

Evaluación en condiciones *in vitro* de la masa micelial de hongos fitopatógenos mediante el uso de filtrados de aislamientos de *Trichoderma* spp.

In vitro evaluation of *Trichoderma* spp. isolates on mycelial growth of phytopathogenic fungi

Glenda Y. Aponte¹, Luis A. Salazar¹, María de J. Alcano¹, Nelly H. Sanabria², Jessica J. Guzmán² y Arnaldo J. Gámez¹

¹Investigadores. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Maracay 2101. Estado Aragua. Venezuela.

²Profesores. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía. Maracay 2105. Estado Aragua. Venezuela. Correos electrónicos: gaponteve@gmail.com, luisagronomia@gmail.com

RESUMEN

Se ha demostrado que las especies del género *Trichoderma* spp. producen metabolitos secundarios con actividad antifúngica, constituyéndose en un taxón de diversos grupos relacionados a su estructura y función, estos contienen componentes volátiles como no volátiles. Se evaluó la actividad metabólica de cinco aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre el control *in vitro* de los hongos fitopatógenos *Fusarium verticillioides*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*, causantes de las enfermedades: pudrición en tallo del maíz, mancha bandeada del maíz y pudrición carbonosa en caraota, respectivamente. Se utilizaron aislamientos antagonistas colectados de zonas de producción de los estados Aragua, Carabobo y Guárico, identificándolos a nivel de especie mediante estudios morfológicos. Para evaluar el mecanismo de antibiosis, los antagonistas se cultivaron en medio de cultivo líquido papa-dextrosa, la reproducción se efectuó de forma estática, se filtraron por separado utilizando papel de 100 µm, se centrifugaron, los sobrenadantes fueron filtrados utilizando papel de 0,22 µm. En los filtrados se colocaron discos de Papa Dextrosa Agar (PDA) colonizados con el patógeno, por un período de 15 días, luego se extrajo la masa micelial desarrollada y fue secada en estufa a 30 °C por 3 días, se pesó y se calculó el porcentaje de inhibición de masa micelial de cada patógeno. El aislamiento que presentó mejor control en todos los patógenos evaluados fue el perteneciente a *T. crassum* 06141 (94,47%), seguido de *T. harzianum* 06143 (92,35%), *T. harzianum* FTSC05 (91,94%), *T. longibrachiatum* Samán Mocho (85,86%) y *T. harzianum* 06146 (84,33%).

Palabras clave: antibiosis, antagonista, *Fusarium verticillioides*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*; metabolitos secundarios.

ABSTRACT

It has been shown that species of *Trichoderma* spp. produce secondary metabolites with antifungal activity, which constitutes a rate of several groups related to their structure and function, this groups contain volatile and nonvolatile components. We evaluated the metabolic activity of five isolates of *Trichoderma* spp. *In vitro* study we evaluated the affect of five isolates of *Trichoderma* spp. in control of *Fusarium verticillioides*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*, wich are causes of the rot in corn stalks, banded stink in corn and charcoal rot in bean respectively. Antagonists isolates were collected from agricultural fiels of the Aragua, Carabobo and Guarico State and the were identifiyned at the species level by morphological studies. To evaluate the mechanism of antibiosis, antagonists were grown in liquid culture medium potato-dextrose, reproduction took place statically, filtered separately using paper 100 µm, were centrifuged, the supernatant was filtered using paper 0.22 µm. In the filtrates were placed discs of PDA colonized with the pathogen, for a period of 15 days, then extracted mycelial mass developed and was dried in an oven at 30 °C for 3 days, then weighed and calculated the percentage of inhibition mycelial mass of each pathogen. The insulation provided better control of all pathogens was evaluated belonging to *T. crassum* 06141 (94.47%), followed by isolation of *T. harzianum* 06143 (92.35%), *T. harzianum* FTSC05 (91.94%), *T. longibrachiatum* Saman Mocho (85.86%) and *T. harzianum* 06146 (84.33%).

Key words: antagonistic, antibiosis, *Fusarium verticillioides*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios (Ms) de los hongos filamentosos son compuestos que poseen estructuras químicas diferentes a la de los metabolitos primarios (azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos). Los Ms no son esenciales para el crecimiento del organismo, pero sirven en diversas funciones para la supervivencia en la naturaleza. Estos, en contraste a la naturaleza general de los metabolitos primarios, son producidos por determinadas especies en un género particular (Reyes y Franco, 2006).

