ^a	5.72±0.41 ^a	6.79±0.25 ^a	7.2±0.16 ^a	7.41±0.04 ^a	7.5±0 ^a
Testigo		0.43±0.02 ^b	0.66±0.03 ^b	1.39±0.11 ^b	2.69±0.11 ^b	4.41±0.09 ^b	5.37±0.1 ^b	6.33±0.16 ^b	7.18±0.12 ^b	7.5±0 ^b	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a



B

		Tiempo de incubación											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Allium cepa</i>		0.22±0.03 ^b	1.04±0.07 ^a	2.07±0.2 ^a	3.42±0.4 ^a	5.06±0.6 ^a	6.16±0.48 ^a	6.7±0.38 ^a	6.98±0.28 ^a	7.28±0.11 ^a	7.44±0.04 ^a	7.47±0.02 ^a	7.5±0 ^a
Testigo		0.63±0.03 ^a	1.08±0.04 ^a	1.8±0.12 ^a	2.67±0.29 ^a	4.45±0.24 ^a	5.41±0.13 ^a	5.94±0.17 ^a	7.01±0.12 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a

Fig. 50. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n=10.



		Tiempo de incubación									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Allium cepa</i>		0.33±0.04 ^b	1.72±0.09 ^b	3.78±0.14 ^b	5.79±0.2 ^b	7.42±0.06 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a
Testigo		0.78±0.04 ^a	2.7±0.08 ^a	4.69±0.1 ^a	6.64±0.14 ^a	7.48±0.01 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a	7.5±0 ^a

Fig. 51. Velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

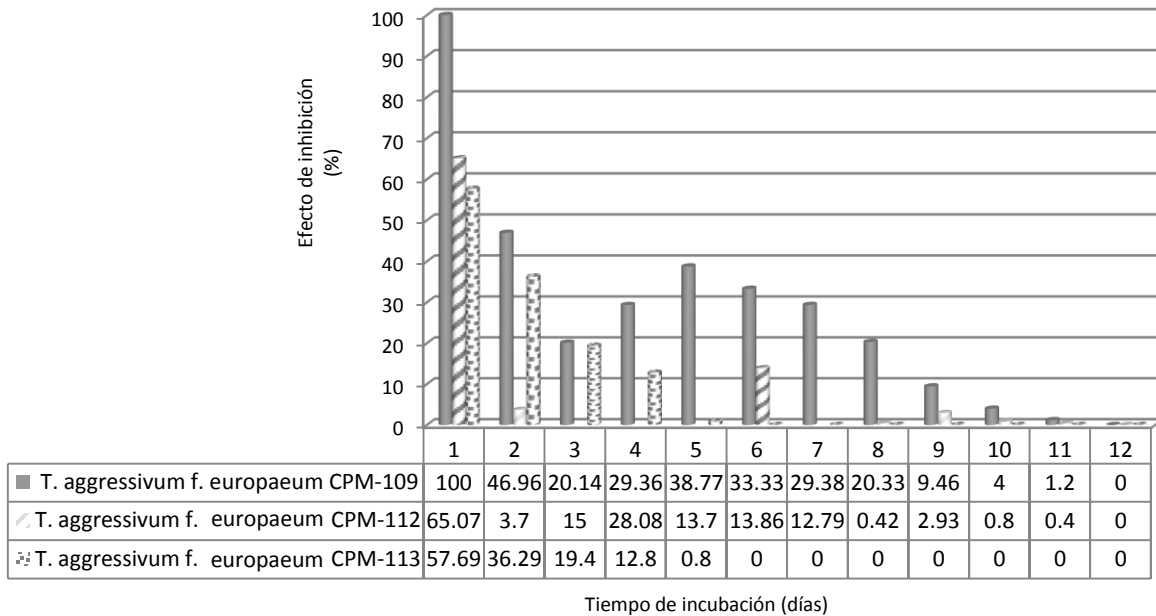


Fig. 52. Efecto promedio de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* cultivadas en medio PDA con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) en una concentración de 4 mg/ml.

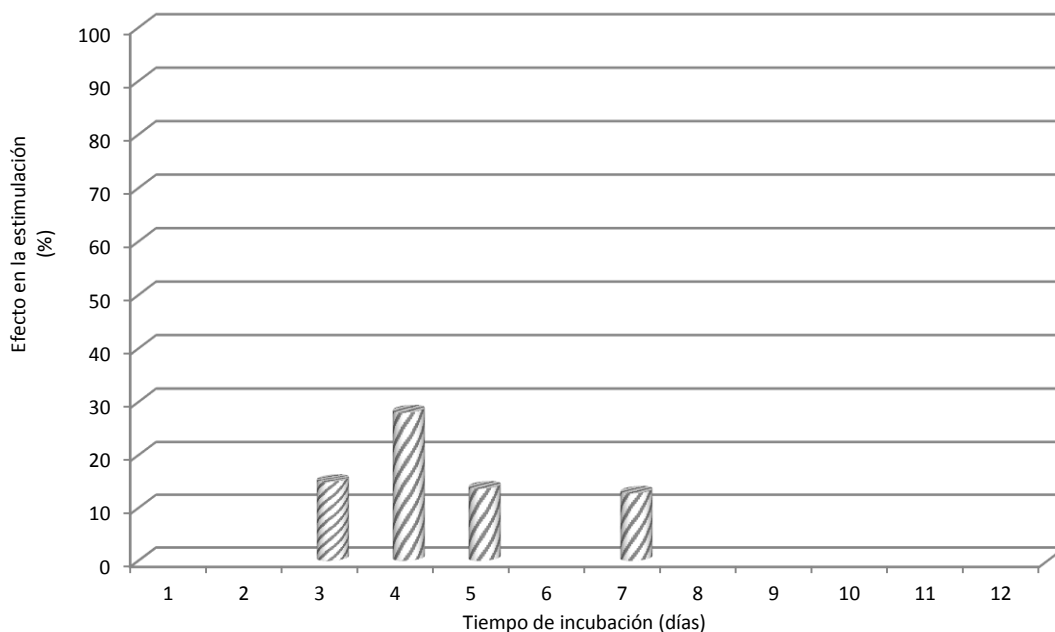
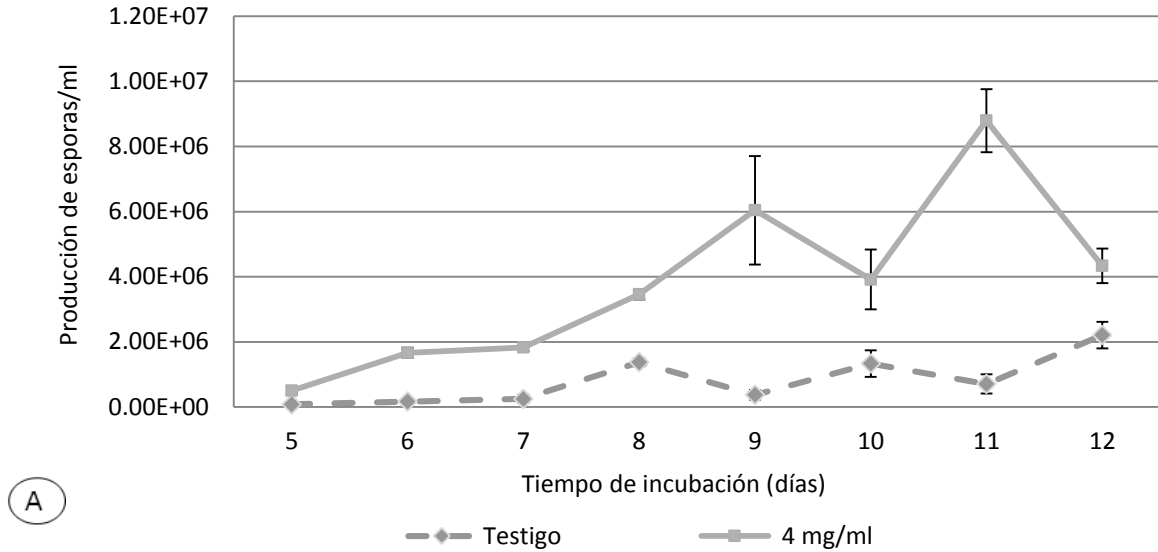


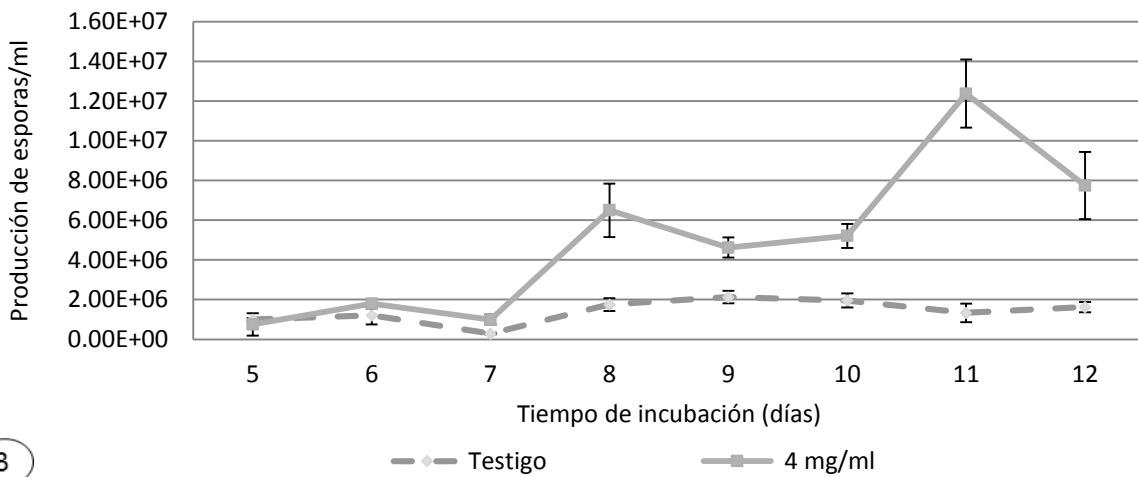
Fig. 53. Efecto promedio de estimulación de la velocidad de crecimiento micelial (%) de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 expuesta al extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) en una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.

8.3.4 Efecto del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) sobre la esporulación de las cepas de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 se desarrollaron en medio de cultivo agar con extracto de malta (EMA) con 4 mg/ml de extracto de cebolla morada (*Allium cepa*). Una vez desarrolladas las colonias y posteriormente a su evaluación de la velocidad de crecimiento micelial, se evaluó el efecto del extracto sobre la esporulación de las cepas, por medio del conteo de esporas en cámara de Neubauer. A pesar que la literatura registra efectos antifúngicos en extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) (Tajkarimi *et al.*, 2010; Wang y Ng, 2004), se pudo observar que en el tratamiento con extracto se observó un aumento considerable en la producción de esporas con respecto al testigo (Figs. 54 - 55). Esto puede atribuirse a la absorción de los nutrientes ya mencionados presentes en la planta de cebolla (*Allium cepa*) por parte de los mohos, como son diversos carbohidratos, vitaminas, antioxidantes y antocianinas (Downes *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2004; Shon *et al.*, 2004).



		Tiempo de incubación							
		5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	8.33E+04 ± 8.33E+04 ^a	1.67E+05 ± 8.33E+04 ^a	2.50E+05 ± 1.25E+05 ^a	1.38E+06 ± 1.25E+05 ^b	3.75E+05 ± 1.44E+05 ^a	1.33E+06 ± 4.10E+05 ^a	7.08E+05 ± 2.92E+05 ^a	2.21E+06 ± 4.10E+05 ^a	
<i>Allium cepa</i> 4 mg/ml	5.00E+05 ± 7.22E+04 ^b	1.67E+06 ± 1.50E+05 ^b	1.83E+06 ± 1.10E+05 ^b	3.46E+06 ± 1.50E+05 ^b	6.04E+06 ± 1.67E+06 ^b	3.92E+06 ± 9.17E+05 ^b	8.79E+06 ± 9.69E+05 ^b	4.33E+06 ± 5.32E+05 ^b	

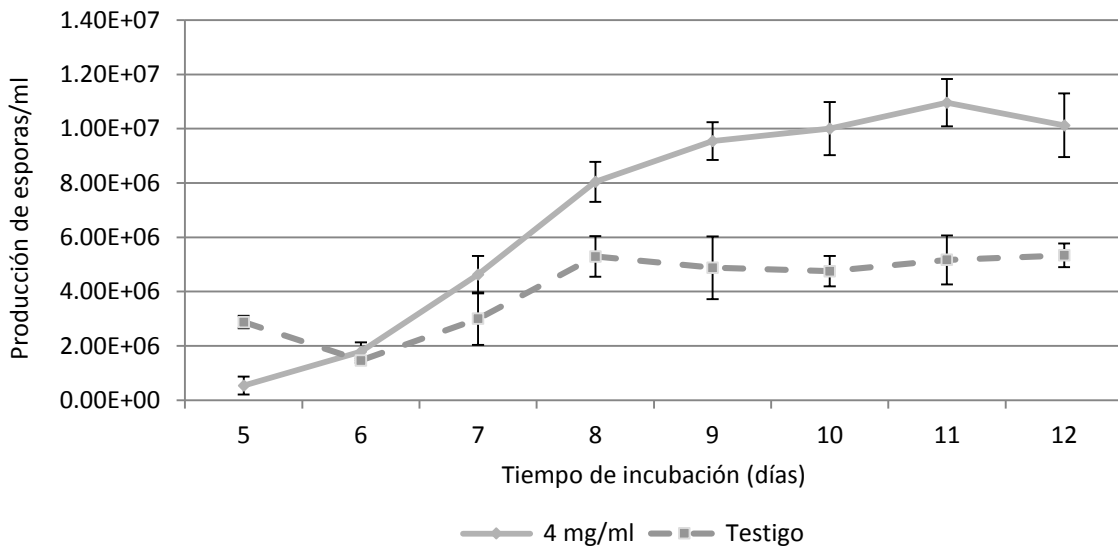


		Tiempo de incubación							
Días		5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	1.00E+06 ± 7.22E+04 ^a	1.21E+06 ± 4.58E+05 ^a	2.92E+05 ± 4.17E+04 ^a	1.75E+06 ± 3.15E+05 ^a	2.13E+06 ± 3.15E+05 ^a	1.96E+06 ± 3.56E+05 ^a	1.33E+06 ± 4.70E+05 ^a	1.63E+06 ± 2.60E+05 ^a	
<i>Allium cepa</i> 4 mg/ml	7.50E+05 ± 5.64E+05 ^a	1.79E+06 ± 2.32E+05 ^b	1.00E+06 ± 2.50E+05 ^b	6.50E+06 ± 1.35E+06 ^b	4.63E+06 ± 5.05E+05 ^b	5.21E+06 ± 6.01E+05 ^b	1.24E+07 ± 1.72E+06 ^b	7.75E+06 ± 1.69E+06 ^b	

Fig. 54. Efecto del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) con 4 mg/ml de extracto en medio de cultivo PDA, sobre la producción de esporas de las colonias de *Trichoderma*. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

La cepa que obtuvo una proporción promedio de estimulación en la esporulación mayor fue la cepa de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-109 con una proporción promedio de estimulación del 77.5% a lo largo del experimento (Fig. 52). En el caso de la cepa de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-112 se observó una proporción promedio de estimulación del 57.6% a lo largo del experimento. Para la cepa de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113 se observó una proporción promedio de estimulación del 41.8% a lo largo del experimento (Fig. 52). Solo se observó una inhibición en la producción de esporas para la cepas de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-112 del 33% y *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113 del 43.7% en el quinto día de crecimiento de las cepas o primer día de conteo (Fig. 53).

A partir del día 7 de crecimiento se observó que todas las cepas de *Trichoderma* continuaron con su proceso de esporulación, si no al 100% igual que el testigo, al menos por arriba del 30% y hasta un 90% en la cepa de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-109, (Fig. 52) esto indica que las cepas no mostraron una sensibilidad significativa ante la presencia del extracto de cebolla (*Allium cepa*) en cuanto a la producción de esporas.



		Tiempo de incubación							
		5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo		2.88E+06 ±	1.46E+06 ±	3.00E+06 ±	5.29E+06 ±	4.88E+06 ±	4.75E+06 ±	5.17E+06 ±	5.33E+06 ±
		3.31E+05 ^a	3.41E+05 ^a	6.88E+05 ^a	7.41E+05 ^a	6.96E+05 ^a	9.76E+05 ^a	8.70E+05 ^a	1.17E+06 ^a
<i>Allium cepa</i> 4 mg/ml		5.42E+05 ±	1.79E+06 ±	4.63E+06 ±	8.04E+06 ±	9.54E+06 ±	1.00E+07 ±	1.10E+07 ±	1.01E+07 ±
		2.32E+05 ^b	8.33E+04 ^a	9.71E+05 ^b	7.51E+05 ^b	1.15E+06 ^b	5.64E+05 ^b	9.02E+05 ^b	4.33E+05 ^b

Fig. 55. Efecto del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) con 4 mg/ml de extracto en medio de cultivo PDA, sobre la producción de esporas de las colonias de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

Entre los azúcares que se encuentran en el bulbo de cebolla (*Allium cepa*), se encuentra la fructosa, se sabe que la cantidad de fructosa en la cebolla roja mantenida a 28 °C es significativamente mayor que en la cebolla almacenada a temperaturas menores de entre 20 y 24 °C (Downes *et al.*, 2009). La cantidad de fructosa presente en el extracto pudo contribuir al aumento en el desarrollo de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, ya que en el proceso de deshidratado del material vegetal se mantuvo a temperatura ambiente (28°C). La presencia del extracto de cebolla (*Allium cepa*) estimuló la producción de esporas de las tres cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Fig. 56). La cepa con una mayor proporción de estimulación en la esporulación fue la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, con niveles superiores al 80% hasta el día onceavo del experimento.

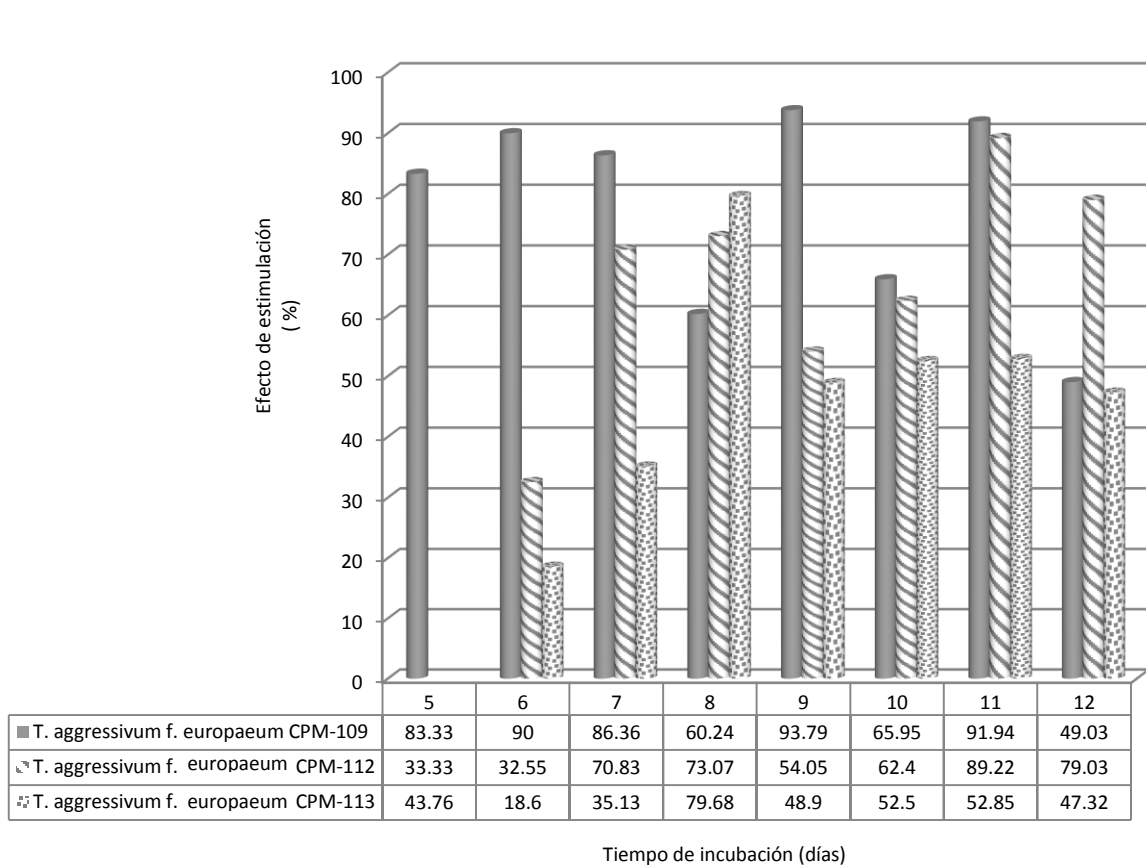


Fig. 56. Efecto promedio de la estimulación sobre la producción de esporas de las colonias de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, por efecto del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) a una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.

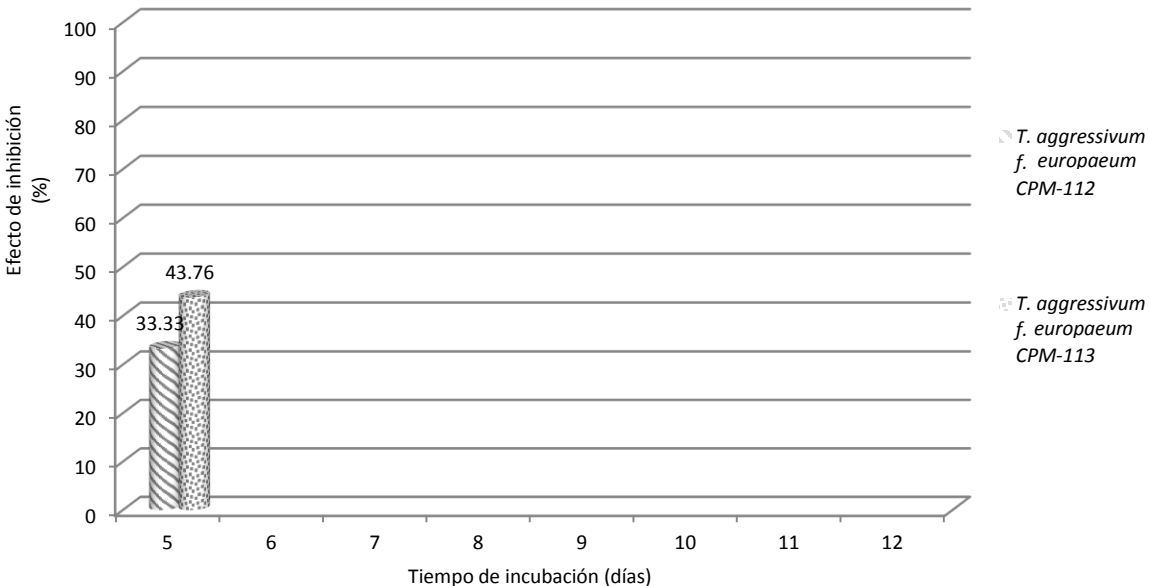


Fig. 57. Efecto promedio de la inhibición (%) de la producción de esporas de las colonias de *Trichoderma aggressiveum f. europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressiveum f. europaeum* CPM-113, por efecto del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) a una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.

8.3.5 Caracterización morfológica

Una vez terminadas las mediciones de la velocidad de crecimiento micelial, se realizó la caracterización morfológica de las cepas de *Trichoderma aggressiveum f. europaeum* cultivadas en medio con extracto de cebolla (*Allium cepa*), (Tabla 26, Fig. 54) a los 10 días del crecimiento micelial. La morfología de las cepas se modificó en cuanto a la densidad del micelio y la cantidad de esporas, siendo siempre superior en las cultivadas en medio con extracto (Tabla 26). Esto puede deberse a que la cebolla (*Allium cepa*) contiene vitaminas B₁, B₂ y C además de potasio; también es rica en carbohidratos del tipo de los polisacáridos, como la fructosa, sacarosa entre otras (Shon *et al.*, 2004). Estos compuestos pudieron haber influido en el crecimiento de las cepas ante el extracto de cebolla (*Allium cepa*), así como también la presencia de algún tipo de alcaloide. Los alcaloides son el grupo más numeroso de metabolitos secundarios de los vegetales, y algunos actúan como reguladores de crecimiento y están ampliamente repartidos en los distintos órganos vegetales (raíces, tallos, hojas, flores, semillas, etc.) (Izco *et al.*, 2004).

Tabla 26. Caracterización morfológica de las colonias de las cepas evaluadas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 cultivadas en agar PDA con 4 mg/ml de extracto de cebolla morada (*Allium cepa*).

Característica	Cepas					
	CPM-109		CPM-112		CPM-113	
	4 mg/ml	Testigo	4 mg/ml	Testigo	4 mg/ml	Testigo
Color (código pantone)	Verde amarillento (376-389)	Amarillo (604)	Verde amarillento (383-394)	Amarillo (603)	Verde amarillento (383-395)	Amarillo verdoso (394-375)
Textura	Algodonoso	Algodonoso	Lanoso	Lanoso	Aterciopelado	Lanoso
Densidad	Abundante	Escasa	Abundante	Regular	Abundante	Abundante
Micelio aéreo	Postrado	Postrado	Postrado	Postrado	Postrado, pulverizado	Postrado
Borde	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular

En cuanto a la coloración de las cepas, los testigos tuvieron coloraciones amarillentas mientras que en los tratamientos expuestos al extracto se pudo observar una mezcla de colores amarillo con verde brillantes (Fig. 54). En cuanto a la textura, la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 fue la única que tuvo modificaciones pasando de lanosa en el testigo a algodonosa en presencia del extracto. La densidad siempre fue abundante en el tratamiento con extracto de cebolla (*Allium cepa*) posiblemente por la diversa cantidad de nutrientes presentes en el extracto.

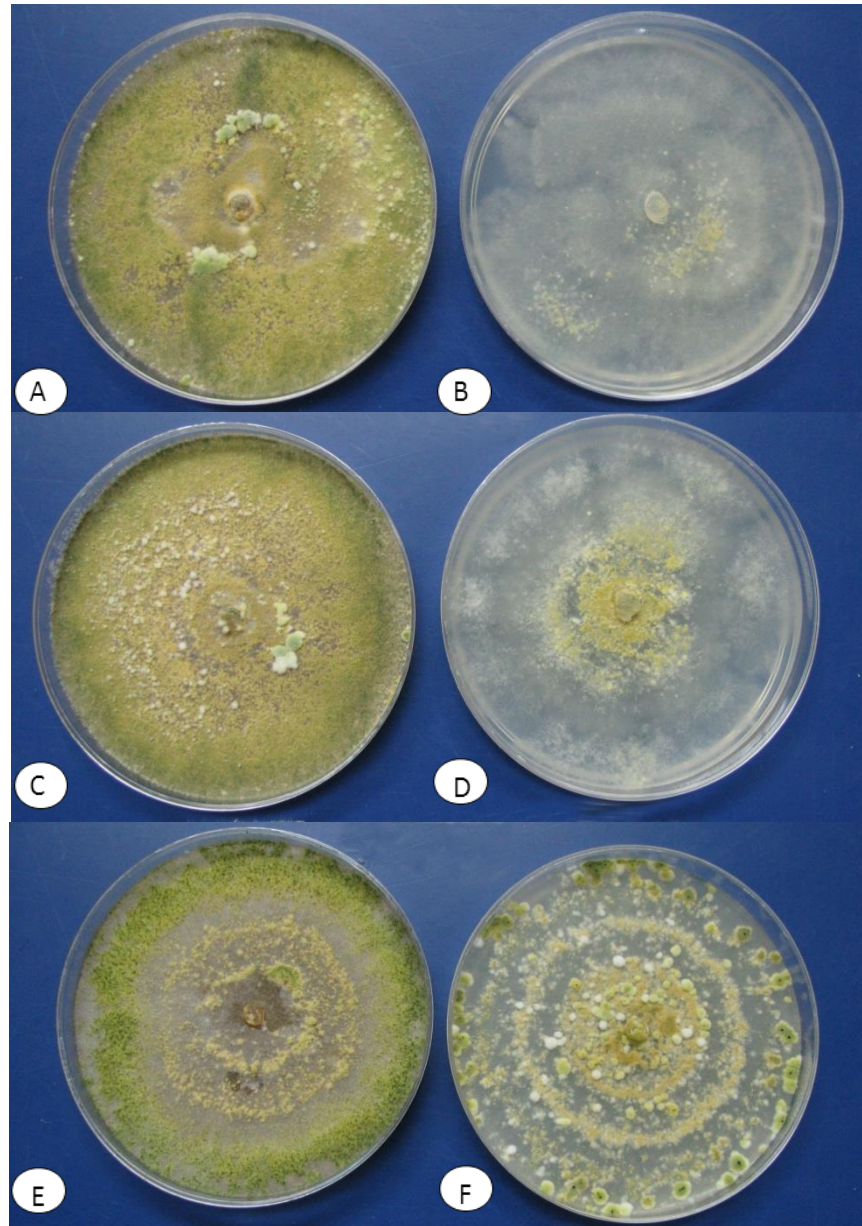


Fig. 58. Colonias de las cepas de *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* evaluadas, A y B: *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-109, C y D: *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-112 y E y F: *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-113. La serie A, C y E son los tratamientos con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) en medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación. La serie B, D y F son los testigos sin extracto.

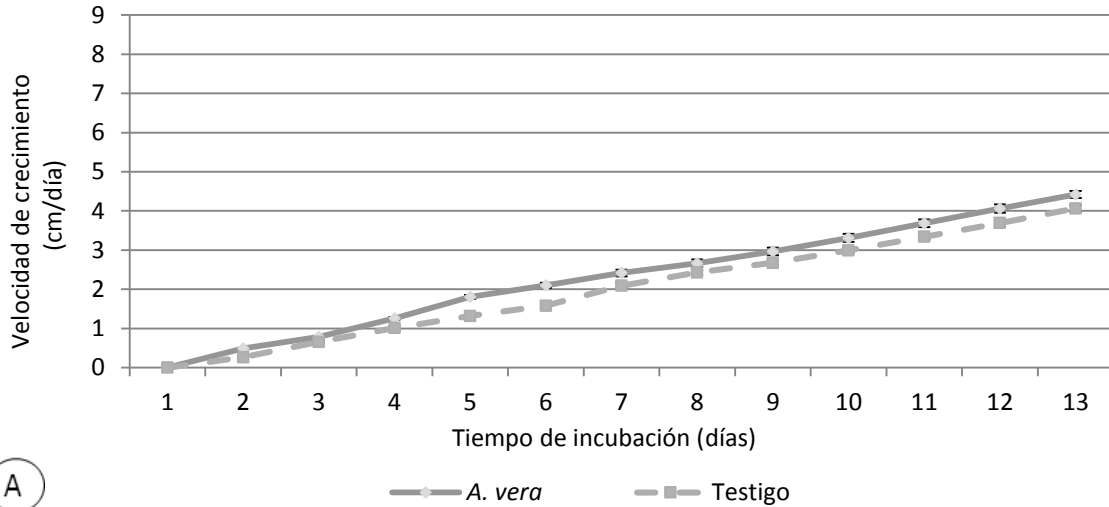
8.3.6 Conclusiones

1. El extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), estimuló la velocidad de crecimiento de las cepas de hongos comestibles evaluados, y aumentó la densidad micelial en su morfología colonial.
2. La cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50 mostró una estimulación del 88% al segundo día rebasando el 100% al sexto día de crecimiento por efecto del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), mientras que la cepa *Pleurotus pulmonarius* CP-267, mostró una estimulación de hasta el 59.8% al séptimo día de crecimiento.
3. El extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) estimuló la velocidad de crecimiento micelial de las cepas evaluadas de *Trichoderma*, excepto en la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109. También se observó un efecto de estimulación en la esporulación y la densidad de micelio en la velocidad de crecimiento de todas las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

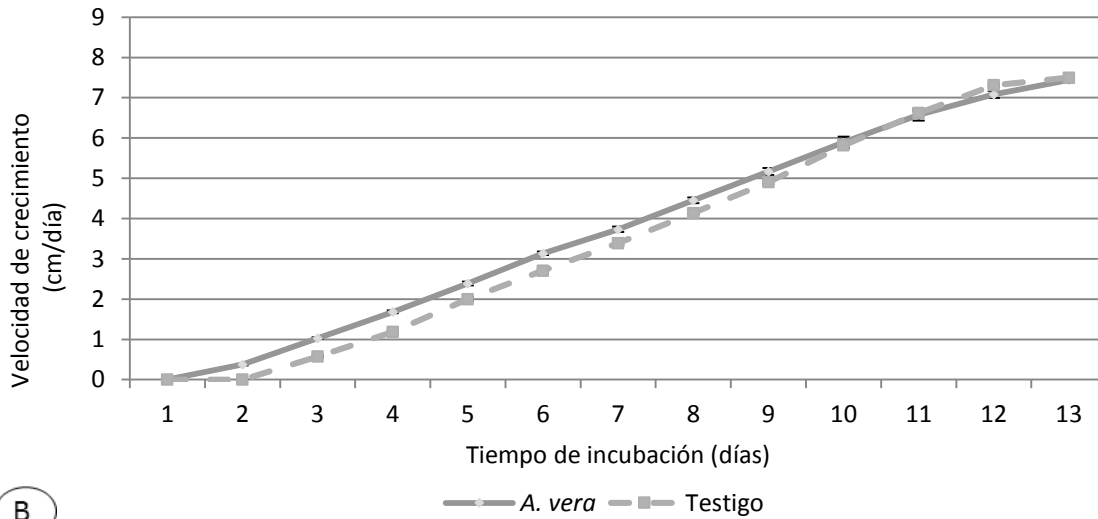
8.4. Efecto del extracto de sábila (*Aloe vera*) con dosis de 4 mg/ml en la velocidad de crecimiento micelial (Experimento 4)

8.4.1 Velocidad de crecimiento micelial de los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* CP-50, *Pleurotus pulmonarius* CP-267 y *Lentinula edodes* CP-7

Una vez obtenidos los resultados del extracto de cebolla morada (*Allium cepa*), se evaluó un extracto de sábila (*Aloe vera*) con la metodología ya estandarizada, por maceración en etanol, evaporación y resuspensión en agua. Se evaluó la velocidad de crecimiento micelial de las tres cepas comestibles previamente analizadas con la dosis de 4 mg/ml en el medio de cultivo. La velocidad de crecimiento micelial de la cepa comestible *Lentinula edodes* CP-7, no presentó una diferencia importante con respecto al testigo (Fig. 59).

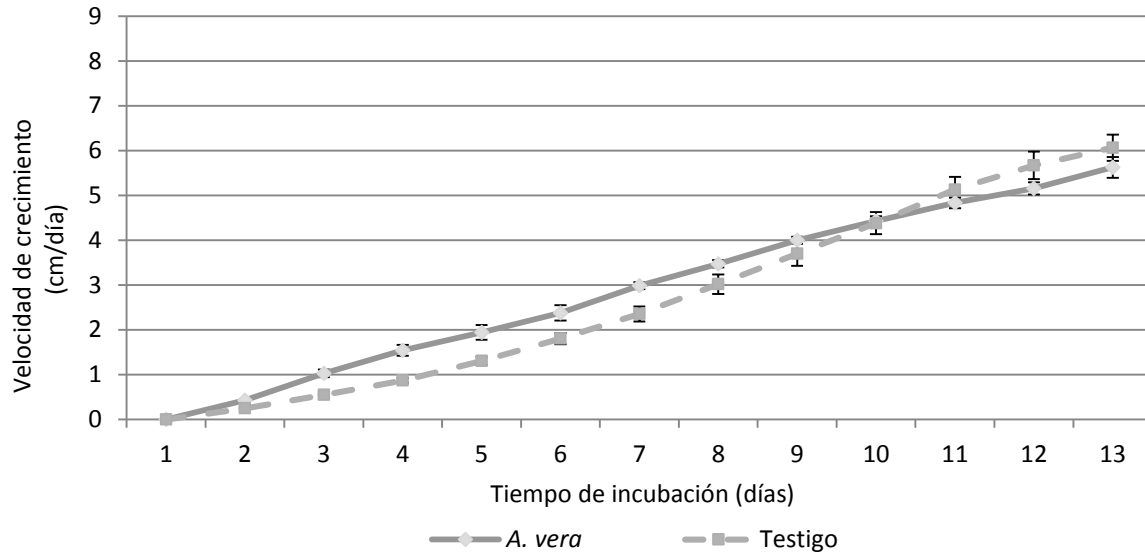


		Tiempo de incubación												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Aloe vera</i>		0±0 ^a	0.49±0.01 ^a	0.78±0.02 ^a	1.26±0.03 ^a	1.81±0.05 ^a	2.10±0.07 ^a	2.42±0.09 ^a	2.66±0.10 ^a	2.96±0.10 ^a	3.31±0.10 ^a	3.69±0.10 ^a	4.06±0.11 ^a	4.42±0.09 ^a
Testigo		0±0 ^a	0.27±0.05 ^a	0.66±0.02 ^a	1.01±0.05 ^a	1.32±0.03 ^b	1.58±0.04 ^b	2.09±0.06 ^b	2.43±0.06 ^b	2.68±0.06 ^b	3.00±0.06 ^b	3.34±0.07 ^b	3.69±0.08 ^b	4.07±0.08 ^b



		Tiempo de incubación												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Aloe vera</i>		0±0 ^a	0.38±0.02 ^a	1.03±0.02 ^a	1.68±0.04 ^a	2.39±0.05 ^a	3.14±0.04 ^a	3.73±0.07 ^a	4.45±0.07 ^a	5.17±0.09 ^a	5.89±0.14 ^a	6.58±0.15 ^a	7.08±0.08 ^a	7.44±0.03 ^a
Testigo		0±0 ^a	0.00±0.00 ^b	0.57±0.03 ^b	1.18±0.04 ^b	2.00±0.04 ^b	2.71±0.05 ^b	3.39±0.05 ^b	4.14±0.04 ^b	4.91±0.05 ^b	5.82±0.05 ^a	6.62±0.05 ^a	7.31±0.04 ^a	7.50±0.00 ^a

Fig. 59. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA. A: *Lentinula edodes* CP-7 y B: *Pleurotus ostreatus* CP-50. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.



		Tiempo de incubación												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Aloe vera</i>		0±0 ^a	0.43±0.02 ^a	1.03±0.09 ^a	1.54±0.12 ^a	1.94±0.17 ^a	2.38±0.17 ^a	2.98±0.08 ^a	3.48±0.09 ^a	4.00±0.08 ^a	4.43±0.11 ^a	4.83±0.12 ^a	5.16±0.14 ^a	5.63±0.23 ^a
Testigo		0±0 ^a	0.25±0.01 ^a	0.55±0.02 ^b	0.87±0.05 ^b	1.31±0.09 ^b	1.81±0.12 ^b	2.36±0.17 ^b	3.02±0.22 ^b	3.70±0.27 ^a	4.38±0.25 ^a	5.13±0.29 ^a	5.67±0.31 ^a	6.07±0.29 ^a

Fig. 60. Velocidad de crecimiento micelial de *Pleurotus pulmonarius* CP-267 con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo EMA. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

En el caso de las cepas *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Pleurotus pulmonarius* CP-267, el tratamiento con extracto de sábila (*Aloe vera*) se mantuvo por encima del testigo, sin embargo no se observó una diferencia importante en la velocidad de crecimiento (Figs. 59 y 60). Con esto se observa que a pesar de que sábila (*Aloe vera*) tiene antecedentes de propiedades antifúngicas (Reynolds y Dweck, 1999; Rosca-Casian *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2010), estos compuestos no afectaron el desarrollo de los hongos comestibles evaluados en el presente estudio. Este resultado es favorable para el objetivo del presente trabajo, ya que al no interferir en la velocidad de crecimiento de las cepas comestibles y no así en las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, puede suponerse que la presencia del extracto no interferirá en la producción de los hongos comestibles en el cultivo del sustrato sólido.

