

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 333**

21 Número de solicitud: 202530451

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

**C12P 1/02** (2006.01)

**A01N 63/30** (2010.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**10.02.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**06.06.2025**

62 Número y fecha presentación solicitud inicial:

**P 202230103 10.02.2022**

56 Se remite la solicitud nacional:

**P202230103**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.00%)**

**Carretera San Vicente del Raspeig s/n**

**03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ TOMÁS, Jorge;**

**ESGUEVA VILA, David;**

**LÓPEZ LLORCA, Luis Vicente y**

**LÓPEZ MOYA, Federico**

54 Título: **USO DEL QUITOSANO PARA MODIFICAR LA EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE  
COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE HONGOS**

57 Resumen:

La presente invención está dirigida a una metodología para modificar la expresión y producción de compuestos orgánicos volátiles procedentes de hongos nematófagos resistentes al quitosano, mediante el tratamiento con quitosano. En concreto, se describe un método de obtención de Metil-pirazina, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-Benceno, 8-metil-Heptadecano, 2,3,5,8-tetrametil-Decano, 2,6,10-trimetil-Dodecano, 2,6,11-trimetil-Dodecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano, 2-6-10-15-tetrametil-Heptadecano, Nonadecano, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) Fenol, 1-Tetradeceno, 1-Hexadecanol y 9-Octadecen-1-ol a partir de un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* suplementado con quitosano.

ES 3 025 333 A1

## DESCRIPCIÓN

**USO DEL QUITOSANO PARA MODIFICAR LA EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE  
COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE HONGOS****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuadra en el campo general de la biotecnología industrial y del sector agrícola y, en particular, se refiere al desarrollo de nuevos métodos para producir compuestos orgánicos volátiles (COVs) a partir de hongos nematófagos que presenten resistencia al quitosano en presencia del mismo, y el efecto del quitosano en la producción de los COVs por dichos hongos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El aumento de plagas en cultivos, el aumento de demanda de alimentos, el desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias, la aparición de nuevos virus o las limitaciones de los combustibles fósiles son sólo algunos ejemplos de los potenciales focos de peligro que ponen en riesgo al ser humano. Por lo tanto, existe una creciente necesidad de encontrar nuevos compuestos que puedan ser de utilidad en diferentes aspectos de la vida humana, como son los compuestos orgánicos volátiles.

En el contexto de la presente invención los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son compuestos de bajo peso molecular basados en carbono que se evaporan a temperatura ambiente, con una presión de vapor de 0.01 kPa a una temperatura aproximada de 20°C (Pagans *et al.*, 2006). Los COVs de hongos son derivados de las vías del metabolismo primario y secundario (Korpi *et al.*, 2009), y debido a su capacidad para difundirse a través de la atmósfera y el suelo, y de atravesar membranas (Morath *et al.*, 2012), son ideales para acarrear información y despertar una respuesta fisiológica o conductual en el receptor (semioquímicos) (Davis *et al.*, 2013).

Los COVs producidos por hongos cada vez reciben más atención debido a su potencial en gran variedad de aplicaciones en el sector biotecnológico, principalmente en el ámbito de la agricultura, industria y medicina. En el ámbito de la agricultura, su principal interés reside en su uso para el desarrollo de estrategias sostenibles de gestión que favorezcan la reducción del uso de pesticidas en cultivos. Los COVs pueden servir como semioquímicos, activadores de las defensas de las plantas, insecticidas o como inhibidores de crecimiento vegetal (Splivallo *et al.*, 2011). Además, los grupos ecológicos de los hongos

(patógenos/saprofíticos...) se reflejan en los perfiles de COVs que emiten (Müller *et al.*, 2013).

En el sector industrial, los COVs podrían ser una alternativa a las limitaciones de los combustibles fósiles, utilizando COVs microbianos como una fuente alternativa y renovable (Strobel *et al.*, 2007). También pueden utilizarse en la industria del perfume o para dar aroma y sabor a los alimentos.

Por lo tanto, los COVs producidos por hongos representan un recurso importante para el descubrimiento de nuevos productos con potencial de explotación y comercialización, debido a su gran variedad de aplicaciones.

Un factor limitante a la hora de extender el uso de los COVs para aplicaciones industriales se debe a su fuente biológica, cuya producción puede ser limitada. Por ello, el descubrimiento de nuevas fuentes de producción de COVs, podría mejorar considerablemente su explotación en los campos ya conocidos y facilitar su implementación en nuevos campos.

La patente ES2600526A1 se refiere al uso de COVs del hongo entomopatógeno *Beuveria bassiana* como agente repelente del picudo rojo de las palmeras. También, la solicitud de patente P201930831 describe la acción repelente de algunos COVs producidos por hongos como repelentes del picudo negro de la platanera. Sin embargo, la principal limitación que presentan estas invenciones es la poca variedad de COVs que produce un único hongo. Esta limitación se ve solucionada con la presente invención. En ella se propone una metodología para modular la expresión y producción de COVs en hongos. Con dicha metodología se generan nuevos volátiles y/o derivados, con potencial y cantidad para su uso comercial e industrial.

La patente WO2016046428A1 se refiere al uso de quitosano para aumentar la formación de apresorios en *Pochonia chlamydosporia* y/o aumentar la patogenicidad de *P. chlamydosporia* sobre huevos de nematodos. Además, se refiere al uso de quitosano para aumentar la colonización de raíces de plantas por *P. chlamydosporia* sin afectar al desarrollo de las mismas. También, la patente WO2008102044A1 se refiere al uso de quitosano para incrementar la esporulación de hongos. No obstante, se desconocía el potencial modulador del quitosano sobre la producción de volátiles en hongos.

La solicitud de patente US9624515B2 divulga un método para producir cepas de hongos mutantes que generen al menos uno de los siguientes COVs: 1,8-cineol, 1-metil-1,4-

ciclohexadieno, y (+)-O-metileno-C.-fenocanforona, administrando de un modulador epigenético durante el crecimiento del hongo, como por ejemplo el ácido hidroxámico suberoilánilido (SAHA) o 5-azacytidina (AZA).

5 He *et al.* (2006) y Badiali *et al.* (2018) utilizaron oligosacáridos de quitosano (COS) como elicitores de defensas vegetales, para la producción de COVs en *Lycopersicon esculentum* y *Hypericum perforatum*. No obstante, este cambio en la producción de COVs únicamente se ha visto en plantas.

10 El quitosano dispara la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (López-Moya *et al.*, 2015), induce la actividad oxidorreductasa (López-Moya *et al.*, 2016) y enriquece el metabolismo oxidativo (Jaime *et al.*, 2012). Los tratamientos con quitosano aumentan la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS oxidan compuestos orgánicos reducidos y, en consecuencia, aumentan la peroxidación lipídica. El quitosano enriquece el metabolismo oxidativo (Jaime *et al.*, 2012) y modifica la expresión génica (transcriptoma) (López-Moya *et al.*, 2016; López-Moya *et al.*, 2019).

15 Por todo ello, existe la necesidad de disponer de métodos para producir de COVs por hongos de manera eficaz. La presente invención supone una mejora frente al estado de la técnica ya que proporciona un método para la generación de nuevos COVs de hongos y la modulación de la producción de estos. Dicho método es rápido, respetuoso con el medio ambiente, biodegradable y no tóxico para animales y plantas.

## 20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Los autores de la presente invención han observado como al exponer hongos resistentes a quitosano, en particular hongos de la especie *Pochonia chlamydosporia*, en presencia de quitosano, éstos liberan diferentes COVs de interés, y que la composición concreta de COVs obtenida puede variar en función de la de edad del cultivo inicial utilizado, así como del tiempo en que el cultivo está expuesto al quitosano. Más concretamente, han observado como al cultivar dichos hongos en presencia de quitosano, se pueden obtener COVs que no se obtienen al cultivar dichos hongos en ausencia de quitosano, o bien se obtiene una cantidad de determinados COVs, mayor que la obtenida de un cultivo de dichos hongos en ausencia de quitosano.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un conjunto de imágenes con carácter ilustrativo y no limitativo, donde se ha representado lo siguiente:

- 5 Las Figuras 1 y 2 muestran un cromatograma del perfil de COVs de un cultivo en arroz de hongos de la especie *Pochonia chlamydosporia* de 25 días del Ejemplo 1 con quitosano (Fig. 1) y sin quitosano (Fig. 2).

La Figura 3 muestra los cromatogramas de las figuras 1 y 2 superpuestos.

- 10 Las Figuras 4 y 5 muestran un cromatograma del perfil de COVs de un cultivo en Czapek-Dox hongos de la especie *Pochonia chlamydosporia* de 6 días del Ejemplo 2 con quitosano (Fig. 4) y sin quitosano (Fig. 5).

La Figura 6 muestra los cromatogramas de las figuras 4 y 5 superpuestos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 Un **primer aspecto** de la invención está dirigido al uso de quitosano para promover la producción por parte de *Pochonia chlamydosporia* de compuestos orgánicos volátiles (COVs) que se seleccionan de la lista que consiste en Metil-pirazina, Ácido 3-metilbutanoico, Metil-2,4-dimetilhexanoato, 2,6,10,14-Tetrametil-heptadecano, 1-Tetradeceno, 2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano, Anhídrido metanosulfórico, Acetoína, 1,3-Octadieno, 2,3-Butanodiol, 2-Heptenal, 2-metil-2-Borneno, 3-Octanol, 1,3-dimetoxi-Benceno, 20 Ácido\_bencenoacético,\_éster\_metilado, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)- Benceno, 8-metil-Heptadecano, 2,3,5,8-Tetrametil-decano, 2,6,10-trimetil-Dodecano, 2,6,11-trimetil-Dodecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)- Octadecano, m-Guaiacol, 3,4-dimetoxi- Fenol, 2-6-10-15 tetrametil-Heptadecano, Nonadecano, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) Fenol, 9H-Pirido[2,3-b]indol\_6-metoxi-, 1-Hexadecanol, 9-Octadecen-1-ol, y combinaciones de los mismos.

- 25 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al método de obtención de Metil-pirazina, Ácido 3-metilbutanoico, Metil-2,4-dimetilhexanoato, 2,6,10,14-Tetrametil-heptadecano, 1-Tetradeceno, 2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano y combinaciones de los mismos que comprende crecer *Pochonia chlamydosporia* en presencia de quitosano.