El género *Trichoderma* spp. fue asociado con el fenómeno del control biológico, debido a que suprime el desarrollo de patógenos del suelo que afectan los sistemas radicales de las plantas (Baker, 1990). Recientes investigaciones revelan la presencia de Ms con actividad antifúngica y antibacteriana producidos por este agente usado como biocontrolador.

Dentro de los mecanismos de acción que presentan algunas especies del género *Trichoderma* para el control de patógenos que afectan a la agricultura, está la antibiosis, que se define como inhibición o muerte de un microorganismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas, las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales de la pared celular como quitina y β -1-3-glucanos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994).

Los componentes antimicrobiales producidos por algunas especies del género *Trichoderma* constituyen una gama de diversos grupos con relación a su estructura y función (Taylor, 1986) y están formados tanto por sustancias volátiles como no volátiles. Un gran número de estos componentes han sido relacionados con la actividad de biocontrol.

En la presente investigación se evaluaron en condiciones *in vitro* la masa micelial de hongos fitopatógenos *Fusarium verticillioides* y *Macrophomina phaseolina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de suelos para aislar *Trichoderma* spp.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. utilizados en las pruebas fueron colectados en zonas productoras de maíz, *Zea mays* L. y caraota, *Phaseolus vulgaris* L., del sur del estado Aragua, norte del estado Guárico y una localidad del estado Carabobo. Por ello se colectó aproximadamente 1 kg de suelo cerca de la rizosfera de las plantas y en condiciones de capacidad de campo. El Cuadro 1 muestra el aislamiento y la especie que corresponde.

Obtención de aislados de *Trichoderma* spp.

Luego de la colecta bajo condiciones de laboratorio, se tomaron 10 g de suelo de cada uno de los sitios, se agregaron 90 ml de agua destilada estéril contenidos en un Erlenmeyer, siendo ésta la solución madre. Posteriormente, se realizaron diluciones en tubos de ensayo que contenían 9 ml de agua destilada estéril, a la cual se le agregó 1 ml de la solución madre hasta llegar a diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} de las diluciones obtenidas; se colocó 1 ml en placas de Petri de 100 x 15 mm de diámetro y se le adicionaron 15 ml de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), se extendió cada una de las diluciones en la placa correspondiente, realizándose por cada una cuatro réplicas.

Cuadro 1. Nombre de los aislamientos de *Trichoderma* sp. y su especie.

Nombre del aislamiento	Especie
06146	<i>Trichoderma harzianum</i>
06141	<i>Trichoderma crassum</i>
06143	<i>Trichoderma harzianum</i>
FTSC05	<i>Trichoderma harzianum</i>
Samán Mocho	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>

Las cápsulas Petri se incubaron a una temperatura de 28 °C por un lapso de 24 a 48 h, transcurrido el tiempo se tomó parte del crecimiento del hongo y se sembró en cultivos monospóricos para la obtención de los cultivos puros y conservados en tubos con PDA a 5 °C.

Identificación de aislamientos de *Trichoderma* spp.

Una vez obtenidos los aislamientos puros, se procedió a su identificación taxonómica a nivel de especie, se consideraron las características fundamentales descritas por Rifai (1969) y Bissett (1991 a,b,c), para ello se utilizaron los aislamientos de 3 a 4 d y de 6 a 8 d de crecimiento en medio PDA.

También se realizaron observaciones macroscópicas con la ayuda de un microscopio óptico y una lupa estereoscópica, dentro de las características consideradas estuvieron: crecimiento de la colonia, color del micelio, tinción de la placa agarificada, producción de pústulas, formación de anillos concéntricos, producción de masas de conidios agregados.

En cuanto a las observaciones microscópicas se prepararon láminas portaobjetos con azul de algodón, se utilizó un microscopio marca Lieder® con lente de inmersión (100X), se tomaron, con el uso de la cámara de Neubauer, las dimensiones de las estructuras fúngicas de valor taxonómico como son: longitud, ancho y forma de las células conidiógenas o fiálides, diámetro, forma, color y ornamentación de los conidios, número de fiálides por verticilos, el tipo y medición del conidióforo, presencia de fiálides intercaladas, presencia de extensiones fértiles e infértiles.

Obtención de los hongos fitopatógenos

Los aislamientos de *F. verticillioides* Sheldon y *R. solani* Kühn fueron colectados de plantas de maíz y *M. phaseolina* (Tassi) Goid de plantas de caraota, provenientes de los municipios Zamora y Libertador del estado Aragua (Cuadro 2).