8.4.2 Velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma*

En el caso de la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* evaluadas, se observó una marcada diferencia en la velocidad de

crecimiento en comparación con el testigo a lo largo del experimento para las tres cepas (Figs. 61-63). Para las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 fue del 84% y 77% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 éste efecto inhibitorio en la velocidad de crecimiento se observó día 1 (Figs. 61-63). El testigo para ambas cepas llegó a su máximo crecimiento al día 4, mientras que el tratamiento con extracto de sábila (*Aloe vera*) lo consiguió hasta el día 7 (Figs. 61-62). La cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, también tuvo una diferencia de velocidad de crecimiento evidente desde el día 1 de medición con una inhibición del 80% (Fig. 63), en este caso el tratamiento testigo llegó a su máximo crecimiento el día 3, mientras que el tratamiento con sábila (*Aloe vera*) llegó a su máximo hasta el día 6; ésta cepa mostró una velocidad de crecimiento mayor a las otras dos evaluadas. La variabilidad en los datos fue mínima para las tres cepas, ya que ambos tratamientos presentaron un crecimiento radial característico de este tipo de mohos.

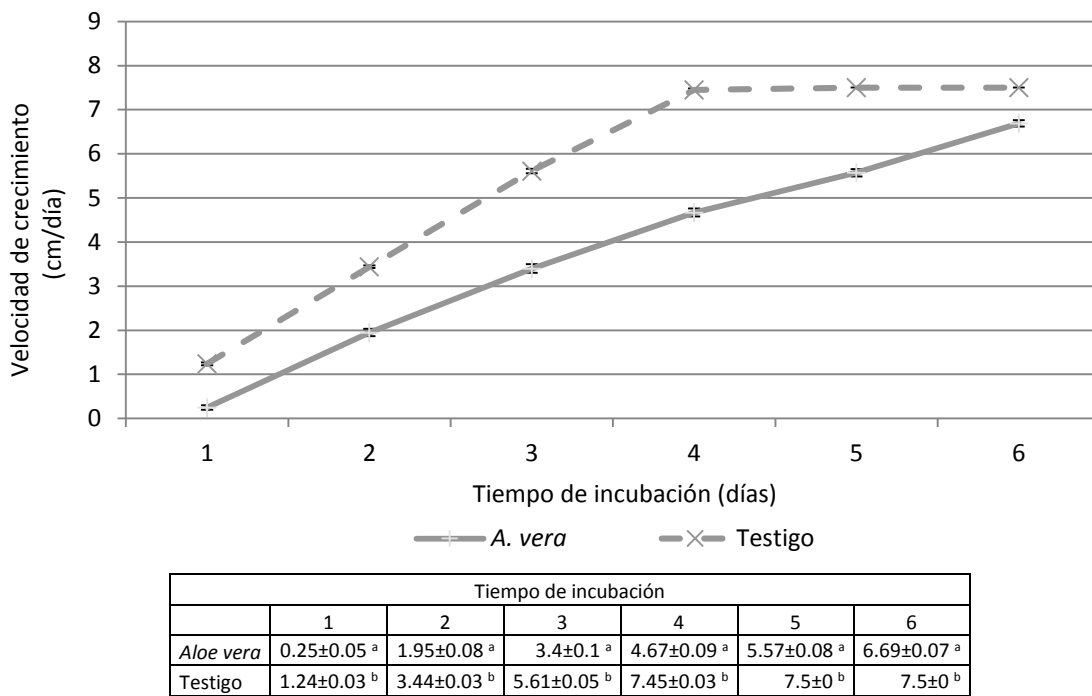
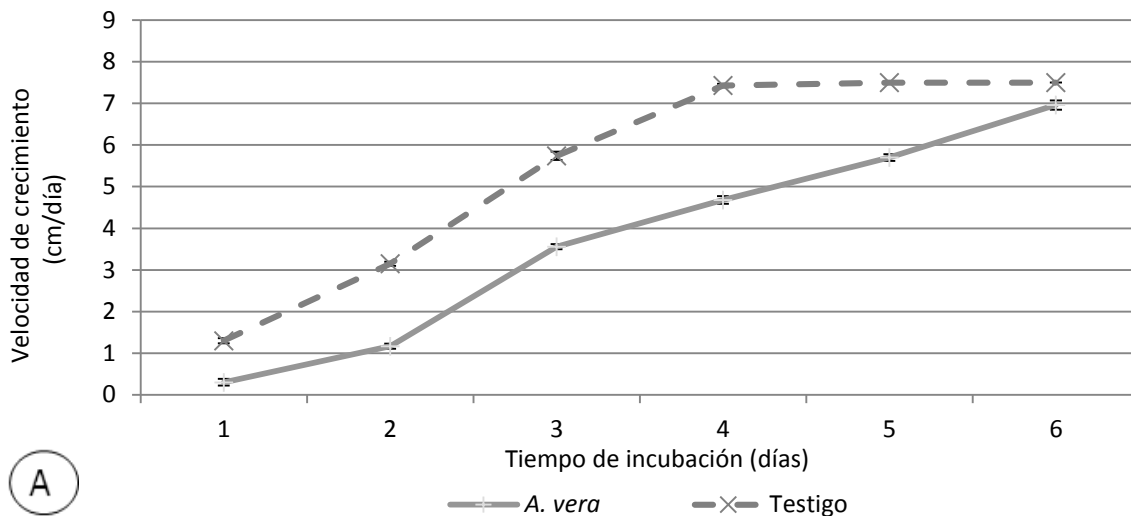
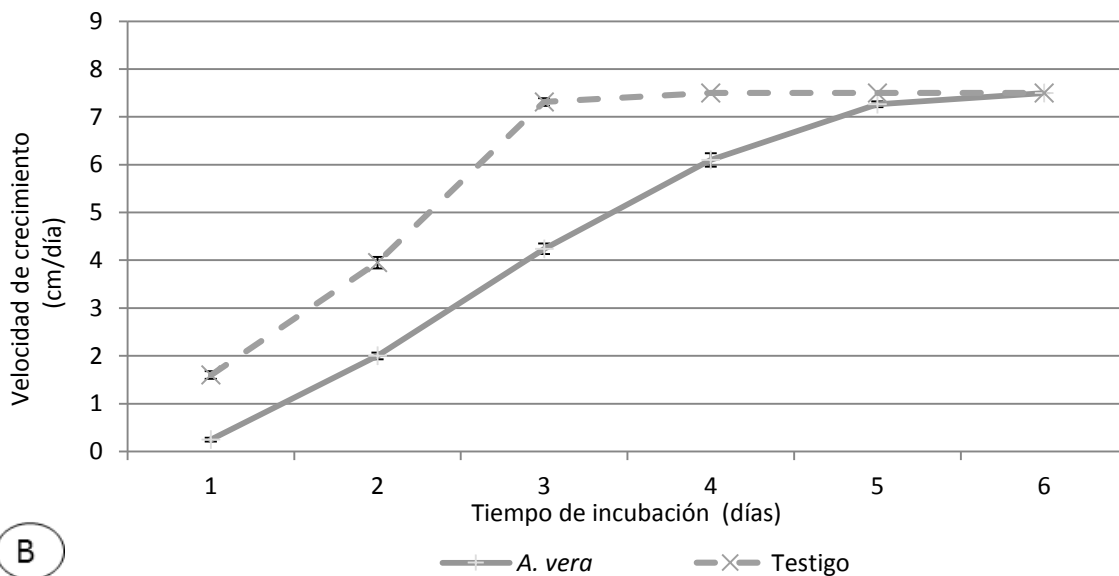


Fig. 61. Velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: $n = 10$.



Tiempo de incubación						
	1	2	3	4	5	6
<i>Aloe vera</i>	0.3±0.08 ^a	1.17±0.06 ^a	3.56±0.06 ^a	4.68±0.09 ^a	5.7±0.08 ^a	6.96±0.11 ^a
Testigo	1.3±0.06 ^b	3.15±0.05 ^b	5.74±0.1 ^b	7.43±0.04 ^b	7.5±0 ^b	7.5±0 ^b



Tiempo de incubación						
Días	1	2	3	4	5	6
<i>Aloe vera</i>	0.25±0.04 ^a	2±0.07 ^a	4.24±0.11 ^a	6.1±0.14 ^a	7.26±0.06 ^a	7.5±0 ^a
Testigo	1.6±0.08 ^b	3.95±0.12 ^b	7.31±0.08 ^b	7.5±0 ^b	7.5±0 ^b	7.5±0 ^a

Fig. 62. Velocidad de crecimiento micelial con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

Este efecto de inhibición en la velocidad de crecimiento puede atribuirse a que existen registros de la presencia de diversos compuestos que contiene sábila (*Aloe vera*), a los que previamente se les ha atribuido un efecto antifúngico (Reynolds y Dweck, 1999), como son los compuestos aloe-emodin y aloin (Castillo *et al.*, 2010), los cuales afectan el desarrollo de hongos imperfectos como son los del género *Trichoderma*, y como pudo observarse en los resultados anteriores no tuvo un efecto negativo en la velocidad de crecimiento de los hongos basidiomicetos de los géneros *Lentinula* y *Pleurotus*. El porcentaje de inhibición de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en las primeras 24 h de evaluación fue del 84%, seguido por un 76.9% y 79.8% de inhibición de las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* CMP-112 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 respectivamente. Para el día dos, las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CMP-112 aun fueron inhibidas con valores alrededor del 50% siendo de 49.3% y 62.8% respectivamente (Fig. 59). Esta inhibición puede estar directamente relacionada con el contenido del compuesto aloin presente en el gel del género *Aloe*. Diversas especies de *Aloe* contienen el compuesto que varía dependiendo de la especie y la estación del año, ya que la época de cosecha afecta grandemente las propiedades del gel, y se han observado variaciones en el contenido de lípidos, proteínas, aloin, fenoles totales, actividad antioxidante, fracciones hidrofílicas y lipofílicas y poliamidas (Zapata *et al.*, 2013).

Uno de los beneficios más evidentes para los productores de hongos comestibles respecto a la inhibición de desarrollo micelial del género *Trichoderma*, es el aspecto de la competitividad por el sustrato ante el crecimiento de las cepas de hongos comestibles. Este tiempo de retención o disminución de la velocidad de crecimiento del moho *Trichoderma* es favorable para el establecimiento inicial del micelio de las cepas comestibles en el sustrato, ya que los primeros días a partir de la siembra son cruciales para un desarrollo exitoso de la cepa comestible en el sustrato y poder crecer libre de contaminantes competidores a lo largo del proceso de incubación.

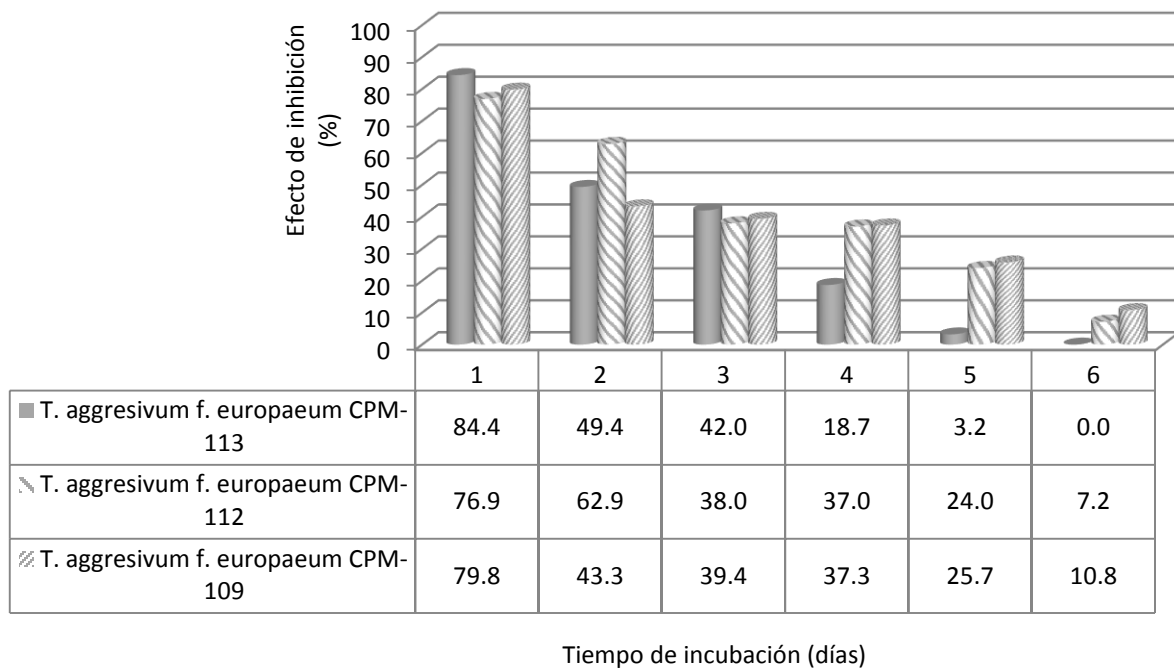


Fig. 63. Efecto de inhibición (%) sobre la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* por efecto del extracto de sábila (*Aloe vera*) en una concentración de 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.

8.4.3 Conteo de esporas de *Trichoderma*

En cuanto a la producción de esporas de las cepas de *Trichoderma* después de ser cultivadas en medio con extracto de sábila (*Aloe vera*), se observó que las tres cepas evaluadas disminuyeron su producción de esporas con respecto al testigo. La producción de esporas se mantuvo estadísticamente por debajo del testigo a lo largo de todo el experimento para las tres cepas (Figs. 64-65).

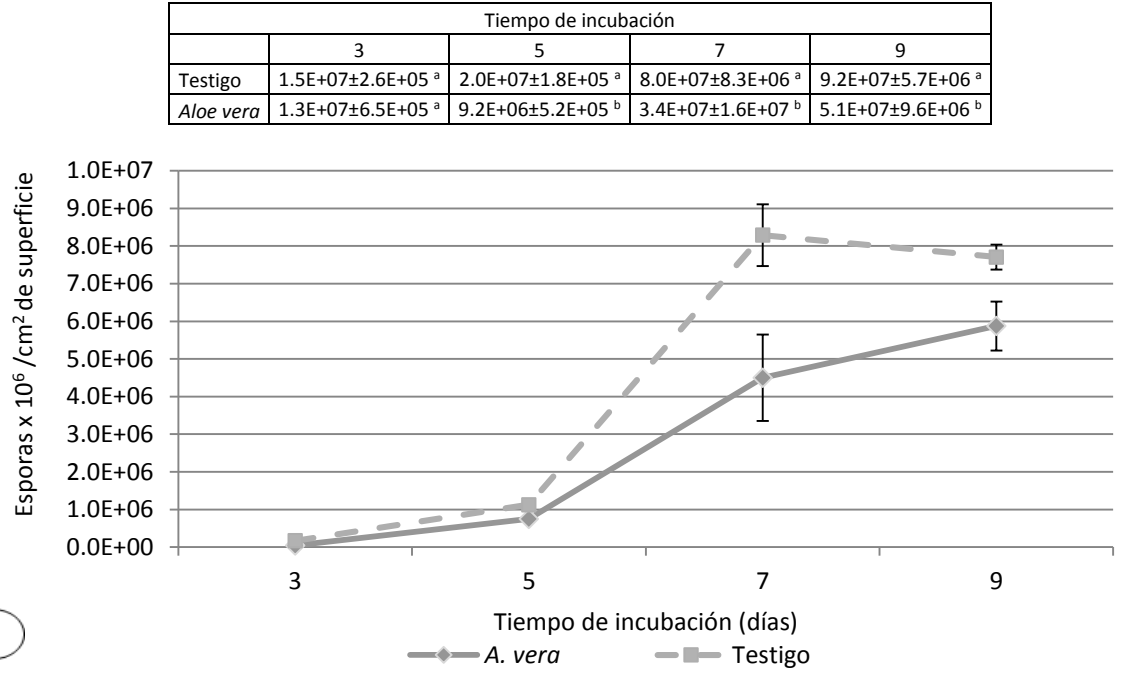
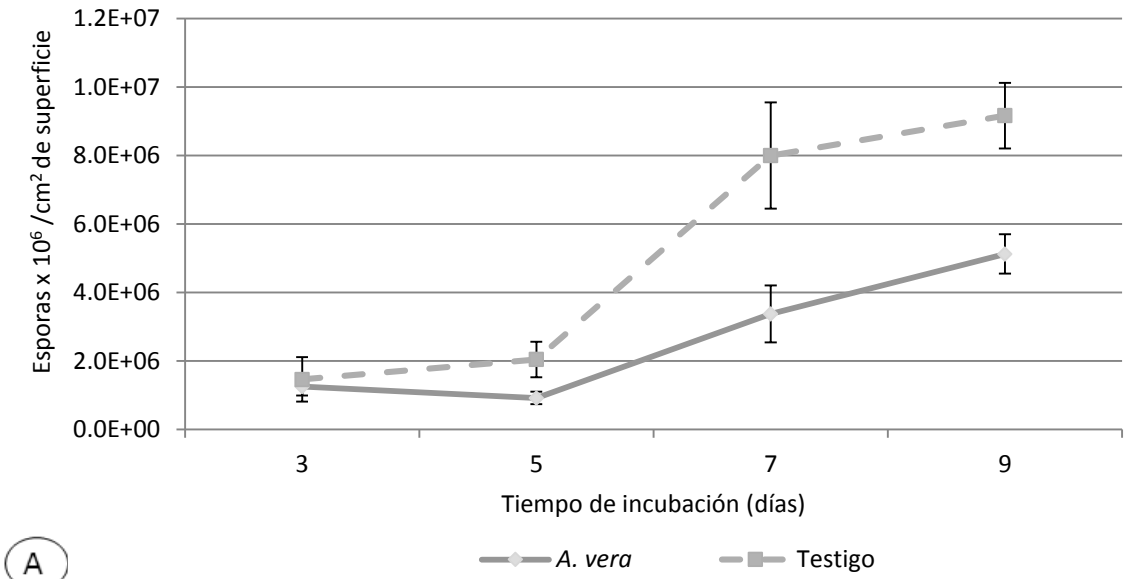
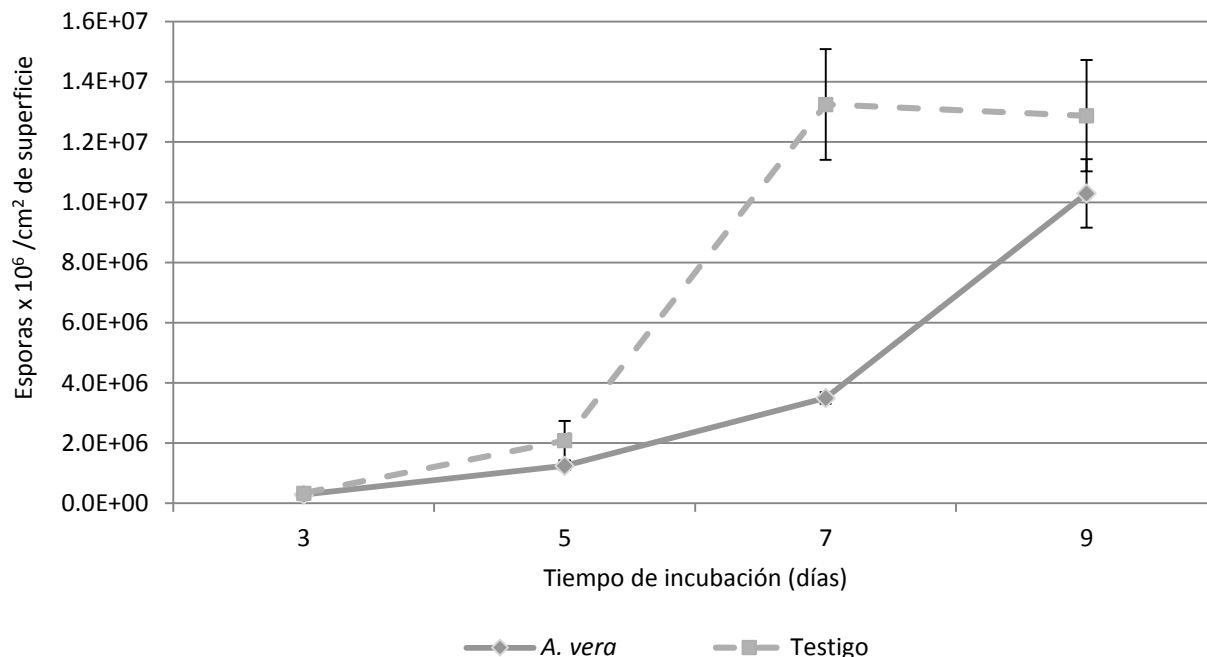


Fig. 64. Efecto del extracto de sábila (*Aloe vera*), en el conteo de esporas de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n=10.



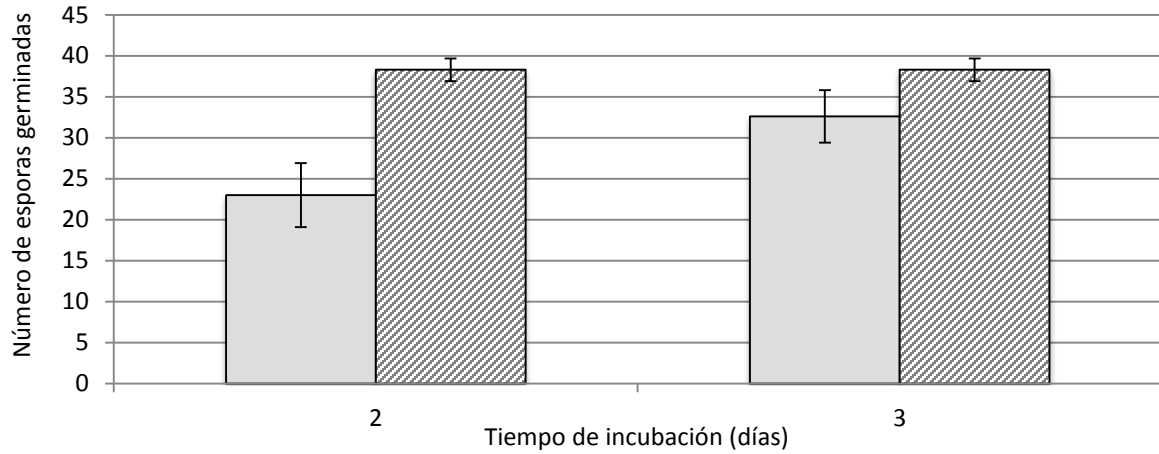
	Tiempo de incubación			
	3	5	7	9
Testigo	3.3.E+06±4.2.E+04 ^a	2.1.E+07± 1.4.E+05 ^a	1.3.E+08± 6.5.E+06 ^a	1.3.E+08± 1.1.E+07 ^a
<i>Aloe vera</i>	2.9.E+06±1.1.E+05 ^a	1.3.E+07± 6.5.E+05 ^a	3.5.E+07± 6.5.E+06 ^b	1.0.E+08± 1.8.E+06 ^a

Fig. 65. Efecto del extracto de sábila (*Aloe vera*), en el conteo de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

Existen registros de la inhibición en la germinación de esporas en los hongos fitopatógenos *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata*, y *Botrytis cinerea* por efecto de la sábila (*Aloe vera*) (Saks and Barkai-Golan, 1995). Los mismos compuestos antifúngicos responsables en la inhibición de la velocidad de crecimiento micelial pueden estar contribuyendo a la inhibición en la producción posterior de esporas en las cepas.

8.4.4 Prueba de germinación de esporas de *Trichoderma*

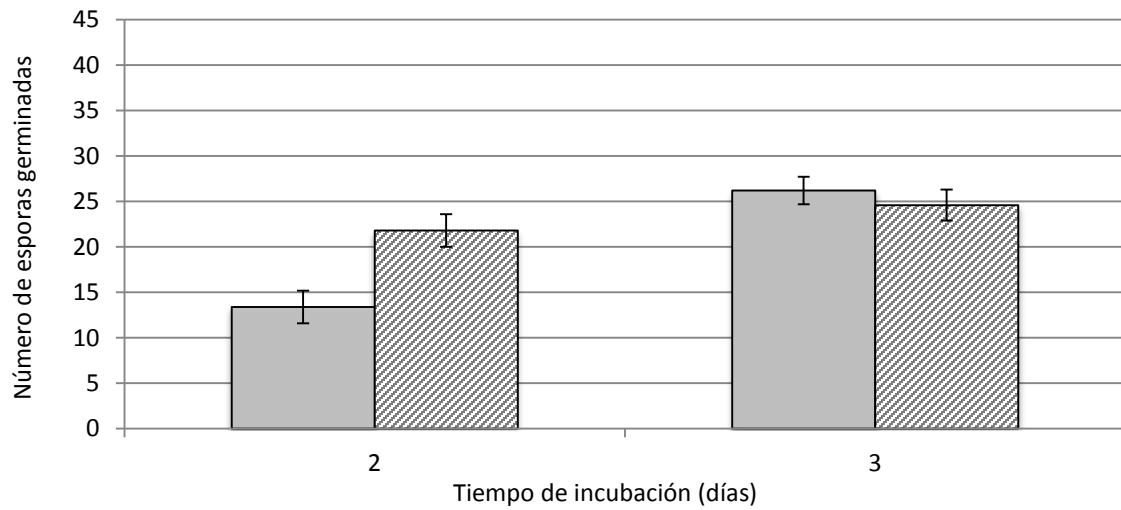
Para la prueba de germinación se realizó un stock con una cantidad conocida de esporas, las cuales se distribuyeron en medio de cultivo sólido con 4 mg/ml de extracto de sábila (*Aloe vera*). Esta prueba de germinación de esporas se realizó con material biológico que no había sido expuesto al extracto de sábila (*Aloe vera*) previamente.



A

□ Aloe vera 4 mg/ml ▨ Testigo

Tiempo de incubación		
	2	3
Aloe vera	23 ± 3.9 ^a	32.6 ± 1.4 ^a
Testigo	38.3 ± 3.2 ^b	38.3 ± 1.4 ^b



B

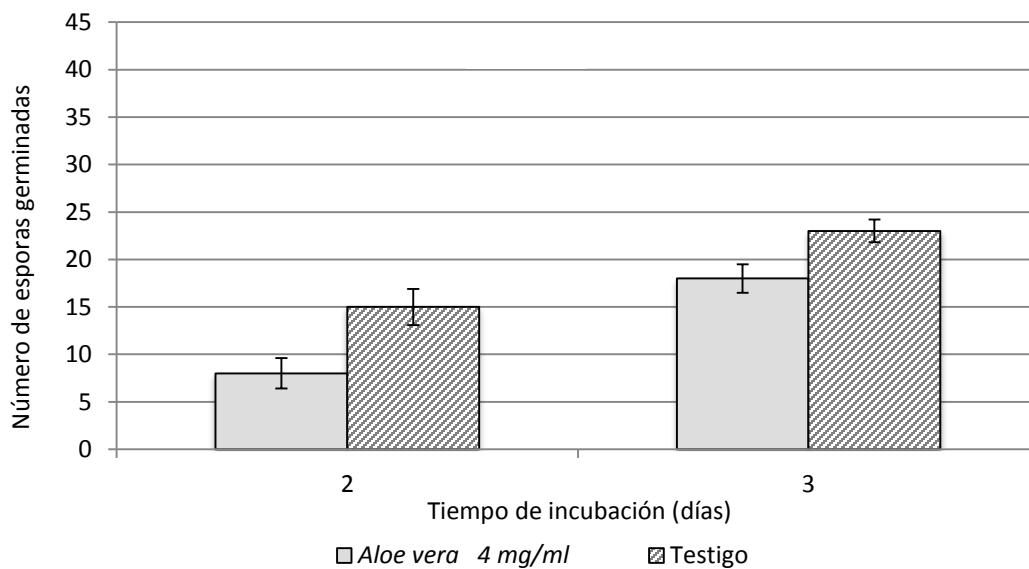
□ Aloe vera 4 mg/ml ▨ Testigo

Tiempo de incubación		
	2	3
Aloe vera	13.4 ± 1.8 ^a	26.2 ± 1.5 ^a
Testigo	21.8 ± 1.8 ^b	24.6 ± 1.7 ^a

Fig. 66. Prueba de germinación de esporas de las cepas de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, A: *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-109 y B: *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-112.

Se observó que para las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 las esporas cultivadas en medio de cultivo con extracto germinaron en menor cantidad en comparación con el testigo, hasta los 3 días para lo cual la caja se cubrió de micelio y ya no fue posible continuar con el conteo (Figs. 66-67). Para la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, solo se encontró inhibición en la germinación de esporas al día 2 (Fig. 66B), ya que para el tercer día el tratamiento con extracto tuvo un mayor número de esporas germinadas que el testigo (Fig. 62B).

Para las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112, se observó una inhibición del 40 y 39% respectivamente en la germinación de esporas con respecto al testigo, mientras que para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 el porcentaje de inhibición fue del 47% (Fig. 68A). Esto puede atribuirse a los compuestos antifúngicos presentes en el gel de la sábila (*Aloe vera*) encontrados por otros autores en extractos con diferentes solventes; entre los compuestos se encuentran el aloin, el ácido fumarico con propiedades antimicrobianas y el aloe-emidin (Zapata *et al.*, 2013; Chang-Liang *et al.*, 2011; Nidiry *et al.*, 2011; Saks y Barkai-Golan, 1995; Reynolds and Dweck, 1999).



Tiempo de incubación		
Días	2	3
Aloe vera	8 ± 1.6 ^a	18 ± 1.5 ^a
Testigo	15 ± 1.9 ^b	23 ± 1.2 ^b

Fig. 67. Prueba de germinación de esporas de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA.

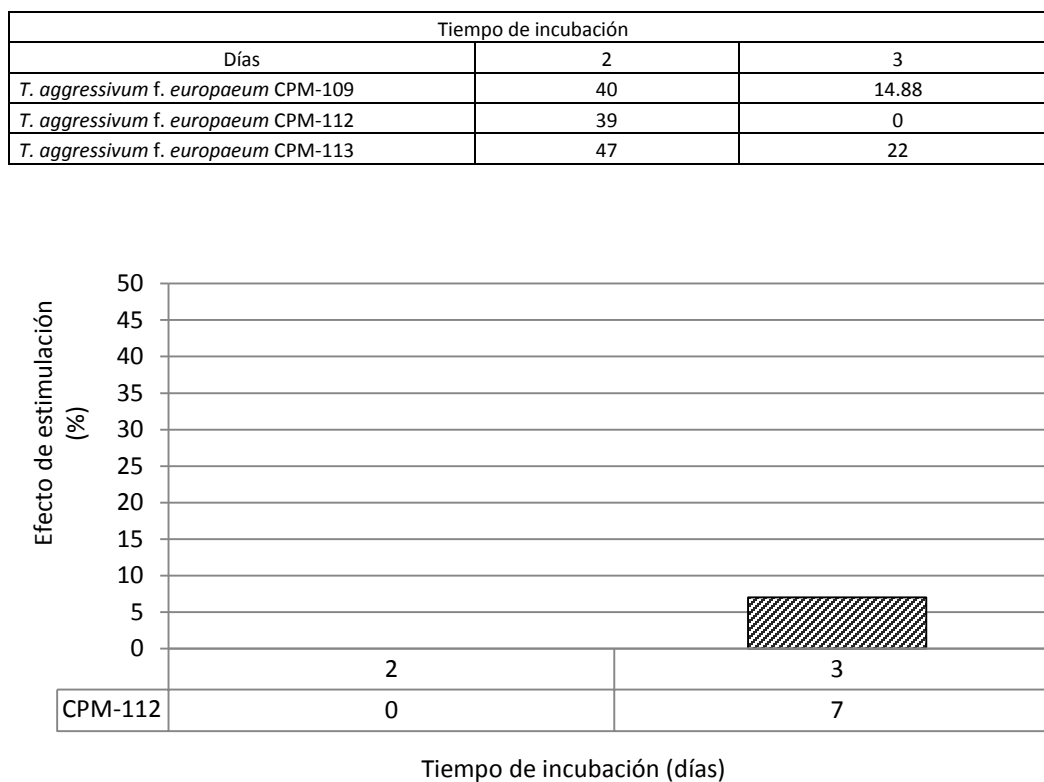
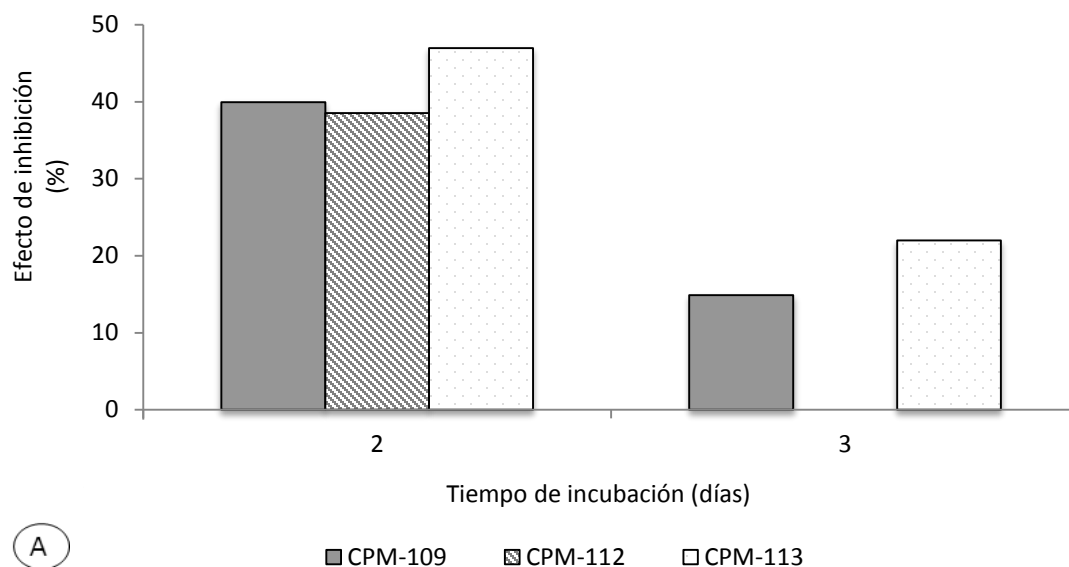


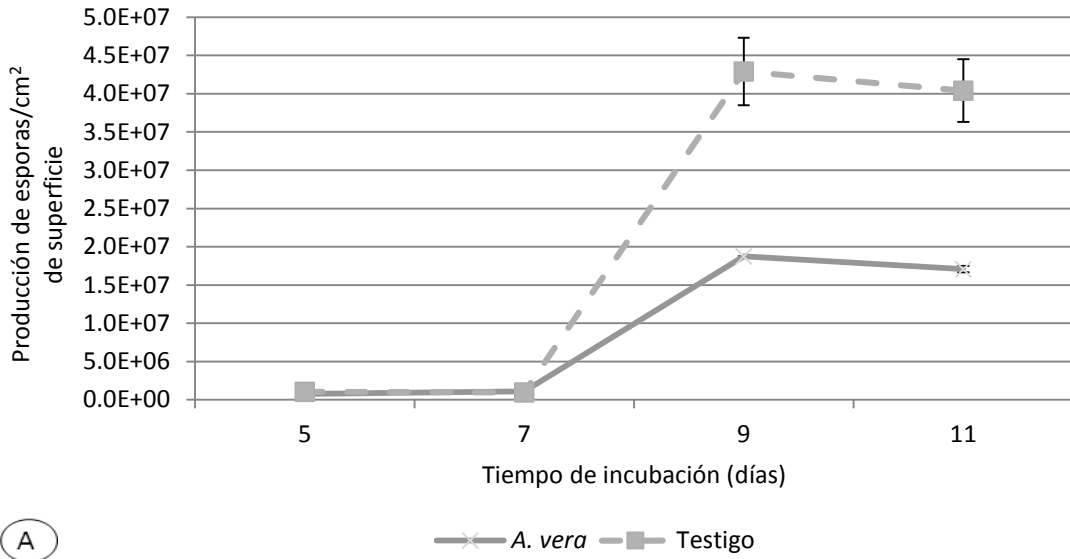
Fig. 68. Efecto de inhibición y estimulación en la germinación de esporas de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, A: Efecto de inhibición de germinación con respecto al testigo y B: Efecto de estimulación de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112.

8.4.5 Conteo de esporas a partir de la prueba de germinación de esporas para tres cepas de *Trichoderma*

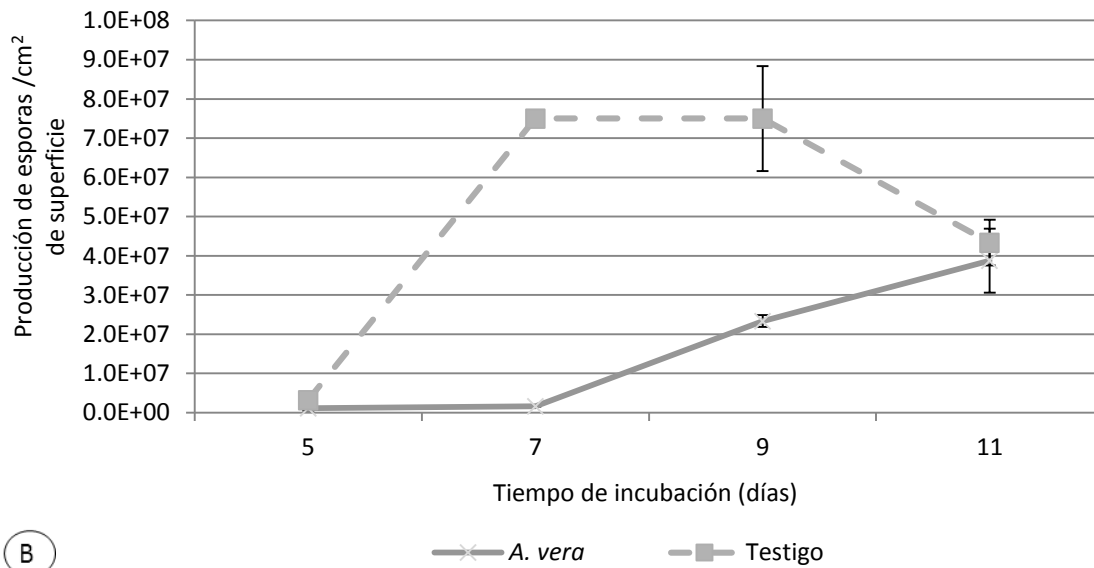
Con la finalidad de evaluar el daño en las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* al haber estado cultivadas en medio con extracto de sábila desde su germinación, se evaluó un conteo de esporas con cámara de Neubauer posterior a la germinación y esporulación sobre el medio de cultivo con 4 mg/ml de extracto de sábila (*Aloe vera*).

Para las cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, se pudo observar una menor producción de esporas en las colonias cultivadas en medio con extracto para los días 9 y 11, en comparación a la producción de esporas producidas por el testigo sin extracto (Fig. 69A). En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 (Fig. 69B), la menor producción de esporas en el tratamiento con extracto fue mas evidente desde la medición del día 7, alcanzando al testigo el día 11. Esto puede deberse a que los compuestos de sábila (*Aloe vera*) dañan la fisiología reproductiva del *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, desde los inicios de la germinación de esporas inhibiendo un porcentaje de éstas y a su vez, su posterior descendencia tiene una producción menor en cuanto a la cantidad de propágulos producidos por la colonia (Figs. 69 y 70).