- 30 En una realización preferida, el método para la obtención de Metil-pirazina, Ácido 3-metilbutanoico, Metil-2,4-dimetilhexanoato, 1-Tetradeceno, 2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano y combinaciones de los mismos comprende:

- (i) añadir quitosano a un medio de cultivo adecuado para el cultivo de *Pochonia chlamydosporia*, en una concentración final de 5 mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo,

5 (ii) crecer un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 5 días de antigüedad en el medio de cultivo obtenido en la etapa (i) durante 24 horas.

En otra realización preferida, el método para la obtención de 2,6,10,14-Tetrametil-heptadecano comprende:

- 10 (i) añadir quitosano a un medio de cultivo adecuado para el cultivo de *Pochonia chlamydosporia*, en una concentración final de 5 mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo,

- (ii) crecer un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 5 días de antigüedad en el medio de cultivo obtenido en la etapa (i) durante 72 horas.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al método para aumentar la producción de Acetoína, 1,3-Octadieno, 2,3-Butanodiol, 2-metil-2-Borneno, 3-Octanol, 15 Ácido\_bencenoacético\_éster\_metilado, m-Guaiacol, 9H-Pirido[2,3-b]indol\_6-metoxi- y combinaciones de los mismos, que comprende:

- (i) añadir quitosano a un medio de cultivo adecuado para el cultivo de *Pochonia chlamydosporia*, en una concentración final de 1mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo,
- 20 (ii) crecer un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 10 días de antigüedad en el medio de cultivo obtenido en la etapa (i) durante 5 días.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al método para aumentar la producción de 2-Heptenal, 1,3-dimetoxi-Benceno, 3,4-dimetoxi- Fenol y combinaciones de los mismos que comprende:

- 25 (i) añadir quitosano a un medio de cultivo adecuado para el cultivo de *Pochonia chlamydosporia*, en una concentración final de 1mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo,
- (ii) crecer un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 20 días de antigüedad en el medio de cultivo obtenido en la etapa (i) durante 5 días.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al método para aumentar la producción de Anhídrido metanosulfúrico y 1,3-Octadieno y combinaciones de los mismos, que comprende:

- (i) añadir quitosano a un medio de cultivo adecuado para el cultivo de *Pochonia chlamydosporia*, en una concentración final de 1 mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo,
- (ii) crecer un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 30 días de antigüedad en el medio de cultivo obtenido en la etapa (i) durante 5 días.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al método para aumentar la producción de 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-Benceno, 8-metil-Heptadecano, 2,3,5,8-tetrametil-Decano, 2,6,10-trimetil-Dodecano, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) Fenol, 2,6,11-trimetil-Dodecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano, 2-6-10-15tetrametil- Heptadecano, Nonadecano, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) Fenol, 1-Hexadecanol y 9-Octadecen-1-ol y combinaciones de los mismos, que comprende:

- (i) añadir quitosano a un medio de cultivo adecuado para el cultivo de *Pochonia chlamydosporia*, en una concentración final de 5 mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo,
- (ii) crecer un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 5 días de antigüedad en el medio de cultivo obtenido en la etapa (i) durante 24 h.

El término “compuestos orgánicos volátiles”, “COVs”, o “volátiles”, tal y como se usan en la presente invención, hacen referencia a compuestos de bajo peso molecular basados en carbono que se evaporan a temperatura ambiente, con una presión de vapor de 0.01 kPa a una temperatura aproximada de 20°C (Pagans *et al.*, 2006). El término Incluye un conjunto de hidrocarburos que, se encuentran en forma gaseosa a temperatura ambiente, o bien, tienen una alta volatilidad en esas condiciones. La normativa europea los define como compuestos orgánicos con una presión de vapor a 293,15 K, superior a 0,01kPa (ver punto 17 de Consejo de la Unión Europea (11 de marzo de 1999). «Directiva 1999/13/CE»). Son compuestos ligeros, con menos de 12 átomos de carbono, y grupos funcionales diversos. Ejemplos no limitantes de COVs, incluyen metano, etano, propano, n-butano, n-pentano, benceno, tolueno, xileno y etileno. Debido a su capacidad para difundirse a través de la atmósfera y el suelo, y de atravesar membranas (Morath *et al.*, 2012), son ideales para transportar información y despertar una respuesta fisiológica o conductual en el receptor (semioquímicos) (Davis *et al.*, 2013). Los COVs se pueden obtener de hongos, en cuyo caso son derivados de las vías del metabolismo primario y secundario (Korpi *et al.*, 2009).

El término “quitosano”, “chitosan”, o “quitosana”, tal y como se usa en la presente invención, hace referencia un polímero de  $\beta$ -1-4-glucosamina parcialmente desacetilado. Se obtiene a partir de un proceso de desacetilación de la quitina, que se puede encontrar en crustáceos, insectos y en paredes de hongos. La desacetilación consiste en la sustitución de un grupo acetilo por un grupo amino, por lo que el grado de desacetilación del quitosano corresponde al porcentaje de grupos amino que presenta, en sustitución de los grupos acetilo. Métodos para determinar el grado desacetilación del quitosano se conocen por un experto en la materia, e incluyen, espectroscopia NMR, o por espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (IR-TF). Se considera quitosano a una quitina desacetilada en más de un 70%.

Una desacetilación de un 70-85% de la quitina, se considera con una desacetilación media, y da lugar a un quitosano que se puede disolver parcialmente en agua. Una quitina con un grado de desacetilación de un 85%-95% se considera quitosano con un alto grado de desacetilación, y presenta buena solubilidad en agua. Una quitina con un grado de desacetilación de 95%-100% se considera quitosano un grado extremo de desacetilación, si bien es difícil de obtener.

En una realización particular, el quitosano de la invención presenta un grado de desacetilación de al menos un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 100%, preferiblemente de al menos un 70%. En otra realización particular, el grado de desacetilación del quitosano de la invención tiene un grado de desacetilación de al menos un 90%, preferiblemente de al menos un 90.1%. Métodos para determinar dicho grado de desacetilación se han indicado en la definición de “quitosano” más arriba.

El término “hongo resistente al quitosano”, tal y como se usa en la presente invención, hace referencia a un hongo cuyo crecimiento no se ve afectado por la presencia de quitosano en el medio. Tal y como entenderá un experto en la materia, los hongos resistentes a quitosano de la invención, hacen referencia a los hongos de la invención. En una realización particular, dicha expresión hace referencia a hongos capaces de crecer en presencia de quitosano, preferentemente en una concentración de al menos un 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.5mg/ml, 0.75mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 6mg/ml, 7mg/ml, 8mg/ml, 9mg/ml, 10mg/ml, 12mg/ml, 15mg/ml, 17mg/ml, 20mg/ml en un medio de cultivo adecuado para su cultivo. En una realización preferida, el quitosano referido en la realización justo anterior tiene un grado de desacetilación de al menos un 70%. Métodos para determinar si un hongo es resistente al quitosano son comúnmente conocidos para un experto en la materia e incluyen, cultivar hongos de una determinada especie o una

determinada cepa de un hongo en un medio sin quitosano y en paralelo, en un medio con quitosano añadido en una de las concentraciones indicadas justo arriba, y comparar el crecimiento de los hongos en cada uno de los cultivo en las mismas condiciones de cultivo (excepto por la diferencia en la concentración de quitosano). En caso de que el crecimiento del hongo en el cultivo con quitosano no sea inferior al observado en el cultivo sin quitosano, un experto en la materia concluiría que dicho hongo es resistente al quitosano.

El término “nematófago” tal y como se usa en la presente invención, hace referencia a hongos que atrapan o parasitan nematodos. Existen diferentes tipos de hongos nematófagos, que incluyen “hongos atrapadores de nematodos”, caracterizados por que el hongo penetra la cutícula del nematodo formando el bulbo de infección dentro del nematodo, a partir del cual las hifas tróficas crecen dentro del cuerpo y digieren sus contenidos. *Arthrobotrys* y *Monacrosporium* son géneros comunes de hongos atrapadores de nematodos. Los hongos nematófagos también incluyen hongos endoparásitos, que utilizan sus esporas para infectar nematodos. Estos hongos son a menudo parásitos obligados de nematodos, y fuera del cuerpo infectado del nematodo aparecen sólo como estructuras de diseminación. Las esporas de estos hongos pueden ser zoosporas móviles (como las de *Catenaria spp.*) que se enquistan sobre el nematodo adhiriéndose a él y penetra la cutícula, conidios adhesivos (por ejemplo, en *Drechmeria coniospora*) o conidios que son ingeridos (*Harposporium spp.*) por los nematodos bacteriófagos. Dentro de los hongos nematófagos, se incluyen también los hongos parásitos de huevos/hembras, que se caracterizan por infectar estadios no móviles de nematodos. Producen apresorios (estructuras de infección en los extremos de las hifas) que se adhieren a la cubierta del huevo y la penetran. Finalmente, el hongo digiere el contenido de los nematodos. Los géneros más comunes de este grupo son *Pochonia* (antes *Verticillium*) spp., *Metapochonia* spp. y *Purpureocillium* (antes *Paecilomyces*) spp. Los hongos nematófagos también incluyen hongos productores de toxinas. El género más común de este subgrupo es *Pleurotus* spp., incluyendo a la especie *Pleurotus ostreatus* (débil descomponedora de madera y nematófaga). Algunas hifas de estos hongos producen toxinas. Tras ponerse en contacto con la toxina, el nematodo queda inmovilizado y las hifas del hongo crecen quimiotrópicamente (dirigidas) hacia las aberturas del nematodo, parasitándolo.

En una realización particular, los hongos nematófagos referidos en la invención son del género *Pochonia*, *Metapochonia*, *Purpureocillium*, *Pleurotus*, *Arthrobotrys*, *Monacrosporium*, *Catenaria*, *Drechmeria*, *Harposporium* o combinaciones de los mismos.

En una realización particular, los hongos nematófagos del género *Pochonia* referidos en la invención son de cualquier especie de dicho género, en particular hongos de la especie *Pochonia chlamydosporia* que se corresponden con los hongos de la cepa Pc123 tal y como se describe en los ejemplos de la invención.