Estas muestras fueron llevadas al laboratorio, se separó la parte basal del tallo de cada planta y se lavaron estas secciones con agua corriente, luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por un lapso de 2 min, se secaron con

papel absorbente y posteriormente se cortó cada sección del tallo en trozos muy pequeños que se sembraron en medio de cultivo PDA bajo condiciones de cámara de aislamiento.

Las placas donde se colocaron las secciones del material vegetal se llevaron a incubación a temperatura de 28 °C por un lapso de 48 h, luego se tomaron las colonias típicas y se colocaron en otras placas con PDA, esto con el propósito de obtener cepas puras.

Se realizaron las pruebas de patogenicidad correspondiente para cada patógeno con la finalidad de comprobar los postulados de Koch, para ello se utilizaron 20 plantas sanas de los cultivos: maíz (Híbrido H-4005) y caraota (variedad Tacarigua), de 20 días de crecimiento en sustrato estéril, dejando cinco plantas de cada cultivo como testigo.

Evaluación del mecanismo de antibiosis de *Trichoderma* spp. sobre fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides*, *Macrophomina phaseolina*)

Para demostrar la presencia de metabolitos secundarios, los aislamientos fueron cultivados en envases de vidrio de 2 l de capacidad, los cuales contenían medio de cultivo líquido papa – dextrosa. Se inoculó un disco de 0,5 mm de diámetro, procedente de medio de cultivo con cada aislamiento de 72 h de crecimiento, la reproducción se efectuó de forma estática a temperatura 28 °C por un período de 15 d, una vez cumplido este tiempo se procedió a filtrar cada aislamiento con papel de filtro de 100 µm y se centrifugó a 4000 rpm por 15 min; el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros milipore de 0,22 µm.

Cuadro 2. Procedencia de los aislamientos patógenos.

Nombre del aislamiento	Procedencia
<i>Fusarium verticillioides</i>	El Pao, estado Aragua
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Tucutunemo, estado Aragua
<i>Rhizoctonia solani</i>	Tucutunemo, estado Aragua

Evaluación de inhibición de patógenos

Los filtrados de cada aislamiento se enriquecieron con 5 g de dextrosa por litro de solución, después se pasó una alícuota de 150 ml a envases de vidrio de 200 ml de capacidad de cada solución perteneciente a cada aislamiento de *Trichoderma* spp. y en ella se colocó un disco colonizado por los hongos patógenos (*R. solani*, *M. phaseolina* y *F. verticillioides*). Cada uno de los patógenos evaluados de manera similar como se indicó previamente, se inocularon en una solución control (cultivo líquido papa-dextrosa, sin filtrados de *Trichoderma* spp.). Los tratamientos indicados previamente y el control se incubaron a 28 °C por un período de 15 días, luego se extrajo la masa micelial desarrollada que fue secada en una estufa a 30 °C por 3 días, se pesó y se calculó el porcentaje de inhibición de masa micelial de cada patógeno (PIM).

El PIM se determinó utilizando la ecuación de J. M. Vincent, empleada por Latiegue (1990).

$$\text{PIM} = 100 (C - T)/C \quad (1)$$

donde:

C: crecimiento micelial del control.

T: crecimiento micelial del tratamiento.

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, donde cada aislamiento antagonista (06141, 06143, 06146, FTSC05 y Samán Mocho) se consideró como un tratamiento, los análisis se realizaron por la vía paramétrica para analizar la varianza (ANAVAR), utilizando el Programa Statistix 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas

Se logró identificar los aislamientos de *Trichoderma* spp. utilizando los criterios de identificación taxonómica y tomando en consideración las características fundamentales descritas por Bissett (1991a,b,c); Rifai (1969). La descripción detallada se presenta en este volumen (Salazar *et al.*, 2012).

Evaluación de inhibición de masa micelial

El análisis de la varianza mostró valores significativos entre los tratamientos, se reflejó que los aislamientos de *Trichoderma* spp. obtuvieron un comportamiento diferente en cuanto a la capacidad de inhibir el desarrollo micelial de los patógenos evaluados.

En la Figura 1, se observa que las pruebas de medias arrojaron tres grupos estadísticos (a, ab y b), donde los aislamientos 06141 *T. crassum* y 06143 *T. harzianum* correspondieron al grupo "a", FTSC05 *T. harzianum* y Samán Mocho *T. longibrachiatum* al grupo "ab" y el 06146 *T. harzianum* al grupo "b".