La cepa con una mayor proporción de inhibición en la producción de esporas fue la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 con una inhibición del 97.8% al día siete, seguida por la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con una inhibición del 93% al día cinco. En el caso de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, se observó una ligera estimulación de esporulación para el día 7 (Fig. 72), sin embargo, en las siguientes mediciones se observó una inhibición en la producción de esporas del 56% al día 9 y del 57.7% al día 11 (Fig. 71). Este efecto inhibitorio en la esporulación de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* por un extracto de sábila (*Aloe vera*) no ha sido reportado por otros autores, sin embargo, es probable que este efecto sea resultado de una acción sinérgica de diversos compuestos presentes en el extracto crudo de sábila (*Aloe vera*).

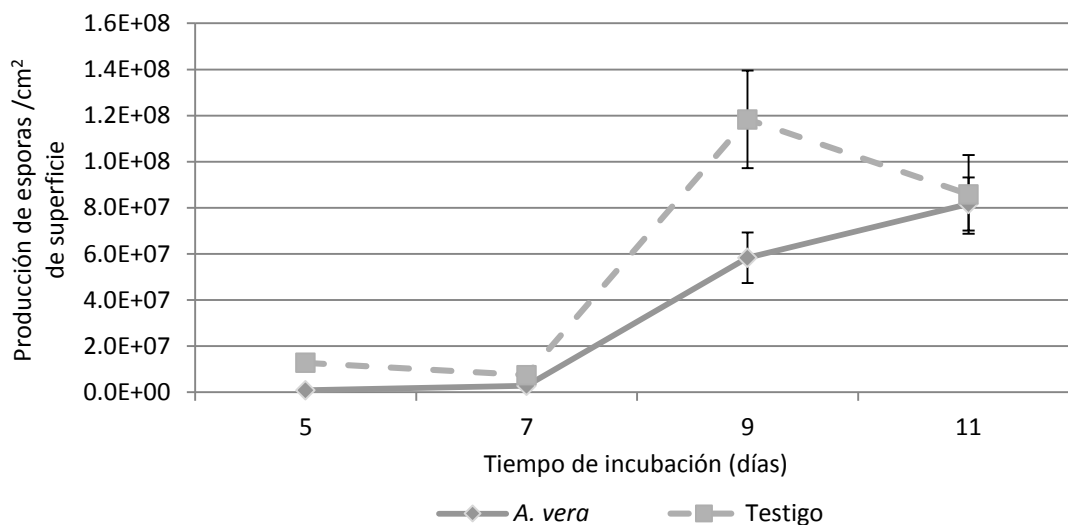


Tiempo de incubación				
	5	7	9	11
<i>Aloe vera</i>	7.5E+05± 3.8E+05 ^a	1.1E+06± 8.3E+04 ^a	1.9E+07±4.2E+05 ^a	1.7E+07±4.2E+05 ^a
Testigo	1.0E+06± 3.6E+05 ^a	9.6E+05± 2.3E+05 ^a	4.3E+07±4.4E+06 ^b	4.0E+07±4.1E+06 ^b



Tiempo de incubación				
Días	5	7	9	11
<i>Aloe vera</i>	1.1E+06±5.1E+05 ^a	1.6E+06±7.2E+04 ^a	2.3E+07±1.5E+06 ^a	3.9E+07±8.2E+06 ^a
Testigo	3.2E+06±1.4E+06 ^a	7.5E+07±2.5E+05 ^b	7.5E+07±1.3E+07 ^b	4.3E+07±5.8E+06 ^a

Fig. 69. Producción de esporas de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, A: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y B: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.



Tiempo de incubación				
Días	5	7	9	11
<i>Aloe vera</i>	8.8E+05±2.6E+05 ^a	2.8E+06±1.9E+05 ^a	5.8E+07±1.1E+07 ^a	8.2E+07±1.2E+07 ^a
Testigo	1.3E+07±3.0E+06 ^b	7.5E+06±9.0E+05 ^a	1.2E+08±2.1E+07 ^b	8.6E+07±1.7E+07 ^a

Fig. 70. Producción de esporas de la cepa de *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-113 con extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

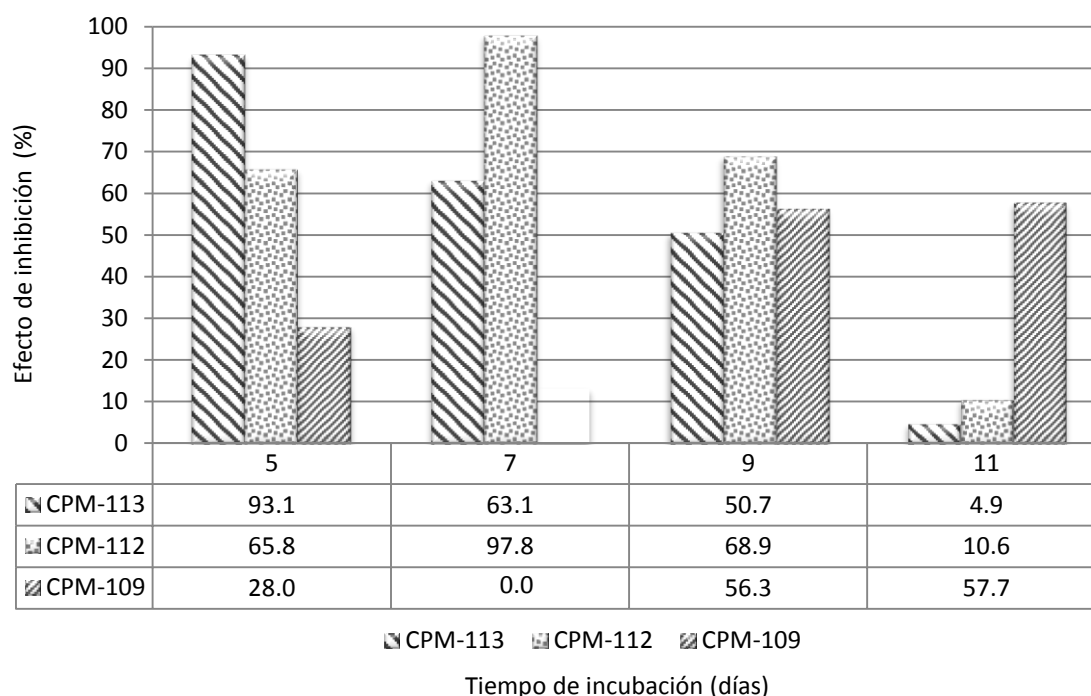


Fig. 71. Efecto de inhibición en el conteo de esporas (%) de *Trichoderma* por el extracto de sábila (*Aloe vera*) con 4 mg/ml en medio de cultivo PDA, para *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-109, *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressiveum* f. *europaeum* CPM-113.

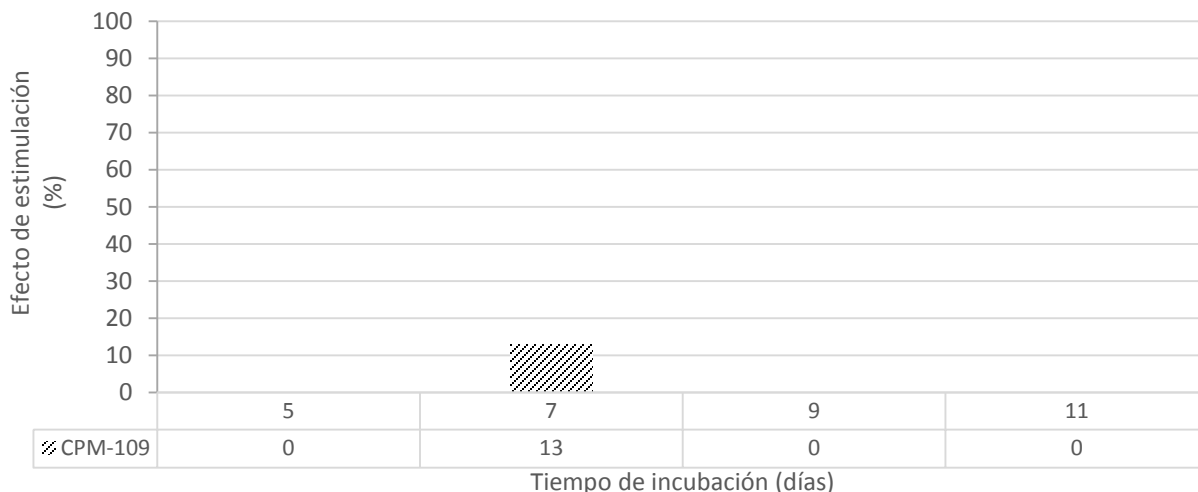


Fig. 72. Efecto de estimulación de producción de esporas (%) para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, en medio de cultivo PDA.

8.4.6 Conclusiones

1. El extracto no tuvo un efecto negativo en el desarrollo micelial de los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* a lo largo del experimento *in vitro*.
2. Se confirmaron las propiedades antifúngicas del extracto de sábila (*Aloe vera*) en presencia de diferentes mohos del género *Trichoderma* en pruebas *in vitro*. Para las cepas de *T. aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 fue del 84% y 77% para *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 en el primer día. La cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109, tuvo una inhibición en la velocidad de crecimiento el primer día del 80%.
3. El extracto de sábila (*Aloe vera*) inhibió la velocidad de crecimiento micelial y la cantidad de esporas en las tres cepas evaluadas del género *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*.
4. Se recomiendan hacer más pruebas con diferentes metodologías de extracción con la finalidad de obtener un mayor rendimiento del extracto.

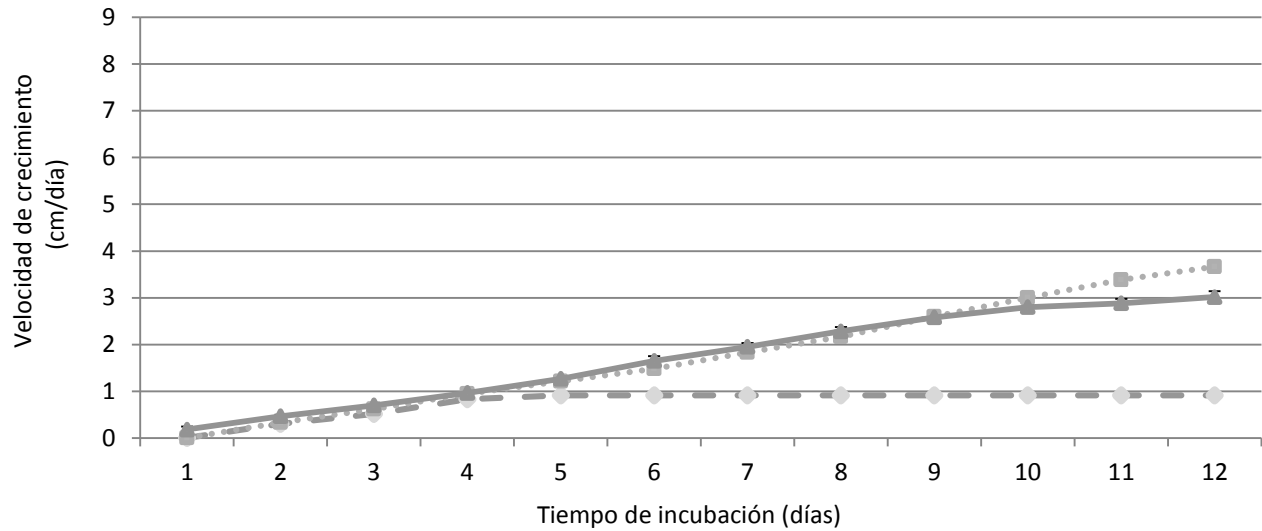
8.5. Efecto de una mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) y cebolla morada (*Allium cepa*) sobre el cultivo dual *in vitro* de *Trichoderma* vs hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*) con una dosis de 1.2% de extracto (Experimento 5)

8.5.1. Cultivo dual *Lentinula edodes* vs *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*

Con base en los resultados previos a la exposición de los extractos individuales de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*), sobre sus efectos en la velocidad de crecimiento micelial de las cepas de hongos comestibles y cepas de *Trichoderma*, así como sobre la esporulación de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, se decidió realizar una mezcla de los extractos en una dosis de 6 mg/ml de cada extracto, para obtener una concentración de extracto al 1.2%.

Una vez definida la dosis a evaluar, se decidió confrontar a las cepas comestibles de *Pleurotus ostreatus*, con la cepa que había mostrado ser las más agresiva de *Trichoderma*, la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113.

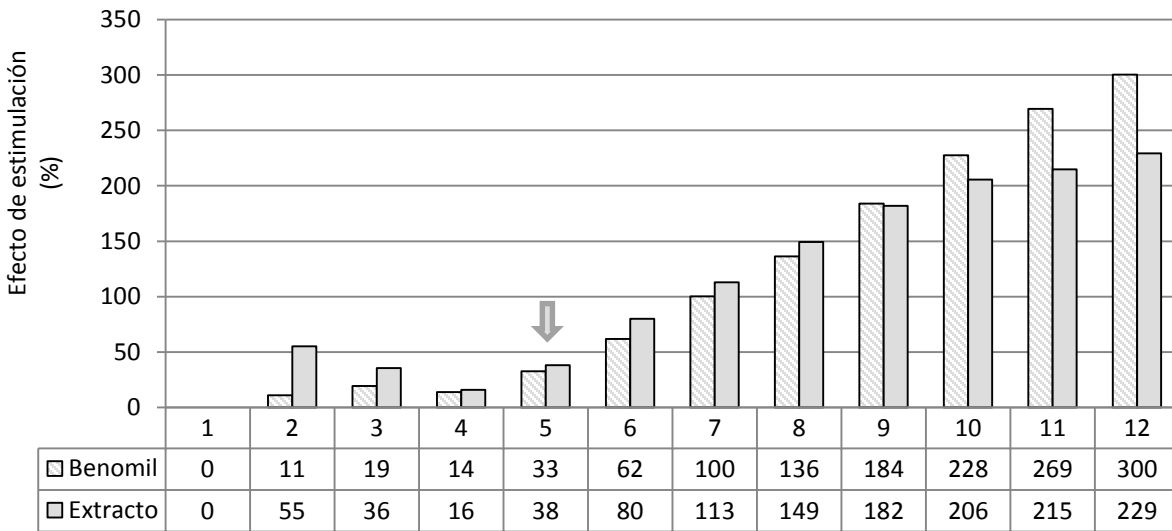
En la figura 73A, se observa la velocidad de crecimiento micelial de la cepa comestible *Lentinula edodes* en cultivo dual con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, el desarrollo micelial del tratamiento testigo de *Lentinula edodes* detuvo su velocidad de crecimiento al día 4, justo al momento de contacto con la colonia de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. En el caso de los tratamientos con benomil y extracto, no se observaron diferencias significativas en el desarrollo micelial de *Lentinula edodes* hasta el noveno día. A partir del día diez, el tratamiento con extracto disminuyó su desarrollo, ya que fue hasta ese día cuando tuvo contacto con la colonia de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Cabe mencionar que la cepa comestible expuesta al medio con extracto pudo seguir desarrollándose por cinco días más a diferencia del testigo (Fig. 73), así como también su textura y densidad del micelio fueron notablemente más densos que el mostrado en el testigo sin extracto cultivado previamente. La cepa de *Lentinula edodes* no tuvo ningún problema de adaptación a las dosis de benomil y tampoco a la dosis del extracto. La presencia de estos compuestos en el medio de cultivo provocaron una estimulación en el desarrollo micelial de *Lentinula edodes* (Fig. 73A). Este efecto se observó principalmente en el medio con extracto, en el segundo y tercer día donde *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* aún no toca la colonia de *Lentinula edodes*, se observó un porcentaje de estimulación de 55% y 36%, respectivamente. La máxima proporción de estimulación para *Lentinula edodes* en presencia del extracto fue del 229% al día doce, así como también para el tratamiento de benomil con un porcentaje del 300% (Fig. 73B y 74B).



A

—●— Testigo ···■··· Benomil —▲— Extracto

Tiempo de incubación												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	0.0± 0.0 ^a	0.3± 0.0 ^a	0.5± 0.0 ^a	0.8± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a	0.9± 0.0 ^a
Benomil	0.0± 0.0 ^a	0.3 ±0.0 ^a	0.6± 0.0 ^a	1.0± 0.1 ^a	1.2± 0.1 ^a	1.5± 0.1 ^a	1.8± 0.1 ^a	2.2± 0.1 ^a	2.6± 0.1 ^a	3.0± 0.1 ^b	3.4± 0.1 ^b	3.7± 0.1 ^b
Extracto	0.2± 0.1 ^b	0.5± 0.0 ^a	0.7± 0.1 ^a	1.0± 0.1 ^a	1.3± 0.1 ^b	1.7± 0.1 ^b	2.0± 0.1 ^b	2.3± 0.1 ^b	2.6± 0.1 ^b	2.8± 0.1 ^c	2.9± 0.1 ^c	3.0± 0.1 ^c

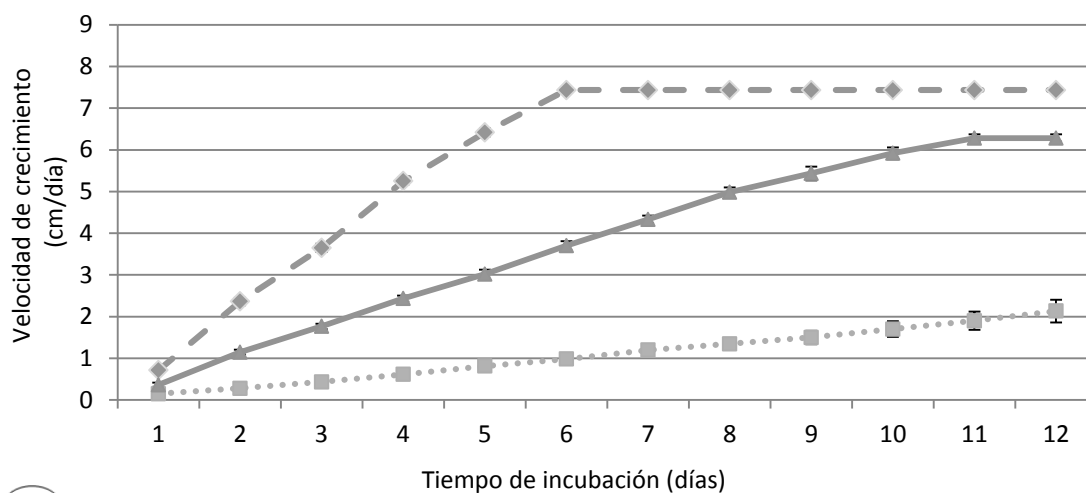


B

Tiempo de incubación (días)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Benomil	0	11	19	14	33	62	100	136	184	228	269	300
Extracto	0	55	36	16	38	80	113	149	182	206	215	229

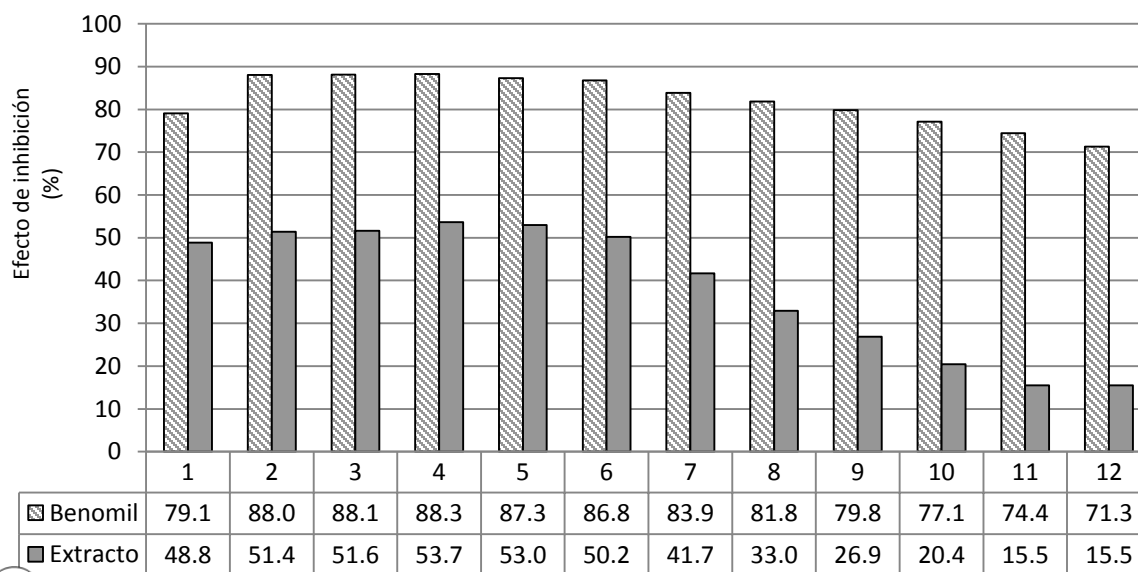
Fig. 73. Velocidad de crecimiento micelial promedio en cultivo dual de la cepa de *Lentinula edodes* en presencia de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 cultivada en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%). El fungicida benomil se utilizó de referencia a 1.47 mg/L. A: Velocidad de crecimiento de *Lentinula edodes* CP-7 en cultivo dual y B: Efecto promedio de estimulación de la velocidad de crecimiento (%) de *Lentinula edodes* CP-7 en presencia del extracto y benomil. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10. La flecha indica cuando el testigo detuvo su crecimiento (⇒).



(A)

—◆— Testigo ···■··· Benomil —▲— Extracto

		Tiempo de incubación											
Días		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo		0.7± 0.0 ^a	2.4± 0.1 ^a	3.7± 0.1 ^a	5.3± 0.1 ^a	6.4± 0.1 ^a	7.4± 0.1 ^a	7.4± 0.1 ^a	7.4± 0.1 ^a	7.4± 0.1 ^a	7.4± 0.1 ^a	7.4± 0.1 ^a	7.4± 0.1 ^a
Benomil		0.2± 0.0 ^b	0.3± 0.0 ^b	0.4± 0.0 ^b	0.6± 0.0 ^b	0.8± 0.0 ^b	1.0± 0.0 ^b	1.2± 0.1 ^b	1.4± 0.1 ^b	1.5± 0.2 ^b	1.7± 0.2 ^b	1.9± 0.2 ^b	2.1± 0.3 ^b
Extracto		0.4± 0.0 ^b	1.2± 0.1 ^c	1.8± 0.1 ^c	2.4± 0.1 ^c	3.0± 0.1 ^c	3.7± 0.1 ^c	4.3± 0.1 ^c	5.0± 0.1 ^c	5.4± 0.2 ^c	5.9± 0.1 ^c	6.3± 0.1 ^c	6.3± 0.1 ^c



(B)

Tiempo de incubación (días)

■ Benomil	79.1	88.0	88.1	88.3	87.3	86.8	83.9	81.8	79.8	77.1	74.4	71.3
■ Extracto	48.8	51.4	51.6	53.7	53.0	50.2	41.7	33.0	26.9	20.4	15.5	15.5

Fig. 74. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en cultivo dual con *Lentinula edodes* CP-7 con extracto de cebolla (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%) en medio de cultivo EMA. El fungicida benomil se utilizó de referencia a una concentración de 1.47 mg/L. A: Velocidad de crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y B: Proporción de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en presencia del extracto y benomil. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

Estos valores elevados de estimulación obtenidos con base en el testigo, se deben a que el tratamiento testigo detuvo la velocidad de crecimiento a partir del cuarto día, cuando *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* llegó al borde de la colonia (Fig. 73A). Esta estimulación de la velocidad de crecimiento puede deberse a la presencia de diversos azúcares y compuestos orgánicos importantes presentes en el gel del *Aloe*, como son glucosa, mannososa, arabinosa, galactosa y xilosa. Así como también en estudios previos se tienen registrados la presencia de aldopentosas y de 18 a 20 aminoácidos, entre ellos se encuentran arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina e histidina. También se tiene registrada la presencia de proteínas, compuestos orgánicos e inorgánicos, vitaminas hidro y lipo solubles, minerales, enzimas, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos (Hamman, 2008; Grindlay y Reynolds, 1986).

En cuanto a la velocidad de crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en el tratamiento con extracto, se mantuvo significativamente por debajo del testigo a lo largo de todo el experimento (Fig. 73A). El testigo cubrió la caja al día seis, con una inhibición de la velocidad de crecimiento del 50% para el tratamiento con extracto y del 86% para el control con benomil. El máximo porcentaje de inhibición de velocidad de crecimiento registrado por el extracto se observó al día cuatro con un 53.7% con respecto al testigo (Fig 64B). Esta inhibición se ha observado en investigaciones previas con extracto de sábila (*Aloe vera*) en otros hongos filamentosos. Rosca-Casian *et al.* (2007), mencionaron una inhibición del 100% de los hongos fitopatógenos *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, *Heterosporum pruneti* y *Penicillium gladioli* expuestos a una dosis de 100 µl/ml. Este efecto inhibitorio se atribuye a la presencia del compuesto aloine presente en un extracto etanólico (Rosca-Casian *et al.*, 2007), como el realizado en la presente investigación.

En una investigación previa para contrarrestar el crecimiento de *V. fungicola* en compost de *Agaricus bisporus*, se observó una mejor inhibición de contaminación en pruebas con extractos individuales, en comparación con la mezcla de diversos extractos (Baars *et al.*, 2008). En este caso, la mezcla de los extractos mostró una inhibición en la velocidad de crecimiento micelial menor a la observada con sábila (*Aloe vera*) por separado, solo por las primeras 24 h, sin embargo, la inhibición de *Trichoderma* con la mezcla de extractos, se mantuvo alrededor del 50% por mas días que en el extracto de manera individual.

8.5.2. Cultivo dual *Pleurotus ostreatus* vs *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*

En la confrontación de la cepa de *Pleurotus ostreatus*, se pudo observar que la presencia del extracto en el desarrollo de la cepa, provocó una estimulación de la velocidad de crecimiento evidente desde el primer día de desarrollo en comparación con el testigo y el tratamiento con benomil (Fig. 75), este efecto se mantuvo a lo largo del experimento, hasta el día 12. Esta estimulación fue del 100% y 93.7% en los primeros dos días en comparación con el benomil que tuvo una estimulación del 31% y 12.9% al segundo y tercer día (Fig. 75B). El efecto de estimulación del tratamiento con extracto disminuyó hasta el día seis donde aumentó nuevamente con un valor máximo de estimulación del 143.6% al día nueve. En este caso la velocidad de crecimiento micelial con el tratamiento con extracto se mantuvo por arriba del testigo y del benomil hasta el día once del experimento (Fig. 76). Cabe mencionar que a partir del día 6, el testigo detuvo su crecimiento debido a la presencia de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en ese momento ambas cepas hicieron contacto en el medio de cultivo.

Esta estimulación en el desarrollo de *Pleurotus ostreatus* puede deberse a que la sábila (*Aloe vera*) contiene diversos polisacáridos como galactosa y polímeros de ácido galacturónico. Entre estos compuestos se encuentran el glucomannan, glucomannan acetilado, galactogalacturan y glucogalactomannan. La mayoría de estos polisacáridos contienen poco nitrógeno, sin embargo, también está registrada la presencia de polipéptidos y glicoproteínas como la lectina; así como también la glicoproteína Pg21-2b, que promueve la proliferación celular; (Reynolds y Dweck, 1999), así como también vitaminas hidro y lipo solubles, minerales, compuestos orgánicos e inorgánicos (Hamman, 2008). A su vez, el extracto de sábila (*Aloe vera*), tiene efectos negativos en el desarrollo de mohos del tipo de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, como ya se ha mencionado anteriormente.

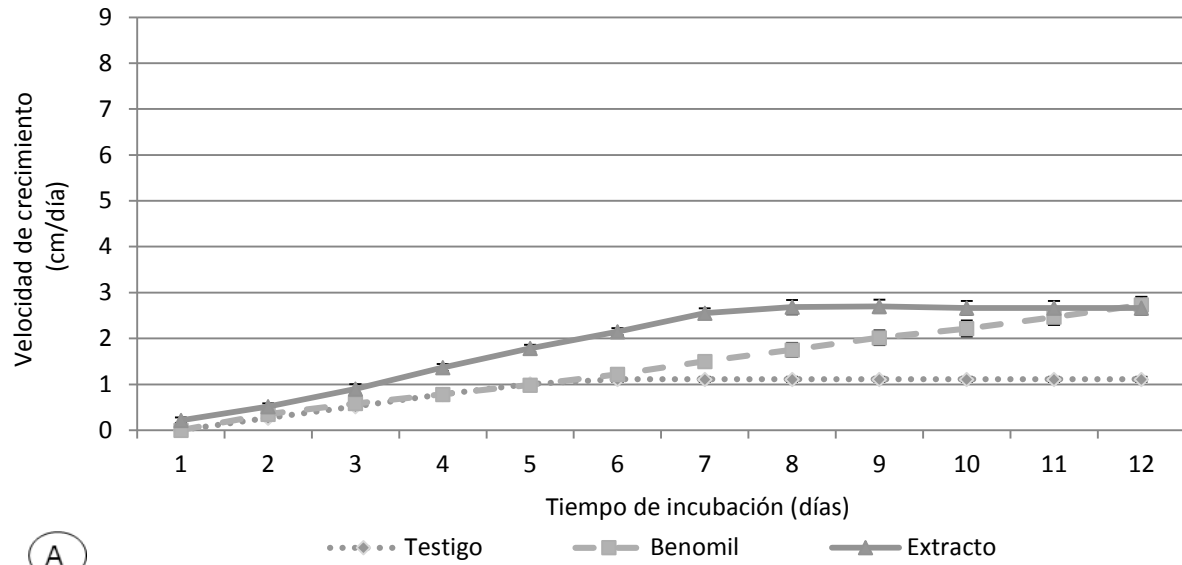
En el caso de la velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento con benomil, no se observó un crecimiento significativamente diferente con respecto al testigo los primeros cinco días del experimento (Fig. 75A) por lo que no se hubo un porcentaje de estimulación significativo en ese lapso. El porcentaje de estimulación en el tratamiento con benomil aumentó paulatinamente a partir del día seis hasta llegar a un valor máximo de 146 % al día doce, con respecto al testigo.

En cuanto a la inhibición de la velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Fig. 76A), se observó una clara diferencia de la velocidad de

crecimiento micelial según el tratamiento; en este caso, el testigo llegó a su máximo crecimiento el día seis, cubriendo la caja petri por completo. Para ese día, los tratamientos con extracto y benomil tuvieron un porcentaje de inhibición del 48.4% y 85.7% respectivamente (Fig 76B). El tratamiento con extracto mostró un porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial del 51% desde el primer día, manteniendo un rango de inhibición en la velocidad de crecimiento entre 49% y 52% hasta el día cinco, con un porcentaje máximo del 55.5% al día cuatro del experimento. Este porcentaje de inhibición es ligeramente mayor a los reportados por otros autores que utilizaron un 0.2% del compuesto puro aloin de sábila (*Aloe vera*) para inhibir a *C. gloesporoides*, donde al quinto día de incubación obtuvieron una inhibición micelial máxima del 53.1% (Nidiry, 2011). El efecto inhibitorio de sábila (*Aloe vera*) ya se ha registrado por otros autores para diversos tipos de hongos fitopatógenos por sus antecedentes de propiedades antibacterianas y antifúngicas (Reynolds y Dweck, 1999), no así para los hongos del género *Trichoderma aggressivum f. europaeum* identificados como competidores de los hongos comestibles.

En otra investigación con extracto de sábila (*Aloe vera*), se tiene registrada una inhibición en la velocidad de crecimiento micelial del 99% para *P. digitatum* y del 87% para *B. cinerea* en una dosis de extracto de sábila (*Aloe vera*) al 10%. Se observó que el efecto inhibitorio de la sábila (*Aloe vera*) depende de la especie de hongo, así como también las condiciones agronómicas y ambientales del desarrollo de la sábila (*Aloe vera*) y el procedimiento de la obtención del gel, los cuales son factores determinantes en la eficacia antifúngica. Entre las moléculas responsables de este efecto inhibitorio se encuentran la aloe-emodin y aloin (Castillo *et al.*, 2010).

Para el tratamiento control con benomil, se utilizó una dosis estandarizada previamente de 1.47 mg/L en el medio de cultivo, donde se observó que el porcentaje máximo de inhibición fue de 88.7% al día cuatro, el cual disminuyó paulatinamente al igual que el tratamiento con extracto (Fig. 76B). Se sabe que la concentración mínima inhibitoria de la dosis de benomil para el mohó *Trichoderma aggressivum f. europaeum* es $>2 \mu\text{g/ml}$ (Kredics *et al.*, 2010).



		Tiempo de incubación											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	0.0± 0.0 ^a	0.3± 0.0 ^a	0.5± 0.0 ^a	0.8± 0.1 ^a	1.0± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a	1.1± 0.1 ^a
Benomil	0.0± 0.0 ^a	0.4± 0.1 ^a	0.6± 0.1 ^a	0.8± 0.1 ^a	1.0± 0.1 ^a	1.2± 0.1 ^a	1.5± 0.1 ^b	1.8± 0.2 ^a	2.0± 0.2 ^b	2.2± 0.2 ^b	2.5± 0.2 ^b	2.7± 0.2 ^b	2.7± 0.2 ^b
Extracto	0.2± 0.1 ^a	0.5± 0.1 ^b	0.9± 0.1 ^b	1.4± 0.1 ^b	1.8± 0.1 ^b	2.2± 0.1 ^b	2.6± 0.1 ^c	2.7± 0.2 ^c	2.7± 0.1 ^c	2.7± 0.1 ^c	2.7± 0.1 ^c	2.7± 0.1 ^c	2.7± 0.1 ^c

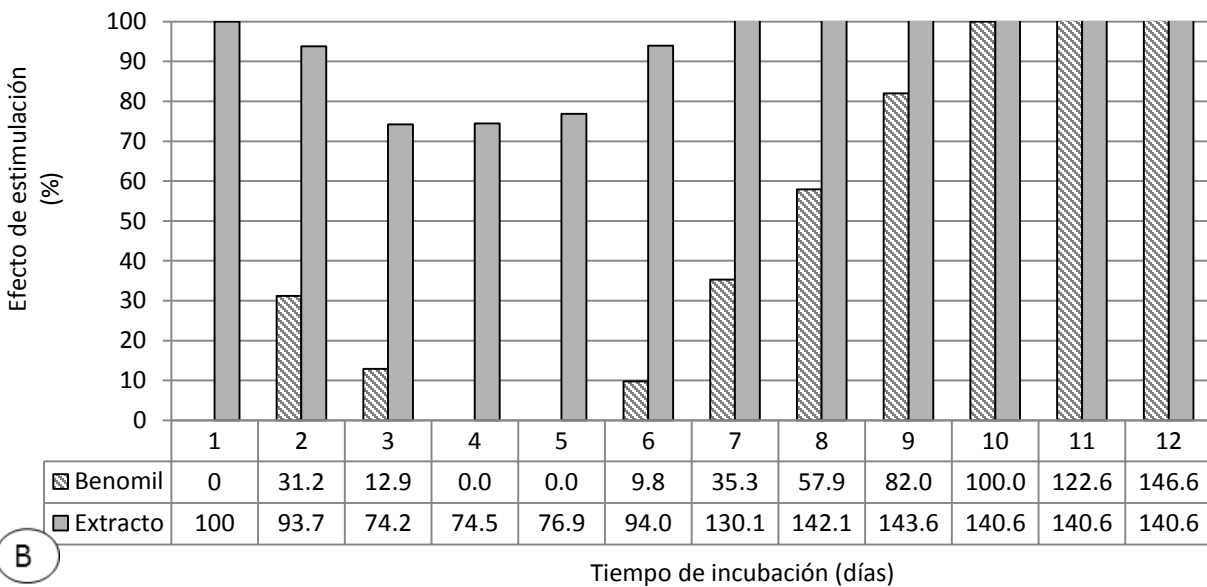
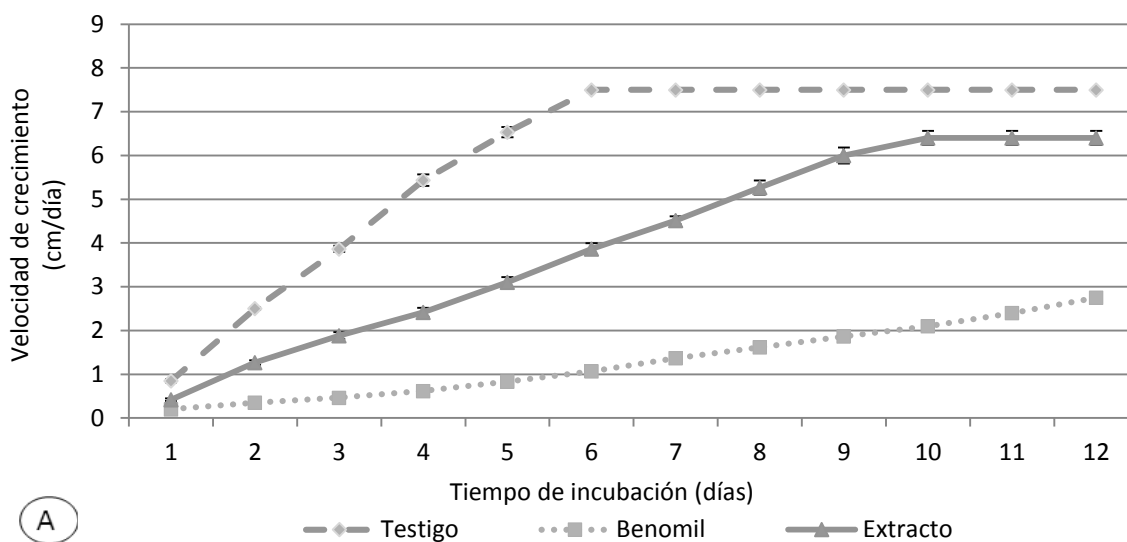


Fig. 75. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de *Pleurotus ostreatus* CP-50 en cultivo dual con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%). El fungicida benomil se utilizó de referencia a una concentración de 1.47 mg/L. A: Velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* CP-50 y B: Efecto de estimulación sobre la velocidad de crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* CP-50 en presencia del extracto y benomil. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.