- 5 El término “medio de cultivo adecuado para el cultivo de hongos resistentes al quitosano”, tal y como se usa en la presente invención, hace referencia a un medio de cultivo que permite el crecimiento de hongos resistentes al quitosano tal y como se definen en la invención. Dichos medios de cultivo, por tanto, comprenden el agua y nutrientes necesarios para el crecimiento de los hongos, y preferiblemente, elementos sólidos sobre los que crecer. Por  
10 tanto, los medios de cultivo para los hongos resistentes al quitosano de la invención, comprenden, un medio líquido, un medio líquido y un sustrato sólido, y/o un medio líquido solidificado (a través de un gelificante, como, por ejemplo, el agar). Por tanto, tal y como entenderá un experto en la materia, el medio de cultivo de la invención comprende “una fracción líquida”, que corresponde con el medio líquido comprendido en el medio de cultivo,  
15 o, en caso de tratarse de un medio de cultivo sólido, o solidificado, con el medio de cultivo antes de su solidificación, i.e. con el medio líquido antes de añadir el gelificante o solidificante (como, por ejemplo, el agar).

Por tanto, tal y como entenderá un experto en la materia, la expresión “con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo” tal y como se usa en la presente invención, hace  
20 referencia al medio líquido comprendido en el medio de cultivo, o bien, en caso de que el medio de cultivo comprenda un medio solidificado (por medio por ejemplo de un gelificante como el agar), al medio líquido de dicho medio antes de solidificar.

En una realización particular, el medio líquido del medio cultivo se selecciona de la lista que consiste en agua, preferentemente agua destilada, Czapek-Dox, Czapek-Dox modificado,  
25 Potato Dextrose Broth (PDB), Vegetable juice (V8), Malt Extract (ME), Yeast Peptone Glucose (YPG), y combinaciones de los mismos. La composición de dichos medios de cultivo es comúnmente conocida para un experto en la materia. En otra realización particular, la fracción líquida del medio de cultivo tal y como se ha definido se selecciona de la lista que consiste en agua, preferentemente agua destilada, Czapek-Dox, Czapek-Dox  
30 modificado, Potato Dextrose Broth (PDB), Vegetable juice (V8), Malt Extract (ME), Yeast Peptone Glucose (YPG), y combinaciones de los mismos.

El término “Vegetable juice (V8)”, “V8”, “zumo vegetal (V8)” o “V8 agar”, tal y como se usa en la presente invención en relación con los medios de cultivo de la invención, hace

referencia al zumo vegetal comúnmente conocido por el experto en la materia para el cultivo de hongos que comprende zumo de tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, berro y espinaca. Más concretamente, comprende agua, zumos concentrados de tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, berro, espinaca, sal, vitamina C, betacaroteno, y ácido cítrico. También puede contener saborizante natural.

En una realización particular, el medio de cultivo líquido que comprende o consiste en Vegetable juice (V8) o v8, hace referencia a un medio de cultivo que comprende zumo de tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, berro y espinaca. En otra realización particular, el medio de cultivo líquido que comprende o consiste en Vegetable juice (V8) o v8, hace referencia a un medio de cultivo que comprende agua, zumos concentrados de tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, berro, espinaca, sal, vitamina C, betacaroteno, y ácido cítrico, y preferiblemente también un saborizante natural.

En otra realización particular, el medio de cultivo comprende un medio líquido tal y como se ha definido más arriba, que ha sido solidificado o gelificado. Los términos “medio solidificado”, “medio sólido” o “medio gelificado”, tal y como se definen en la presente invención, hacen referencia a medios líquidos de la invención, que han sido solidificados por diferentes métodos. Métodos para solidificar un medio líquido para obtener un medio de cultivo sólido son comúnmente conocidos para un experto en la materia. Un ejemplo no limitante de método para solidificar un medio líquido comprende aportar un 1-2% en peso de agar, calentar el conjunto hasta alcanzar 100°C, y dejar enfriar la mezcla hasta su solidificación. Por tanto, en una realización preferida, el medio solidificado, tal y como se usa en la presente invención, es un medio líquido solidificado con agar. En una realización particular, el medio solidificado se aporta como una pieza entera, o bien como una pieza desmenuzada en pequeñas porciones. En una realización particular, las porciones de medio solidificado tienen un largo de entre 1mm-2cm, 2mm-1.5cm, 3mm- 1.2cm, 5mm-1cm, 7mm-9mm de largo, preferiblemente 1mm-2cm de largo. En otra realización particular, tienen un ancho de entre 1mm-2cm, 2mm-1.5cm, 3mm- 1.2cm, 5mm-1cm, 7mm-9mm de ancho, preferiblemente 1mm-2cm de ancho. En otra realización particular, las porciones de medio solidificado tienen un diámetro de entre 1mm-2cm, 2mm-1.5cm, 3mm- 1.2cm, 5mm-1cm, 7mm-9mm de largo, preferiblemente 1mm-2cm, preferiblemente de entre 1mm-2cm. En una realización particular, el medio solidificado constituye el medio de cultivo. En otra realización particular, el medio solidificado obtenido se utiliza como sustrato sólido tal y como se define más abajo. Por tanto, en una realización particular, el medio solidificado tal y como se ha

definido en la invención se aporta en combinación con un medio líquido y ambos conforman el medio de cultivo.

Tal y como entenderá un experto en la materia, en caso de que el medio de cultivo tal y como se define en la invención comprenda un medio líquido solidificado, la fracción líquida del medio de cultivo comprende o consisten en el medio solidificado, antes de ser solidificado. Por tanto, en una realización particular, la fracción líquida corresponde al medio líquido utilizado para obtener el medio solidificado. En una realización preferida, en caso de que el medio de cultivo además del medio solidificado comprenda un medio líquido, la fracción líquida del medio de cultivo corresponde al medio líquido utilizado para obtener el medio solidificado, y el medio líquido añadido al medio solidificado. En otra realización particular, en caso de que el medio de cultivo además del medio solidificado comprenda un medio líquido, la fracción líquida del medio de cultivo corresponde al medio líquido utilizado para obtener el medio solidificado.

En una realización particular, el medio de cultivo comprende el medio líquido tal y como se ha definido, y, además, comprende un sustrato sólido. En una realización particular el sustrato sólido es un elemento sólido depositado en el medio de cultivo, al que se pueden adherir los hongos y sobre el cual pueden crecer. En una realización particular, el sustrato sólido además es una fuente de nutrientes para el hongo. En una realización particular, el sustrato sólido es un cereal, o partes del mismo. En una realización particular, el sustrato sólido son las semillas o frutos de una planta de cereal, o partes de las mismas. En una realización particular, el cereal, o la planta de cereal, se selecciona de la lista que consiste en arroz, avena, maíz, cebada, y combinaciones de los mismos. En una realización particular, el arroz hace referencia a las semillas de la planta del género *Oryza*, preferiblemente de la especie *Oryza sativa*. En otra realización particular, la avena hace referencia a las semillas de la planta del género *Avena*, preferiblemente de la especie *Avena sativa*. En otra realización particular, el maíz hace referencia a las semillas o granos de la planta del género *Zea*, preferiblemente de la especie *Zea Mays*. En otra realización particular, la cebada hace referencia a las semillas de la planta del género *Hordeum*, preferiblemente de la especie *Hordeum vulgare*. En una realización particular, el sustrato sólido de la invención comprende un medio solidificado tal y como se ha definido en la invención.

En una realización preferida, el medio de cultivo de la invención comprende un medio líquido y un sustrato sólido, en donde el medio líquido es preferiblemente agua. En otra realización preferida, el agua es agua destilada, preferiblemente agua destilada estéril. En una

realización particular, los sustratos sólidos se seleccionan de la lista que consiste en un medio sólido tal y como se ha definido, semillas de arroz, partes de las mismas, semillas de avena, partes de las mismas, semillas de maíz, partes de las mismas, semillas de cebada, partes de las mismas y combinaciones de los mismos.

- 5 En una realización preferida, el medio de cultivo de la invención comprende un medio líquido y un sustrato sólido, en donde el medio líquido es agua, preferiblemente agua destilada, más preferiblemente agua destilada estéril, y el sustrato sólido comprende semillas de arroz y/o fragmentos de las mismas. En una realización particular, el medio de cultivo de la invención comprende un medio líquido y un sustrato sólido, en donde la proporción de peso de
- 10 sustrato sólido (g) con respecto al volumen de medio líquido (ml) es de, al menos, 100:1, 75:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 25:1, 25:1.5, 25:2, 25:2.5, 25:3, 25:3.5, 25:4, 25:4.5, 25:5, 25:5.5, 25:6, 25:7, 25:8, 25:9, 25:10, 25:12, 25:13, 25:14, 25:15, 25:17, 25:20, 25:22, 25:25, preferiblemente de, al menos, 25:5. En una realización particular, la proporción de peso de sustrato sólido (g) con respecto al volumen de medio líquido (ml) es de 100:1-25:25, 75:1-
- 15 25:25, 50:1-25:25, 30:1-25:25, 25:1-25:25, 25:1- 25:20, 25:1-25:15, 25:1-25:10, 25:1-25:7, 25:1-25:5, 25:1-25:2.5, preferiblemente, 25:1-25:5.

En una realización preferida, el medio líquido del párrafo anterior es agua, preferiblemente agua destilada, más preferiblemente agua destilada estéril.

- En una realización particular del método del segundo aspecto de la invención, la expresión
- 20 “aumentar la cantidad de COVs producidos por hongos resistentes al quitosano” hace referencia a que la cantidad de al menos uno de los COVs producido por los hongos resistentes al quitosano al final del método es superior que un valor de referencia, en al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%,
- 25 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 625%, 650%, 675%, 700%, 725%, 750%, 775%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%. En una realización preferida, el valor de referencia es la cantidad de dicho al menos
- 30 un COV producido por el mismo hongo (misma especie o cepa de hongos) tratado con un método de referencia, diferente de los métodos de la invención. En una realización preferida, el método de referencia es un método que comprende las mismas etapas que los métodos de la invención, excepto porque no comprende añadir quitosano al medio. Por tanto, en una realización aún más preferida, el método de referencia de la invención es un método que

comprende simplemente cultivar el hongo de la invención en un medio cultivo adecuado para el cultivo de los hongos de la invención, en un medio de cultivo que no comprende quitosano.

5 Métodos para determinar la cantidad de un determinado COV producidos por un cultivo de hongos son comúnmente conocidos por un experto en la materia, e incluyen los descritos en los ejemplos de la invención.

El término "1-octen-3-ol" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "oct-1-en-3-ol".

El término "3-octanona" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "Octan-3-one".