Los aislamientos 06141 *T. crassum* y 06143 *T. harzianum* produjeron un mayor porcentaje de inhibición de masa sobre *F. verticillioides* con valores de 89,83% y 89,77%, respectivamente, mientras que 06146 *T. harzianum* produjo el menor porcentaje de inhibición de masa con un valor de 76,64%.

El efecto de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* se puede apreciar en la Figura 2; FTSC05 *T. harzianum* y 06141 *T. crassum* (grupo "a") indujeron un mayor porcentaje de inhibición de masa a este hongo, con valores de 97,94 y 97,56% de PIM, respectivamente.

Asimismo, *T. longibrachiatum* Samán Mocho produjo un 94,74% de inhibición de masa (grupo "ab") y 06143 y 06146 perteneciente a *T. harzianum* produjeron un menor porcentaje (grupo "b") siendo estos valores de 90,54 y 88,19%, respectivamente.

En lo que respecta al efecto de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp., sobre *M. phaseolina*, se puede observar en la Figura 3 cuatro grupos (a, ab, bc y c). El mayor porcentaje de inhibición de masa lo produjo FTSC05 *T. harzianum* (97,08%), seguido por 06141 *T. crassum* y 06143 *T. harzianum* (96,03% y 95,51%, respectivamente), el aislamiento 06146 *T. harzianum* (88,17); Samán Mocho *T. longibrachiatum* (83,54%) que ocasionó menor porcentaje de inhibición sobre el patógeno.

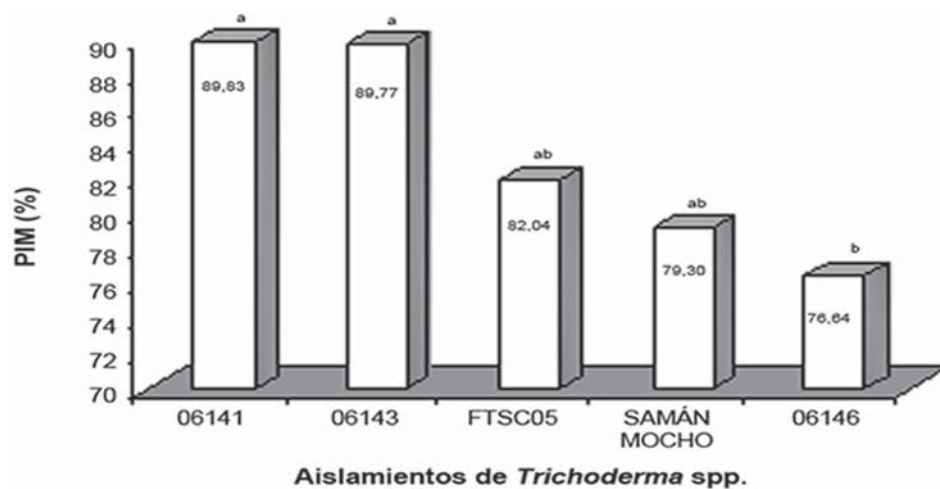


Figura 1. Porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium verticillioides* por especies de *Trichoderma* spp.

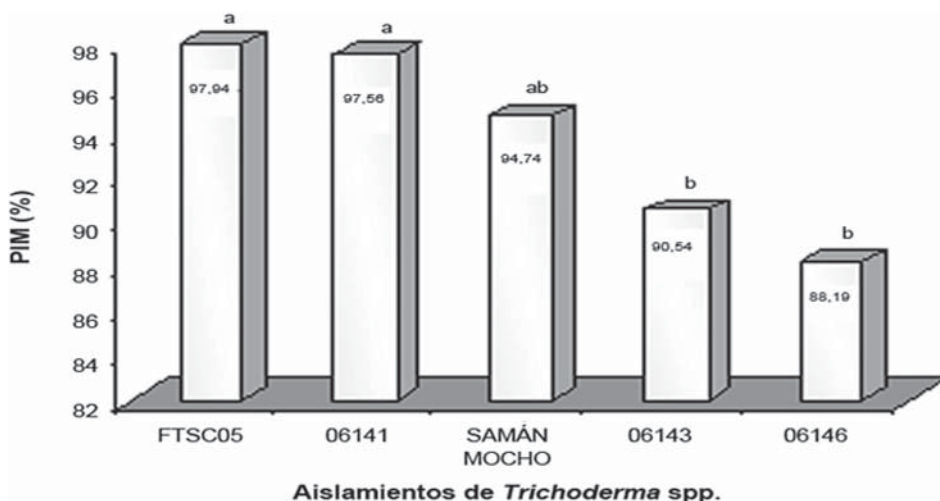


Figura 2. Porcentaje de inhibición de masa sobre *Rhizoctonia solani*.