Tiempo de incubación												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	0.9±0.0 ^a	2.5±0.0 ^a	3.9±0.1 ^a	5.4±0.1 ^a	6.5±0.1 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a
Benomil	0.2±0.0 ^b	0.4±0.0 ^b	0.5±0.0 ^b	0.6±0.0 ^b	0.8±0.0 ^b	1.1±0.0 ^b	1.4±0.0 ^b	1.6±0.0 ^b	1.9±0.0 ^b	2.1±0.1 ^b	2.4±0.6 ^b	2.8±0.7 ^b
Extracto	0.4±0.0 ^b	1.3±0.0 ^c	1.9±0.1 ^c	2.4±0.1 ^c	3.1±0.1 ^c	3.9±0.1 ^c	4.5±0.1 ^c	5.3±0.2 ^c	6.0±0.2 ^c	6.4±0.2 ^c	6.4±0.2 ^c	6.4±0.2 ^c

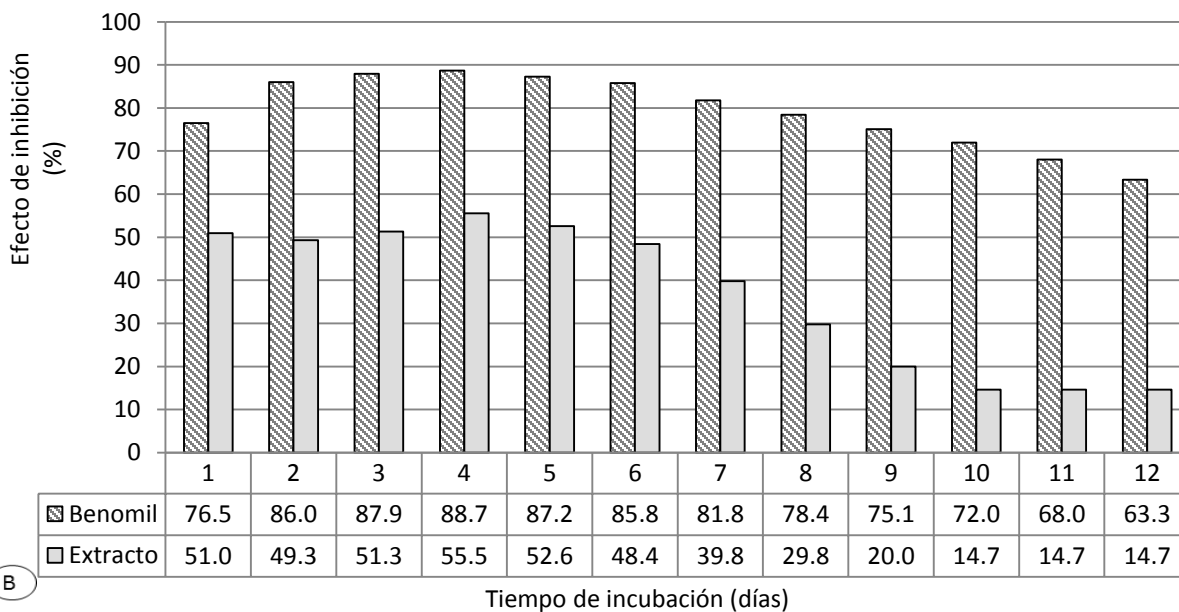


Fig. 76. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y efecto de inhibición en la velocidad de crecimiento (%) en cultivo dual con *Pleurotus ostreatus* CP-50 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%). Se utilizó el fungicida benomil de referencia a una concentración de 1.47 mg/L. A: Velocidad de crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y B: Efecto de inhibición sobre la velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en presencia del extracto y benomil. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

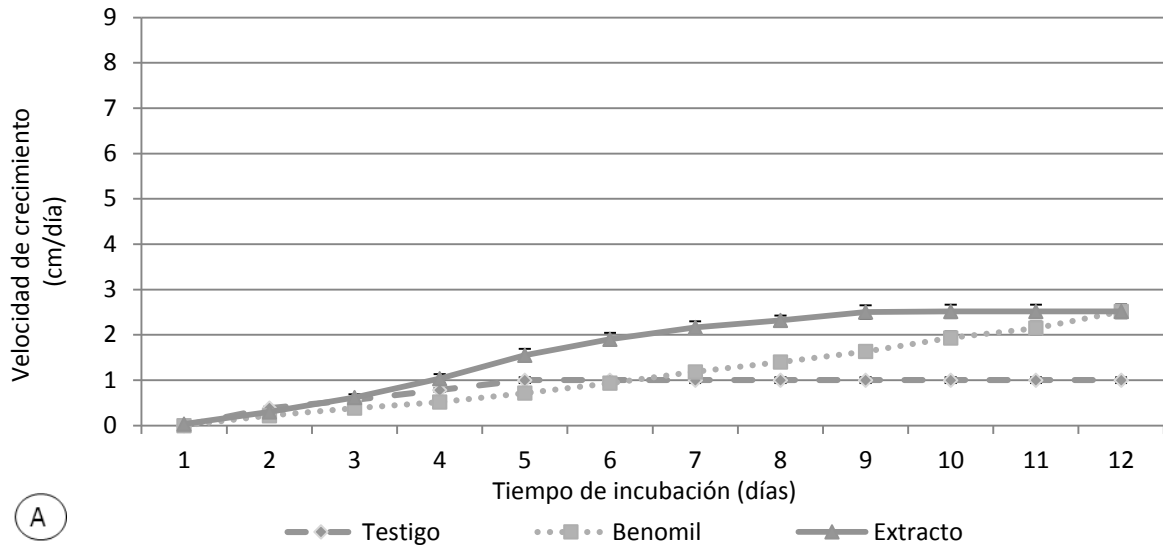
8.5.3 Cultivo dual *Pleurotus pulmonarius* vs *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*

En cuanto a la confrontación de la cepa *Pleurotus pulmonarius* CP-267 con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en el medio de cultivo con los tratamientos evaluados, se observó que en la velocidad de crecimiento micelial de *Pleurotus pulmonarius*, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos testigo, benomil y extracto durante los primeros dos días (Fig. 77A).

La velocidad de crecimiento micelial del testigo de *Pleurotus pulmonarius* se detuvo al día cinco debido al contacto con la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* el cual detuvo su crecimiento hasta el final del experimento (Fig. 77A). La presencia del extracto también tuvo un efecto negativo al segundo día de crecimiento en *Pleurotus pulmonarius* ya que se observó una inhibición del 21% (Fig. 78). Sin embargo, el hongo se adaptó rápidamente al extracto ya que aumentó paulatinamente a partir del tercer día hasta obtener un máximo del 150% al día nueve, el cual se mantuvo a lo largo del experimento (Fig. 77B). Cabe mencionar que el testigo dejó de crecer al cuarto día por lo que la proporción de estimulación en la velocidad de crecimiento rebasó el 100% al séptimo día y continuó aumentando hasta el día 9 en el tratamiento con extracto. La estimulación en la velocidad de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* puede deberse a la presencia de compuestos antioxidantes, flavonoides y compuestos fenólicos, los cuales están presentes en bulbos de cebolla roja. Estos compuestos tienen un potencial de actividad antimutagénica y antioxidante. Se sabe que los extractos de cebolla son útiles antioxidantes nutricionales y su uso nulifica en estrés oxidativo (Shon *et al.*, 2004).

En el caso del tratamiento con benomil, a partir del día dos, se observó un efecto inhibitorio del 43.5% en la velocidad de crecimiento micelial de *Pleurotus pulmonarius* (Fig. 77), lo cual disminuyó paulatinamente hasta el día siete, donde comenzó a observarse un efecto de estimulación en el crecimiento, el cual aumentó paulatinamente hasta el día doce (Fig. 77B).

En cuanto a la velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Fig. 79A), las diferencias en crecimiento por los tratamientos evaluados fue evidente (Fig. 80). En el caso del tratamiento testigo, cubrió la caja al día seis, mientras que el tratamiento con extracto tuvo un porcentaje de inhibición del 49% para ese mismo día, éste tratamiento tuvo una inhibición máxima del 51% al cuarto día.



Tiempo de incubación												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	0.0±0.0 ^a	0.4±0.0 ^a	0.6±0.0 ^a	0.8±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a
Benomil	0.0±0.0 ^a	0.2±0.0 ^a	0.4±0.0 ^b	0.5±0.0 ^b	0.7±0.0 ^b	0.9±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	1.4±0.1 ^b	1.6±0.1 ^b	1.9±0.1 ^b	2.2±0.1 ^b	2.5±0.1 ^a
Extracto	0.0±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	0.6±0.1 ^a	1.0±0.1 ^c	1.6±0.1 ^c	1.9±0.1 ^c	2.2±0.1 ^c	2.3±0.1 ^c	2.5±0.1 ^c	2.5±0.1 ^c	2.5±0.1 ^c	2.5±0.1 ^a

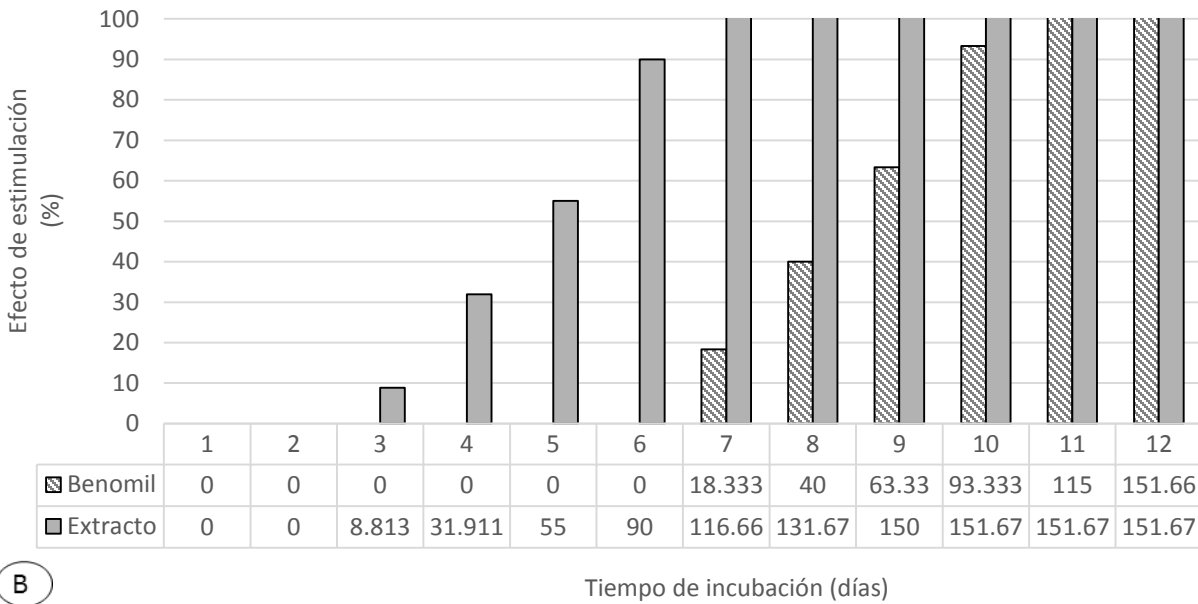


Fig. 77. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de *Pleurotus pulmonarius* CP-267 y proporción de estimulación en la velocidad de crecimiento en cultivo dual con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%). Se utilizó el fungicida benomil de referencia a una concentración de 1.47 mg/L. A: Velocidad de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* y B: Efecto de estimulación de la velocidad de crecimiento micelial (%) de *Pleurotus pulmonarius* en presencia del extracto y benomil. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

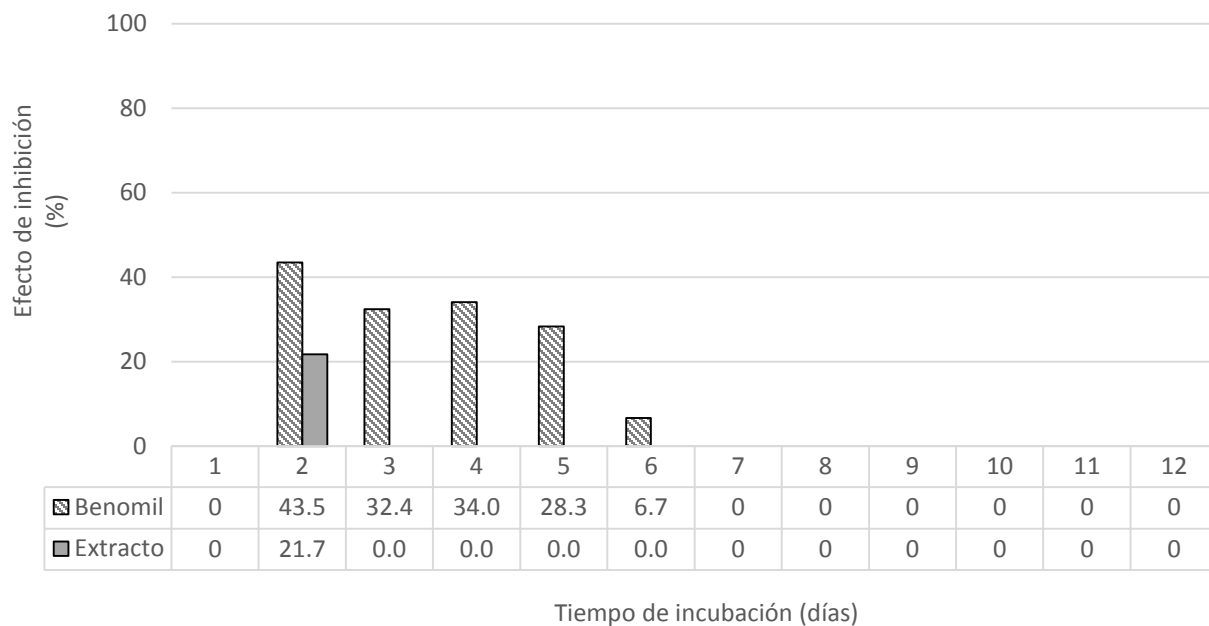
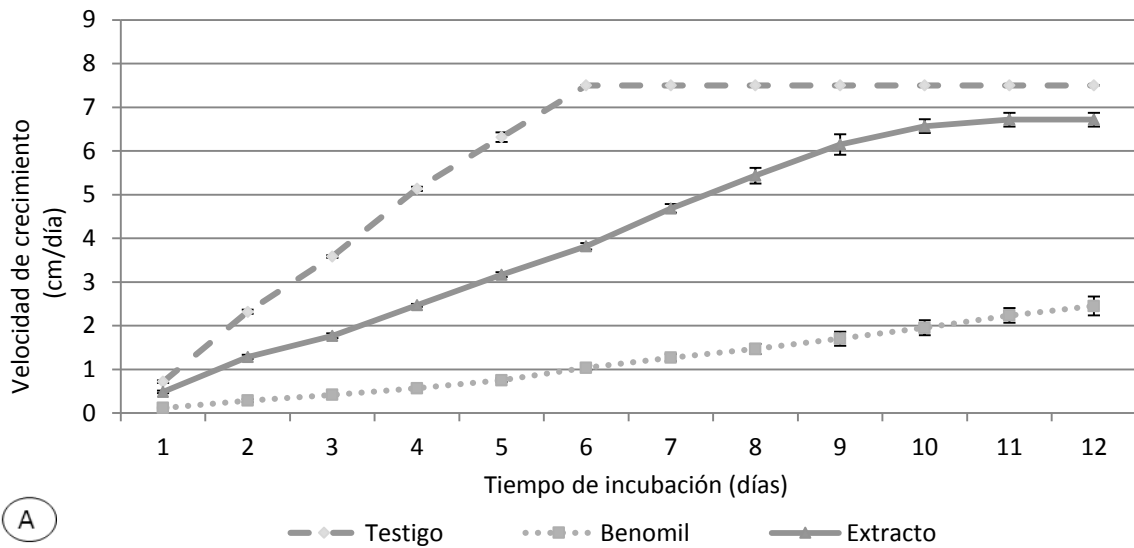


Fig. 78. Efecto de inhibición en la velocidad de crecimiento micelial (%) de la cepa de *Pleurotus pulmonarius* CP-267 con el extracto de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2 % y al fungicida benomil a una concentración de 1.47 mg/L en medio de cultivo EMA.

Esta inhibición de la velocidad de crecimiento podría deberse a la presencia de compuestos antifúngicos ya registrados en extractos de cebolla (*Allium cepa*), como son los compuestos sulfurados como metil propil disulfuro y dimetil trisulfuro (Martín-Lagos *et al.*, 1992; Shon *et al.*, 2004). La inhibición de la velocidad de crecimiento micelial también puede atribuirse a la presencia de saponinas en cebolla (*Allium cepa*), las cuales también tienen un efecto antifúngico ante algunos mohos. Entre estas saponinas se encuentran diversos tipos de ceposidos, los cuales evaluados por separado logran inhibiciones fúngicas alrededor del 30%, pero de manera conjunta logran una inhibición del 50% para hongos como *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum* en dosis de 200 ppm (Lanzotti *et al.*, 2012). Además de las saponinas, la actividad antimicrobiana del género *Allium* es reconocida por el contenido de alicina, otros tiosulfatos y su transformación en diversos productos, péptidos, flavonoides, fenoles alcaloides y saponinas; así como degradación de sulfóxidos con actividad antimicrobiana (Kyung, 2011).



Tiempo de incubación												
Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Testigo	0.7±0.0 ^a	2.3±0.0 ^a	3.6±0.0 ^a	5.1±0.0 ^a	6.3±0.1 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a	7.5±0.0 ^a
Benomil	0.1±0.0 ^a	0.3±0.0 ^b	0.4±0.0 ^b	0.6±0.0 ^b	0.8±0.0 ^b	1.0±0.0 ^a	1.3±0.1 ^a	1.5±0.1 ^b	1.7±0.2 ^b	2.0±0.2 ^b	2.2±0.2 ^b	2.5±0.2 ^b
Extracto	0.5±0.0 ^a	1.3±0.0 ^c	1.8±0.1 ^c	2.5±0.0 ^c	3.2±0.1 ^c	3.8±0.1 ^c	4.7±0.1 ^c	5.4±0.2 ^c	6.2±0.2 ^c	6.6±0.2 ^c	6.7±0.2 ^c	6.7±0.2 ^c

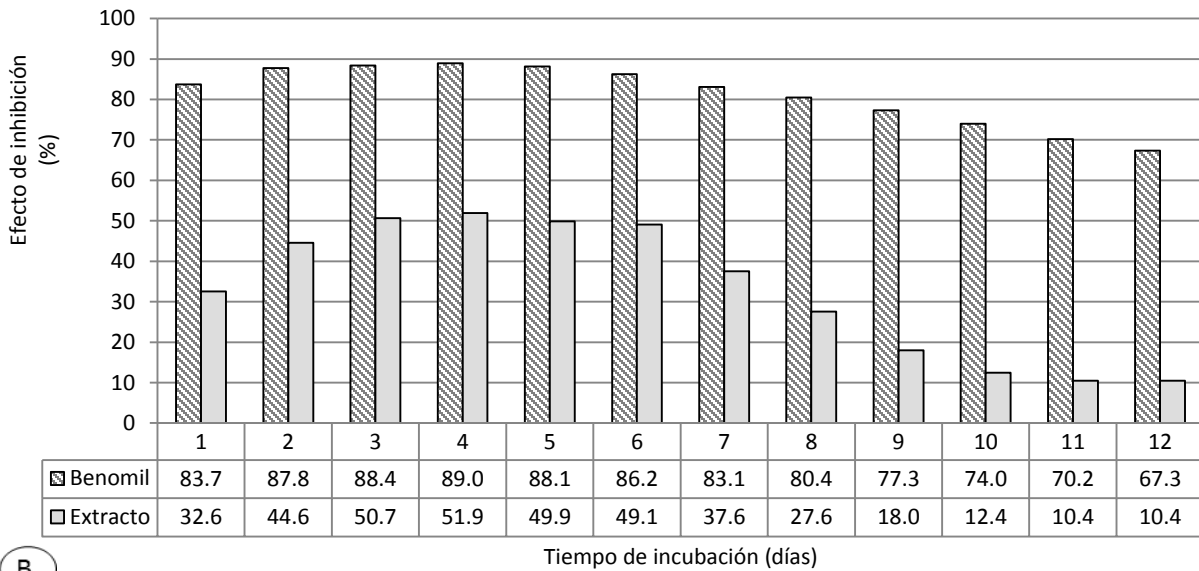


Fig. 79. Velocidad de crecimiento micelial promedio de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y efecto de inhibición en la velocidad de crecimiento (%) en cultivo dual con *Pleurotus pulmonarius* CP-267 en medio de cultivo EMA con extracto de cebolla (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%). Se utilizó el fungicida benomil de referencia a una concentración de 1.47 mg/L. A: Velocidad de crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y B: Efecto de inhibición de la velocidad de crecimiento micelial (%) de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en presencia del extracto y benomil. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

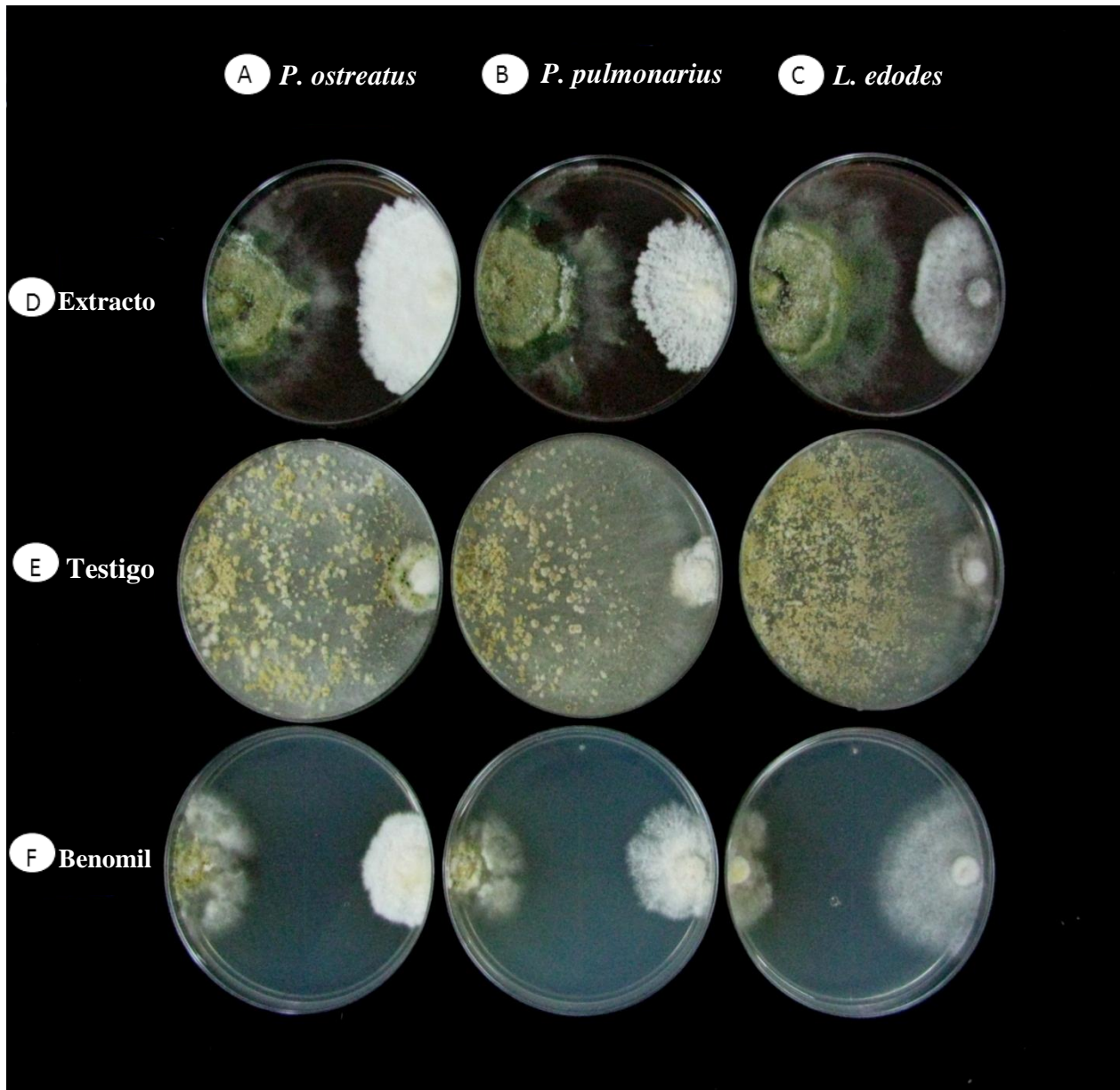


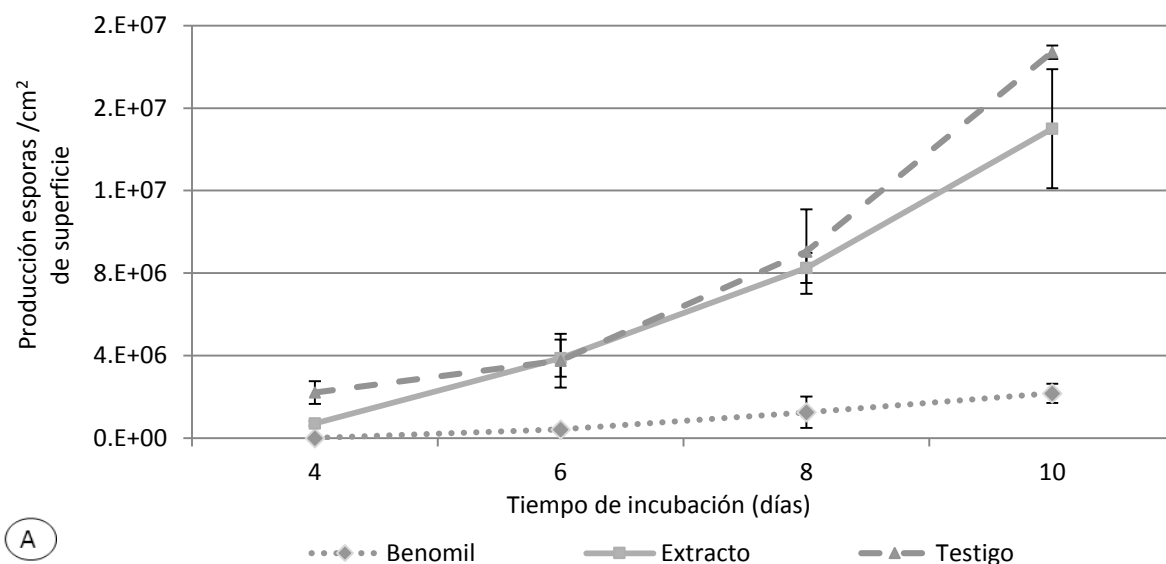
Fig. 80. Desarrollo de las colonias de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con hongos comestibles en cultivo dual *in vitro* en medio de cultivo EMA, con una mezcla de extractos de cebolla (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%) a los 10 días de crecimiento. Como referencia se utilizó el fungicida benomil, a una concentración de 1.47 mg/L en medio de cultivo. En forma vertical se observan las cepas comestibles evaluadas A: *Pleurotus ostreatus*, B: *Pleurotus pulmonarius* y C: *Lentinula edodes*. En forma horizontal se observan los diferentes tratamientos D: Extracto dual sábila-cebolla morada (*Aloe vera* - *Allium cepa*), E: Testigo sin extracto y F: fungicida benomil.

8.5.4. Efecto de la mezcla de extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) sobre la esporulación de *Trichoderma aggressivum f. europaeum*

A la par de la evaluación del crecimiento micelial, se realizó un conteo de esporas en la cepa de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* a partir del cuarto día de siembra.

En el tratamiento con extracto la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113 en cultivo dual con *Lentinula edodes* tuvo una proporción de inhibición en la producción de esporas del 67.9% al cuarto día (Fig. 81B), sin embargo a partir del día seis no se observó una diferencia significativa con el testigo (Fig. 81), debido a la variabilidad de los datos. Se sabe que *Aloe vera* tiene un efecto inhibitorio en la germinación de esporas y en el desarrollo micelial de los hongos fitopatógenos como *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata*, y *Botrytis cinerea* (Saks y Barkai-Golan, 1995). La sensibilidad de las cepas de hongos filamentosos ante los extractos de *Aloe vera* varía de acuerdo a géneros y especies de hongos. El procesamiento del material vegetal para la elaboración del extracto y su posterior esterilización también es un factor importante para obtener una inhibición fúngica significativa. En el presente estudio, la esterilización por filtración debió mantener presentes los compuestos activos, ya que se sabe que la actividad antifúngica del gel de *Aloe vera* es eliminada por el calentamiento debido a la presencia de compuestos lábiles al calor. Estos compuestos tienen un alto potencial osmótico los cuales pueden ser los responsables del efecto antifúngico (Saks y Barkai-Golan, 1995). Cuando un extracto se obtiene a una temperatura mayor a los 40°C, parte de estos compuestos activos se desnaturalizan, ocasionando un bajo efecto de inhibición. Se sabe la pasteurización del extracto de *Aloe vera* muestra valores bajos de inhibición en la velocidad de crecimiento micelial de algunos mohos, como es el caso de una inhibición del 13% para *F. oxysporum* y solo del 8% para *C. coccodes* con dosis de $10^5 \mu\text{l L}^{-1}$ (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005).

En el caso del tratamiento con benomil, se observó una inhibición total de la producción de esporas al día cuatro, manteniendo una inhibición mayor al 80% hasta el día diez (Fig. 81B). Este agroquímico con acción fungicida es de uso común para el control de diversos mohos, el cual a pesar de ser catalogado como ligeramente tóxico, mostró un efecto inhibitorio significativo en dosis muy baja, a pesar de haber sido sometido a un proceso de esterilización a 121 °C por 25 min en el medio de cultivo.



Tiempo de incubación				
	4	6	8	10
Benomil	0.00E+00 ± 0.00E+00 ^a	4.17E+05 ± 1.10E+05 ^a	1.25E+06 ± 7.64E+05 ^a	2.17E+06 ± 4.64E+05 ^a
Extracto	7.08E+05 ± 1.10E+05 ^b	3.88E+06 ± 9.01E+05 ^b	8.25E+06 ± 7.32E+05 ^b	1.50E+07 ± 2.88E+06 ^b
Testigo	2.21E+06 ± 5.51E+05 ^b	3.75E+06 ± 1.30E+06 ^b	9.04E+06 ± 2.05E+06 ^b	1.87E+07 ± 3.25E+05 ^b

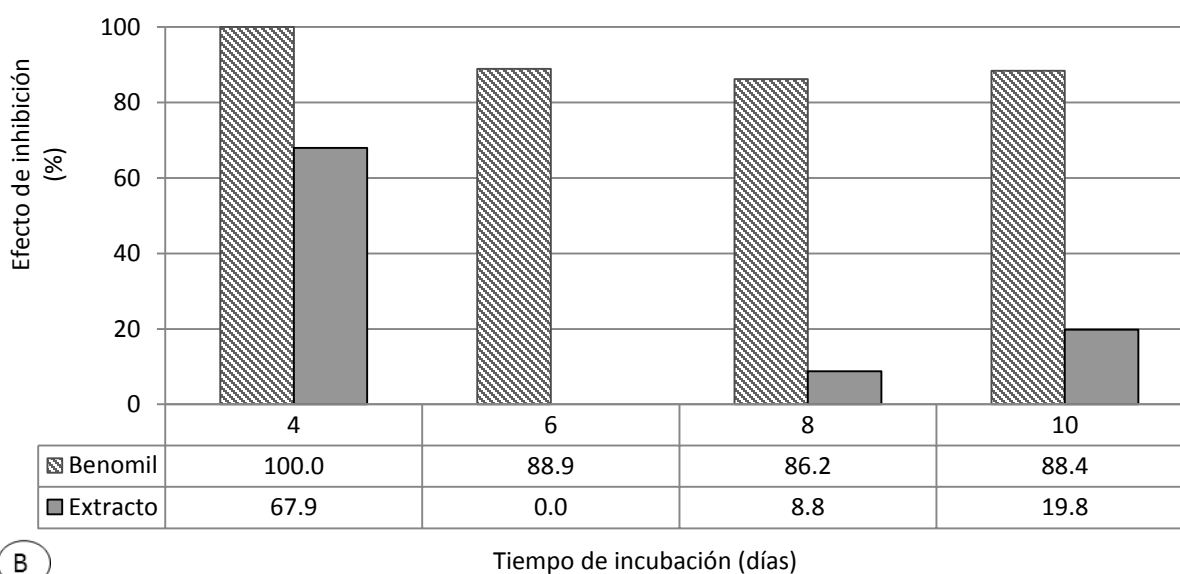
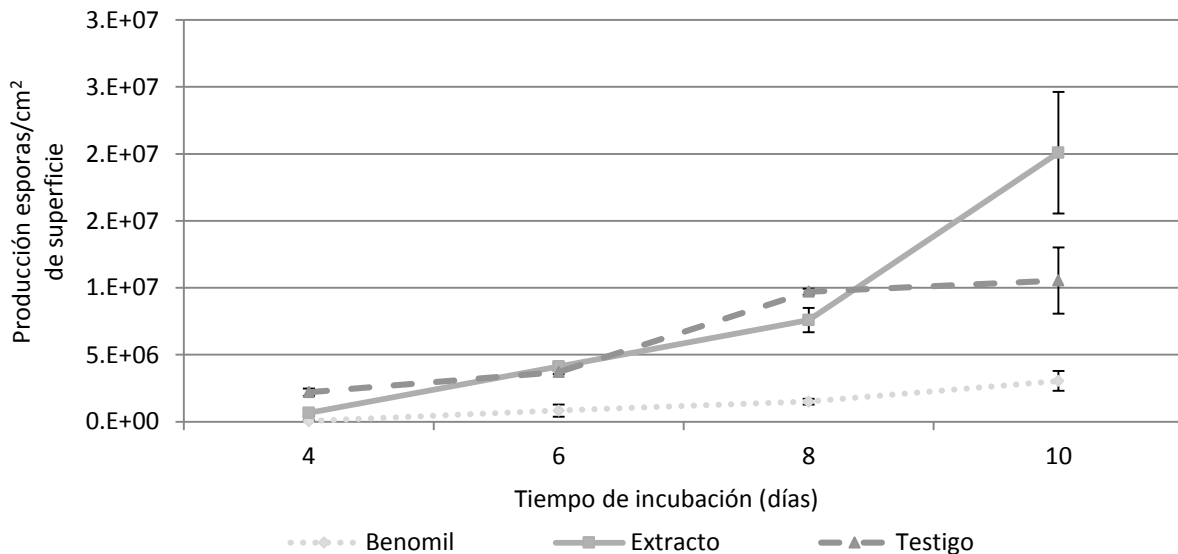


Fig. 81. Efecto de la mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) en medio de cultivo EMA sobre la esporulación de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en cultivo dual con *Lentinula edodes* CP-7. Como referencia se utilizó el fungicida benomil, a una concentración de 1.47 mg/L. A: Producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con *Lentinula edodes* y B: Efecto de inhibición sobre la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con *Lentinula edodes*. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

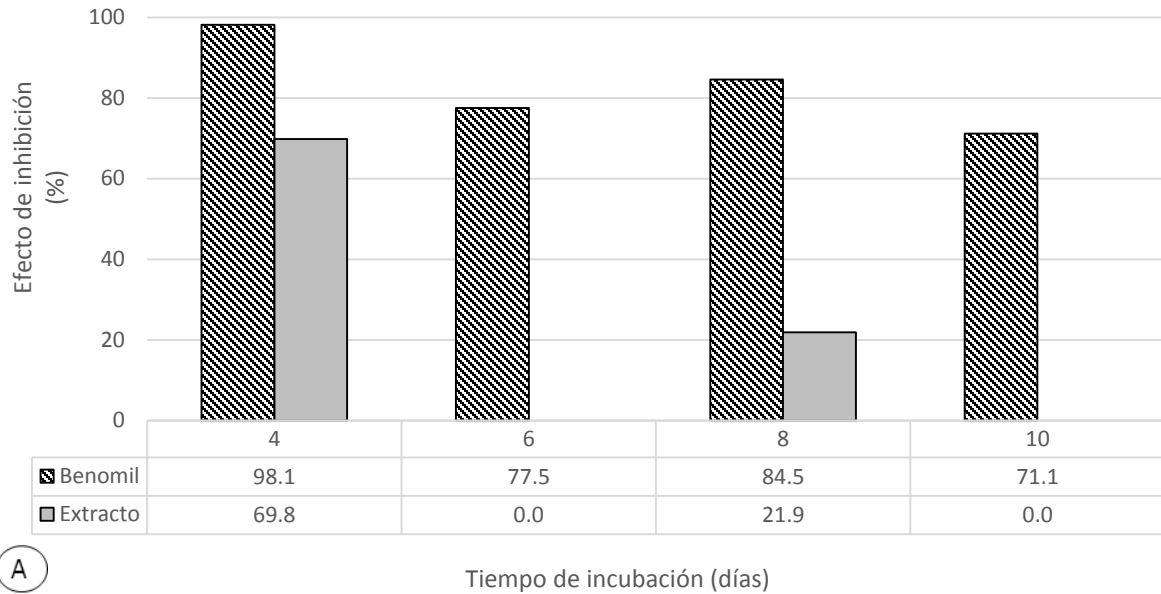
En cuanto a la producción de esporas por *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en el cultivo dual con *Pleurotus ostreatus* (Fig. 82), el tratamiento testigo se mostró por arriba del tratamiento con extracto y con Benomil. En el caso del tratamiento con extracto, la inhibición al inicio del conteo (día cuatro) fue del 69.8%. No se observó una inhibición significativa en los días seis y ocho; incluso se observó una estimulación de la esporulación del 11% al sexto día y del 90% al día diez en presencia del extracto (Fig. 83B). Esta estimulación de esporulación ya ha sido registrada para el hongo *Botrytis cinerea*, ya que se observó un efecto estimulador en la supervivencia de la germinación de esporas conforme se aumentó la concentración de gel de sábila (*Aloe vera*) en el medio de cultivo (Saks and Barkai-Golan, 1995).

En el caso del tratamiento con Benomil (Fig. 82), se pudo observar que la dosis de 1.47 mg/L en medio de cultivo, tuvo un efecto notorio en la inhibición de producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* desde el inicio con una inhibición del 98% hasta el último conteo al decimo día, con una inhibición del 71% (Fig. 83A).

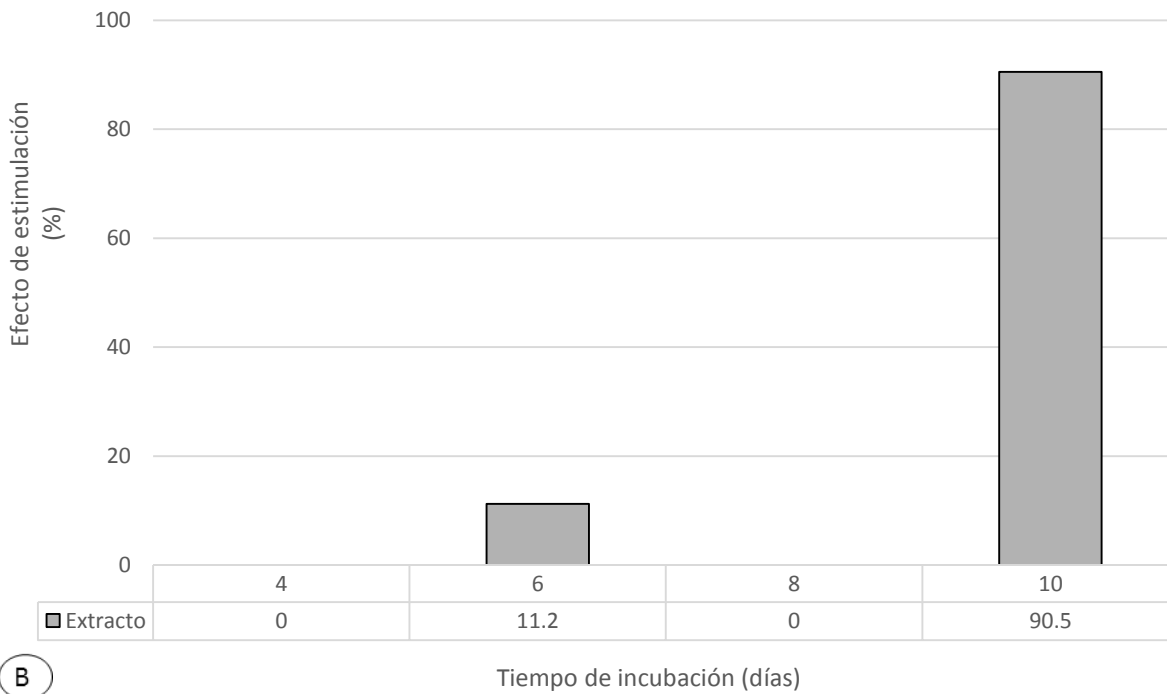


Días	Tiempo de incubación			
	4	6	8	10
Benomil	4.17E+04 ± 4.17E+04 ^a	8.33E+05 ± 4.58E+05 ^b	1.50E+06 ± 2.17E+05 ^b	3.04E+06 ± 7.41E+05 ^a
Extracto	6.67E+05 ± 2.53E+05 ^a	4.13E+06 ± 2.53E+05 ^a	7.58E+06 ± 9.08E+05 ^a	2.01E+07 ± 4.53E+06 ^b
Testigo	2.21E+06 ± 2.73E+05 ^a	3.71E+06 ± 1.50E+05 ^a	9.71E+06 ± 2.32E+05 ^a	1.05E+07 ± 2.46E+06 ^c

Fig. 82. Efecto de la mezcla de extractos de la sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) en medio de cultivo EMA sobre la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en cultivo dual con el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* CP-50. Como referencia se utilizó el fungicida benomil, a una concentración de 1.47 mg/L. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 10.