10 El término "Ácido 3-metilbutanoico" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "3-Methylbutanoic acid".

El término "Fenol\_3,4-dimetoxi-" hacer referencia al compuesto con nombre IUPAC "3,4-dimethoxyphenol".

El término "m-Guaiacol" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "3-Methoxyphenol".

15 El término "1-hexadecanol" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "hexadecan-1-ol".

El término "9-Octadecen-1-ol" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "octadec-9-en-1-ol".

20 El término "Metil-2,4-dimetilhexanoato" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "methyl 2,4-dimethylhexanoate".

El término "Metil-pirazina" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "2-methylpyrazine".

El término "2-6-10-15, tetrametil-heptadecano" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "2,6,10,15-tetramethylheptadecane".

25 El término "1-Tetradeceno" hace referencia al compuesto con nombre IUPAC "tetradec-1-ene".

El término “2,6,10-trimetil-dodecano” hace referencia al compuesto con nombre IUPAC “2,6,10-trimethyldodecane”.

El término “3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano” hace referencia al compuesto con nombre IUPAC “3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)octadecane”.

- 5 El término “2,6,10,14-tetrametil-heptadecano” hace referencia al compuesto con nombre IUPAC “2,6,10,14-tetramethylheptadecane”.

El término “Nonadecano” hace referencia al compuesto con nombre IUPAC “nonadecane”.

- 10 En una realización particular de los métodos de la invención, los métodos de la invención comprenden una etapa (i') anterior a la etapa (i) de la invención que comprende obtener un cultivo de hongos resistente al quitosano y que corresponde al cultivo de hongos de la etapa (ii) del método.

- 15 En una realización particular, el medio de cultivo utilizado en el cultivo de la etapa (i'), (i) y/o (ii) de los métodos de la invención es el medio de cultivo tal y como se ha definido en la presente invención y en cualquiera de las realizaciones particulares de la presente invención. En una realización preferida, el medio de cultivo utilizado en las etapas (i') y (ii) es el mismo (a excepción de que el medio de cultivo de la etapa (ii) comprende quitosano tal y como se ha indicado en la invención, a diferencia del medio de la etapa (i')). En otra realización preferida, el medio de cultivo utilizado en las etapas (i'), (ii) y (iii) de los métodos de la invención es el mismo y cualquier de los indicados en las definiciones y realizaciones particulares de la presente invención (a excepción de que el medio de cultivo obtenido de la etapa (i) y el utilizado en la etapa (ii), comprenden quitosano, tal y como se ha definido en la invención, a diferencia del medio de cultivo de la etapa (i')). En una realización particular, la etapa (i') de los métodos de la invención comprenden inocular el medio de cultivo de la invención, es decir, el medio de cultivo adecuado para el cultivo de los hongos de la invención tal y como se ha definido más arriba, con conidios de los hongos de la invención, en una concentración final con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo, tal y como se ha definido más arriba, de al menos  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ , conidios/ml, preferiblemente con al menos  $10^6$  conidios/ml. El término “conidios”, tal y como se usa en la presente invención, hace referencia al término comúnmente conocido por un experto en la materia. En una realización particular, hace referencia a las esporas asexuales inmóviles formadas directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena. En una realización preferida, dicha concentración de conidios es con respecto al medio líquido comprendido en el medio de cultivo de la invención. En otra realización particular, la

concentración de conidios inoculada para comenzar el cultivo de la etapa (i') de los métodos de la invención es de  $10^2$ - $10^{12}$ ,  $10^3$ - $10^{11}$ ,  $10^4$ - $10^{10}$ ,  $10^5$ - $10^9$ ,  $10^5$ - $10^8$ ,  $10^5$ - $10^7$  conidios/ml, preferiblemente  $10^5$ - $10^7$  conidios/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo, tal y como se define en la presente invención. En una realización preferida, dicha

5 concentración de conidios es con respecto al medio líquido comprendido en el medio de cultivo de la invención.

En una realización preferida, los cultivos de las etapas (ii) y (i') de los métodos de la invención, comienzan inoculando la concentración de conidios indicadas justo arriba, a la fracción líquida del medio de la invención, preferiblemente al medio líquido comprendido en

10 el medio de cultivo de la invención de las etapas (ii) o (i'), respectivamente.

En otra realización particular, el cultivo obtenido de la etapa (i') de los métodos de la invención tiene al menos 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 12 días, 15 días, 17 días, 20 días, 22 días, 25 días, 27 días, 30 días, 32 días, 35 días, 34 días, 45 días 50 días, 60 días, preferiblemente al menos 3 días.

15 En otra realización particular, el cultivo obtenido de la etapa (i') de los métodos de la invención tiene en torno a 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 12 días, 15 días, 17 días, 20 días, 22 días, 25 días, 27 días, 30 días, 32 días, 35 días, 34 días, 45 días 50 días, 60 días, preferiblemente en torno a 3 días. En una realización particular, la expresión "en torno a" en el contexto del número de días de

20 duración de un cultivo en la presente invención, hace referencia a una variabilidad de +- 12 horas.

En otra realización particular, la etapa (ii) de los métodos de la invención dura al menos 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 12 días, 15 días, 17 días, 20 días, 22 días, 25 días, 27 días, 30 días, 32 días, 35 días, 34 días, 45 días

25 50 días, 60 días, preferiblemente al menos 3 días. Tal y como entenderá un experto en la materia, el tiempo de duración de la etapa (ii) de los métodos de la invención, tal y como se definen en la presente invención, hacen referencia al tiempo de durante el cual se cultivan los hongos resistentes al quitosano de la invención en el medio que comprende quitosano obtenido de la etapa (i) del método.

30 En otra realización particular, la etapa (ii) de los métodos de la invención de los métodos de la invención dura en torno a 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 12 días, 15 días, 17 días, 20 días, 22 días, 25 días, 27 días, 30 días, 32 días, 35 días, 34 días, 45 días 50 días, 60 días, preferiblemente en torno a 3 días. En una

realización particular, la expresión “en torno a” en el contexto del número de días de duración de la etapa (ii) de los métodos de la invención, hace referencia a una variabilidad de  $\pm$  12 horas.

En una realización particular, la concentración final de quitosano en el medio obtenido de la etapa (i) de los métodos de la invención es de 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml, 0.6mg/ml, 0.7mg/ml, 0.8mg/ml, 0.9mg/ml, 1mg/ml, 1.5mg/ml, 2mg/ml, 2.5mg/ml, 3mg/ml, 3.5mg/ml, 4mg/ml, 4.5mg/ml, 5mg/ml, 5.5 mg/ml, 6mg/ml, 6.5mg/ml, 7mg/ml, 7.5mg/ml, 8mg/ml, 8.5mg/ml, 9mg/ml, 9.5mg/ml, 10mg/ml, 11mg/ml, 12mg/ml, 13mg/ml, 14mg/ml, 15mg/ml, 17mg/ml, 20mg/ml, 22mg/ml, 25mg/ml, 27mg/ml, 30mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo, tal y como se ha definido, preferiblemente de 1mg/ml. En una realización, la concentración final de quitosano en el medio obtenido en la etapa (i) del método de la invención es de 0.1mg/ml-30mg/ml, 0.1mg/ml-25mg/ml, 0.1mg/ml-20mg/ml, 0.1mg/ml-15mg/ml, 0.1mg/ml-10mg/ml, 0.1mg/ml-7mg/ml, 0.1mg/ml-5mg/ml, 0.1mg/ml-5mg/ml, 0.2mg/ml-4mg/ml, 0.5mg/ml-0.3mg/ml, con respecto a la fracción líquida del medio de cultivo, tal y como se ha definido, preferiblemente de entre 0.1mg/ml-10mg/ml, más preferiblemente de entre 0.5mg/ml-3mg/ml. En una realización preferida, la fracción líquida del medio es el medio líquido comprendido en el medio de cultivo.

En una realización particular, la etapa (i) de los métodos de la invención comprenden añadir quitosano en estado sólido, o en estado líquido en forma de solución. En una realización particular, la etapa (i) de los métodos de la invención comprenden añadir a la fracción líquida del medio de cultivo tal y como se ha definido más arriba, preferiblemente al medio líquido comprendido en el medio de cultivo de la invención, una solución de quitosano a una concentración de 0.1mg/ml-20mg/ml, preferiblemente a una concentración de 1 mg/ml-20mg/ml, 2mg/ml-17mg/ml, 3mg/ml-15mg/ml, 4mg/ml-12mg/ml, 5mg/ml-10mg/ml, preferiblemente 5mg/ml-10mg/ml. Métodos para obtener una solución de quitosano a una concentración determinada son comúnmente conocidos por un experto en la materia, así como para obtener una solución final a partir de una solución concentrada de quitosano, e incluyen los métodos descritos en los ejemplos de la invención. En una realización preferida, la etapa (i) de los métodos de la invención comprende añadir una solución de quitosano a una concentración de 1 mg/ml-20mg/ml a la fracción líquida del medio de cultivo.

En una realización particular, los utensilios utilizados en cada una de las etapas de los métodos de la invención se han esterilizado antes de su uso en el método de la invención, de manera que los utensilios utilizados en los métodos de la invención son estériles. Ejemplos no limitantes de los utensilios utilizados en los métodos de la invención incluyen

tanto el recipiente en que se llevan a cabo los cultivos, los medios de cultivo, como el tapón para sellar el recipiente en que se llevan a cabo los cultivos. Por tanto, en una realización preferida, el medio de cultivo y los utensilios utilizados en cualquiera de las etapas (i')-(ii) de los métodos de la invención han sido esterilizados antes de llevarlos a cabo. Métodos de esterilización de medios de cultivo y de utensilios de laboratorio con comúnmente conocidos por un experto en la materia, e incluyen el autoclavado de estos, por ejemplo, tal y como se describe en los ejemplos de la invención.

En una realización particular, para que los métodos de la invención se lleven a cabo en condiciones estériles, las preparaciones de los medios de cultivo y los cultivos de la invención, se llevan a cabo en los recipientes esterilizados tal y como se ha indicado justo arriba, y sellados. Por tanto, en una realización particular, los cultivos de los hongos de los métodos de la invención se llevan a cabo en un recipiente sellado. En una realización particular, dicho sellado se realiza de manera que pueda entrar y salir oxígeno u otro elemento necesario para el crecimiento de los hongos, en el recipiente de cultivo. Métodos para sellar un recipiente en el que se cultiva un hongo que permiten la entrada de oxígeno u otros elementos necesarios para el crecimiento de los hongos son comúnmente conocidos para un experto en la materia, e incluyen, como ejemplo no limitativo, el método descrito en los ejemplos de la invención.