El desarrollo micelial de los patógenos evaluados fue mayor cuando estos fueron sembrados en medio caldo papa dextrosa (control), pudiéndose evidenciar, además, el desarrollo de estructuras de resistencia como son esclerocios y microesclerocios para el caso de *R. solani* y *M. phaseolina*, respectivamente; a diferencia de los tratamientos (medio enmendado con los metabolitos secundarios de los aislamientos de *Trichoderma* spp.) donde hubo poca a escasa producción de micelio por parte de los patógenos evaluados (Figuras 4, 5 y 6).

El aislamiento que presentó mejor control en promedio de todos los patógenos evaluados fue el 06141 perteneciente a *T. crassum* (94,47%), seguido de 06143 *T. harzianum* (92,35%), FTSC05 *T. harzianum* (91,94%), Samán Mocho *T. longibrachiatum* (85,86 %) y 06146 *T. harzianum* (84,33%), siendo estos promisorios para el control biológico. Queda demostrado el efecto de los metabolitos secundarios pertenecientes al género *Trichoderma* spp. para la inhibición micelial de los tres aislamientos fitopatógenos evaluados.

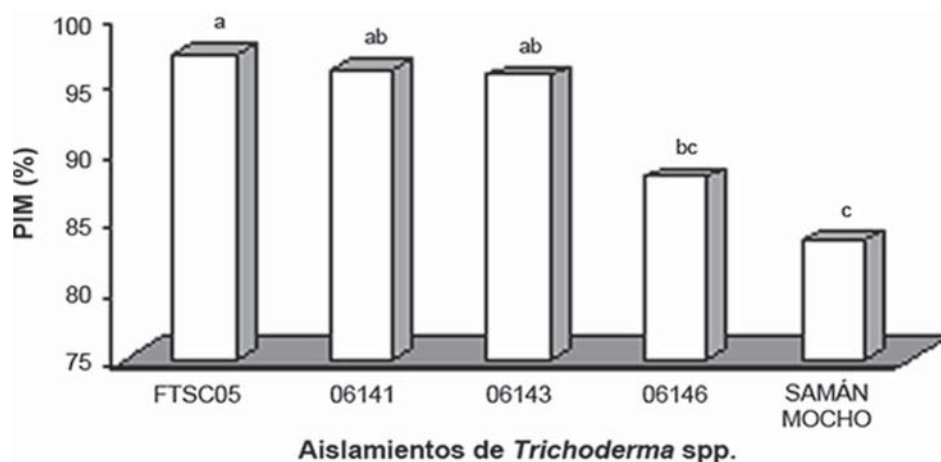


Figura 3. Porcentaje de inhibición de masa sobre *Macrophomina phaseolina*.

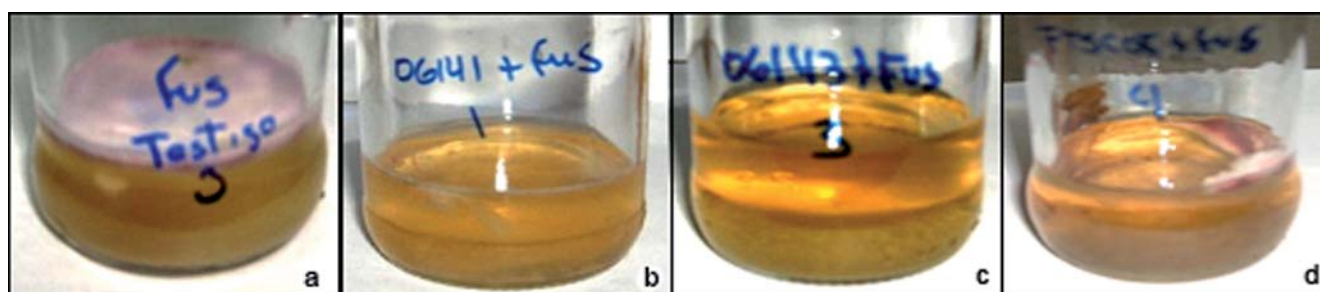


Figura 4. Inhibición del crecimiento de la masa micelial en colonias de *Fusarium verticillioides* por *Trichoderma* spp.; a) control (colonia del hongo patógeno creciendo en PDA); b) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamiento 06141 *T. crassum*; c) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamiento 06143; d) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamiento FTSC05 *T. harzianum*.