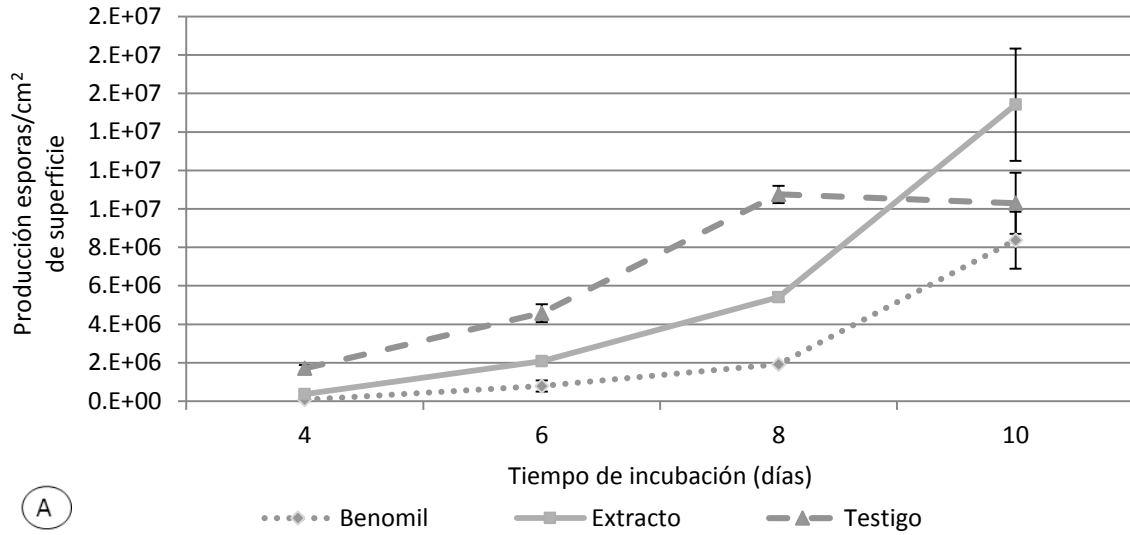


A



B

Fig. 83. Efecto de inhibición y estimulación de producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en crecimiento dual con *Pleurotus ostreatus* CP-50, por efecto de la mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) en medio de cultivo EMA. Como referencia se utilizó el fungicida benomil, a una concentración de 1.47 mg/L. A: Efecto de inhibición sobre la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y B: Efecto de estimulación sobre la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113.



Tiempo de incubación				
Días	4	6	8	10
Benomil	8.E+04 ± 4.17E+04 ^a	8.E+05 ± 2.92E+05 ^a	2.E+06 ± 4.17E+04 ^a	8.E+06 ± 1.48E+06 ^a
Extracto	4.E+05 ± 1.25E+05 ^a	2.E+06 ± 4.17E+04 ^a	5.E+06 ± 2.20E+05 ^b	2.E+07 ± 2.92E+06 ^b
Testigo	2.E+06 ± 1.82E+05 ^a	5.E+06 ± 4.64E+05 ^b	1.E+07 ± 4.51E+05 ^c	1.E+07 ± 1.59E+06 ^a

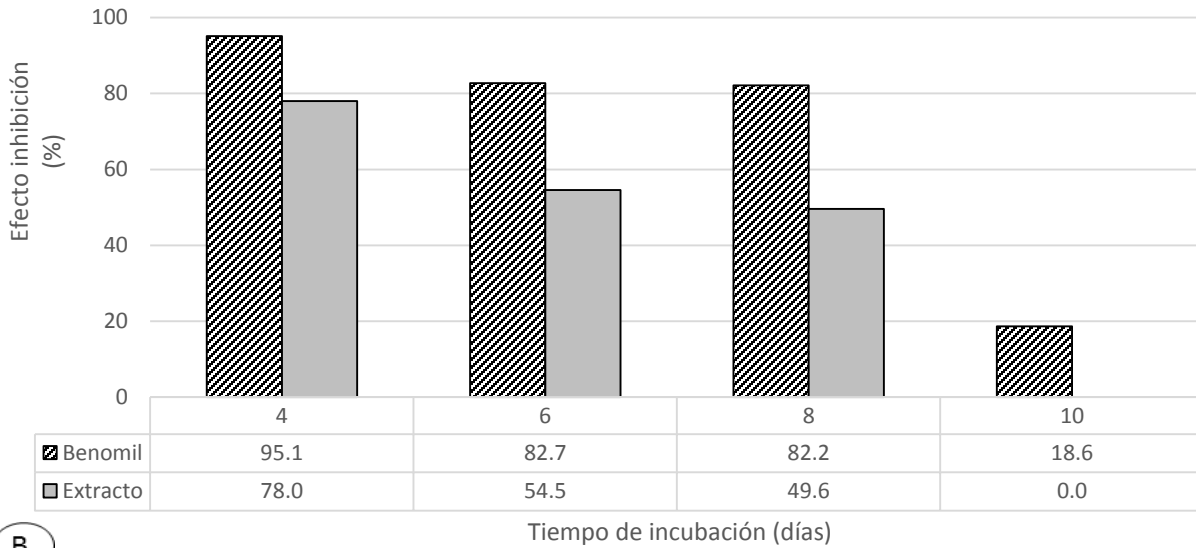


Fig. 84. Producción de esporas de la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en cultivo dual con la cepa comestible *Pleurotus pulmonarius* CP-267 expuesta al extracto de cebolla (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2 %, así como benomil con 1.47 mg/L en medio de cultivo EMA. A: Cantidad de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con *Pleurotus pulmonarius* CP-267, B: Efecto de inhibición sobre la producción esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con *Pleurotus pulmonarius* CP-267. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 10.

Para la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en cultivo dual con *Pleurotus pulmonarioides*, se observó un efecto inhibitorio del extracto desde el primer conteo de esporas (día cuatro), ya que el testigo se mantuvo por arriba del tratamiento con extracto hasta el día 8 del experimento (Fig. 80A). El tratamiento con extracto mostró un porcentaje de inhibición del 78% para el día 4, el cual se mantuvo cerca del 50% hasta el octavo día. Sin embargo, la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* pareció adaptarse con el tiempo, ya que al día diez se observó una estimulación en la producción de esporas de hasta el 49% (Fig. 81).

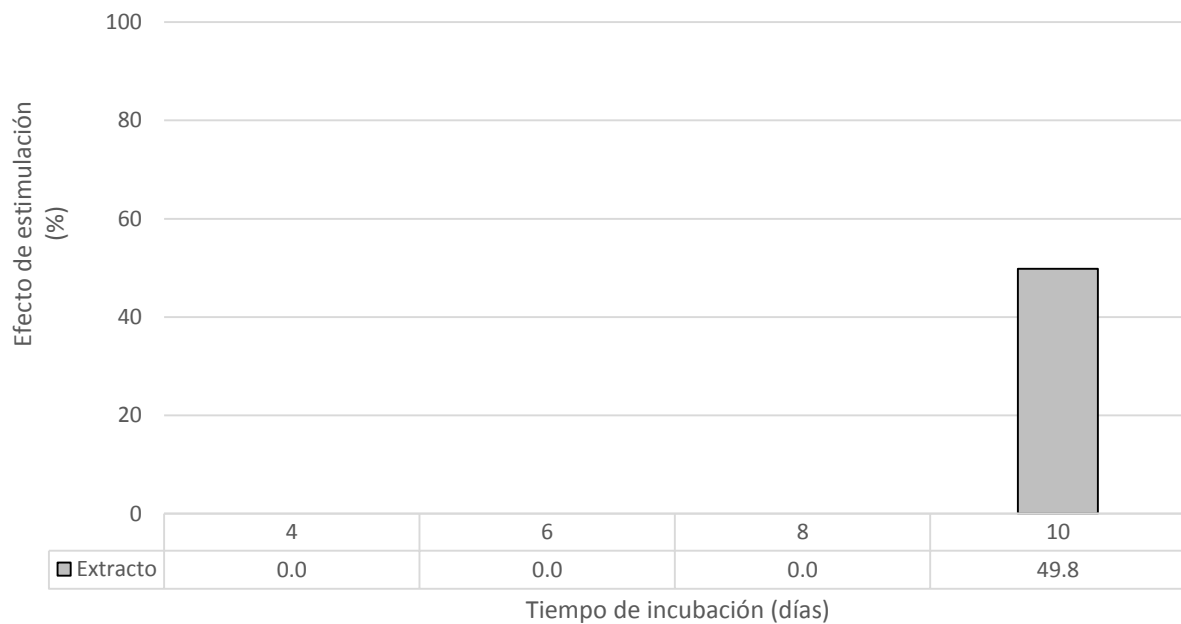


Fig. 85. Efecto de estimulación en la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 con *Pleurotus pulmonarius* CP-267 en cultivo dual con extracto de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2%, así como benomil con 1.47 mg/L en medio de cultivo EMA.

En el caso del tratamiento con benomil, la inhibición en la producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 se mantuvo hasta el día ocho, ya que al día diez no se observó una diferencia significativa con el testigo (Fig. 80A). En este caso se observó una proporción de inhibición del 95% para el día 4, mientras que los días 6 y 8 se mantuvo en un 82% para disminuir a un 18% para el día 10 (Fig. 80B).

8.5.5 Conclusiones

1. Se observó una estimulación de la velocidad de crecimiento micelial por efecto del extracto para las tres cepas de hongos comestibles a todo lo largo del experimento. Para *Lentinula edodes* en el segundo y tercer día donde *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* aún no toca la colonia, se observó un porcentaje de estimulación de 55% y 36%, respectivamente. Para *Pleurotus ostreatus*, se observó una estimulación en la velocidad de crecimiento micelial del 100% y 93.7% en los primeros dos días. Para *Pleurotus pulmonarius* se obtuvo una estimulación del 55% y 90% en los días 5 y 6 del experimento.
2. La mezcla de los extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) tuvo un efecto inhibitorio significativamente diferente con respecto al testigo en la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en su velocidad de crecimiento dual, con la cepa de *Pleurotus ostreatus* fue de 48.4 %, con *Pleurotus pulmonarius* del 49% y con *Lentinula edodes* del 50%.
3. La producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* fue significativamente menor en presencia de la cepa *Pleurotus pulmonarius* con un 78% por efecto del extracto en comparación con las cepas de *Pleurotus ostreatus* con un 69.8% y *Lentinula edodes* con un 67.9%.
4. Este es el primer registro del cual se tiene conocimiento donde la mezcla de dos extractos tiene una actividad inhibitoria sobre el mohó *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, competidor en el cultivo de hongos y que al mismo tiempo estimula en desarrollo de cepas de hongos comestible, sin embargo, se requiere de más investigación en la aplicación de estos extractos a nivel de substrato sólido para que puedan ser utilizados por productores de hongos comestibles.

8.6. Efecto de la mezcla de extractos de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) en el cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*) en sustrato sólido en condiciones de módulo experimental (Experimento 6)

Con base en los resultados obtenidos previamente en cultivo *in vitro* en condiciones controladas de laboratorio, se procedió a evaluar el efecto en sustrato sólido para las cepas de *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7 en condiciones de modulo experimental hasta su fructificación.

8.6.1 Descripción general del experimento

Para el montado del experimento se seleccionaron solo dos de las cepas de hongos comestibles evaluadas previamente, en este caso *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*. El sustrato utilizado fue el más recomendado para el cultivo de cada cepa, en el caso de *Pleurotus ostretus* se utilizó paja de trigo picada en molino de martillos con criba de una pulgada. En el caso de la cepa *Lentinula edodes* se utilizó como sustrato una mezcla de aserrín suplementado (fórmula Colpos-17) estadarizada en el laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados de Biotecnología de Hongos Comestibles.

Para las unidades de producción, se agregaron 500 g de sustrato húmedo a bolsas esterilizables con filtro (marca Unicorn, E.U.A.) y se esterilizaron por 1 h a 121°C, se dejaron enfriar por 12 h y se inocularon con 25 g de “semilla” de la cepa correspondiente para completar 18 tratamientos a evaluar (Tabla 27).

Para inocular el *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en los tratamientos correspondientes, se realizó una solución de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 para obtener 1×10^6 esporas/10 ml para la inoculación del sustrato en los tratamientos correspondientes. En el caso del extracto de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%), se realizó una resuspensión en agua destilada estéril de los extractos por separado con la dosis estandarizada a partir de los resultados en los experimentos *in vitro*. Posteriormente se realizó una mezcla de manera homogénea en condiciones de esterilidad para obtener una dosis

de 1.2% de extracto, una vez realizada la mezcla se procedió a tomar la alícuota correspondiente de 10 ml para la inoculación de cada sustrato. En el caso del benomil, se realizó una suspensión de 1.47 mg/L, del cual se tomó una alícuota de 10 ml para cada unidad de producción correspondiente. La inoculación de los sustratos con la semilla de los hongos correspondientes, así como sus complementos se realizaron en condiciones de esterilidad.

En el caso de las unidades con la condición número 8, el testigo de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, solo se inoculó una suspensión de esporas al sustrato sin semilla de hongo comestible. Estas unidades fueron para garantizar la germinación de las esporas utilizadas en la suspensión y posterior contaminación de las unidades experimentales. En el caso de las unidades con la condición número 9, testigo sustrato, no se les aplicó ningún tipo de inóculo ya que se utilizaron como prueba de esterilidad del sustrato a lo largo del experimento.

Tabla 27. Condiciones experimentales estudiadas en sustratos inoculados con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*), empleando sustratos estériles.

Condición	Clave	Réplicas	Tratamientos del sustrato		
1	Extractos + <i>Trichoderma</i> CPM-113	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Extracto (10 ml)	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)
2	Extractos	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Extracto (10 ml)	Agua (10 ml)
3	<i>Trichoderma</i> CPM-11	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)	Agua (10 ml)
4	Benomil + <i>Trichoderma</i> CPM-113	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Benomil	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)
5	Benomil	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Benomil	Agua (10 ml)
6	Blanco positivo	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Agua (20 ml)	-
7	Blanco negativo	5	Semilla de hongo comestible (25 g)	Cultivo convencional en la región central de México	-
8	Testigo <i>Trichoderma</i> CPM-113	5	Sin "semilla" de hongo comestible	<i>Trichoderma</i> CPM-113 (10 ml)	-
9	Testigo sustrato	5	Sin "semilla" de hongo comestible	Sin Tratamiento	-

Extractos= Extracto mezclado de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2 %.

CPM-113= *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, suspensión de esporas a una concentración de $1 \times 10^6/10$ ml. Adición de benomil (1.47 mg/L).

8.6.2 Evaluación de las variables

Para la evaluación de variables, se estimó el porcentaje de colonización del sustrato de las cepas de *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7, así como de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en los tratamientos hasta la colonización total de cada unidad de producción.

Una vez terminada la evaluación de colonización micelial, las unidades experimentales se mantuvieron en condiciones de producción. Posteriormente se caracterizaron morfológicamente los basidiocarpos cosechados, el rendimiento en gramos y la eficiencia biológica.

En el caso de los sustratos se determinaron los porcentajes de humedad y pH al inicio y al final de los experimentos.

8.6.3 Colonización de *Pleurotus ostreatus* CP-50 con extracto de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en sustrato de paja

8.6.3.1 Colonización del sustrato

En cuanto a los resultados obtenidos por la colonización del sustrato de *Pleurotus ostreatus* (Fig. 82), se observó una ligera aceleración en la velocidad de crecimiento micelial en el tratamiento de extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* al segundo día, siendo mayor que todos los otros tratamientos evaluados. En el cuarto día se pudo observar que la colonización de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento de extracto con agua obtuvo el valor más alto de colonización que los otros tratamientos con un 18 % de colonización. Al parecer, el efecto de estimulación micelial que se observó en las pruebas *in vitro*, se manifestó para el cuarto día de desarrollo micelial; a pesar de que el micelio se observó visiblemente más denso, el efecto no fue suficiente para superar al resto de las condiciones experimentales, principalmente la presencia del moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*.

Al sexto día de colonización, este tratamiento de extracto con agua se mantuvo por arriba de los tratamientos extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y Comercial, fue superado por el tratamiento solo con agua que fue el primero en llegar a una colonización del 60% en comparación con los otros tratamientos. El tratamiento de benomil con agua se igualó en colonización con el tratamiento de extracto con agua, obteniendo un 50% de colonización. Ambos tratamientos al sexto y al octavo

día cubrieron la totalidad de las unidades experimentales. Los tratamientos de agua, benomil con agua, extracto con agua y comercial, colonizaron al 100% al octavo día (Fig. 86).

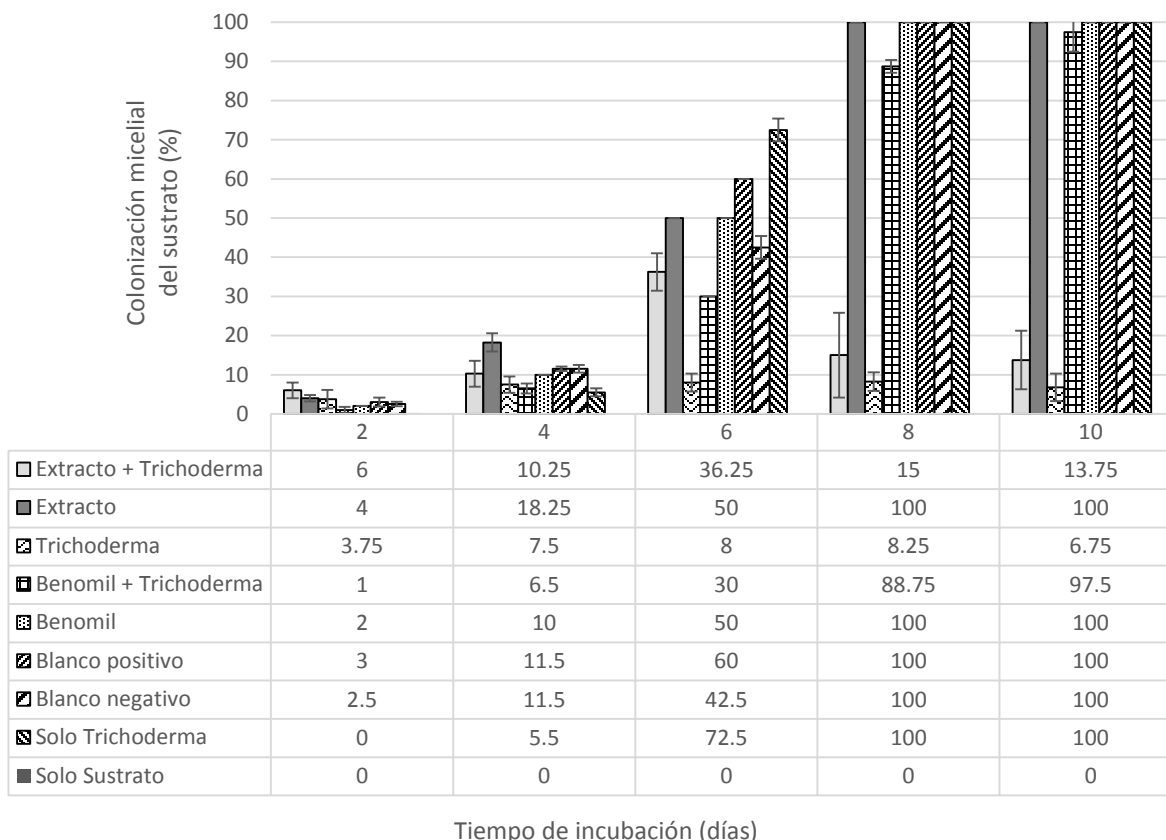


Fig. 86. Proporción promedio de la colonización del sustrato por el micelio de *Pleurotus ostreatus* en las diferentes condiciones experimentales estudiadas, incluyendo la inoculación de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Se agregó una mezcla de extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%) a la condición correspondiente. Como referencia se utilizó el fungicida benomil a una concentración de 1.47 mg/L al sustrato. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$. Réplicas: n = 4

8.6.3.2 Producción de biomasa fresca en los tratamientos

En cuanto a la producción total de hongos por tratamiento (Fig. 87) para la cepa de *Pleurotus ostreatus*, el tratamiento que mayor cantidad de hongos produjo fue el de benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, con una producción de 653 g, seguido por el tratamiento de agua con 604 g, extracto con agua con 558 g y comercial con 530 g. La estimulación de la velocidad de crecimiento en la presencia de benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* coincide con la encontrada en el experimento dual “*in vitro*”, donde el

desarrollo micelial de *Pleurotus ostreatus* se vió estimulado por la presencia del benomil y del moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. El benomil ha probado ser un fungicida eficiente para controlar los mohos contaminantes en el cultivo de hongos comestibles, sin embargo, la pura presencia del benomil con agua pareció inhibir la producción final de hongos (Figs. 87-88).

En el caso del tratamiento extracto con agua, se observó una producción ligeramente mayor al tratamiento comercial, este aumento en la producción podría tener relación con la presencia del extracto, o simplemente el aumento de humedad en el sustrato estimuló el desarrollo de los cuerpos fructíferos, tal como se mostró en el tratamiento solo con agua. En investigaciones previas se tiene registrado que el uso de extractos de diversas plantas para el control de *V. fungicola* en sustrato de compost, no tuvo un efecto negativo en la producción de hongos comestibles (Baars *et al.*, 2008). En este caso la presencia del extracto tampoco tuvo un efecto negativo en la producción de los hongos evaluados en este estudio. Estos resultados de producción final se esperaban mas evidentes dados los resultados obtenidos en la prueba “*in vitro*”, sin embargo, se sabe que algunos compuestos con propiedades antimicrobianas presentes en extractos vegetales su efecto puede ser minimizado al entrar en contacto con sustancias proteicas (Tajkarimi *et al.*, 2010).

En el caso de la sábila, diversos estudios de laboratorio indican que su actividad está presente en estudios *in vitro*, sin embargo, cuando son probados en estudios *in vivo*, existen diversos factores involucrados los cuales pueden influir de manera negativa en el efecto de los componentes presentes en el gel del *Aloe* (Reynolds and Dweck, 1999). Aunado a estos registros, se sabe que la inhibición de microorganismos por productos de *Allium*, se observa cuando son probados a nivel experimental en laboratorio, pero pierden dicho efecto cuando son probados en mezclas con alimentos. Esto esta atribuído a que las proteínas de los alimentos forman enlaces con los compuestos activos de los extractos reduciendo su efecto inhibitorio. Así como el compuesto allicin es significativamente menos estable mezclado con diversos alimentos, ya que se sabe que el compuesto allicin y los tiosulfinatos en general reaccionan con aminoácidos y otros compuestos aminos presentes en los alimentos (Kyung, 2011), este mismo efecto pudo haberse generado con los compuestos activos que estimularon el desarrollo micelial de la cepa *in vitro*, y que en sustrato sólido el efecto en el desarrollo no se observó tan evidente. Esta reacción de los compuestos activos de extractos vegetales con otros componentes orgánicos limita su aplicación como conservador de alimentos (Kyung, 2011), en éste caso, éste tipo de extractos se

podrían probar en dosis más elevadas o aplicados en diferentes condiciones para corroborar un efecto negativo en el control de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. Esta reacción de combinación de compuestos activos con compuestos orgánicos en el sustrato pudo haberse llevado a cabo en presencia del sustrato de paja y el efecto de estimulación micelial observado previamente se vio afectado (Figs.87-88).

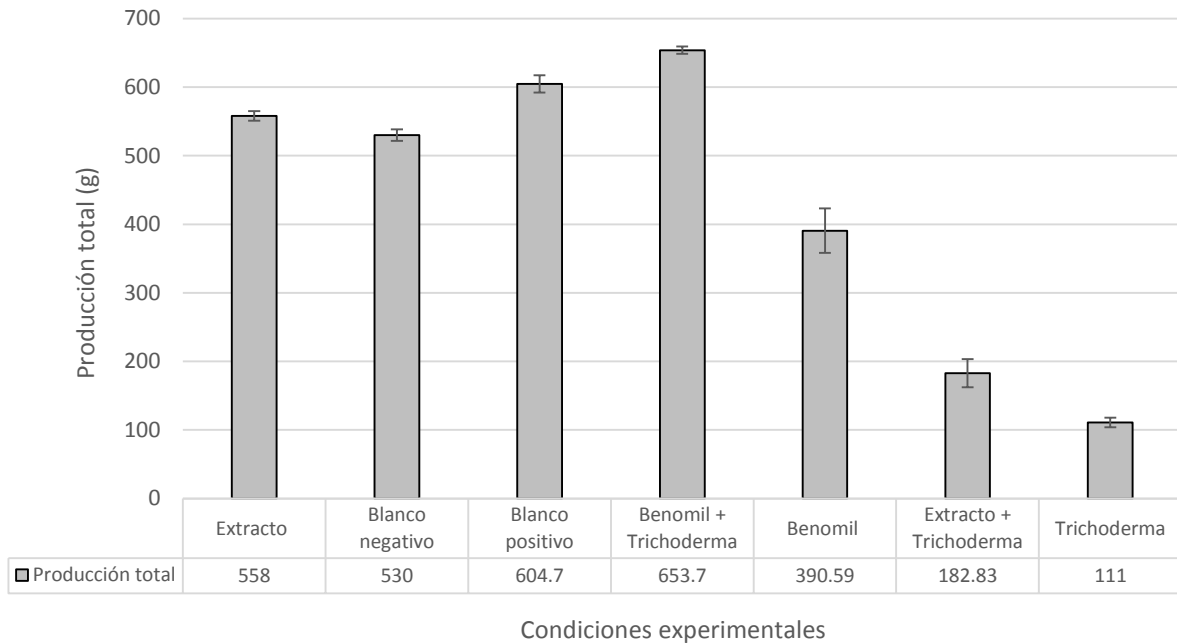


Fig. 87. Producción total de los basidiocarpos cosechados de *Pleurotus ostreatus* CP-50 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Condiciones: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, extracto, extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, benomil, benomil con *Trichoderma*, blanco positivo y blanco negativo. Cada condición tuvo n = 4 réplicas. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

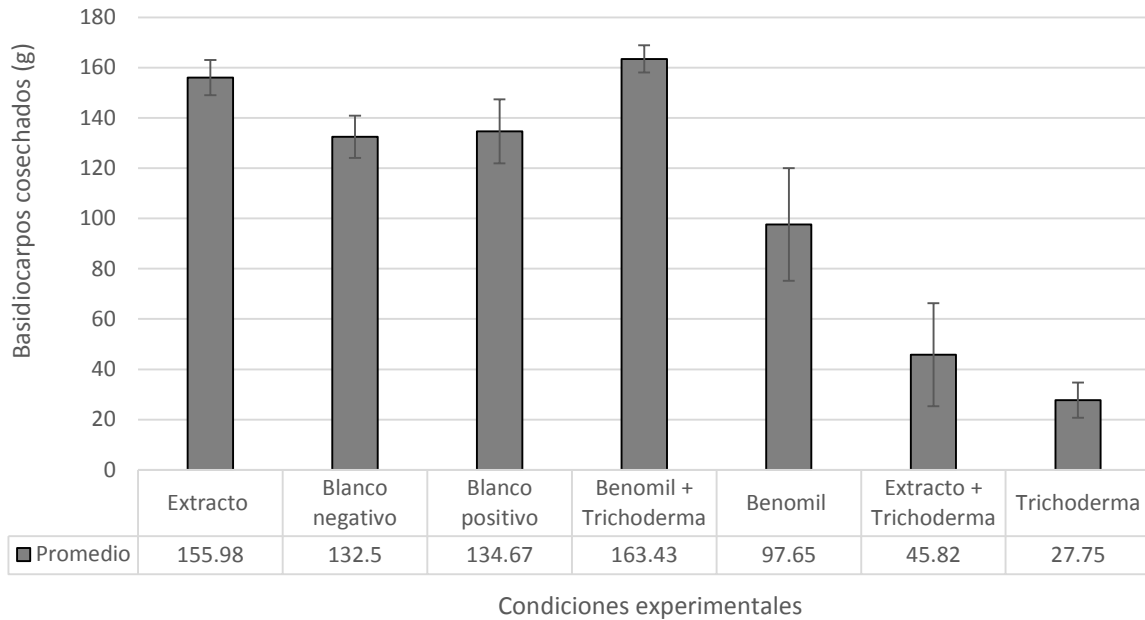


Fig. 88. Producción promedio por tratamiento de los basidiocarpos cosechados de *Pleurotus ostreatus* CP-50 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Condiciones: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, extracto, extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, benomil, benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, blanco positivo y blanco negativo. Cada condición tuvo n = 4 réplicas. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

8.6.3.3 Eficiencia biológica (%)

En cuanto a la eficiencia biológica de *Pleurotus ostreatus* (Fig. 89), se pudo observar que los tratamientos más eficientes fueron el de benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y el tratamiento solo con agua. Entre el tratamiento comercial, extracto con agua y benomil con agua, la variabilidad de los datos no generó una diferencia importante entre ellos.

En el caso de los tratamientos de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con extracto y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con agua se observaron los valores menores en su eficiencia biológica. En el caso del tratamiento con extracto, pudo observarse que la dosis utilizada no fue suficiente como para detener de una forma eficiente el avance del moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, a pesar de esto, se observa que si existió diferencia entre el uso del extracto y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en comparación con el tratamiento con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y agua, ya que este último tratamiento obtuvo el valor mas bajo (Fig. 89).

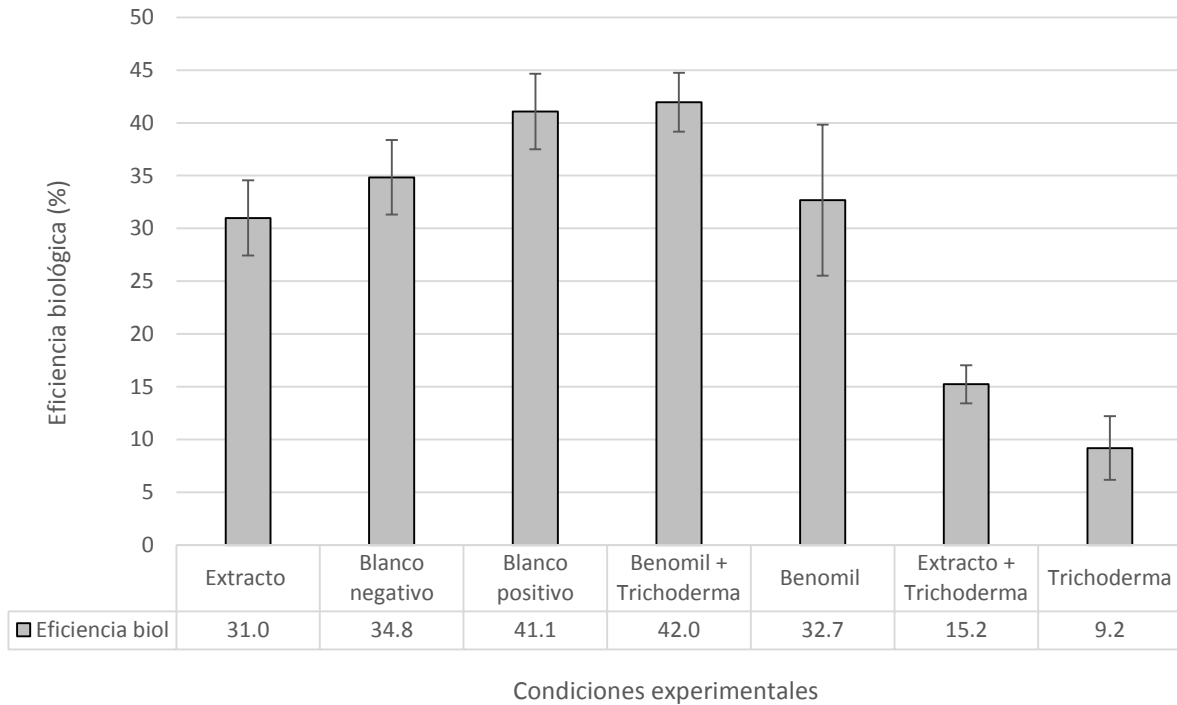


Fig. 89. Eficiencia biológica de *Pleurotus ostreatus* CP-50 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Condiciones: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, extracto, extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, benomil, benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, blanco positivo y blanco negativo. Cada condición tuvo n = 4 réplicas. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

8.6.3.4 Caracterización de los basidiocarpos

A partir de la producción de los basidiocarpos (Fig. 90), se realizó una caracterización de los mismos por cada tratamiento (Tabla 28). En el caso del diámetro del pileo, el tratamiento con el valor mayor fue el de benomil con agua, seguido por el tratamiento comercial y extracto con agua. Se pudo observar que el tratamiento con agua obtuvo los hongos con menor tamaño y estípites más largos para la primera cosecha; además de que el inicio de su fructificación tuvo un retraso de ocho días en comparación con los otros tratamientos. El tratamiento de benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, también obtuvo hongos pequeños tanto en la primera como en la segunda cosecha. Esto pudiera atribuirse a que la cepa sufrió un estrés mayor para lograr la producción de hongos por la presencia del benomil y a su vez la inoculación con el moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 lo cual disminuyó su capacidad en la producción final.

Tabla 28. Caracterización morfológica de la producción de *Pleurotus ostreatus* CP-50.

Condición	Primera cosecha				
		Píleo		Estípite	
		Diámetro	Largo	Diámetro	Deshidratación
1	Extracto + <i>Trichoderma</i>	4	3.17	1.23	Nula
2	Extracto	5.94	4.48	1.62	Nula
3	<i>Trichoderma</i>	3.5	6	1.2	Nula
4	Benomil + <i>Trichoderma</i>	8.23	6.0	1.13	Nula
5	Benomil	6.48	5.38	1.13	Parcial
6	Blanco positivo	4	6.18	0.86	Parcial
7	Blanco negativo	6.35	3.88	1.06	Parcial
Segunda cosecha					
1	Extracto + <i>Trichoderma</i>	0.0	0.0	0.0	---
2	Extracto	5.36	2.93	0.79	Nula
3	<i>Trichoderma</i>	0.0	0.0	0.0	---
4	Benomil + <i>Trichoderma</i>	4.69	3.88	0.85	Nula
5	Benomil	3.95	1.76	0.54	Nula
6	Blanco positivo	4.21	3.61	0.74	Nula
7	Blanco negativo	3.44	2.12	0.66	Nula

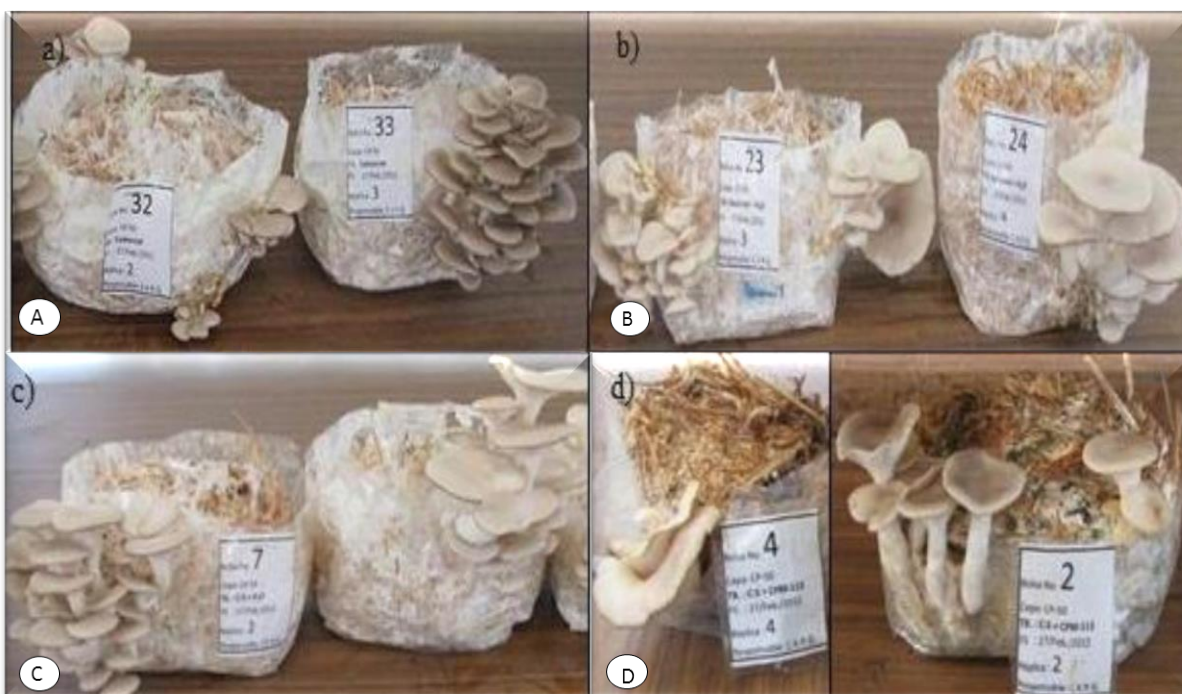


Fig. 90. Basidiocarpos de *Pleurotus ostreatus* CP-50 producidos en las diferentes condiciones experimentales evaluadas. A: blanco negativo, B: Benomil, C: Extracto, D: Extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*

8.6.3.5 Evaluación del sustrato

En cuanto al cambio de pH en el sustrato de paja se pudo observar que la presencia de *Pleurotus ostreatus* modificó el pH a más ácido en todos los tratamientos evaluados en el sustrato residual al final del experimento (Tabla 29), esto puede deberse a los exudados producidos por el micelio del hongo ante la degradación del sustrato.

En la comparación de pH entre tratamientos, se observó que la presencia del extracto en el sustrato al inicio del experimento disminuyó el pH a un valor menor de 6 en comparación con los demás tratamientos. Sin embargo en el sustrato residual final, se observó que los valores de los tratamientos con extracto no fueron notoriamente diferentes en comparación con los tratamientos sin extracto de benomil y agua. El tratamiento con el pH más elevado fue el comercial, al cual no se le agregó ningún compuesto más que la semilla de hongo comestible.

Los porcentajes de humedad iniciales del sustrato fueron muy cercanos al 80% (Tabla 29), y una vez finalizado el experimento oscilaron entre el 66% y 82%, siendo el tratamiento de agua el más húmedo al momento de su cosecha final. Este porcentaje de humedad puede estar relacionado a la obtención de una mayor producción como se observó previamente, para los tratamientos de benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 y sólo agua (Fig. 87), los cuales obtuvieron los mayores valores de humedad al final de experimento (Tabla 29).

Tabla 29. Determinaciones de pH y porcentajes de humedad de sustrato de paja.