En una realización particular, las condiciones de cultivo de los hongos en cualquiera de las etapas de los métodos de la invención, comprenden mantener el cultivo a una temperatura de 15°C -35°C, 18°C -32°C, 20°C -30°C, 20°C -28°C, 22°C -26°C, 23°C -25°C, preferiblemente 23°C-25°C, y con iluminación natural.

En otra realización particular, las condiciones de cultivo de los hongos en cualquiera de las etapas de los métodos de la invención, comprenden mantener el cultivo a en agitación, preferiblemente a 25-500rpm, 50-500rpm, 50-250rpm.

En una realización particular, los COVs generados por los hongos de la invención al exponerlos a un medio con quitosano, dependen de la edad de los cultivos que se exponen a quitosano (i.e. la edad o días de los hongos que se utilizan en la etapa (ii) de los métodos de la invención), así como del tiempo durante el cual están expuestos al quitosano en la etapa (ii) del método (i.e. tiempo de duración de la etapa (ii) del método).

Tal y como entenderá un experto en la materia, los COVs indicados arriba obtenidos con el método del segundo aspecto de la invención se obtienen en una cantidad mayor con dicho método, que con un método de referencia tal y como se ha definido más arriba,

preferiblemente en al menos uno de los porcentajes indicados en la definición de la expresión “aumentar la cantidad de COVs producidos por hongos resistentes al quitosano”.

En una realización particular, los métodos de la invención permiten obtener al menos uno de los COVs indicados en cualquiera de las realizaciones de la invención, en una cantidad superior a la obtenida con un método de referencia, tal y como se ha definido más arriba, en donde la cantidad obtenida con dicho método de referencia puede ser igual o cercana a 0. Por tanto, en una realización particular, los métodos de la invención permiten obtener al menos uno de los COVs indicados en cualquiera de las realizaciones de la invención, en una cantidad superior a la obtenida con un método como cualquiera de los métodos de la invención, excepto por que dicho método no comprende añadir quitosano al medio de cultivo, en donde la cantidad obtenida con dicho método de referencia puede ser igual o cercana a 0.

En una realización particular, los métodos de la invención comprenden una etapa (iii) en donde se aíslan COVs obtenidos en la etapa (ii) del método correspondiente. Métodos para aislar COVs son comúnmente conocidos para un experto en la materia, y comprenden, por ejemplo, aspirar la atmósfera del recipiente sellado en que se han cultivado los hongos de la invención al final de la etapa (ii) del método, o en que se han transferido los hongos obtenidos al final de la etapa (ii) del método, y transferir dicha atmósfera a un recipiente sellado herméticamente. Dicho recipiente sellado herméticamente puede comprender un difusor que permite liberar la atmósfera en la que se encuentran los COVs obtenidos con los métodos de la invención en un lugar de interés. En una realización particular, para extraer los COVs en la etapa (iii) del método, antes de la extracción, se calienta el recipiente sellado en que se han cultivado los hongos de la invención al final de la etapa (ii) del método, a al menos 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, preferiblemente a al menos 60°C. En otra realización particular, para extraer los COVs en la etapa (iii) del método, antes de la extracción, se calienta el recipiente sellado en que se han transferido los hongos obtenidos al final de la etapa (ii) del método, a al menos 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, preferiblemente a al menos 60°C.

Otro método para aislar los COVs obtenidos de la etapa (ii) del método de la invención comprende fijar los COVs obtenidos en la atmósfera del recipiente sellado en que se han cultivado los hongos de la invención al final de la etapa (ii) del método, o en que se han transferido los hongos obtenidos al final de la etapa (ii) del método, mediante el uso de fibras de microextracción de fase sólida (fibras SPME), tal y como se describe, por ejemplo, en los ejemplos de la solicitud.

En una realización particular, la etapa (iii) del método se realiza aspirando la atmósfera del recipiente sellado en que se han cultivado los hongos de la invención al final de la etapa (ii) del método, y transfiriendo dicha atmosfera a un recipiente sellado herméticamente. En una realización particular, la etapa (iii) del método se realiza aspirando la atmósfera del recipiente sellado en que se han transferido los hongos obtenidos al final de la etapa (ii) del método y transfiriendo dicha atmosfera a un recipiente sellado herméticamente. En otra realización particular, la etapa (iii) del método se realiza poniendo en contacto la atmosfera del recipiente sellado en que se han cultivado los hongos de la invención al final de la etapa (ii) del método, o en que se han transferido los hongos obtenidos al final de la etapa (ii) del método con fibras microextracción de fase sólida (fibras SPME).

En otra realización particular de la invención, la etapa (iii) de los métodos de la invención comprende transferir los hongos obtenidos al final de la etapa (ii) del método a un recipiente sellado. En una realización particular, dicho recipiente sellado se calienta a al menos 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, preferiblemente a al menos 60°C, preferiblemente antes de la extracción.

En una realización particular, los COVs aislados comprenden cualquiera de los COVs mencionados en cualquiera de las realizaciones particulares de la invención.

En una realización particular, el término “comprende” utilizado en una realización de la invención se sustituye por el término “consiste en”. En otra realización particular, el término “consiste en” utilizado en una realización de la invención se sustituye por “comprende”.

A continuación, se describe la invención por medio de los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan de manera únicamente ilustrativa y en ningún caso de manera limitativa.

## EJEMPLOS

**EJEMPLO 1: COVs obtenidos de un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 10, 20 o 30 días de duración tras exponer dicho cultivo 5 días a quitosano (ver Figs. 1-3).**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento y subcultivo del hongo

Se selecciona la cepa del hongo *Pochonia chlamydosporia* aislada de huevos infectados de nemátodos de quistes de los cereales (*Heterodera avenae*) en Sevilla. Este aislado,

*Pochonia chlamydosporia* aislado Pc123 (de aquí en adelante Pc123), se cultiva en placas de Petri con patata-dextrosa-agar (PDA) como medio de cultivo. Se trata de un hongo nematófago estudiado ampliamente como agente de control biológico.

5 *P. chlamydosporia* es un hongo resistente al quitosano, que puede soportar altas dosis del compuesto. El quitosano favorece el crecimiento del micelio de Pc123, mejora su esporulación y aumenta la producción de enzimas extracelulares para degradar el quitosano. También induce la producción de proteasas, la expresión de algunos genes e incrementa la virulencia sobre huevos de nematodos.

### **Preparación del medio inductor con quitosano**

10 Se disuelve quitosano en HCl (0.25 M) a una concentración de 10 mg/l. El quitosano se añadió paulatinamente al vaso de precipitados con el ácido dispuesto en un agitador magnético y con una barra magnética de agitación. Se empleó quitosano T8 (Chitosan 90/60/A1) con un tamaño de partícula menor a 0.5 mm, con una pérdida por desecación de 5.2%, un contenido de cenizas del 0.1%, viscosidad dinámica 20°C ( $\pm 5\%$ ) (1% sol. en 1% ácido acético sol.) de 69.0 mPa.s, un grado de desacetilación de 90.1% y una concentración  
15 de metales pesados inferior a 50 ppm, suministrado por Louis Schoppenhauer GmbH & Co. KG.

A continuación, se ajusta el pH a 5.60-5.61 con NaOH (1 M), siempre mientras la disolución se encuentra en agitación. Una vez ajustado, se hidratan y enjuagan las membranas de  
20 celulosa (membranas de diálisis) donde se introduce la disolución de quitosano a 10 mg/l. Posteriormente, se coloca la membrana de diálisis en un vaso de precipitados con agua destilada a 4°C durante 48 horas en constante agitación. Cada 24 horas es preciso cambiar el agua destilada del recipiente.

Pasadas las 48 horas se saca la membrana de diálisis, se vierte el contenido en una probeta  
25 y se mide el volumen para obtener la concentración del quitosano líquido. Se recomienda ajustar con agua destilada autoclavada a una concentración de 1 mg/ml. Por último, se autoclava 20 minutos a 121°C y se guarda a 4°C. La disolución se puede utilizar hasta un mes después de su preparación.

### **Crecimiento y cultivo de Pc123**

30 El crecimiento y cultivo de Pc123 se realizó utilizando arroz como sustrato. Se hidrató arroz y se pesaron 25 g de arroz hidratado para añadirlos a un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Se

le colocó un tapón de algodón en la boca del matraz, de tal forma que entre un poco hacia el cuello del matraz y sobresalga por arriba, evitando huecos por donde pueda entrar cualquier fuente de contaminación. El tapón se envolvió después con 2 capas de papel de aluminio, intentando dejar una fina capa de aire entre el algodón y el papel de aluminio, apretándolo en el cuello del matraz. Por último, se autoclavó durante 20 minutos a 121°C para obtener un sustrato estéril.

Se extrajeron los conidios del hongo Pc123 de colonias del hongo en placas de PDA de 14-21 días y se preparó una suspensión de  $10^6$  conidios/ml en agua destilada estéril. A continuación, se destaparon los matraces Erlenmeyer con arroz autoclavados, en condiciones de esterilidad, se diluyó 1 ml de la suspensión de conidios de Pc123 en 4 ml de agua destilada estéril y se inoculó en los matraces. Posteriormente, se volvieron a sellar para mantener la esterilidad dentro de los matraces y se agitó para homogeneizar la suspensión de conidios por el sustrato. Se incubaron en condiciones de laboratorio a 23-25°C e iluminación natural.

A los 10, 20 y 30 días, en condiciones de esterilidad, se destaparon los matraces con el hongo crecido, se le añadió a cada matraz 5 ml de la disolución de quitosano a 1mg/ml o de disolución tampón para los controles homogeneizándolo correctamente por todo el micelio, y se incubaron durante 5 días más en las mismas condiciones de cultivo. Al cabo de 5 días (15, 25 y 35 días de edad del cultivo), se miden los perfiles de COVs de los matraces.