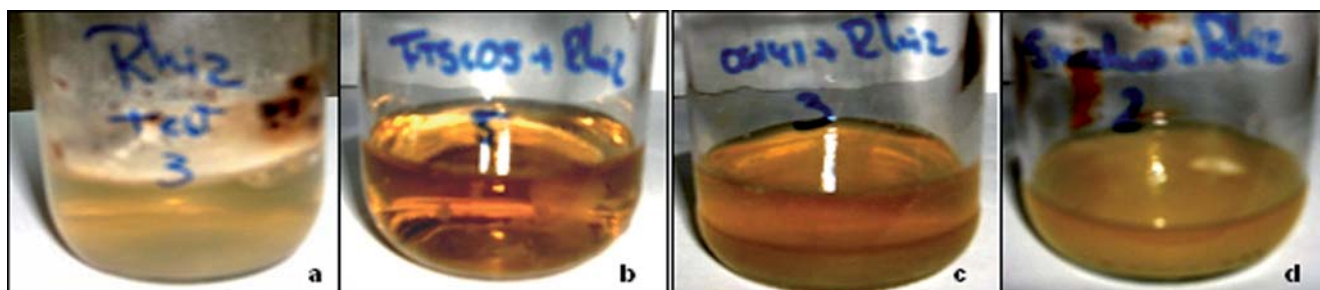


Figura 5. Inhibición del crecimiento de la masa micelial en colonias de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* spp.; a) control (colonia del hongo patógeno creciendo en PD); b) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamientos FTSC05 *T. harzianum*; c) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamientos 06141 *T. crassum*; d) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamientos Samán Mocho *T. longibrachiatum*.

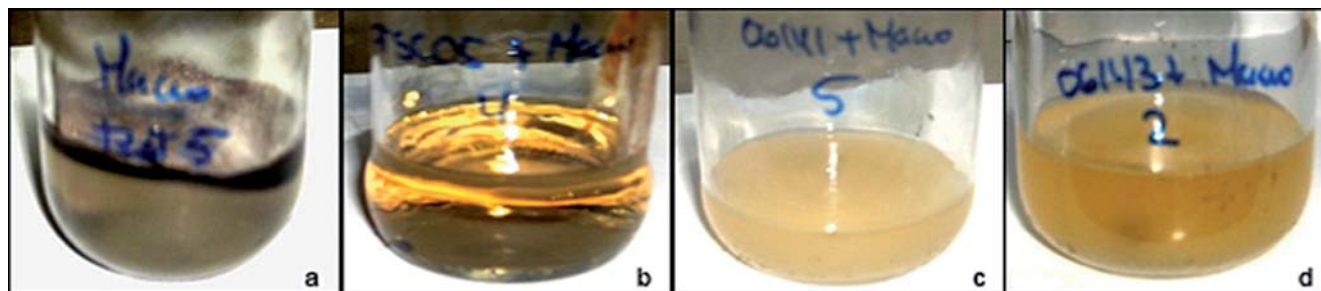


Figura 6. Inhibición del crecimiento de la masa micelial en colonias de *Macrophomina phaseolina* por *Trichoderma* spp.; a) control (colonia del hongo patógeno creciendo en PD); b) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamiento FTSC05 *T. harzianum*; c) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamiento 06141 *T. crassum*; d) colonia del hongo patógeno creciendo sobre filtrado activo de aislamiento 06143 *T. harzianum*.

Estos resultados revisten gran importancia debido a que son pocas las investigaciones relacionadas a este tópico; por tanto, a continuación señalamos estudios similares donde se evaluó la actividad antagonista de una cepa de *Trichoderma* spp. nativa y una comercial de *T. harzianum*, frente a tres aislados de *Alternaria solani*; sobre la base de crecimiento micelial y el efecto metabólico.

Se observó que las cepas de *Trichoderma* spp. mostraron un alto efecto antagonista frente a *A. solani*, tanto en forma micelial como metabólica, destacándose la cepa nativa que ejerció un efecto antagonista significativamente superior ($P \leq 0,05$) a la comercial (González *et al.*, 1994).