Condición	Substrato paja estéril	Substrato inicial		Substrato residual final	
	Tratamiento	Humedad (%)	pH inicial	Humedad (%)	pH final
1	Extracto + <i>T. aggressivum</i>	80.02	5.97	74.3	4.6
2	Extracto	80.12	5.85	74.8	4.82
3	<i>Trichoderma</i>	80.15	6.30	74.0	5.1
4	Benomil + <i>T. aggressivum</i>	77.9	6.32	78.5	5.09
5	Benomil	78.34	6.23	66.2	4.7
6	Blanco positivo	79.15	6.22	82.5	4.9
7	Blanco negativo	79.62	6.32	64.5	5.1

8.6.3.6 Conclusiones

En el caso del sustrato de paja se pudo observar que la presencia del benomil y el *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, así como el aumento en la humedad de sustrato estimularon la producción de los hongos comestibles. La presencia del extracto estimuló ligeramente la producción de hongos en comparación con el tratamiento comercial. La dosis de extracto utilizada no fue lo suficientemente fuerte como para inhibir el crecimiento de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 lo necesario para controlar la contaminación de tal manera que produjera la misma cantidad de hongos que un cultivo comercial.

Como recomendación futura, se sugiere probar con dosis mayores de extracto aplicados al sustrato para poder observar con mayor claridad el aumento en la densidad del micelio de los hongos comestibles. También se recomienda utilizar unidades experimentales de mayor capacidad, así con un mayor número de réplicas. En este caso, el sustrato fue esterilizado y manejado bajo condiciones de esterilidad, en el caso de un futuro experimento con los cambios previos mencionados se recomienda solo pasteurizar el sustrato y aplicar el extracto en las condiciones normales de un cultivo tradicional.

8.6.4 Colonización de *Lentinula edodes* CP-7 con extracto de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 en sustrato de aserrín

8.6.4.1 Colonización del sustrato

En cuanto a la colonización del sustrato por *Lentinula edodes*, no se observó una diferencia evidente hasta el quinto día, donde el tratamiento de extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113 se observó muy por debajo del resto de los tratamientos (Fig. 91). Entre los tratamientos comercial y solo con agua, no se observaron diferencias en la colonización entre ambos, así como en la comparación de los tratamientos de benomil con agua, benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y extracto con agua, tampoco se observaron diferencias significativas entre ellos. Esto se atribuye a que la dosis de extracto no fue suficiente para lograr el efecto observado en la prueba *in vitro*. En un estudio previo se observó que dosis menores del 2% de extractos de diversas plantas no fueron efectivas contra *V. fungicola* en compost con *Agaricus bisporus* (Baars, 2008). En este caso, el porcentaje de 1.2% tampoco fue efectivo en el control del moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* en sustrato de aserrín, sin embargo, el extracto tuvo un valor muy cercano al obtenido con el tratamiento de benomil con agua (Fig. 91). A pesar de que el benomil es un fungicida ampliamente utilizado en el cultivo de hongos comestibles para controlar mohos contaminantes del tipo de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, en este caso la dosis utilizada no fue lo suficientemente fuerte para detener la invasión en el sustrato, y la colonización de *Lentinula edodes* se vio fuertemente inhibida por el moho para los días 7 y 9 de colonización micelial. Este efecto también se observó para el tratamiento de extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, seguido por el *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con agua.

Cabe mencionar que en los tratamientos con extracto, la velocidad de crecimiento del micelio se observó con una densidad mayor que en el tratamiento comercial y el tratamiento con solo agua, lo cual coincidió con los efectos encontrados en el experimento dual “*in vitro*”. Sin embargo, en el caso del tratamiento con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, esto no fue suficiente para evitar la colonización del moho, con una inoculación de 1×10^6 esporas en 500 g de sustrato. En una investigación donde se aplicaron extractos vegetales sobre compost contaminado con *Verticillium fungicola* en cultivo de champiñón, se determinó que dosis de extractos menores al 2% son menos efectivas (Baars, 2008); en éste caso, la dosis inoculada en el

substrato fue de 1.2% resultado de la mezcla de una solución de extracto al 0.6% de cebolla morada (*Allium cepa*) y 0.6% de sábila (*Aloe vera*).

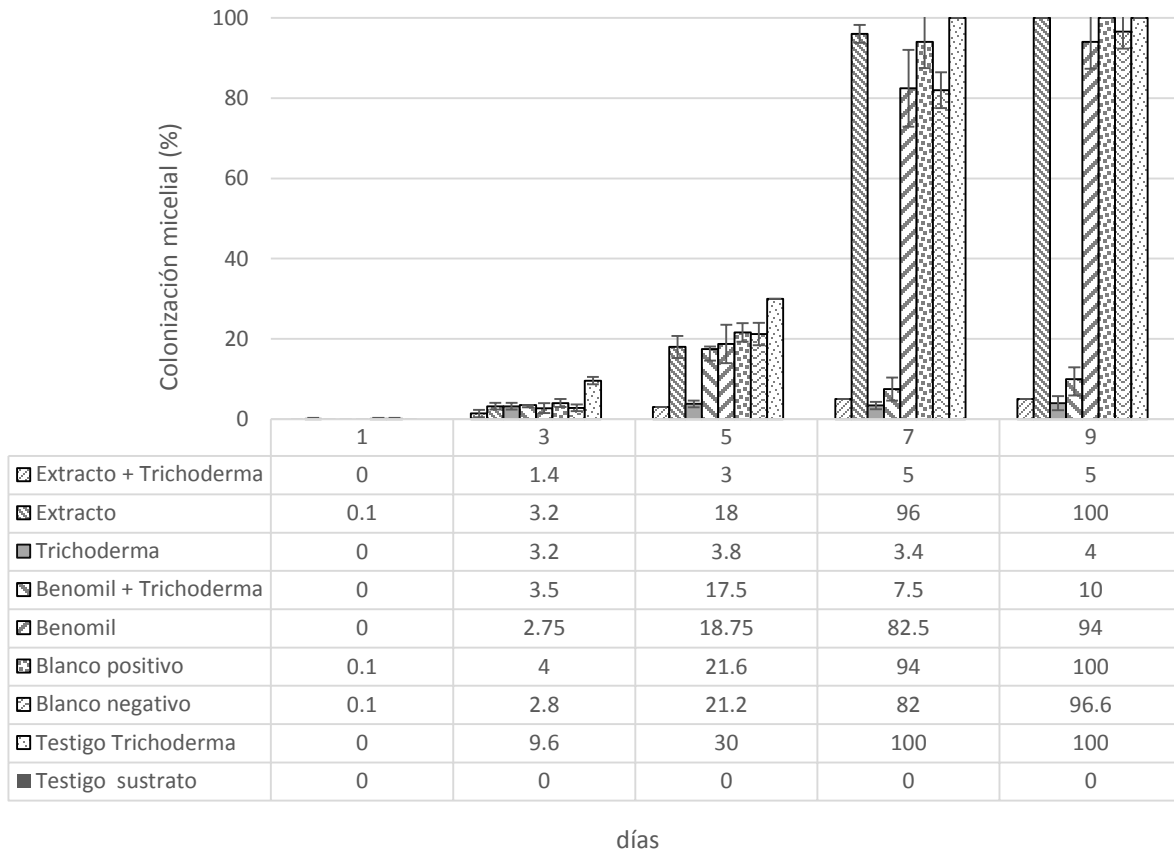


Fig. 91. Proporción promedio de la colonización del sustrato de aserrín por el micelio de *Lentinula edodes* CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas, incluyendo la inoculación de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113. Se agregó una mezcla de extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%) a la condición correspondiente. Como referencia se utilizó el fungicida benomil a una concentración de 1.47 mg/L al sustrato. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Réplicas: n = 4

8.6.4.2 Producción de biomasa fresca en los tratamientos

En cuanto a la producción total de cuerpos fructíferos (Fig. 92), el tratamiento que obtuvo mayor cantidad fue el de agua con 370 g seguido del extracto con agua con una producción de 342 g. El tratamiento comercial y benomil con agua fueron los que produjeron menor cantidad de hongos con producciones de 318 y 252 g respectivamente. Cabe mencionar que el tratamiento de benomil con agua presentó la formación de abortos (hongos sin píleo) en algunas unidades de producción.

Los tratamientos de benomil con *Trichoderma aggressivum f. europaeum*, extracto con *Trichoderma aggressivum f. europaeum* y *Trichoderma aggressivum f. europaeum* con agua no fructificaron en todo el tiempo del experimento. Esto pudo deberse a que la contaminación inducida de 1×10^6 esporas por unidad de 500 g de substrato fue demasiado agresiva para la cepa de *Lentinula edodes*. En este caso la presencia del benomil no contribuyo a una colonización mas rápida de *Lentinula edodes* en presencia del moho *Trichoderma aggressivum f. europaeum*. Esto también coincide con los resultados encontrados en la prueba *in vitro* ya que la presencia del benomil inhibió el desarrollo de *Lentinula edodes* en sus primeros días, y en este tiempo *Trichoderma aggressivum f. europaeum* avanzó rápidamente en la colonización del substrato; esto también pudo observarse en las pruebas *in vitro*. Se sabe que la aplicación del fungicida benomil solía usarse para el control del moho *Verticillium fungicola* en el cultivo de *Agaricus bisporus*; sin embargo, con el tiempo, *Verticillium fungicola* se hizo resistente a dicho fungicida (Baars, 2008), por lo que es probable que con el tiempo el moho *Trichoderma aggressivum f. europaeum* también pueda generar cierta resistencia a la presencia del fungicida benomil.

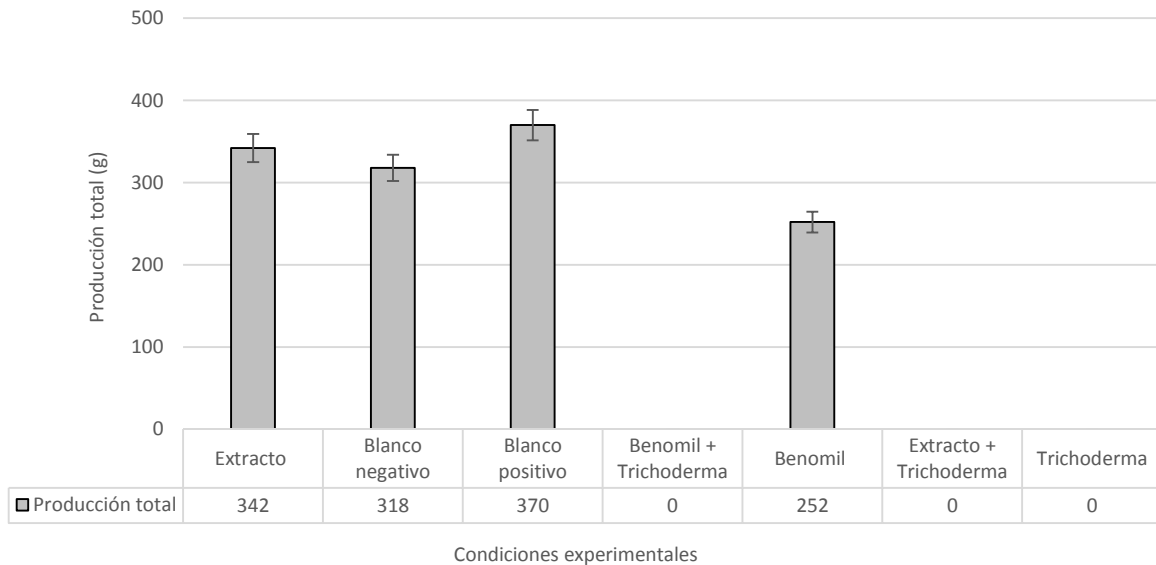


Fig. 92. Producción total de los basidiocarpos cosechados de *Lentinula edodes* CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Condiciones: *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113, extracto, extracto con *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113, benomil, benomil con *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-113, blanco positivo y blanco negativo. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. $n=4$

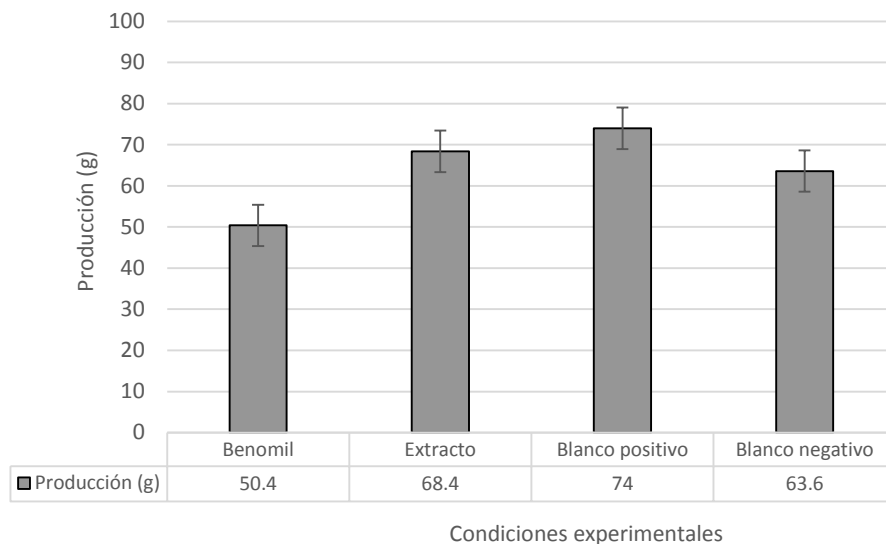


Fig. 93. Producción promedio de los basidiocarpos cosechados de *Lentinula edodes* CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Condiciones: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, extracto, extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, benomil, benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, blanco positivo y blanco negativo. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha=0.05$, $n = 4$ réplicas.

8.6.4.3 Eficiencia biológica

En cuanto a la eficiencia biológica de la producción de *Lentinula edodes*, el tratamiento solo con agua fue el que obtuvo una mayor eficiencia, seguido por el tratamiento de extracto con agua, benomil con agua y comercial. Sin embargo, la variabilidad entre las replicas muestra que no se observó una diferencia estadística entre los tratamientos (Fig. 94).

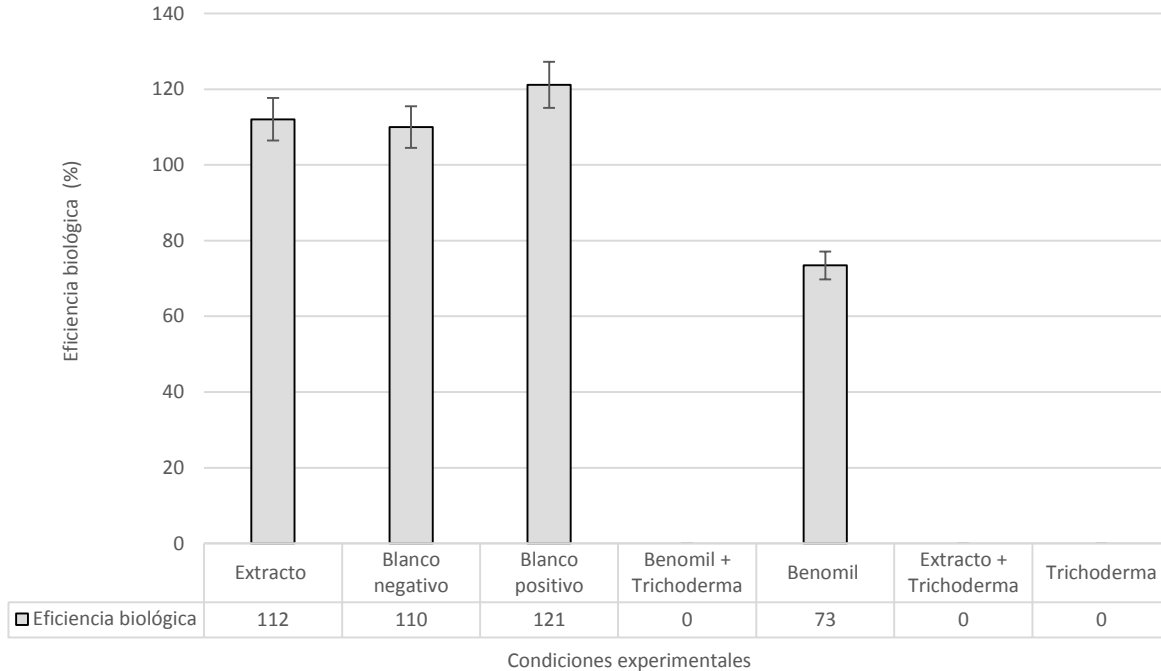


Fig. 94 Eficiencia biológica de *Lentinula edodes* CP-7 en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Condiciones: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, extracto, extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, benomil, benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, blanco positivo y blanco negativo. Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), Prueba de Tukey $\alpha = 0.0$, $n=4$.

8.6.4.4 Caracterización de los basidiocarpos

En cuanto a la caracterización morfológica (Tabla 30) se observó que los tratamientos de extracto con agua y benomil con agua tuvieron los hongos más grandes en comparación con los hongos del tratamiento comercial y solo agua. Este efecto podría estar relacionado a la estimulación micelial observada en las pruebas *in vitro* con los tratamientos de extracto, donde se observó un crecimiento micelial mas denso en comparación con el testigo. Al igual que en las pruebas de laboratorio, también pudo observarse el estímulo de la velocidad de crecimiento en los tratamientos con benomil, teniendo como resultado en substrato un mayor diámetro del pileo en los hongos producidos. Cabe mencionar que los tratamientos de benomil con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, extracto con *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* con agua no fructificaron en todo el tiempo del experimento.

Tabla 30. Caracterización morfológica de los hongos de *Lentinula edodes*.

Condición	Primera cosecha				
		Pileo		Estipite	
		Diámetro	Largo	Diámetro	Deshidratación
1	Extracto + <i>Trichoderma</i>	---	---	---	---
2	Extracto + Agua	3.9	3.1	0.7	Nula
3	<i>Trichoderma</i> + Agua	---	---	---	---
4	Benomil + <i>Trichoderma</i>	---	---	---	---
5	Benomil + Agua	3.9	3.9	0.7	Nula
6	Agua	3	2.9	0.5	Nula
7	Comercial	3.3	3.6	0.7	Nula



Fig. 95. Basidiocarpos de *Lentinula edodes* CP-7 producidos en las diferentes condiciones experimentales evaluadas. A: Blanco negativo, B: Benomil, C: Extracto y D: Blanco positivo.

8.6.4.5 Caracterización del sustrato

En cuanto a las determinaciones del cambio de pH inicial del sustrato al tomado después de la inoculación (Tabla 31), se observó que la presencia del extracto no tuvo un efecto significativo ya que se modificó en 0.6 al igual que el tratamiento comercial al cual no se le agregó más que la “semilla” de *Pleurotus ostreatus* al igual que a todas las unidades.

La presencia de benomil en el sustrato lo modificó de 4.0 a 3.6, esta modificación de 0.4 fue aun menor que el tratamiento comercial. A pesar de esto, todos los tratamientos evaluados tuvieron una disminución del pH inicial al final del experimento, esto puede deberse en parte a los acidos orgánicos producidos por el micelio de las cepas de hongos distribuidos en el sustrato.

Tabla 31. Determinaciones de pH y porcentajes de humedad de sustrato de aserrín.

Condición	Substrato Aserrín estéril	Substrato inicial		Substrato residual	
	Tratamiento	Humedad (%)	pH inicial	Humedad (%)	pH final
1	Extracto + <i>T. aggressivum</i>	39.65	4.7	45.8	4.10
2	Extracto	38.96	4.65	44.7	4.05
4	Benomil + <i>T. aggressivum</i>	34.16	4.03	ND	ND
5	Benomil	31.38	4.08	68.8	3.66
6	Blanco positivo	38.91	4.68	48.4	3.84
7	Blanco negativo	42.18	4.75	53.1	4.13

ND: no determinado

8.6.5. Conclusiones

1. La dosis utilizada de extractos de sábila (*Aloe vera*) (0.6%) y cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) en sustrato sólido no fue lo suficientemente fuerte como para detener la velocidad de crecimiento del moho *T. aggressivum* el tiempo necesario para que las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* colonizaran el sustrato y frutificaran de manera normal.
2. La presencia del extracto promovió una ligera estimulación de la velocidad de crecimiento en la colonización y una textura mas densa del micelio en las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, así como una estimulación en la resistencia ante la presencia del moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*.
3. La presencia del extracto estimuló ligeramente la producción de basidiocarpos de ambas cepas comestibles (*Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*) en comparación con el testigo comercial y no afectó la producción y morfología de los basidiocarpos.

4. Se recomiendan hacer más pruebas con dosis mayores y diferentes alternativas de aplicación para una recomendación práctica para productores y un uso más eficiente de los extractos.
5. La presencia del extracto sin la presencia de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* promovió una estimulación de la velocidad de crecimiento micelial en la colonización y una textura más densa del micelio. La presencia del extracto estimuló ligeramente la producción de basidiocarpos en comparación con el testigo comercial. El extracto no tuvo un efecto negativo en la producción y morfología de los basidiocarpos.

8.6.6. Recomendación para la aplicación de una mezcla de extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* en substrato sólido

Debido a los resultados observados en la aplicación del extracto dual, cebolla morada – sábila (*Allium cepa* y *Aloe vera* al 0.6% de cada extracto), donde la presencia del extracto promovió una ligera estimulación de la velocidad de crecimiento en la colonización por los hongos comestibles, así como se observó una textura más densa del micelio de ambas cepas de hongos comestibles. Esto contribuyó a aumentar la resistencia de contaminación en el substrato por parte de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*.

Para obtener mejores resultados se recomienda utilizar dosis mayores de cada extracto sobre el substrato. La estrategia para su aplicación en substrato es la siguiente:

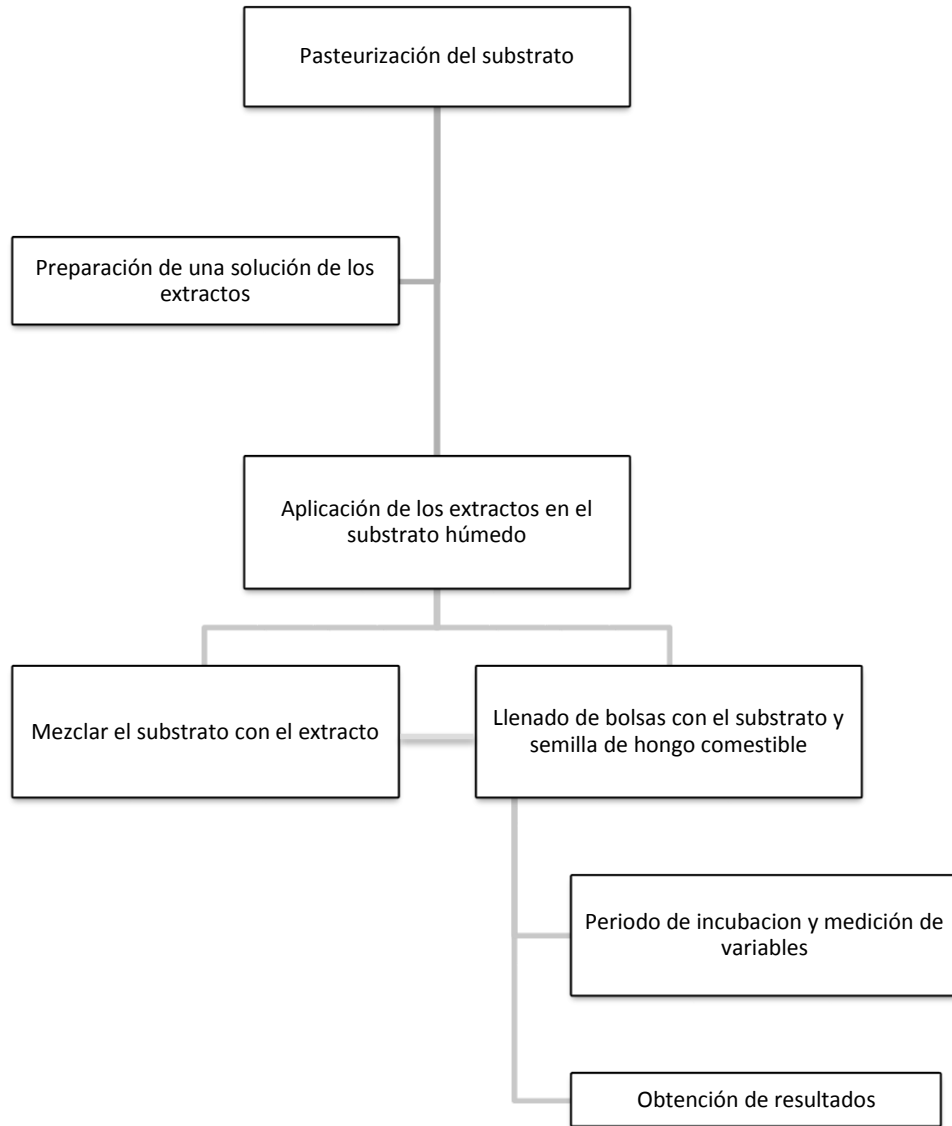


Fig. 96 Recomendación para la aplicación de la mezcla de extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*) al 1.2 % sobre sustrato sólido para el cultivo de hongos comestibles.

IX Conclusiones

1. En este estudio se aceptó la hipótesis general de que existen extractos vegetales con propiedades antifúngicas diferenciadas con la capacidad de inhibir la velocidad de crecimiento micelial y la producción de esporas producidas por *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, y que a su vez permiten el crecimiento micelial de los hongos comestibles *Lentinula* y *Pleurotus*.
2. También se aceptó la hipótesis que algunos de los extractos seleccionados no tuvieron un efecto negativo en el desarrollo de los basidiocarpos de los hongos comestibles del género *Lentinula* y *Pleurotus* en cultivo experimental.
3. El extracto de bulbo de cebolla morada (*Allium cepa*) estimuló la velocidad de crecimiento de las cepas de hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* CP-267 (59.8 %), y de *Pleurotus ostreatus* CP-50 (88 %), y a su vez aumentó la densidad micelial en su morfología colonial.
4. La mezcla de los extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%) tuvo un efecto inhibitorio significativamente diferente con respecto al testigo en la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-113, en su velocidad de crecimiento dual con las cepas de hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* CP-267 del 49%, *Pleurotus ostreatus* CP-50 del 48.4% y *Lentinula edodes* CP-7 del 50%, de manera independiente. Se observó una estimulación de la velocidad de crecimiento micelial por efecto del extracto para las tres cepas de hongos comestibles a todo lo largo del experimento.
5. Este es el primer registro del cual se tiene conocimiento donde la mezcla de dos extractos tiene una actividad inhibitoria sobre el moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, competidor en el cultivo de hongos y al mismo tiempo estimula en desarrollo de las cepas de hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* CP-267, *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7 en condiciones *in vitro*.

6. En el caso de la mezcla de extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) (0.6%) y sábila (*Aloe vera*) (0.6%) en condiciones de modulo experimental, la presencia del extracto promovió una ligera estimulación de la velocidad de crecimiento en la colonización de *Pleurotus ostratus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7, así como una textura más densa del micelio de ambas cepas. En el caso de *Pleurotus ostreatus* CP-50 se observó cierta resistencia ante la presencia del moho *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*.
7. La producción de esporas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* fue significativamente menor en presencia de la cepa *Pleurotus pulmonarius* con un 78% por efecto del extracto en comparación con las cepas de *Pleurotus ostreatus* con un 69.8% y *Lentinula edodes* con un 67.9%.
8. El extracto no tuvo un efecto negativo en la producción y morfología de los basidiocarpos de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*.
9. Se recomienda hacer más pruebas con dosis mayores y diferentes alternativas de aplicación para generar una innovación tecnológica con impacto sobre los procesos productivos de los productores y un uso más eficiente de los extractos.
10. A pesar de los prometedores resultados de este trabajo, hay que tomar en cuenta que es una de las primeras investigaciones respecto al tema. Hasta el día de hoy, no existen productos de origen natural en el mercado dirigidos al cultivo de hongos comestibles, específicamente al control del “moho verde” (*Trichoderma*). Debido a esto, se recomiendan hacer más pruebas con dosis más altas y diferentes alternativas de aplicación para la obtención de un producto final que pueda llegar a ser comercializado y recomendado en su momento, ya que aún no existe ninguna garantía de éxito en el resultado práctico a mayor escala.
11. Se recomienda realizar un estudio a fondo sobre los costos de producción y comercialización de los extractos, los diversos productos a base de estos, proveedores de materia prima, insumos, uso de equipos especializados, la obtención de un producto comercializable, así como la oferta y demanda de los mismos.

X. Estrategia para el control del “moho verde” en el cultivo de hongos comestibles funcionales y medicinales con extractos de origen vegetal

Con base en los resultados de la presente investigación, se puede plantear una estrategia que permita la aplicación de extractos de origen vegetal para el control del “moho verde” (*Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*) en el cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus*, *Lentinula*) a pequeña y gran escala.

La estrategia de aplicación de los extractos en el cultivo de hongos comestibles tiene como beneficios el utilizar los subproductos agroindustriales como sustrato en el cultivo, contribuir al aporte económico de las familias de bajos recursos mediante el ingreso por la venta de hongos comestibles funcionales y medicinales en el mercado y contribuir al mejoramiento de la producción comercial de los hongos comestibles en el país. Mediante esta estrategia se pretende apoyar el proceso de desarrollo social y económico dirigido principalmente al sector rural.

10.1. Actores de la Estrategia

Para la aplicación de esta estrategia (Fig. 97) se consideraron a actores directos e indirectos, los cuales son:

- a) Los productores y personas de diferentes ámbitos interesados en el cultivo de hongos comestibles.
- b) Los productores de las diferentes especies de plantas con propiedades antifúngicas y las personas que se dedican a la reproducción y venta en viveros.
- c) Las instituciones de investigación y organizaciones encargadas de proporcionar alternativas con proyectos de cultivo de hongos para mejorar la calidad de vida del entorno social y/o rural. Entre ellos se encuentran el Colegio de Postgraduados, Universidades, Institutos, Centros de Investigación y escuelas.
- d) El sector gubernamental a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la Secretaría de Desarrollo Rural, la Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL) y Financiera Rural que pueden llegar a brindar apoyo técnico, financiero y administrativo.
- e) Los consumidores finales beneficiados por el autoconsumo del producto final libre de agroquímicos y/o su venta en los mercados locales.

Sector académico y gubernamental

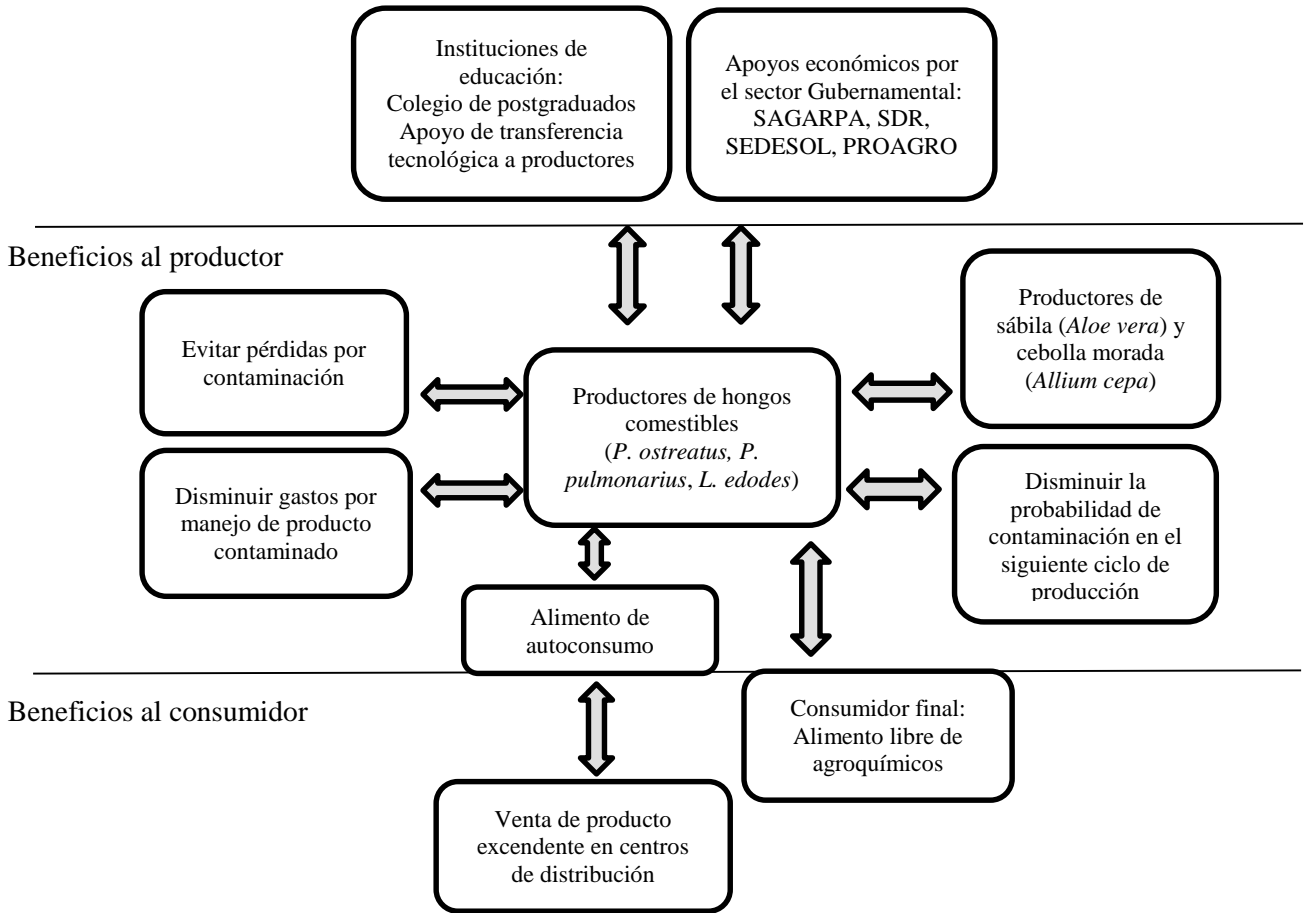


Fig. 97 Diagrama que muestra a los actores de la estrategia para el control del “moho verde” *Trichoderma* con extractos de origen vegetal.

En continuidad al presente trabajo se deben tomar en cuenta ciertas recomendaciones para obtener un extracto validado con estudios analíticos y pruebas de laboratorio que sustenten el efecto manifestado en la presente investigación.

Análisis de los extractos:

- Fragmentación de los extractos crudos por columna de sílica gel
- Identificación preliminar de los principales compuestos presentes en los extractos fragmentados por el método de cromatografía en papel
- Prueba de las fracciones de los extractos con las cepas del presente estudio en condiciones *in vitro* en busca de los mismos efectos mostrados en el presente trabajo sobre la velocidad de crecimiento micelial, tanto para el mohó *Trichoderma* como para los hongos comestibles.
- Identificación y cuantificación analítica de los compuestos presentes en los extractos por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- Aislamiento y purificación de los compuestos activos.
- Determinar las nuevas dosis para obtener el efecto deseado con los compuestos activos purificados.
- Pruebas con el material biológico *in vitro* con las nuevas dosis de compuestos activos purificados
- Analizar las formas de aplicación de los compuestos activos en sustrato sólido
- Pruebas con el material biológico en sustrato sólido con las nuevas dosis de compuestos activos purificados

Proceso de Validación de los extractos:

- Validar las muestras obtenidas para asegurarse que podrán aplicarse en diversos medios con resultados equivalentes al derivado en el presente trabajo de investigación.

Para la producción de los extractos evaluados en el presente trabajo, se sugiere realizar un análisis de costos del proceso para el cual deben considerarse diversos aspectos (Fig. 98), desde obtener un material vegetal de buena calidad hasta el proceso de los extractos.

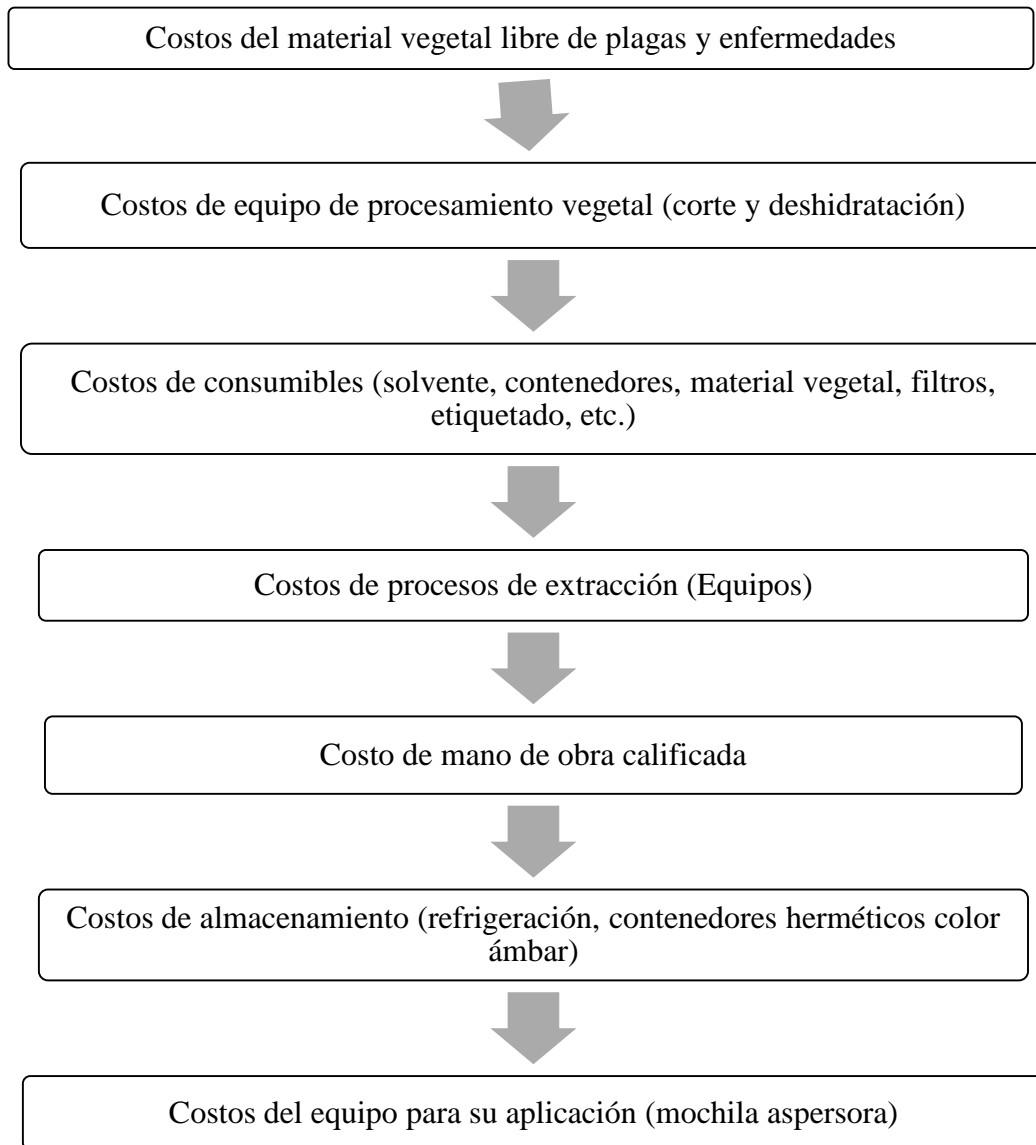


Fig. 98 Recomendación para un análisis de costes de producción de extractos de cebolla morada (*Allium cepa*) y sábila (*Aloe vera*).