## **Recolección y detección de COVs de Pc123**

El análisis de volátiles de Pc123 se llevó a cabo realizando una microextracción en fase sólida (SPME) y analizándolo en cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

Se siguió el protocolo descrito por Lozano-Soria *et al.* (2020). En condiciones de esterilidad, se prepara un vial con 5 g de muestra de cada matraz con el hongo. Se sella la tapa haciendo uso de unas pinzas metálicas y se introducen los viales en un baño de 60°C. Para llevar a cabo la HS-SPME se emplea un holder con el fin de proteger la fibra de Tenax durante la extracción. La descripción del holder se puede encontrar en el trabajo de Grafit *et al.* (2018). Se inserta la fibra en la zona superior (*headspace*) de los viales y se deja 15 minutos para que los COVs se repartan y alcancen el equilibrio entre la fibra, el medio y el *headspace*. Una vez pasado el tiempo la fibra se recoge dentro del holder y se lleva a la fase de desorción en el inyector de la GC/MS.

El análisis de GC-MS de los COVs extraídos se realiza usando un cromatógrafo Agilent 7890B GC System con automuestreador multipropósito (MPS) de GERSTEL. La fibra utilizada fue SPME Fiber, DVB/C-WR/PDMS/10, d. gray-3/pk (Part Number:5191-5874) con viales (Art.Nr.: 093640-036-00) y septums (Art.Nr.: 093640-040-00) para el sellado, de la marca GERSTEL. Se utilizó una columna de cromatografía de gases de alta resolución de la marca J&W Scientific, con número de referencia 122-1334, para la captación de COVs.

La fibra recoge los volátiles del vial a la vez que éste se calienta. La absorción de los volátiles se lleva a cabo durante 15 minutos mientras el incubador está a 60 °C, empleando el mismo protocolo que en el ejemplo 1 pero de manera automatizada por el cromatógrafo.

La desorción de los COVs de la fibra dura 240 segundos (4 minutos) en el inyector del GC. La temperatura del inyector es de 250°C y se trabaja en modo splitless. El horno de la columna tiene una temperatura inicial de 40°C, ascendiendo en una rampa de 5°C/minuto, llegando a una temperatura máxima de 230°C. Se aplica un flujo de helio como portador a 1 ml/minuto. A partir de entonces, la fibra se retira y la cromatografía continuó por 53 minutos.

Los espectros de masas que la máquina detecta se basan en el principio de la ionización por impacto electrónico. El MS trabajó con un rango de masas comprendidas entre las 25 y 400 uma. La temperatura de la fuente de ionización es de 230 °C y trabaja a 70 electron Volts. El cuadrupolo se halla a 150 °C.

Una vez identificados los compuestos por HS-SPME/GC-MS, se realiza un repaso manual de los compuestos identificados por el espectrómetro de masas que emplea la librería del sistema (Wiley275). Para ello se emplea el software Agilent MassHunter Qualitative Analysis Navigator B.08.00 de manera que se pueden superponer cromatogramas y comparar espectros de masas. Finalmente, se eliminan aquellos COVs cuya coincidencia con los espectros de masas de la librería del sistema sea menor al 50%. Además, para identificar los volátiles propios de *P. chlamydosporia*, se eliminan de dichas muestras aquellos volátiles propios de los controles de arroz, con y sin tratamiento de quitosano, ya que no los produce *P. chlamydosporia*.

Los compuestos restantes (seleccionados) se clasifican en 2 grupos en función de su abundancia: COVs mayoritarios (pico > 50000 ppm) y COVs minoritarios (50000 > pico ppm).

## RESULTADOS

Se han identificado un total de 25 COVs en las muestras de 15 días tratadas con quitosano, de los cuales 3 (DC007, DC011 y DC014) se sintetizan únicamente en presencia de

quitosano. Además, los compuestos DC030, DC002, DC004, DC006, DC012, DC013, DC019, DC048 ven aumentada su abundancia en presencia del quitosano (p-valor < 0.05) (ver Tabla 1).

En las muestras de 25 días se observan 20 COVs en presencia de quitosano, de los cuales los compuestos DC002, DC004, DC009, DC018, DC030 y DC033 ven aumentada su producción (p-valor < 0.05) (ver Tabla 2). Se observa también, que la producción de COVs se ve influenciada por la edad del cultivo.

Por último, en las muestras de 35 días se observan 20 COVs en presencia de quitosano, de los cuales los compuestos DC001, DC004, ven aumentada su producción (p-valor < 0.05) (ver Tabla 3).

**Tabla 1.** Muestra los COVs identificados y su altura de pico del cultivo de *Pochonia chlamydosporia* en arroz durante 10 días y 5 días más con quitosano (Pc+T8) o una disolución tampón (Pc).

| Código       | Compuesto                           | Tiempo de retención (min) | Altura pico Pc  | Altura pico Pc+T8 |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------|
| <b>MCOVs</b> |                                     |                           |                 |                   |
| DC002        | Acetoína                            | 11.876                    | 66402.66        | 140203.66         |
| DC004        | 1,3-Octadieno                       | 14.68                     | 56919.33        | 89883.33          |
| DC008        | Anisol                              | 19.2                      | 69604           | 51741.33          |
| DC010        | 1-Octen-3-ol                        | 21.85                     | 649414          | 399266            |
| <b>DC011</b> | <b>3-Octanona</b>                   | <b>21.9</b>               | <b>0</b>        | <b>114310.66</b>  |
| DC013        | 3-Octanol                           | 22.29                     | 119415          | 130339.33         |
| DC018        | 1,3-dimetoxi-Benceno                | 28.25                     | 3022819<br>6.7  | 23396956.3        |
| <b>DC030</b> | <b>m-Guaiacol</b>                   | <b>32.2</b>               | <b>57144.66</b> | <b>73917</b>      |
| DC035        | trans-alfa-Bergamoteno              | 34.84                     | 91357           | 84528.33          |
| DC039        | CIS-BETA-FARNESA                    | 36.317                    | 1102849.<br>33  | 922376.66         |
| <b>mCOVs</b> |                                     |                           |                 |                   |
| DC006        | 2,3-Butanodiol                      | 16.698                    | 6820.33         | 38923.66          |
| <b>DC007</b> | <b>Ácido 3-metilbutanoico</b>       | <b>18.373</b>             | <b>0</b>        | <b>14420</b>      |
| DC012        | 2-metil-2-Borneno                   | 22.18                     | 16335.33        | 28434.66          |
| <b>DC014</b> | <b>Metil-2,4-dimetilhexanoato</b>   | <b>22.445</b>             | <b>0</b>        | <b>23886.6667</b> |
| DC016        | No identificado                     | 23.76                     | 23261           | 37258             |
| DC019        | Ácido_bencenoacético_éster_metilado | 28.59                     | 21108.33        | 48876.66          |
| DC025        | No identificado                     | 30.44                     | 23157.33        | 38556.66          |

|       |                                |        |          |          |
|-------|--------------------------------|--------|----------|----------|
| DC033 | 3,4-dimetoxi-Fenol             | 33.97  | 20412    | 12502    |
| DC036 | 2,6-Dimetoxitolueno            | 35.469 | 14198.33 | 8232.33  |
| DC040 | No identificado                | 36.47  | 38818.66 | 31658    |
| DC041 | beta-Bisabolenol               | 36.65  | 20789    | 20508    |
| DC043 | No identificado                | 37     | 9688.33  | 9270.66  |
| DC046 | 2,4-dimetil-Quinolina          | 37.552 | 10420.33 | 11458    |
| DC048 | 9H-Pirido[2,3-b]indol 6-metoxi | 38.69  | 20149.33 | 32050    |
| DC049 | No identificado                | 40.6   | 15165.33 | 15571.66 |

**Tabla 2.** Muestra los COVs identificados y su altura de pico del cultivo de *Pochonia chlamydosporia* en arroz durante 20 días y 5 días más con quitosano (Pc+T8) o una disolución tampón (Pc).

| Código       | Compuesto                           | Tiempo de retención (min) | Altura pico Pc  | Altura pico Pc+T8 |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------|
| <b>MCOVs</b> |                                     |                           |                 |                   |
| DC002        | Acetoína                            | 11.876                    | 125554.33       | 388898.33         |
| DC004        | 1,3-Octadieno                       | 14.68                     | 55423.66        | 69747             |
| DC008        | Anisol                              | 19.2                      | 91969.33        | 152280.33         |
| DC011        | 3-Octanona                          | 21.9                      | 399307.33       | 277246.66         |
| DC018        | 1,3-dimetoxi-Benceno                | 28.25                     | 2385215.7       | 27827414          |
| <b>DC030</b> | <b>m-Guaiacol</b>                   | <b>32.2</b>               | <b>82675.66</b> | <b>191472.33</b>  |
| DC039        | CIS-BETA-FARNESA                    | 36.317                    | 1402859         | 1068108.67        |
| DC040        | No identificado                     | 36.47                     | 23306.33        | 51100             |
| <b>mCOVs</b> |                                     |                           |                 |                   |
| DC009        | 2-heptenal                          | 21.36                     | 7376.33         | 16133             |
| DC012        | 2-metil-2-Borneno                   | 22.18                     | 20317           | 19826.33          |
| DC013        | 3-Octanol                           | 22.29                     | 114748          | 46439.33          |
| DC019        | Ácido bencenoacético éster metilado | 28.59                     | 26653           | 31430.66          |
| DC020        | No identificado                     | 28.64                     | 27762.33        | 36181.33          |
| DC025        | No identificado                     | 30.44                     | 7149            | 10626.33          |
| <b>DC033</b> | <b>3,4-dimetoxi-Fenol</b>           | <b>33.97</b>              | <b>16339.66</b> | <b>25793</b>      |
| DC035        | trans-alfa-Bergamoteno              | 34.84                     | 95971           | 44375             |
| DC041        | beta-Bisabolenol                    | 36.65                     | 21290           | 14716.33          |
| DC043        | No identificado                     | 37                        | 29647.33        | 24423.66          |
| DC049        | No identificado                     | 40.6                      | 13819.33        | 6881              |
| DC052        | ISOAROMADENDRENO EPÓXIDO            | 41.14                     | 21819.66        | 18851             |

**Tabla 3.** Muestra los COVs identificados y su altura de pico del cultivo de *Pochonia chlamydosporia* en arroz durante 30 días y 5 días más con quitosano (Pc+T8) o una disolución tampón (Pc).