Asimismo, otros autores señalan que la actividad antagonista de aislamientos nativos *in vitro* de *Trichoderma* spp. y *Aspergillus* sp., contra *Colletotrichum falcatum* en muchos casos tienen alto poder antagonista y que son promisorios para el uso en el control biológico de patógenos del suelo (Alfonso y Cruz, 1987).

Stefanova (1999) señaló que los metabolitos producidos por las cepas de *Trichoderma* spp. provocaron un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia de *Phytophthora nicotianae* en comparación con el testigo. La cepa A-86 aislada de *T. viride* produjo un efecto fungistático notable sobre el hongo fitopatógeno.

Bonnarme *et al.* (1997) determinaron la presencia de una lactona volátil, 6-pentyl alfa pirona, con fragancia a coco, como metabolito principal de *T. viride*, el cual tiene efecto antagonista con relación a una gran cantidad de hongos fitopatógenos de interés agrícola.

CONCLUSIONES

Los filtrados de los aislamientos estudiados de *Trichoderma* spp. mezclados con el medio de cultivo, limitaron el crecimiento de las especies fitopatógenas por la presencia de metabolitos biológicamente activos, demostrándose de esta manera la capacidad de producir metabolitos con actividad antibiótica por parte de las cepas antagonistas.

Samán Mocho *T. longibrachiatum* y 06143 *T. harzianum*, fueron los aislamientos que ejercieron mejor control en cuanto a la evaluación de los filtrados no volátiles en los patógenos evaluados, oscilando los valores desde 95,73 hasta 96,9% de inhibición de crecimiento.

Los mayores porcentajes de inhibición de masa micelial fueron obtenidos a partir de los filtrados de los aislamientos FTSC05 *T. harzianum*, 06141 *T. crassum* y 06143 *T. harzianum*, con un valor de PIM que varió desde 82,04 hasta 97,94%.

LITERATURA CITADA

- Alfonso, F. y B. Cruz. 1987. Actividad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp., contra *Colletotrichum falcatum*. Protección Vegetal. 2(2):119-124.
- Baker, R. 1990. An overview of current and future strategies and models for biological control. In: Biological control of Soil-borne Plant Pathogens. Redw. Press. Melksham. Wiltshire. Hornby D (ed.). pp. 375-388.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* II: Intra-generic classification. Canadian Journal of Botany. 69(11):2.357-2.372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* III: Section Pachybasium. Canadian Journal of Botany. 69(11):2.373-2.414.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma* IV: Additional notes on section Longibrachiatum. Canadian Journal of Botany. 69(11):2.418-2.420.
- Bonnarme, P., A. Djian, A. Latrasre, G. Feron, C. Ginies, A. Durand and J. L. Le Querre. 1997. Production of 6-pentyl-alfa-pyrone by *Trichoderma* spp., from vegetable oils. Journal of Biotechnology. 56(2):143-150.
- Goldman, G., C. Hayes y G. Harman. 1994. Molecular and Cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. TIBTECH. 12(12):478-482.
- González Salgado, C., A. Puertas Arias, M. Fonseca Flores, E. Suárez Soto y R. Blaya Gómez. 1994. Actividad antagónica de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani* Sor. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16(2):167-173.
- Latiegui, A. 1990. *Trichoderma harzianum*. Rifai. como antagonista de *Slerotium rolfsii* Sacc., agente causal de pudrición basal de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto. Venezuela. 61 p.
- Pezet, R., V. Pont and R. Tabacchi. 1999. Simple analysis of 6-Pentyl-alpha-pyrone, a mayor antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. Phytoch. Annal. 10:285-288.
- Reyes, G. y C. Franco. 2006. Producción Biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias. Bogota, Colombia. 11(2):23-30.
- Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116. pp. 1-56
- Salazar, L. A., G. Y. Aponte, M. de J. Alcano, N. H. Sanabria y J. J. Guzmán, J. 2012. Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Aragua, Venezuela. Agronomía Trop. 62(1 - 4):7-15.
- Stefanova, M., A. Leiva, L. Larrinaga y M. F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp., para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16:509-516.
- Taylor, A. 1986. Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hipocrea* and its anamorphs, *Trichoderma* and *Gliocladium*. Proc. Nova Scotia Institute Science. 36(1):27-58.