XI. Literatura citada

- Albertó, E., N. Curvetto, J. Deschamps, R. González Matute y B. Lechner. 2010. Hongos silvestres y de cultivo en Argentina: historia, regiones y sistemas de producción, consumo, mercado interno y externo, legislación, oferta tecnológica e investigación y desarrollo. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales de Latinoamérica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI.* Capítulo 19, Pp.333-358. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. H. Mora. Ed. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Alcalá de Marcano, D., N. Vargas y A. Pire. 2005. Efecto de los extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista de la Facultad de Agronomía* 22: 315-323.
- Alexopolus, C. J. y C. W. Mims. 1979. *Introductory Mycology*. 3a ed. John Wiley & Sons. 632 pp.
- Aliviano, D. S. y C. S. Aliviano. 2009. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10: 106-121.
- Anaya, A. L. 2003. *Ecología Química*. Ed. Plaza y Valdés. 343 pp.
- Argumedo-Delira, R., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerato y J. J. Peña-Cabriales. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de Contaminación Ambiental* 25: 257-269.
- Astiasarán, I., B. Lasheras, A. Ariño y J. Martínez. 2003. *Alimentos y Nutrición en la Práctica Sanitaria*. Ed. Díaz de Santos. Pp. 82-83.
- Baars, J., J. Rutjens, W. de Kogel y J. Baar. 2008. The use of plant extracts to control the major disease and pest in mushroom cultivation. *Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII. Proceedings of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science*. Pp. 602-614.
- Baars, J. 2008. Plant extracts to combat: dry bubble. *Mushroom Business* 29: 26-27.
- Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Swis. Society of Food Science and Technology* 37: 263-268.

- Bernabé-Gonzalez, T. y M. Cayetano-Catarino. 2010. Investigación y producción de hongos comestibles en Guerrero, México. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales de Latinoamérica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Capítulo 10, Pp.141-150. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. H. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Bernal-Alcocer, A., J. F. Zamora-Natera, G. Virgen-Calleros y R. Nuño-Romero. 2005. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 140-146.
- Bueno, F. S. 2010. The production and consumption of edible and medicinal mushrooms in Brazil. Capítulo 20. Pp. 359-379. *In: Hacia un desarrollo sostenible de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Silo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4
- Cárdenas, N., S. Pérez, M.A. Zavala, J. R. Aguirre y C. Pérez. 2005. Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspegillus flavus* Link. *Revista mexicana de ciencias farmaceuticas* 36: 21-26.
- Castillo, S., D. Navarro, P. J. Zapata, F. Guillen y D. Valero. 2010. Antifungal efficacy of *Aloe vera in vitro* and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and Technology* 57: 183-188.
- Celis, A., C. Mendoza, M. Pachón, J. Cardona, W. Delgado y L. E. Cuca. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26: 97-106.
- Céspedes, C. L., J. G. Avila, A. Martínez, B. Serrato, J. C. Calderón-Mugica y R. Salgado-Garciglia. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54: 3521-3527.
- Chang, H. T., Y. H. Cheng, C. L. Wu, S. T. Chang, T. T. Chang y Y. C. Su. 2008. Antifungal activity of esencial oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant patogenic fungi. *Bioresource Technology* 99 (14):6266-6270.

- Chang-Liang, H., F. Ben-Dong, S. Hai-Qing, J. Xiao-Lin y W. Xu-Bin. 2011. Fumaric acid, an antibacterial component of *Aloe vera* L. *African Journal of Biotechnology* 10: 2973-2977.
- Chang, S. T. y P. G. Miles. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional value, Medicinal effect, and environmental impact*. 2nd ed. Ed. CC Press. 451 pp.
- Chimey, C. A. y M. E. Holgado. 2010. Los hongos comestibles silvestres y cultivados en Perú. Capítulo 21, Pp. 381-395. In: *Hacia un desarrollo sostenible de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Silo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora.
- Colina, A., A. Ferrer y L. Urribarri. 2009. Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. *Revista Tecnológica de la Universidad de Zulia* 32: 152-159.
- Cotton, C. M. 1996. *Ethnobotany: principles and applications*. Ed. Wisley. P.
- Davicino, R., M. Mattar, Y. Casali, S. Correa, E. Pettenati y B. Micalizzi. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología* 2: 247-251.
- Deans, S.G. y P.G. Waterman. 1993. *Biological activity of volatil oils*. In: Hay R.K. M. y P.G. Waterman. *Volatil oil Crops: their biology, biochemistry and production*. Harlow, Longman Scientific and Technical, Essex. Pp. 97-111.
- De León, R. 2010. Producción comercial de *Pleurotus* spp. y *Lentinula edodes* en Guatemala. Capítulo 26, Pp. 465-487. In: *Hacia un desarrollo sostenible de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Silo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Dere, S., T. Günes y R. Sivaci. 1998. Spectrophotometric Determination of chlorophyll – A, B and Total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Tr. *Journal of Botany* 22: 13-17.
- Downes, K., G. A. Chope y L. A. Terry. 2009. Effect of curing at different temperatures on biochemical composition of onion (*Allium cepa* L.) skin from thee freshly cured and cold stored UK-grown onion cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 54: 80-86.

- El-Sayed, K., S. Mansour, S. Farouk y S. A. Ross. 2000. New Quinoline Alkaloids from *Ruta chalepensis*. *Journal of Natural Products* 63:995-997.
- Escobar, J. L. 2007. El desarrollo sustentable en México (1980-2007). *Revista Digital Universitaria*. DGSCA-UNAM. 9: 3-13.
<http://www.revista.unam.mx/vol.9/num3/art14/art14.pdf>.
- Ferrán, J. L. 1969. *Como cultivar el champiñón, la trufa y otros hongos*. Biblioteca Agrícola Aedos. 188 pp.
- Figueroa, R. y B. Martínez. 2004. *Conocimientos de herbolaria y aplicaciones en la región del Tenzto, Puebla*. GIMTRAP. Folleto. 19 pp.
- Fletcher, J. T., P.F. White y R. H. Gaze. 1986. *Champiñones, control de las enfermedades y plagas*. Acribia. P. 159.
- Gaitán-Hernández, R., D. Salmones, R. Pérez y G. Mata. 2009. Evaluación de la eficiencia biológica de cepas de *Pleurotus pulmonarius* en paja de cebada fermentada. *Revista Mexicana de Micología* 30: 63-71.
- García, I. E. y M. B. Vázquez. 2002. *Catálogo de plantas medicinales del hospital integral con medicina tradicional de Coxcatlán*. Gobierno del Estado de Puebla. Secretaría de Salud. Plan Puebla-Panamá.
- García, R. M. 2003. *Cultivo de Setas y Trufas*. 4ª ed. Mundi-Prensa. 239 pp.
- García, R. M. 2006. *Manual para buscar Setas*. 6ª ed. Mundi-Prensa. 454 pp.
- García-Camarillo, E. A., M. Y. Quezada-Viay, J. Moreno-Lara, G. Sánchez-Hernández, E. Moreno-Martinez y M. C. J. Pérez-Reyes. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) y orégano (*Origanum vulgare L.*) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (F.A.Wangenh) K. Koch] *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 8-12.
- González, R., D. Figlas y N. Curvetto. 2010. Cultivo de *Agaricus bisporus* usando un sistema a pequeña escala para el compostado de mezclas a base de cáscara de semilla de girasol. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales de Latinoamérica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Capítulo 8, Pp.111-123. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. H. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.

- Grindlay, D. y T. Reynolds. 1986. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology* 16: 117-151.
- Guerrero, R. E., S. Solís, F. Hernández, A. Flores, V. Sandoval y D. Jasso. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.Fr.) Keissl. *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Fitopatología* No. 001. 25: 48-53.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velázco y L. Guzmán-Dávalos. 2002. *El cultivo de los hongos comestibles*. Instituto Politécnico Nacional. 245 pp.
- Hale, A. L., M. Meepagala, A. Oliva, G. Aliotta y S. O. Duke. 2004. Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52: 3345-3349.
- Hamman, J. H. 2008. Composition and applications of *Aloe vera* Leaf gel. *Molecules*. 13: 1599-1616.
- Hernández-Albiter, R.C., L. L. Barrera-Necha, S. Bautista-Baños y L. Bravo-Luna. 2007. Antifungal potencial of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 180-185.
- Hobbs, Ch. 1995. *Medicinal Mushrooms. An exploration of Tradition, Healing & Culture*. Ed. Botanica Press. 251 pp.
- Huang, Y. 2007. Imported mushroom products in China. Mushroom Business. *International independent magazine for growers* Nr.26 December.
- Irkin, R. y M. Korukluoglu. 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. *African Journal of Biotechnology* 4:384-387.
- Izco, J. E. Barreno, M. Brugués, M. Costa, J. A. Devesa, F. Fernandez, T. Gallardo, X. Lliona, C. Prada, S. Talavera y B. Valdes. 2004. *Botánica*. 2ª ed. McGrawHill. Pp.169-189.
- Jasso de Rodríguez, D., D. Hernández-Castillo, R. Rodríguez-García y J. L. Angulo-Sánchez. 2005. Antifungal *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 21: 81-87.
- Jasso de Rodríguez, D., D. Hernández-Castillo, J. L. Angulo-Sánchez, R. Rodríguez-García, J. A. Villareal y R. H. Lira-Saldivar. 2007. Antifungal activity *in vitro* of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxisporum*. *Industrial Crops and Products* 25: 111-116.

- Kordali, S., A. Cakir, H. Ozer, R. Cakmakci, M. Kesdek y E. Mete. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresource Technology* 99: 8788-8795.
- Kredics, L., L. García, S. Naeimi, D. Czifra, P. Urbán, L. Manczinger, C. Vágvölgyi y L. Hatvani. 2010. A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* Pp. 295-305. A. Mendez-Vilas Formatex.
- Kurtzman, R. H. 2010. The why and how of oyster mushroom cultivation: a worldwide perspective. In: *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales de Latinoamerica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Capítulo 31, pp.609-644. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. H. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Kyung, K. H. 2011. Antimicrobial properties of *Allium* species. *Current opinion in Biotechnology* 23: 1-6.
- Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A* 21: 3-22.
- Lanzotti, V., A. Romano, S. Lanzuise, G. Bonanomi y F. Scala. 2012. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry* 74: 133-139.
- Lizcano, M. C. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotium*. Tesis Microbiología Agrícola. Pontificada Univ. Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogota. 71 pp.
- Lux-Endrich, A. y B. Hock. 2005. Allelopathy. 619 pp. In: *Plant Toxicology* Eds. B. Hock and F. E. Erich. Macel Dekker.
- Mahmoud, Y. A., M. K. Ebrahim y M. Aly. 2004. Influence of some plant extracts and microbioagents on some physiological traits of faba bean infected with *Botrytis fabae*. *Turk Journal of Botany* 28: 519-528.
- Martínez, I. 2000. Las Plantas Medicinales. *Revista Cubana de Oncología* 16: 66.
- Martínez-Carrera, D. y L. López-Martínez de Alva. 2010. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009

- Capítulo 8, Pp.513-551. *In: Hacia un desarrollo sostenible de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Silo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: El sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capitulo 6.1, 20 Pp. *In: El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez- Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR-CONACYT, México, D.F.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez y Y. Mayett. 2004. *Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales y su contribución a la alimentación mexicana. El shiitake*. Colegio de Postgraduados. 44 pp.
- Martínez-Carrera, D. 1998. *Oyster mushrooms*. McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology. 1999. New York. Pp.242-245. ISBN 0-07-052625-7.
- Martínez-Carrera, D. C. 1995. Classical and molecular characterization of the *Agaricus bitorquis* complex. PhD. Thesis, University of London. King College, Londres.
- Martínez-Carrera, D., R. Leben, P. Morales, M. Sobal y A. Larqué-Saavedra. 1991. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. *Ciencia y desarrollo* 14: 33-43.
- Martín-Lagos, R. A., M. F. O. Serrano y M. D. Ruiz-López. 1992. Comparative study by gas chromatography-mass spectrometry of methods for the extraction of sulfur compounds in *Allium cepa* L. *Food Chemistry* 44: 305-308.
- Masschelein-Kleiner, L. 2004. *Los solventes*. Centro cultural de conservación y restauración. Santiago de Chile. Pp. 149. ISBN: 956-244-166-0.
- Mata, G., D. Salmones y R. Gaitán-Hernández. 2010. Basic and Applied research on mushroom cultivation at the Institute of Ecology, Xalapa, Mexico. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales de Latinoamérica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Capítulo 3, Pp.31-44. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. H. Mora. Ed. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.

- Mohammed, E., C. Pérez, A. Sid, M. E. Requena y M. E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Morales, P. y D. Martínez-Carrera. 1990. Cultivation of *Lentinula edodes* in México. *Micología Neotropical Aplicada* 3: 13-17.
- Morales, P. y D. Martínez-Carrera. 1991. Bursera sawdust as a substrate for *shiitake* cultivation. *Micología Neotropical Aplicada* 4: 41-47.
- Morales, P., D. Martínez-Carrera y W. Martínez-Sánchez. 1991. Cultivo del *shiitake* sobre diversos substratos en México. *Micología Neotropical Aplicada* 4: 75-81.
- Morales P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez-Carrasco, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. De Lima, S. Villa, E. Montiel y D. Martínez-Carrera. 2010. Los hongos comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología y desarrollo del sistema de producción-consumo. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales de Latinoamérica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Capítulo 7, Pp.91-110. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. H. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Narváez, P y P. Martínez. 2004. Taller de Plantas Medicinales. *Folleto*. 13 pp.
- Nidiry, E. S., G. Ganeshan y A. N. Loksha. 2011. Antifungal activity of some extractives and constituents of *Aloe vera*. *Research Journal of Medicinal Plant* 5: 196-200.
- Oei, P. 1991. *Manual of mushroom cultivator*. Tool Foundation, Amsterdam. 249 pp.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., y Vuorela, P. 2000. Antimicrobial activity of some courmain containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 299-305.
- Oliva, A., E. Lahoz, R. Contillo y G. Aliotta. 1999. Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 25: 519-526.
- Oliva, A., K. M. Meepagala, D. E. Wedge, D. Harries, A. L. Hale, G. Aliotta, y S. O. Duke. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 890-896.
- Pinto, C. M., L. A. Maffia, W. D. Casali y A. A. Cardoso. 1998. *In Vitro* Effect of plant leaf extracts on mycelial growth and sclerotial. *Journal of Phytopathology* 146: 421-425.

- Przybylowicz, P. y J. Donoghue. 1990. *Shiitake Growers Handbook. The art and science of Mushroom Cultivation*. Ed. Kendall/Hunt Publishing Company. 217 pp.
- Quélet, L. 1872. Les champignons du Jura et des Vosges. *Memories de la Societé d'Emulation de Montbéliard* 5: 43-332.
- Ramírez, A. P. 2006. Cepas comerciales como una estrategia para el desarrollo de la producción rural de hongos comestibles (*Pleurotus*): Mejoramiento genético emplendo marcadores y segregación meiótica. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. P. 122.
- Reynolds, T. y A. C. Dweck. 1999. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 68: 3-37.
- Rodríguez, O. S. y H. Lira. 2006. *Creación de valor en un centro de investigación y desarrollo tecnológico*. Caso: Extractos vegetales de plantas de las zonas áridas, una opción a los agroquímicos y antibióticos sintéticos. Foro Consultivo Científico y Tecnológico. Pp. 32-34.
- Rosca-Casian, O., M. Parvu, L. Vlase y M. Tamas. 2007. Atifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia* 78: 219-222.
- Roselloí, J. 2006. Extractos Naturales Utilizados en Agricultura Ecológica. *Folleto*. 12 pp.
- Saks, Y. y R. Barkai-Golan. 1995. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology and Technology* 6:159-165.
- Salazar, G. 2008. El cilantro (*Coriandrum sativum*) como planta medicinal emergente. *inFARMAte* Año 3. No. 17.
- Samuels, G. J., S. L. Dodd, W. Gams, L. A. Castlebury y O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycología* 94: 146-170.
- Sánchez, C. 2009. Lignocelulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:185-194.
- Sánchez, J. E. y D. J. Royse. 2002. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* 2ª ed. Ed. Limusa. 290 pp.
- Sánchez, J. E., E. H. Andrade y M. Cohello. 2010. Los hongos comestibles en el sureste de México. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales de Latinoamerica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Capítulo 11, Pp.151-168. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P.

- Morales & V. H. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Saxena, J., C. Munimbazi, y L. B. Bullerman. 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochatoxin A production. *International Journal of Food Microbiology* 29:34.
- Shon, M. Y., D. Ch. Sang, G. G. Kahng, S. H. Nam y N. Sung. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scaening activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food and Chemistry Toxicology* 42: 659-666.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta y D. Martínez-Carrera. 2007. El centro de recursos genéticos de hongos comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1. Pp. 27-40. *In: El cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata and H. Leal. ECOSUR, México, D.F.
- Stamets, P. 2000. *Growing gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3ª ed. Ten Speed Press. 574 pp.
- Stamets, P. y J. S. Chilton. 1983. *The mushroom cultivator*. Ed. Agarikon Press. 415 pp.
- Suárez-Jiménez, G. M., M. O. Cortez-Rocha, E. C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, M. Plascencia-Jatomea y F. J. Cinco-Moroyoqui. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb and Fumonisin B1 production. *Revista Mexicana de Fitopatología* No. 2 (25): 134-142.
- Tajkarimi, M. M., S. A. Ibrahim y D. O. Cliver. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21: 119-1218.
- Tellez, M., R. Estell, E. D. Fredrickson, J. Powell, D. Wedge, K. Schader y M. Kobaisy. 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): Volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. *Journal of Chemical Ecology* 27: 2263-2273.
- Thomas, L., S. Leung, M. Cumming, M. Shaw, N. Albert, J. McCallum y M. McManus. 2011. Genotypic variation in sulphur assimilation and metabolism of onion (*Allium cepa* L.). II: Characterisation of ATP sulphurylase activity. *Phytochemistry* 72: 888-896.
- Tu, C.C. and Liao, Y. M. 1989. Mayor disease of cultivated mushroom and their control in Taiwan. *Mushroom Science XII* 2: 615-626.
- Ulrike, L. T., H. J. Niedermeyer y W. D. Jülich. 2005. The pharmacological potential of Mushrooms. *eCAM* 2(3):285-299.
- Valencia, C. 1995. *Fundamentos de Fitoquímica*. Ed. Trillas. 235 pp.

- Vellunti, A., V. Sanchis, A. J. Ramos, J. Egido y S. Marin. 2003. Inhibitory effect of cinnamom, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisim B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 89: 145-154.
- Wang, H. X. y B. Ng. 2004. Isolation of Allicepin, a novel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs. *Journal of Peptide Science* 10: 173-177.
- Yang, J., K. J. Meyers, J. Van der Heide y L. RuiHai. 2004. Varietal Differences in Phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52: 6787-6793.
- Zapata, R., M. E. Sanabria y D. A. Rodríguez. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de *Cardón lefaria* (*Cereus deficiens* OTTO & DIERT). *Interciencia* 28: 302-306.
- Zapata, P. J., D. Navarro, F. Guillén, S. Castillo, D. Martínez-Romero, D. Valero y M. Serrano. 2013. Characterisation of gels from different *Aloe* spp. As antifungal treatment: Potential crops for industrial applications. *Industrial Crops and Products* 42: 223-230.

XII. ANEXOS

**Pruebas para estandarizar las dosis de diversos los diversos
extractos**

ANEXO I

Experimento de propiedades antifúngicas *in vitro* con extractos en medio de cultivo

A partir de los resultados obtenidos en la prueba de sensidiscos, se decidió probar dosis mayores a 10 mg/ml, así como también se realizó una selección de las plantas que tuvieron mejor efecto inhibitorio para repetir la exposición de *Trichoderma* a los extractos. Se realizó una nueva selección de plantas con propiedades antifúngicas.

Material biológico

Para las pruebas de propiedades antifúngicas se seleccionaron dos cepas de mohos *Trichoderma* y dos cepas de hongos comestibles (Tabla 1).

Tabla 40. Selección de cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* utilizadas en la evaluación de diversos extractos vegetales.

Clave de la Cepa	Especie	Origen del aislado	Procedencia
CPM-109	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal, Xalapa, Ver.
CPM-112	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal Xalapa, Ver.
CP-50	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Paja de cebada	Alemania
CP-7	<i>Lentinula edodes</i>	-	Hong Kong

Material vegetal

Se adquirió 1kg de planta fresca de diversas plantas (Tabla 2) en el Jardín Etnobotánico de San Andrés Cholula Puebla, las cuales fueron cultivadas en compost natural, elaborado *in situ*. Con las plantas se realizó una limpieza superficial en seco, con el fin de eliminar plantas ajenas e insectos. Durante 15 días se secaron a temperatura ambiente a la sombra. Una vez deshidratado el material se tomó el peso seco y se fragmentó el material en trozos de aproximadamente 1 cm de largo.

Tabla 41. Selección de plantas para la evaluación en medio de cultivo.

Nombre común	Nombre científico
Cebolla Hojas Cebolla Bulbo	<i>Allium cepa</i>
Ruda	<i>Ruta graveolens</i>
Col	<i>Brassica oleracea</i>
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>
Nopal	<i>Opuntia</i> sp.
Sábila	<i>Aloe vera</i>

Obtención del extracto

Se realizó una prueba con una concentración de 10 mg/ml de extracto distribuida en el medio de cultivo. Se realizaron nuevos extractos crudos a partir de 1 kg de planta fresca con solvente de etanol al 96 °GL y se obtuvo el rendimiento (Tabla 3). Se pesaron los extractos correspondientes y se agregó etanol al 96°GL para su resuspensión. Debido a que la resuspensión del extracto no fue completa se peso el remanente para obtener la dosis real utilizada (Tabla 4) con un promedio de 73.77 mg en 10 ml de medio de cultivo.

Una vez preparadas las cajas de petri se sembraron con las cepas seleccionadas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* y de las cepas comestibles. En el caso de los hongos comestibles (Fig. 1), se observó que las cepas CP-50 de *Pleurotus ostreatus* y CP-7 de *Lentinula edodes*, fueron fuertemente inhibidas en la dosis de 10 mg/ml en el medio de cultivo.

Tabla 42. Rendimientos obtenidos para 1 kg de planta en fresco con extracto de etanol.

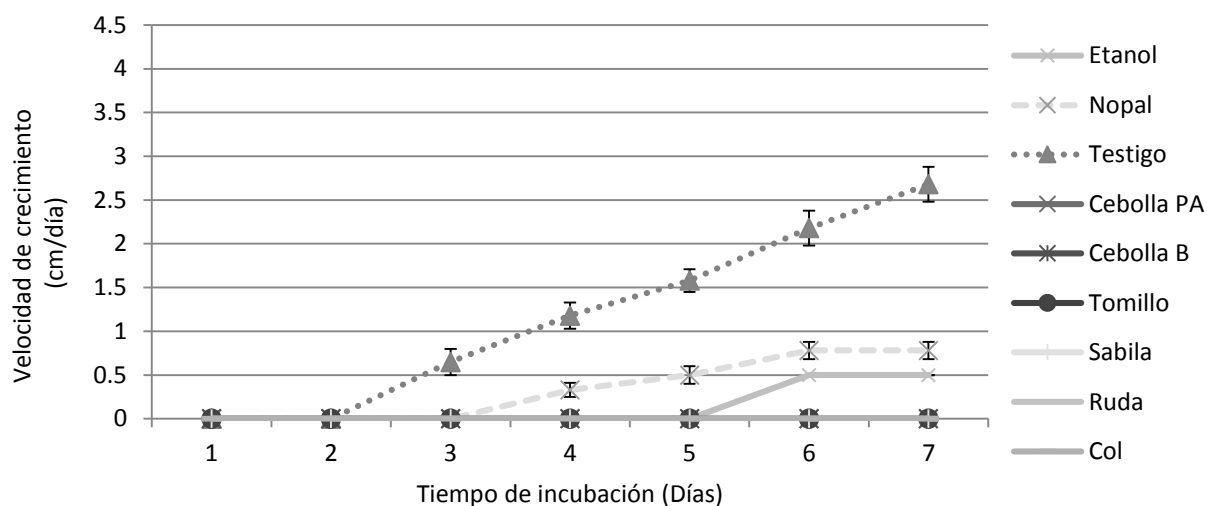
Planta	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Rendimiento (g)
Cebolla (<i>Allium cepa</i>) parte aérea	1,340	160	22.7
Cebolla (<i>Allium cepa</i>) bulbo	1,245	218	15.8
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	1,090	312	27.58
Col (<i>Brassica oleracea</i>)	1000	150	17.56
Sábila (<i>Aloe vera</i>)	1,748	152	7.96
Nopal (<i>Opuntia</i>)	660	124	6.53
Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	1,098	345	34.67

En el caso de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* evaluadas, todos los extractos inhibieron el desarrollo micelial al 100 %, con excepción del extracto de nopal (Fig. 1), con un crecimiento del 58% para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y del 72% para la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 a los 5 días. En esta prueba se observó una interferencia del solvente con respecto al testigo en todas las cepas ya que no se observó crecimiento micelial en el tratamiento del testigo con solvente. Esto pudiera

deberse a una alta sensibilidad de las cepas a la presencia de etanol en el medio de cultivo. El extracto de nopal fue el único que no presentó una inhibición a pesar de la presencia del solvente. Esto puede deberse a la presencia de compuestos del extracto de nopal que pudiesen estimular el crecimiento de las cepas a pesar de la presencia del solvente.

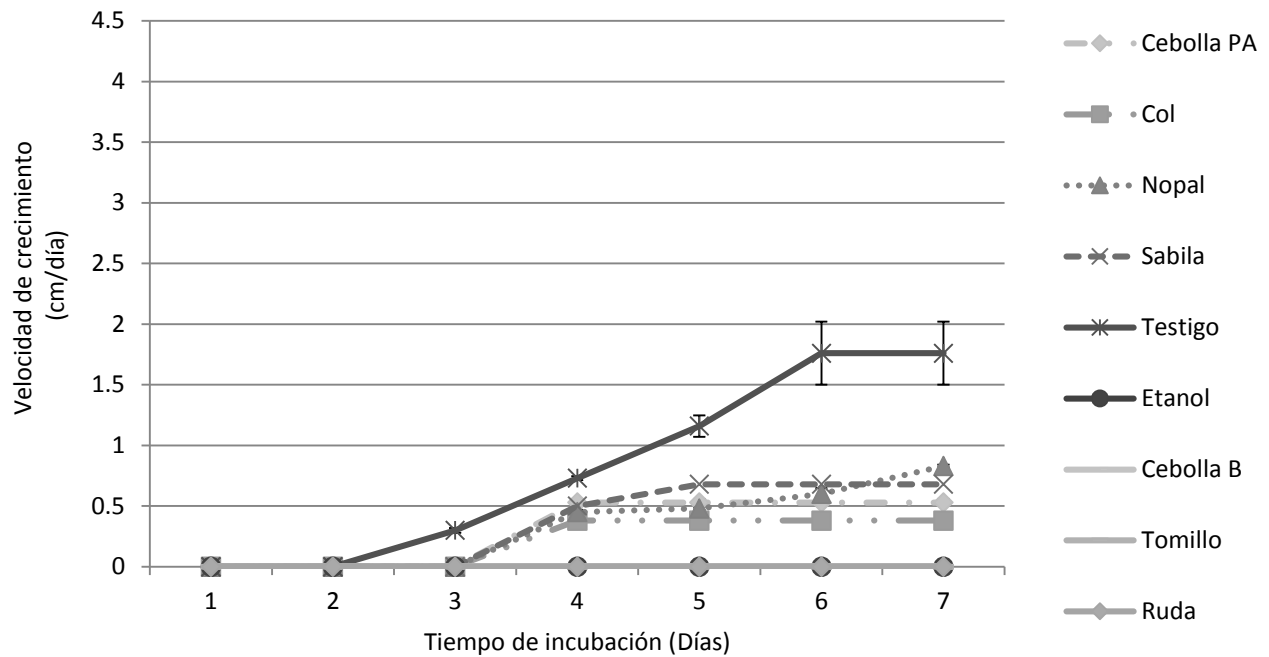
Tabla 43. Concentración real de los extractos utilizados para 10 mg/ml.

Planta	Peso Compuesto	Remanente	Compuesto en el medio (g)	1200 mg para 12 cajas de petri	
				mg totales	mg por caja
Cebolla (<i>Allium cepa</i>) parte aérea	1.2453	0.5098	0.7355	735.5	61.291
Cebolla (<i>Allium cepa</i>) bulbo	1.274	0.4903	0.7837	783.7	65.308
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	1.2105	0.0902	1.1203	1120.3	93.358
Col (<i>Brassica oleracea</i>)	1.2484	0.5261	0.7223	722.3	60.191
Sábila (<i>Aloe vera</i>)	1.2233	0.2253	0.998	998	83.166
Nopal (<i>Opuntia</i>)	1.2366	0.0903	1.1463	1146.3	95.525
Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	1.2381	0.547	0.6911	691.1	57.591



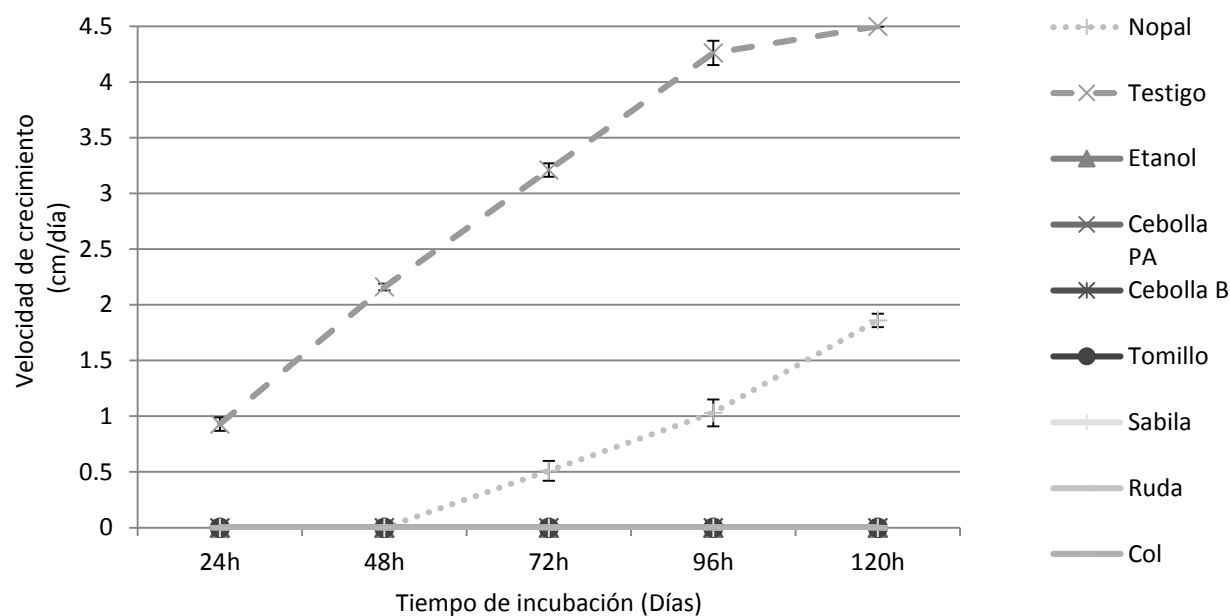
	Tiempo de incubación						
	1	2	3	4	5	6	7
Etanol	0	0	0	0	0	0.5	0.5
Nopal	0	0	0	0.33±0.15	0.5±0.1	0.78±0.1	0.78±0.1
Testigo	0	0	0.65±0.15	1.18±0.15	1.58±0.13	2.18±0.2	2.68±0.2
Cebolla PA	0	0	0	0	0	0	0
Cebolla B	0	0	0	0	0	0	0
Tomillo	0	0	0	0	0	0	0
Sábila	0	0	0	0	0	0	0
Ruda	0	0	0	0	0	0	0
Col	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 99. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50, con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo EMA con solvente etanol 96°Gl. ANOVA Tukey $\alpha= 0.05$



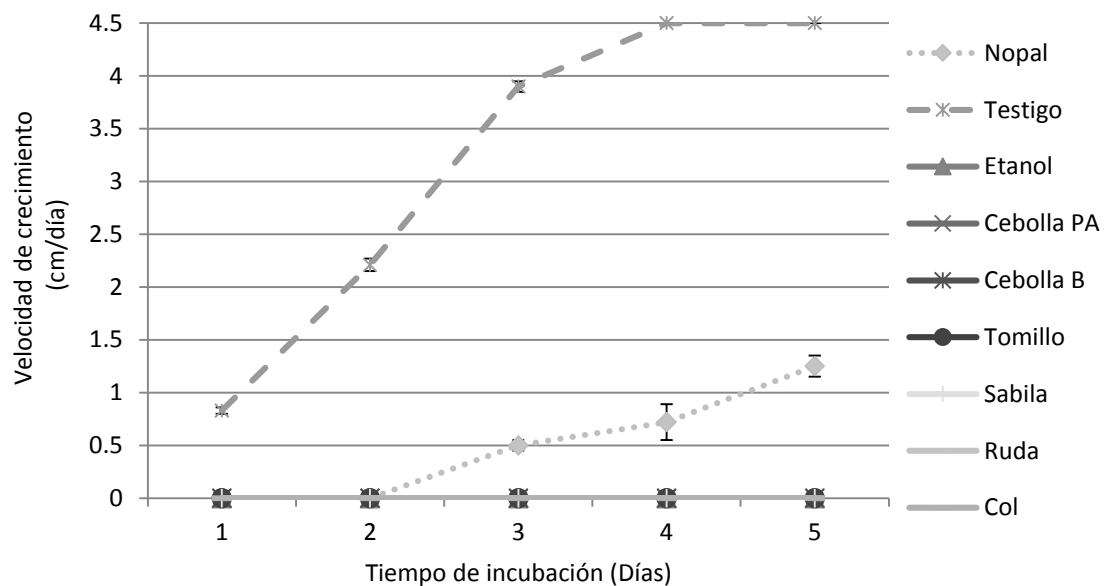
Días	1	2	3	4	5	6	7
Cebolla PA	0	0	0	0.53±0.03	0.53±0.03	0.53±0.03	0.53±0.03
Col	0	0	0	0.38±0.04	0.38±0.04	0.38±0.04	0.38±0.04
Nopal	0	0	0	0.45±0.02	0.48±0.01	0.6±0.05	0.83±0.01
Sábila	0	0	0	0.5±0.1	0.68±0.04	0.68±0.04	0.68±0.04
Testigo	0	0	0.3±0.02	0.73±0.01	1.16±0.08	1.76±0.26	1.76±0.26
Etanol	0	0	0	0	0	0	0
Cebolla PA	0	0	0	0	0	0	0
Cebolla B	0	0	0	0	0	0	0
Tomillo	0	0	0	0	0	0	0
Ruda	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 100. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Lentinula edodes* CP-7 con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo EMA con solvente etanol 96°Gl. ANOVA Tukey $\alpha= 0.05$



Días	1	2	3	4	5
Nopal	0	0	0.51±0.09	1.03±0.1	1.86±0.06
Testigo	0.93±0.06	2.16±0.03	3.21±0.06	4.26±0.1	4.5±0
Etanol	0	0	0	0	0
Cebolla PA	0	0	0	0	0
Cebolla B	0	0	0	0	0
Tomillo	0	0	0	0	0
Sábila	0	0	0	0	0
Ruda	0	0	0	0	0
Col	0	0	0	0	0

Fig. 101. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Trichoderma aggressivum f. europaeum* CPM-109 con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo PDA con solvente etanol 96°Gl. ANOVA Tukey $\alpha= 0.05$



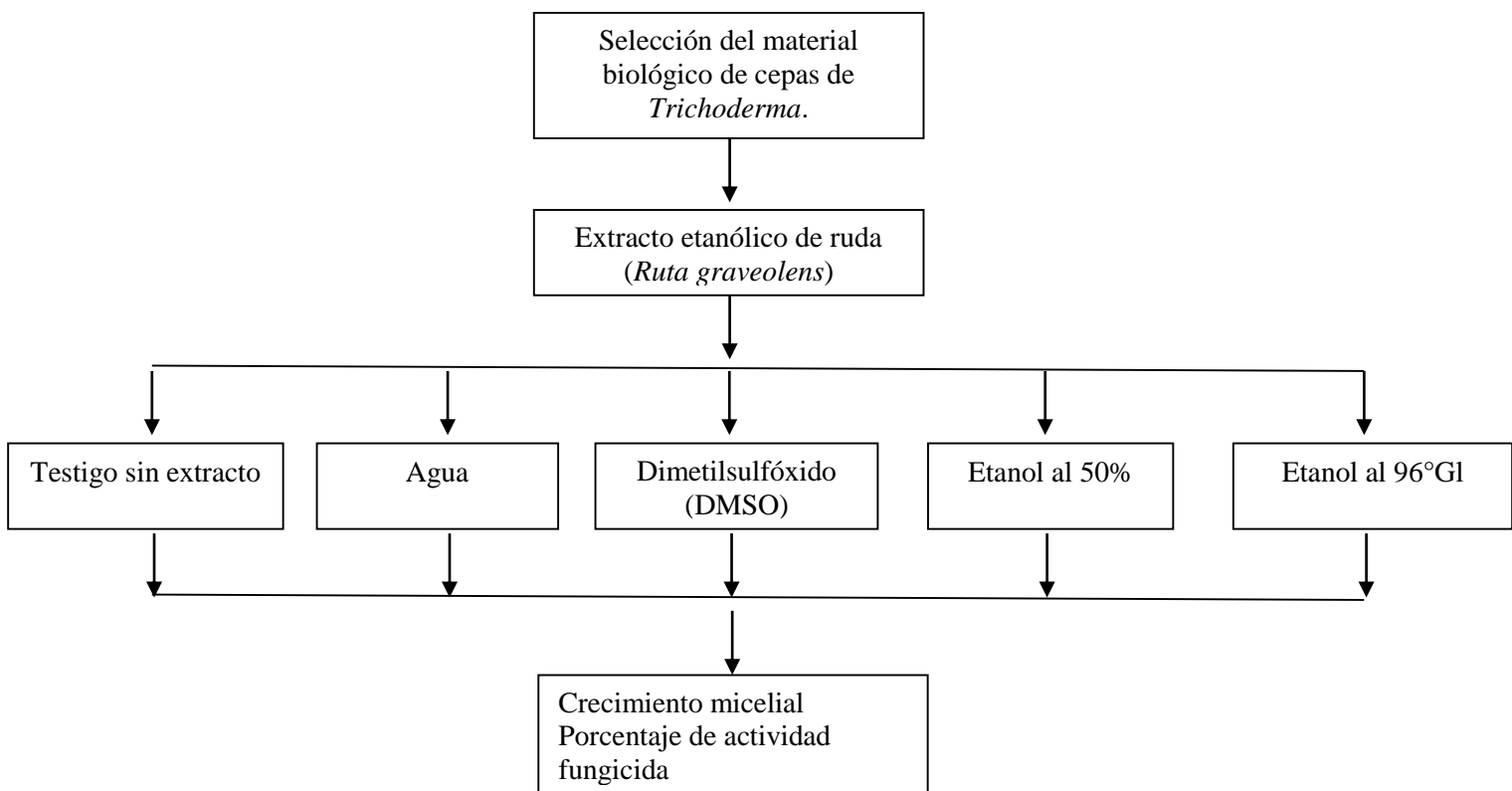
	Tiempo de incubación				
	1	2	3	4	5
Nopal	0	0	0.5±0.05	0.72±0.17	1.25±0
Testigo	0.83±0.03	2.21±0.06	3.9±0.05	4.5±0	4.5±0
Etanol	0	0	0	0	0
Cebolla PA	0	0	0	0	0
Cebolla B	0	0	0	0	0
Tomillo	0	0	0	0	0
Sábila	0	0	0	0	0
Ruda	0	0	0	0	0
Col	0	0	0	0	0

Fig. 102. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 con dosis de 10 mg/ml en medio de cultivo PDA con solvente etanol 96°Gl. ANOVA Tukey $\alpha= 0.05$

ANEXO II

Evaluación de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en diferentes solventes

Debido a que en el ensayo anterior se observó que no hubo una resuspensión total del extracto en el solvente, se procedió a evaluar diferentes solventes para una resuspensión óptima del extracto. Los solventes a evaluar fueron agua, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol al 50%, etanol al 96% y los testigos correspondientes. La concentración evaluada fue de 6 mg/ml de medio de cultivo. Se evaluó crecimiento micelial de las cepas (Tabla 5).