| Código       | Compuesto                                     | Tiempo de retención (min) | Altura pico Pc | Altura pico Pc+T8 |
|--------------|-----------------------------------------------|---------------------------|----------------|-------------------|
| <b>MCOVs</b> |                                               |                           |                |                   |
| DC018        | 1,3-dimetoxi-Benceno                          | 28.25                     | 2451926<br>5   | 8751248.67        |
| DC020        | No identificado                               | 28.64                     | 53460          | 50249.33          |
| DC031        | 1,2,3-Trimetoxibenceno                        | 32.55                     | 79005          | 31746.66          |
| DC034        | 1,2,4-Trimetoxibenceno                        | 34.3                      | 69126.33       | 25044             |
| DC039        | CIS-BETA-FARNESA                              | 36.317                    | 442461.6<br>6  | 176422.66         |
| <b>mCOVs</b> |                                               |                           |                |                   |
| DC001        | anhídrido metanosulfórico                     | 7.7                       | 22358.33       | 27594.33          |
| DC002        | Acetoína                                      | 11.876                    | 17897          | 0                 |
| DC003        | 3-Hexen-1-ol, acetato (E)-                    | 12.8                      | 16231          | 0                 |
| DC004        | 1,3-Octadieno                                 | 14.68                     | 16699          | 40255.33          |
| DC008        | Anisol                                        | 19.2                      | 39812.66       | 3329              |
| DC032        | No identificado                               | 32.85                     | 45120.66       | 30699             |
| DC033        | 3,4-dimetoxi-Fenol                            | 33.97                     | 47431          | 5007.66           |
| DC035        | trans-alfa-Bergamoteno                        | 34.84                     | 13735          | 0                 |
| DC040        | No identificado                               | 36.47                     | 20834          | 5173.66           |
| DC041        | beta-Bisaboleno                               | 36.65                     | 14563          | 3672.66           |
| DC043        | No identificado                               | 37                        | 37273.66       | 18933.33          |
| DC044        | No identificado                               | 37.1                      | 6520           | 0                 |
| DC045        | Benceno, 1,2-dicloro-4,5-dimetoxi-, COLORONEB | 37.4                      | 22518.66       | 7982.66           |
| DC051        | No identificado                               | 40.98                     | 8441           | 0                 |
| DC052        | ISOAROMADENDRENO EPÓXIDO                      | 41.14                     | 11739.66       | 0                 |

5 **EJEMPLO 2: COVs obtenidos de un cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de 5 días de edad tras exponerlo 1, 2 o 3 días a quitosano**

El Ejemplo 2 tiene como base el mismo método de tratamiento que el ejemplo 1 (ver MATERIALES Y MÉTODOS del ejemplo 1), pero con modificaciones en el medio y tiempo de cultivo y en la concentración de quitosano y tiempo de exposición del hongo al tratamiento. Para el Ejemplo 2 se utilizó el mismo hongo (Pc123) que en el Ejemplo 1.

También, el método de preparación de quitosano fue el mismo, sin embargo, se obtuvo a una concentración final de 5 mg/ml, superior a la del Ejemplo 1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Crecimiento y cultivo de Pc123

- 5 Se utilizó medio líquido Czapek-Dox modificado (Olivares-Bernabeu y López-Llorca, 2002) como medio de cultivo. Se prepararon viales de 20 ml con 5 ml de Czapek-Dox y se inocularon  $10^6$  conidios/ml del hongo *P. chlamydosporia*. Los cultivos se crecieron durante 5 días en agitación a 120 rpm y 25 °C. A continuación, se eliminó el medio Czapek-Dox de los  
10 viales y se sustituyó por 5 ml de una disolución de quitosano a 1 mg/ml y por 5 ml de disolución tampón sin quitosano para los controles. A continuación, los viales se sellan para evitar pérdidas de COVs durante la manipulación. Tras añadir el tratamiento se tomaron muestras de los cultivos a 1, 2 y 3 días de exposición al quitosano.

### Recolección y detección de COVs de Pc123

- Se analiza directamente el vial donde se ha cultivado el hongo para no perder ningún volátil  
15 durante el manejo de la muestra. La metodología y tecnología empleada para la recolección y detección de COVs es la misma que para el Ejemplo 1 .

## RESULTADOS

### Efecto del quitosano en la producción de COVs de Pc123 en medio líquido

- Tras 24 horas en contacto con el quitosano se han determinado 19 COVs, 4 de los cuales  
20 son únicos de las muestras tratadas con quitosano (DC005, DC053, DC010), siendo uno de ellos un MCOV (DC010). Además, otros compuestos como el DC022, DC023, DC024, DC026, DC028, DC029, DC037, DC042, DC055 y DC056 ven aumentada su producción significativamente ( $p$ -valor  $< 0.05$ ). El compuesto DC010 ha mostrado en estudios previos una buena acción repelente frente al picudo negro de la platanera (*Cosmopolites sordidus*).  
25 Como se ha indicado es la mayor plaga del cultivo a escala mundial (Lozano-Soria *et al.*, 2020). El compuesto DC010 se encontró en altas cantidades y únicamente en las muestras tratadas con quitosano (ver Tabla 4).

- Después de 48 horas en presencia de quitosano se ve un cambio en el perfil de COVs del hongo. Sin embargo, el compuesto DC010 sigue apareciendo únicamente en las muestras  
30 tratadas con quitosano (ver Tabla 5).

Por último, después de 72 horas en contacto con el quitosano, se han determinado 14 COVs, de los cuales 5 son exclusivos de las muestras tratadas con quitosano (DC010, DC026, DC029, DC038 y DC042). Además, los compuestos DC026, DC028, DC0037, DC047, DC055 y DC056 ven aumentada su producción en presencia de quitosano ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) (Tabla 6).

Se observa que el perfil del hongo es variable con el tiempo del crecimiento, sin embargo, el quitosano tiene un efecto modulador en la producción de COVs del hongo, favoreciendo la producción *de novo* de algunos compuestos y el aumento de producción de otros.

Cambiando el método de inducción se facilita la producción de volátiles de ciertos compuestos como el 1-Octen-3-ol, etc. Además, da acceso a un nuevo abanico de COVs de potencial utilidad. Se obtienen muchas diferencias en los perfiles de volátiles al utilizar diferentes medios de cultivo debido a la diferente accesibilidad que estos aportan a los nutrientes esenciales como el carbono y el nitrógeno. El Czapek-Dox presenta fuentes definidas de carbono de fácil acceso con importantes aportes de nitrógeno (nitrato de amonio), fósforo y otros bioelementos. Por otro lado, el arroz presenta fuentes no definidas de carbono y menos cantidad de nitrógeno.

No obstante, empleando ambos medios de cultivo se han determinado volátiles de nueva producción y otros que aumentan significativamente su producción, por lo que el uso de diferentes bases puede promover la producción de determinados volátiles e incrementar su producción con la aplicación de quitosano. Así mismo, el uso de un medio líquido de cultivo puede facilitar la aplicación industrial de esta patente.

**Tabla 4.** Muestra los COVs identificados y su altura de pico del cultivo de *Pochonia chlamydosporia* en Czapek-Dox modificado durante 5 días y 1 día más con quitosano (Pc+T8) o una disolución tampón (Pc).

| Código       | Compuesto                         | Tiempo de retención (min) | Altura pico Pc   | Altura pico Pc+T8 |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|
| <b>MCOVs</b> |                                   |                           |                  |                   |
| <b>DC010</b> | <b>1-Octen-3-ol</b>               | <b>21.85</b>              | <b>0</b>         | <b>218516.66</b>  |
| DC023        | 8-metil-Heptadecano               | 29.95                     | 64212.66         | 87610.33          |
| DC028        | 2,6,11-trimetil-dodecano          | 31.2                      | 38103.66         | 59529             |
| DC037        | 2-6-10-15, tetrametil-heptadecano | 35.8                      | 23811.66         | 51634.33          |
| DC047        | 2,4-bis(1,1-dimetiletil)Fenol     | 38.2                      | 116881           | 131087.33         |
| <b>DC055</b> | <b>1-hexadecanol</b>              | <b>46</b>                 | <b>361050.66</b> | <b>1036705</b>    |

|              |                                   |              |               |                  |
|--------------|-----------------------------------|--------------|---------------|------------------|
| <b>DC056</b> | <b>9-Octadecen-1-ol</b>           | <b>52.6</b>  | <b>171950</b> | <b>626179.33</b> |
| <b>mCOVs</b> |                                   |              |               |                  |
| <b>DC005</b> | <b>Metil-pirazina</b>             | <b>15.59</b> | <b>0</b>      | <b>5187.66</b>   |
| DC015        | 3,7-dimetil-Decano                | 22.9         | 15703         | 11180            |
| DC017        | 5-metil-Undecano                  | 24.4         | 13636.33      | 10221.33         |
| DC022        | 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-Benceno  | 29.86        | 16118         | 25663            |
| DC024        | 2,3,5,8-tetrametil-decano         | 30.2         | 12118         | 16236            |
| DC026        | 2,6,10-trimetil-dodecano          | 30.6         | 4661.66       | 11949.33         |
| DC029        | 3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano | 31.5         | 9473          | 14333            |
| DC042        | Nonadecano                        | 36.9         | 9777          | 27725.33         |
| <b>DC053</b> | <b>1-Tetradeceno</b>              | <b>41.2</b>  | <b>0</b>      | <b>34551.33</b>  |

**Tabla 5.** Muestra los COVs identificados y su altura de pico del cultivo de *Pochonia chlamydosporia* en Czapek-Dox modificado durante 5 días y 2 días más con quitosano (Pc+T8) o una disolución tampón (Pc).

| Código       | Compuesto                         | Tiempo de retención (min) | Altura pico Pc | Altura pico Pc+T8 |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------|-------------------|
| <b>MCOVs</b> |                                   |                           |                |                   |
| <b>DC010</b> | <b>1-Octen-3-ol</b>               | <b>21.85</b>              | <b>0</b>       | <b>132448.33</b>  |
| DC023        | 8-metil-Heptadecano               | 29.95                     | 66092.33       | 69603.33          |
| DC037        | 2-6-10-15, tetrametil-heptadecano | 35.8                      | 64745.33       | 58443.3           |
| DC047        | 2,4-bis(1,1-dimetiletil)Fenol     | 38.2                      | 78442.66       | 69674.33          |
| DC055        | 1-hexadecanol                     | 46                        | 224019.66      | 191852.33         |
| DC056        | 9-Octadecen-1-ol                  | 52.6                      | 90861.33       | 118469            |
| <b>mCOVs</b> |                                   |                           |                |                   |
| DC021        | Naftaleno                         | 28.9                      | 10350          | 6898              |
| DC022        | 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-Benceno  | 29.86                     | 5426.66        | 0                 |
| DC024        | 2,3,5,8-tetrametil-decano         | 30.2                      | 5167.66        | 10693.66          |
| DC026        | 2,6,10-trimetil-dodecano          | 30.6                      | 9740.33        | 0                 |
| DC028        | 2,6,11-trimetil-dodecano          | 31.2                      | 34817.33       | 35308.66          |
| DC042        | Nonadecano                        | 36.9                      | 30276.33       | 27063             |
| DC054        | 2-6-11-15 tetrametil Hexadecano   | 41.9                      | 13774.33       | 16144             |