Se realizó un análisis de varianza ANOVA Tukey $\alpha = 0.05$ con 3 réplicas

Obtención del extracto

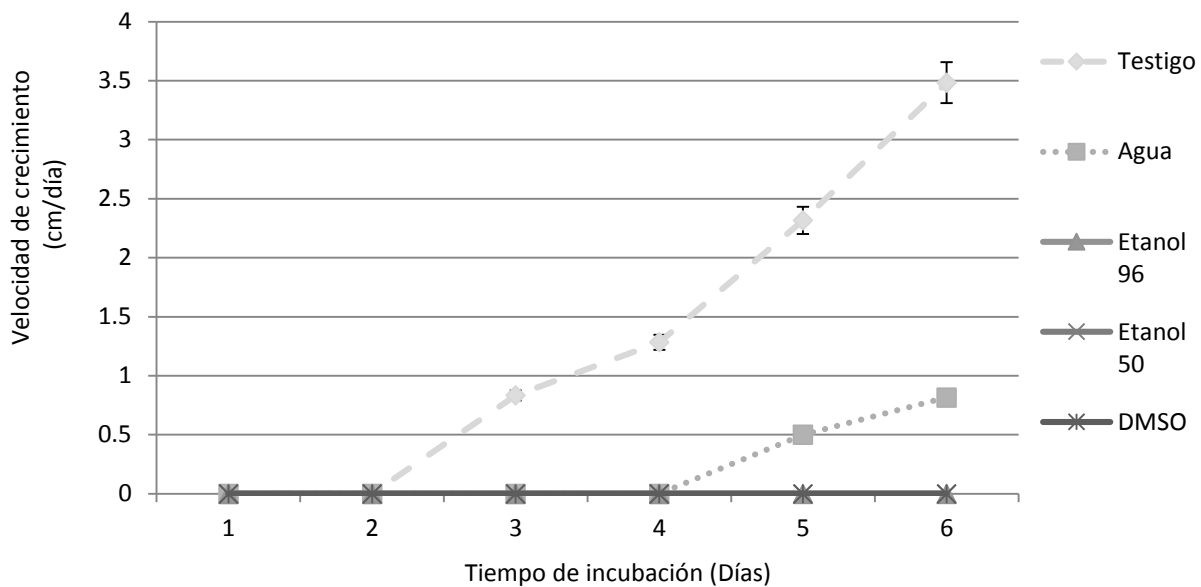
Se utilizó la técnica de maceración en frascos de vidrio de 3.78 L de capacidad. Se colocó el material deshidratado en un recipiente de vidrio y se agregaron aproximadamente 2 L de solvente etanol al 96 °GL con el objetivo de cubrirlo completamente, por 24 h. Se decantó y filtró con papel filtro Whatman No. 40. Tras cubrirse nuevamente con solvente, el material se maceró por otras 24 h para un segundo y un posterior tercer filtrado. El solvente se evaporó a

temperatura ambiente con ayuda de un ventilador y a la sombra, obtenido el rendimiento de los extractos finales, después de su secado total a temperatura ambiente, se les mantuvo en congelación a -4°C hasta su uso.

Debido a que el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) obtuvo un mayor rendimiento, se seleccionó para realizar la presente prueba. Se agregó etanol al 96°Gl al extracto hasta disolverlo y posteriormente se agregó al medio de cultivo PDA tibio en una concentración de 10 mg/ml.

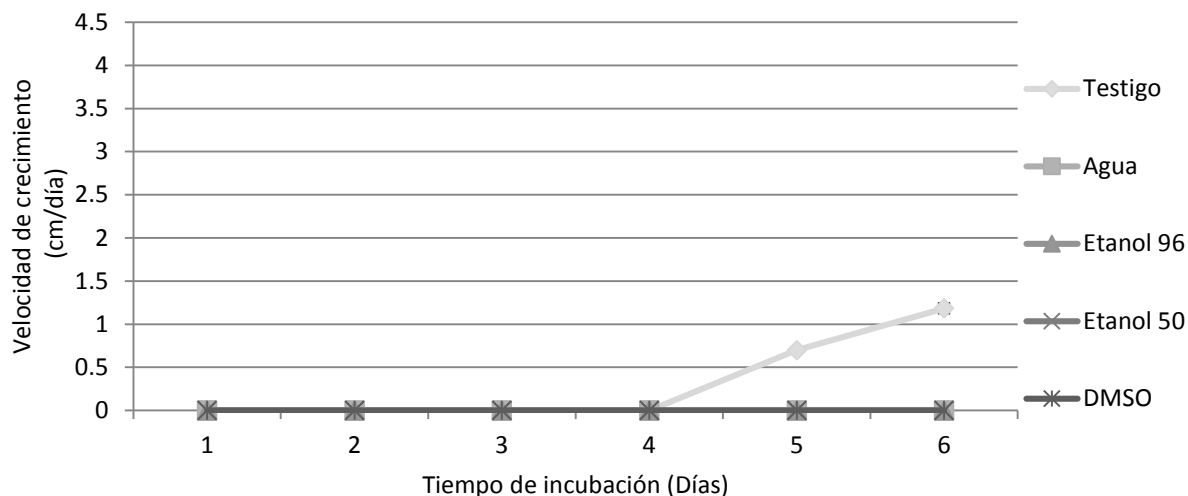
Tabla 44. Selección de cepas en estudio.

Clave de la Cepa	Especie	Origen del aislado	Procedencia
CPM-109	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal, Xalapa, Ver.
CPM-112	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Compost de <i>Agaricus</i>	El Riojal Xalapa, Ver.
CP-50	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Paja de cebada	Alemania
CP-7	<i>Lentinula edodes</i>	-	Hong Kong



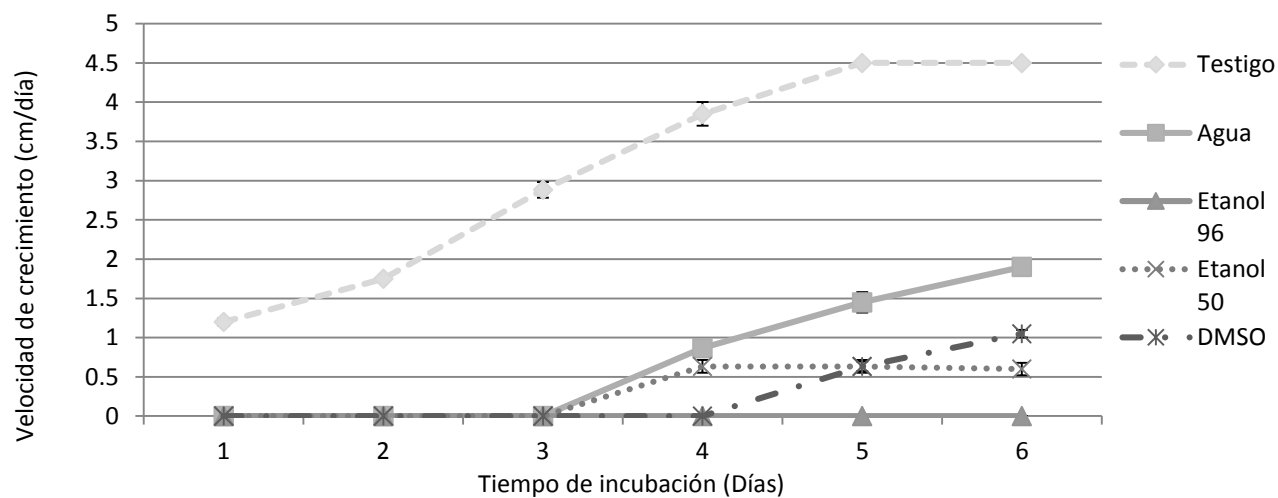
	Tiempo de incubación					
	1	2	3	4	5	6
Testigo	0	0	0.83±0.01	1.28±0.01	2.32±0.05	3.48±0.1
Agua	0	0	0	0	0.5±0.01	0.82±0.01
Etanol 96	0	0	0	0	0	0
Etanol 50	0	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0

Fig. 103. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50, con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo EMA. ANOVA Tukey α 0.05



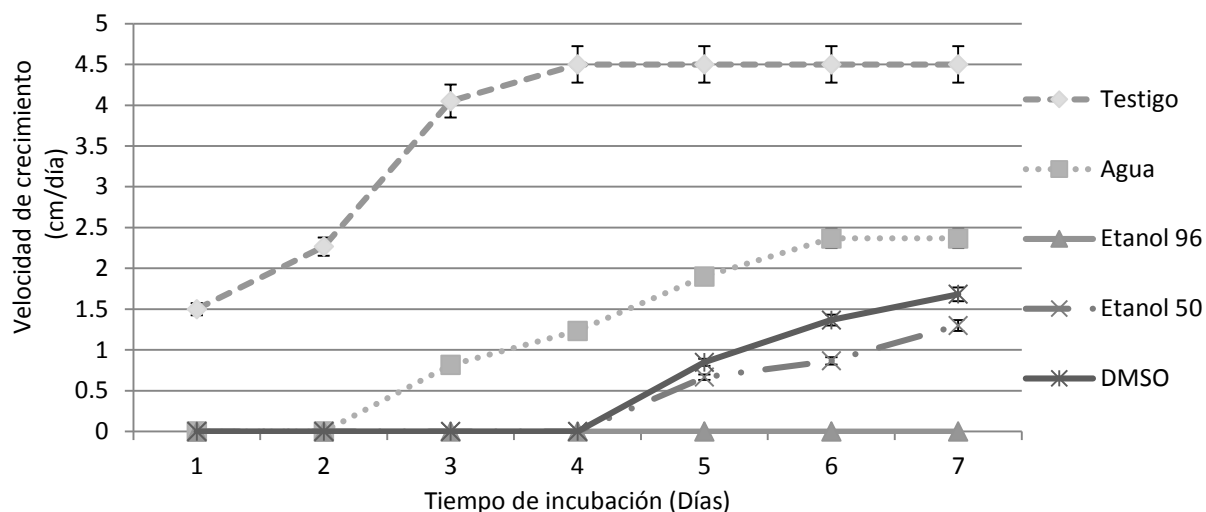
Días	1	2	3	4	5	6
Testigo	0	0	0	0	0.7±0.01	1.18±0.02
Agua	0	0	0	0	0	0
Etanol 96	0	0	0	0	0	0
Etanol 50	0	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0

Fig. 104. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa, *Lentinula edodes* CP-7, con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo EMA. ANOVA Tukey $\alpha = 0.05$



Tiempo de incubación						
Días	1	2	3	4	5	6
Testigo	1.2±0.01	1.75±0.01	2.88±0.02	3.85±0.25	4.50±0	4.5±0
Agua	0	0	0	0.87±0.02	1.45±0.02	1.9±0.05
Etanol 96	0	0	0	0	0	0
Etanol 50	0	0	0	0.63±0.02	0.63±0.02	0.6±0.02
DMSO	0	0	0	0	0.63±0.01	1.05±0.05

Fig. 105. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo PDA. ANOVA Tukey $\alpha = 0.05$



		Tiempo de incubación						
Días	1	2	3	4	5	6	7	
Testigo	1.5±0.07	2.3±0.06	4.1±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	
Agua	0	0	0.8±0.1	1.2±0.06	1.9±0.05	2.4±0.08	2.4±0.08	
Etanol 96	0	0	0	0	0	0	0	
Etanol 50	0	0	0	0	0.7±0.07	0.9±0.13	1.3±0.18	
DMSO	0	0	0	0	0.9±0.05	1.4±0.04	1.7±0.17	

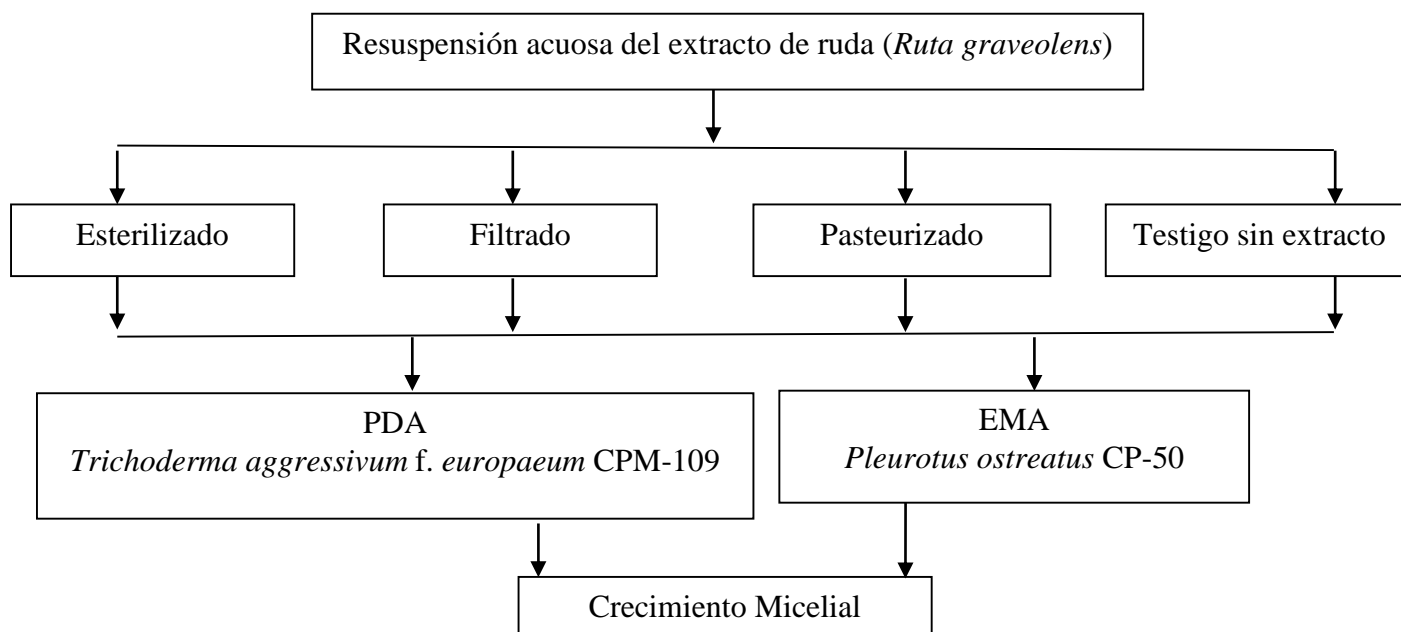
Fig. 106. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 con diferentes solventes a 6 mg/ml en medio de cultivo PDA. ANOVA Tukey $\alpha=0.05$

A partir de los experimentos previos se realizó una búsqueda del solvente ideal que tuviera la capacidad de disolver la mayor parte del extracto así como que no interfiriera con el crecimiento de las cepas, principalmente de las comestibles. En esta prueba se observó que el agua fue el solvente en el que las cepas evaluadas tuvieron un mayor desarrollo con respecto a los otros solventes utilizados (Fig. 2). Esto puede deberse a que el agua pura es un solvente altamente versátil ya que puede ser utilizada para separar purinas comunes y pirimidinas, así como compuestos fenólicos y glicósidos en general encontrados en las plantas (Harborne, 1984).

ANEXO III

Tratamiento de purificación del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en resuspensión acuosa

A partir del experimento anterior, se concluyó que la resuspensión acuosa fue la mejor opción para un mejor aprovechamiento del extracto. Se procedió a dar un tratamiento de purificación a dicho extracto con un método que no influyera en el desarrollo micelial de las cepas.



Se realizó un análisis de varianza ANOVA Tukey $\alpha = 0.05$ con 5 réplicas

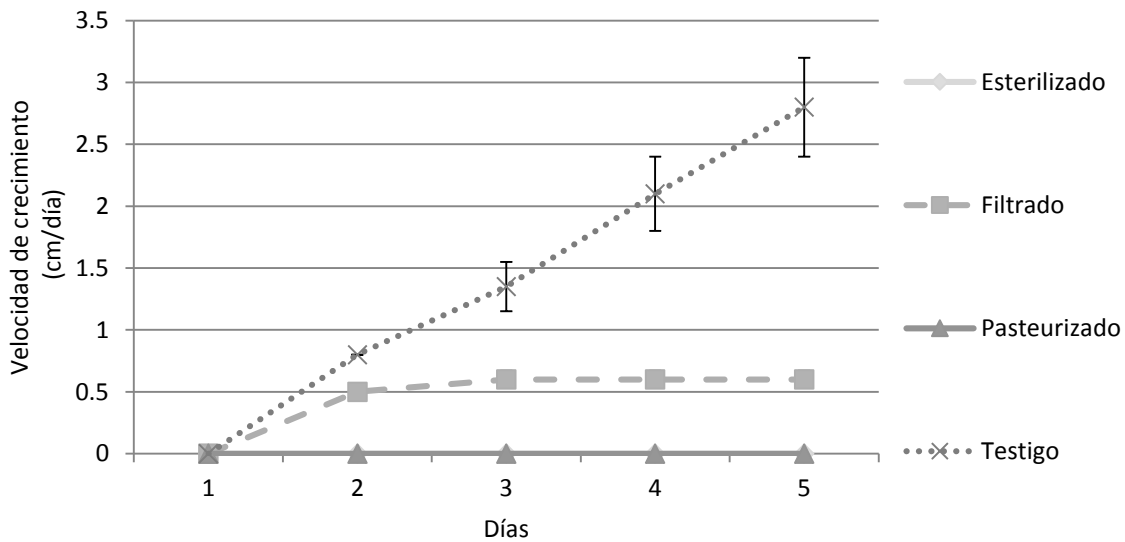
Se utilizaron tres metodologías diferentes de purificación:

Esterilizado: Se resuspendieron 600 mg de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en 40 ml de agua destilada estéril. Se puso en agitación a 120 rpm por una hora y se esterilizó a 20 lb por 25 min. Se dejó enfriar y se mantuvo a temperatura ambiente.

Filtrado: Se resuspendieron 600 mg de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en 40 ml de agua destilada estéril. Se puso en agitación a 120 rpm por una hora. Se centrifugó el extracto en una centrifuga 5415 C marca Eppendorf a 10 000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y en campana de flujo laminar se realizó un filtrado con acrodisco hidrofílico Dismic-25 AS, (Advantec) de 0.20 μm de apertura de poro.

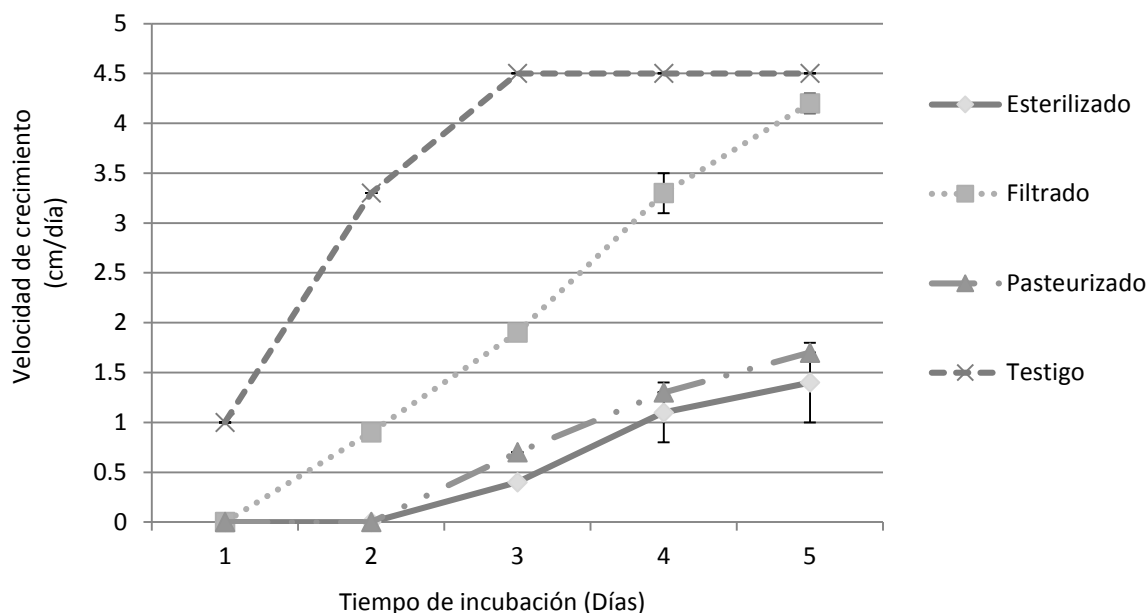
Pasteurizado: Se resuspendieron 600 mg de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en 40 ml de agua destilada estéril. Se puso en agitación a 120 rpm por una hora. En una parrilla de calentamiento se colocó el frasco con extracto, se midió la temperatura del líquido hasta 60 °C, la cual se mantuvo constante por una hora, posteriormente se tapó el frasco y se refrigeró a 4 °C por 24 h. Cuando se tuvieron listos los extractos, se agregaron purificados como parte del medio de cultivo EMA para el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* CP-50 y PDA para las cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109.

Resultados



Tiempo de incubación					
Días	1	2	3	4	5
Esterilizado	0	0	0	0	0
Filtrado	0	0.5±0.05	0.6±0.07	0.6±0.07	0.6±0.07
Pasteurizado	0	0	0	0	0
Testigo	0	0.8±0	1.35±0.2	2.1±0.3	2.8±0.4

Fig. 107. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50 expuesta al extracto de ruda (*Ruta graveolens*) a 6 mg/ml en medio de cultivo EMA con diferentes metodologías de esterilizado del extracto. En los tratamientos esterilizado y pasteurizado no se observó crecimiento. ANOVA Tukey $\alpha= 0.05$



Días	Tiempo de incubación				
	1	2	3	4	5
Esterilizado	0±0	0±0	0.4±0	1.1±0.3	1.4±0.4
Filtrado	0±0	0.9±0	1.9±0	3.3±0.2	4.2±0.1
Pasteurizado	0±0	0±0	0.7±0	1.3±0	1.7±0
Testigo	1±0	3.3±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0

Fig. 108. Velocidad de crecimiento micelial de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 cultivada en medio de cultivo PDA con extracto de ruda (*Ruta graveolens*) a 6 mg/ml en diferentes metodologías de esterilizado del extracto. En los tratamientos esterilizado y pasteurizado no se observó crecimiento. ANOVA Tukey $\alpha=0.05$

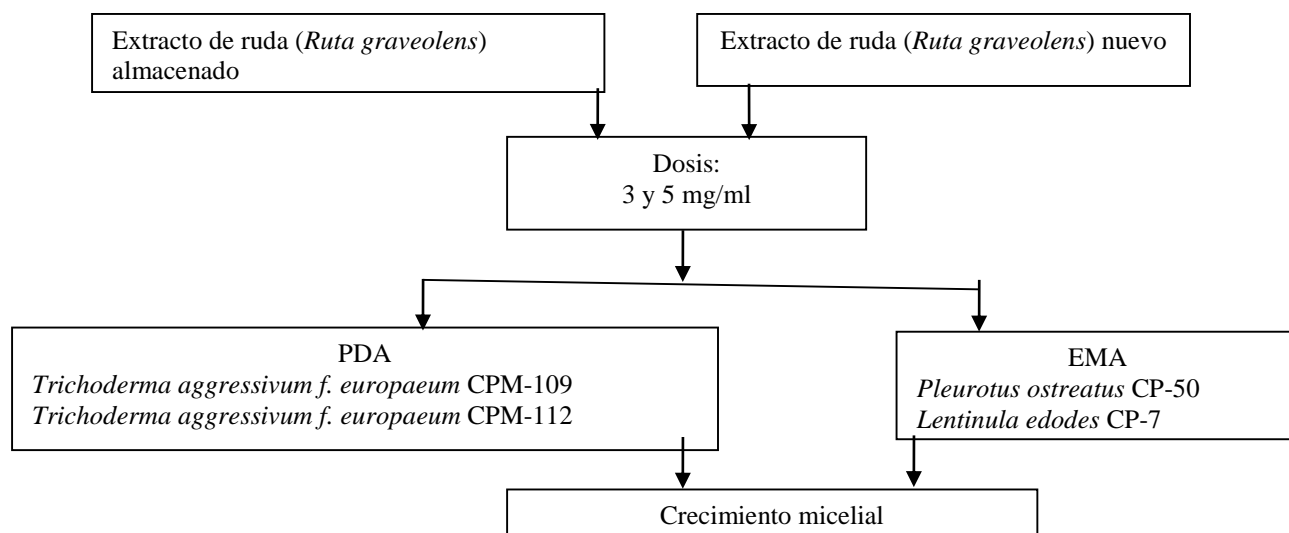
Para la purificación del extracto sin que se modificara algún componente que interfiriera con el crecimiento de las cepas, se procedió a probar con diversas metodologías de esterilizado por calor, filtrado, y pasteurizado. La metodología con el mejor desarrollo micelial fue el extracto filtrado con acrodisco hidrofílico DISMIC-25 AS, (Advantec) de 0.20 μm para su esterilización. Esto se observó tanto para la cepa comestible *Pleurotus ostreatus* CP-50 como para la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 (Fig. 3). Esto confirma investigaciones previas donde se observó que el calentamiento de los extractos vegetales disminuye su actividad antifúngica de forma significativa (Cárdenas *et al.*, 2005).

ANEXO IV

Evaluación de un extracto almacenado y uno reciente ruda (*Ruta graveolens*) con dosis de 3 mg/ml y 5 mg/ml

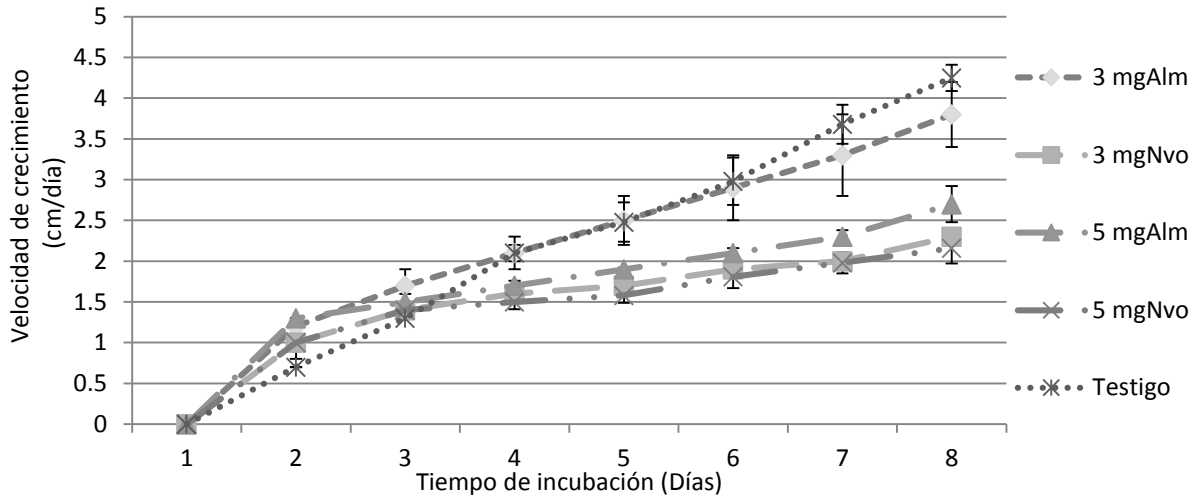
Se realizó una prueba para evaluar la actividad antifúngica del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) almacenado y uno realizado en el momento de la prueba. El material vegetal se procesó de la forma ya citada con la técnica de maceración con etanol al 96 °G1 y se evaporó hasta sequedad.

El extracto se resuspendió en 30 ml de agua destilada estéril en un agitador rotatorio MAXQ4000 a 110 rpm en 35 °C por una hora. Con una centrífuga Brinkmann 5415C marca Ependorff se centrifugó a 10 000 rpm, por 5 min. El extracto se decantó y, en condiciones de esterilidad, se filtró con acrodisco hidrofílico Dismic-25 AS, (Advantec) de 0.20 µm para su esterilización, incorporándolo al medio de cultivo tibio. Se evaluaron dosis de 3 y 5 mg/ml de medio de cultivo. Se evaluó crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7.

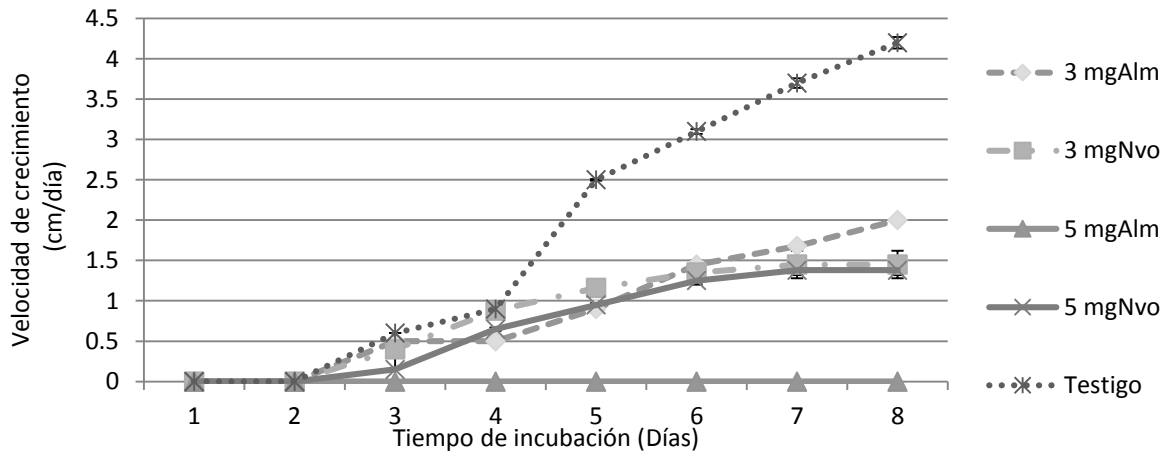


Se realizó un análisis de varianza ANOVA Tukey $\alpha = 0.05$ con 5 réplicas

Resultados

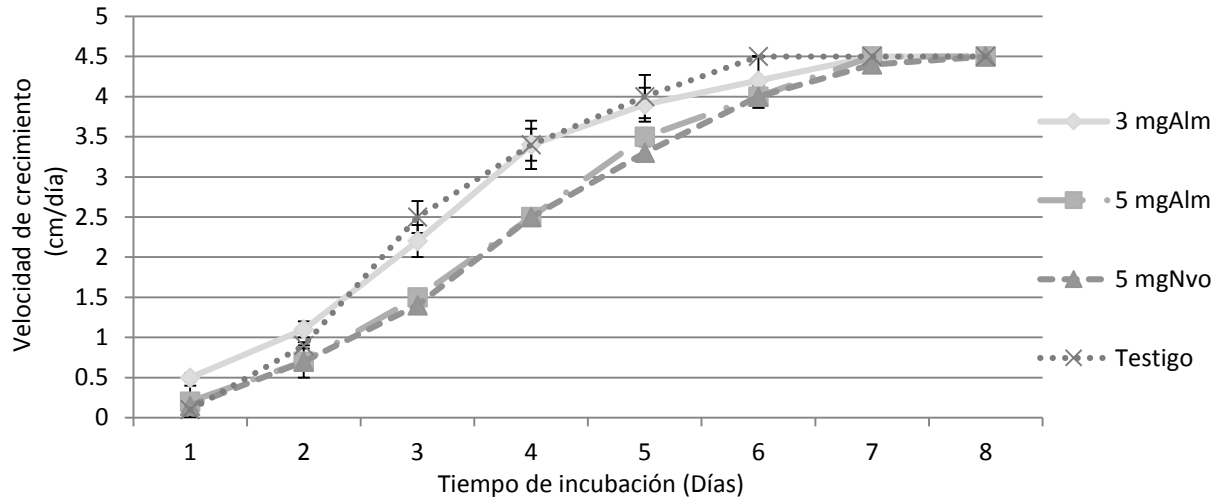


Tiempo de incubación								
Días	1	2	3	4	5	6	7	8
3 mg/ml Alm	0±0	1.2±0.1	1.7±0.2	2.1±0.2	2.5±0.3	2.9±0.4	3.3±0.5	3.8±0.4
3 mg/ml Nvo	0±0	1±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1	1.7±0.1	1.9±0.08	2±0.09	2.3±0.03
5 mg/ml Alm	0±0	1.3±0	1.5±0.1	1.7±0.06	1.9±0.02	2.1±0.06	2.3±0.08	2.7±0.22
5 mg/ml Nvo	0±0	1±0.2	1.4±0.1	1.5±0.09	1.58±0.09	1.81±0.14	1.98±0.13	2.16±0.19
Testigo	0±0	0.7±0	1.3±0	2.1±0.1	2.48±0.24	2.98±0.29	3.68±0.24	4.25±0.19

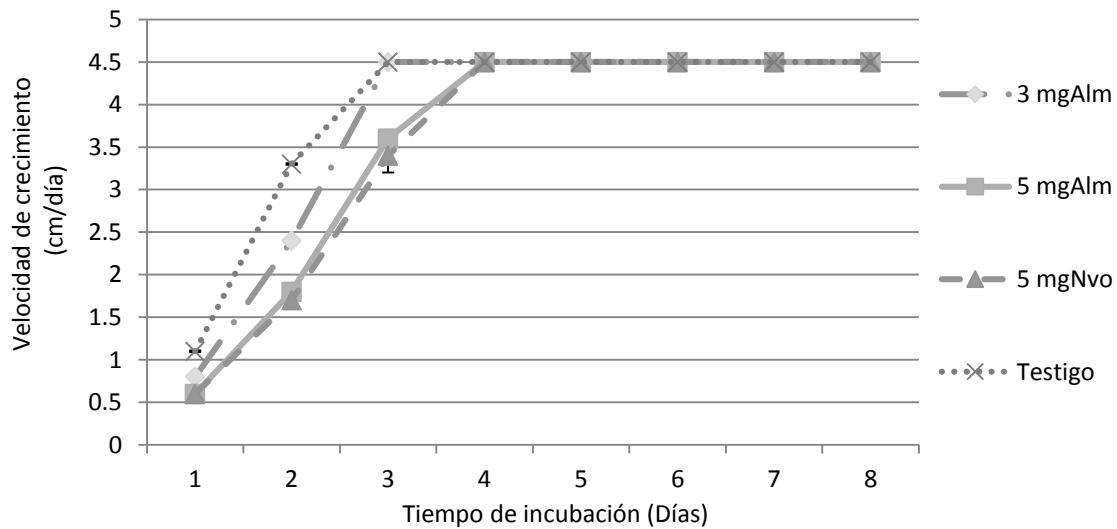


Tiempo de incubación								
Días	1	2	3	4	5	6	7	8
3 mg/ml Alm	0±0	0±0	0.5±0.02	0.5±0.02	0.9±0.05	1.45±0	1.68±0.01	2±0.01
3 mg/ml Nvo	0±0	0±0	0.4±0	0.88±0.06	1.16±0.06	1.35±0.15	1.45±0.17	1.45±0.17
5 mg/ml Alm	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
5 mg/ml Nvo	0±0	0±0	0.15±0.15	0.65±0.02	0.95±0.02	1.25±0.02	1.38±0.06	1.38±0.06
Testigo	0±0	0±0	0.6±0	0.9±0.06	2.5±0.01	3.1±0.03	3.7±0.06	4.2±0.07

Fig. 109. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas *Pleurotus ostreatus* CP-50 y *Lentinula edodes* CP-7 por efecto de dos dosis de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) filtrado en resuspensión acuosa con dosis de 3 y 5 mg/ml en medio de cultivo EMA. Alm: Extracto almacenado, Nvo: Extracto recién elaborado. ANOVA Tukey $\alpha=0.05$.



Tiempo de incubación								
Días	1	2	3	4	5	6	7	8
3 mg/ml Alm	0.5±0.05	1.1±0.1	2.2±0.2	3.4±0.2	3.9±0.21	4.2±0.3	4.5±0	4.5±0
5 mg/ml Alm	0.2±0.2	0.7±0.2	1.5±0.05	2.5±0.1	3.5±0.01	4±0.06	4.5±0	4.5±0
5 mg/ml Nvo	0.15±0.1	0.7±0.1	1.4±0.08	2.5±0.1	3.3±0.08	4±0.14	4.4±0.06	4.5±0
Testigo	0.1±0.1	0.9±0.04	2.5±0.2	3.4±0.3	4±0.27	4.5±0	4.5±0	4.5±0



Tiempo de incubación								
Días	1	2	3	4	5	6	7	8
3 mg/ml Alm	0.8±0.02	2.4±0.01	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0
5 mg/ml Alm	0.6±0	1.8±0.07	3.6±0.01	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0
5 mg/ml Nvo	0.6±0.03	1.7±0.07	3.4±0.2	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0
Testigo	1.1±0.01	3.3±0.01	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0	4.5±0

Fig. 110. Velocidad de crecimiento micelial de las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 por efecto de dos dosis de extracto de ruda (*Ruta graveolens*) filtrado en resuspensión acuosa con dosis de 3 y 5 mg/ml en medio de cultivo PDA. Alm: Extracto almacenado, Nvo: Extracto recién elaborado. ANOVA Tukey $\alpha=0.05$.

Con la finalidad de corroborar la estabilidad de los compuestos de interés en los extractos, se realizó una prueba para comparar un extracto de ruda (*Ruta graveolens*) almacenado y uno de reciente elaboración, así como también dos dosis de 3 y 5 mg/ml en medio de cultivo (Fig. 4). En dicha prueba se pudo observar que en el caso de las cepa comestible *Pleurotus ostreatus* CP-50, existieron diferencias en el crecimiento micelial en la dosis de 3 mg/ml entre el extracto almacenado y el nuevo, teniendo un mejor crecimiento en el extracto almacenado. En el caso de la dosis de 5 mg/ml se observó un crecimiento menor en ambos extractos, sin embargo también hubo un mejor desarrollo en el extracto almacenado. Por otro lado, la cepa *Lentinula edodes* CP-7, fue más sensible al extracto almacenado ya que no se observó crecimiento en la concentración de 5 mg/ml, sin embargo si se observó crecimiento con el extracto de reciente elaboración con la misma dosis. En la concentración de 3 mg/ml no se observó una diferencia marcada en el crecimiento entre el extracto nuevo y el almacenado.

En el caso de las cepas de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* evaluadas, no se observó una diferencia significativa para el desarrollo micelial entre el extracto almacenado y nuevo en la concentración de 5 mg/ml. En el caso de la concentración de 3 mg/ml la cepa de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 no tuvo diferencia en el desarrollo con respecto al testigo.

Conclusiones

1. No se observó diferencia entre los extractos de ruda (*Ruta graveolens*) nuevo y almacenado con la dosis de 5 mg/ml en las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112.
2. No se observó diferencia entre la dosis de 3 mg/ml y el testigo en las cepas *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-109 y *Pleurotus ostreatus* CP-50.
3. La velocidad de crecimiento de la cepa *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* CPM-112 fue inhibido ligeramente, sin embargo a los 3 días cubrió la caja al igual que el testigo.
4. No se observó diferencia significativa entre la dosis de 3 mg/ml extracto almacenado y el testigo en la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50. Las dosis de 5 mg/ml almacenado (63.5%), nuevo (50.82%) y de 3 mg/ml nuevo (54.11%) tuvieron un efecto negativo en la velocidad de crecimiento de la cepa *Pleurotus ostreatus* CP-50.