5

**Tabla 6.** Muestra los COVs identificados y su altura de pico del cultivo de *Pochonia chlamydosporia* en Czapek-Dox modificado durante 5 días y 3 días más con quitosano (Pc+T8) o una disolución tampón (Pc).

| Código | Compuesto | Tiempo de | Altura | Altura pico |
|--------|-----------|-----------|--------|-------------|
|--------|-----------|-----------|--------|-------------|

|              |                                          | retención<br>(min) | pico Pc        | Pc+T8           |
|--------------|------------------------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| <b>MCOVs</b> |                                          |                    |                |                 |
| <b>DC010</b> | <b>1-Octen-3-ol</b>                      | <b>21.85</b>       | <b>0</b>       | <b>55408.66</b> |
| DC023        | 8-metil-Heptadecano                      | 29.95              | 33097          | 74636.33        |
| DC037        | 2-6-10-15, tetrametil-heptadecano        | 35.8               | 24891.33       | 59734.66        |
| DC047        | 2,4-bis(1,1-dimetiletil)Fenol            | 38.2               | 59575.33       | 75155.66        |
| <b>mCOVs</b> |                                          |                    |                |                 |
| DC005        | Metil-pirazina                           | 15.59              | 5531.66        | 5023.66         |
| <b>DC026</b> | <b>2,6,10-trimetil-dodecano</b>          | <b>30.6</b>        | <b>0</b>       | <b>17214.66</b> |
| DC028        | 2,6,11-trimetil-dodecano                 | 31.2               | 18099.33       | 47015.66        |
| <b>DC029</b> | <b>3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano</b> | <b>31.5</b>        | <b>0</b>       | <b>11371.33</b> |
| <b>DC038</b> | <b>2,6,10,14-tetrametil-heptadecano</b>  | <b>36.05</b>       | <b>0</b>       | <b>4446.66</b>  |
| <b>DC042</b> | <b>Nonadecano</b>                        | <b>36.9</b>        | <b>0</b>       | <b>24760.33</b> |
| DC055        | 1-hexadecanol                            | 46                 | 6540.33        | 17328.66        |
| <b>DC056</b> | <b>9-Octadecen-1-ol</b>                  | <b>52.6</b>        | <b>4028.33</b> | <b>21290.33</b> |

## REFERENCIAS

- Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Stellarini, A., Corsetti, A. y Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 487-499.
- Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., y Dijksterhuis, J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2823-2829.
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R.W. y Tomberlin, J. K. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 840–859.
- Gómez-Vidal, S., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. B., y Salinas, J. (2006). Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron*, 37(7), 624-632.
- López-Moya, F., Colom-Valiente, M. F., Martínez-Peinado, P., Martínez-López, J. E., Puellas, E., Sempere-Ortells, J. M. y López-Llorca, L. V. (2015). Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. *Fungal Biology* 119(2-3), 154-169.

- Lopez-Moya, F., Kowbel, D., Nueda, M. J., Palma-Guerrero, J., Glass, N. L. y López-Llorca, L. V. (2016). *Neurospora crassa* transcriptomics reveals oxidative stress and plasma membrane homeostasis biology genes as key targets in response to chitosan. *Molecular BioSystems*, 12(2), 391-403.
- 5 Lopez-Moya, F., Suarez-Fernández, M. y López-Llorca, L. V. (2019). Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 332.
- Lozano-Soria, A., Picciotti, U., Lopez-Moya, F., Lopez-Cepero, J., Porcelli, F., & Lopez-Llorca, L. V. (2020). Volatile organic compounds from entomopathogenic and  
 10 nematophagous fungi, repel banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects*, 11(8), 509.
- Maciá-Vicente, J. G., Jansson, H. B., Abdullah, S. K., Descals, E., Salinas, J., y Lopez-Llorca, L. V. (2008). Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1),  
 15 90-105.
- Maciá-Vicente, J. G., Jansson, H. B., Talbot, N. J., y Lopez-Llorca, L. V. (2009). Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist*, 182(1), 213-228.
- 20 Morath, S. U., Hung, R. y Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73-83.
- Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J. P. y Rosenkranz, M. (2013). Volatile profiles of fungi—chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology*, 54, 25-33.
- 25 Olivares-Bernabeu, C. M., y López-Llorca, L. V. (2002). Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(2), 104-110
- Pagans, E., Font, X. y Sánchez, A. (2006). Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. *Journal of Hazardous*  
 30 *Materials*, 131(1-3), 179-86.

- Shaw, J. J., Spakowicz, D. J., Dalal, R. S., Davis, J. H., Lehr, N. A., Dunican, B. F., Orellana, E. A., Narváez-Trujillo, A. y Strobel, S. A. (2015). Biosynthesis and genomic analysis of medium-chain hydrocarbon production by the endophytic fungal isolate *Nigrograna mackinnonii* E5202H. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3715-3728.
- 5 Splivallo, R., Ottonello, S., Mello, A. y Karlovsky, P. (2011). Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 189(3), 688-699.
- Strobel, G. A., Knighton, B., Kluck, K., Ren, Y., Livinghouse, T., Griffin, M., Spakowicz, D. y Sears, J. (2008). The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology*, 154(11), 3319-3328.
- 10 Zavala-González, E. A., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Cruz-Valerio, M., Lopez-Llorca, L. V., y Ramírez-Lepe, M. (2016). Tolerance to chitosan by *Trichoderma* species is associated with low membrane fluidity. *Journal of basic microbiology*, 56(7), 792-800.

## REIVINDICACIONES

1. Método para obtener o aumentar la producción de Metil-pirazina, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-Benceno, 8-metil-Heptadecano, 2,3,5,8-tetrametil-Decano, 2,6,10-trimetil-Dodecano, 2,6,11-trimetil-Dodecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano, 2-6-10-15 tetrametil- Heptadecano, 5 Nonadecano, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) Fenol, 1-Tetradeceno, 1-Hexadecanol y 9-Octadecen-1-ol y combinaciones de los mismos, que comprende:
- (i) crecer *Pochonia chlamydosporia* en medio líquido Czapek-Dox modificado durante 5 días, y
  - (ii) eliminar el medio de cultivo y sustituirlo por una disolución de quitosano en una 10 concentración de 5 mg/ml y crecer el cultivo de *Pochonia chlamydosporia* de la etapa (i) durante 24 horas.

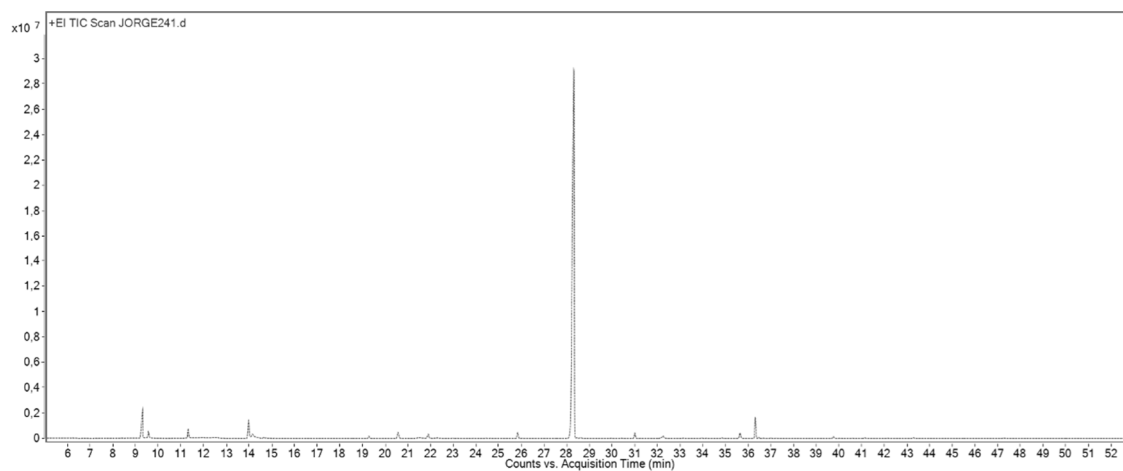


Fig. 1

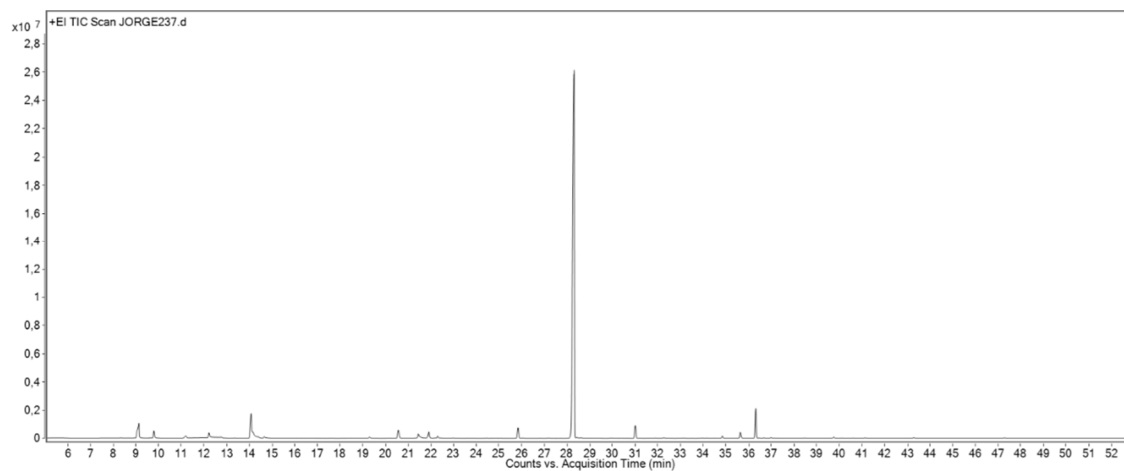


Fig. 2

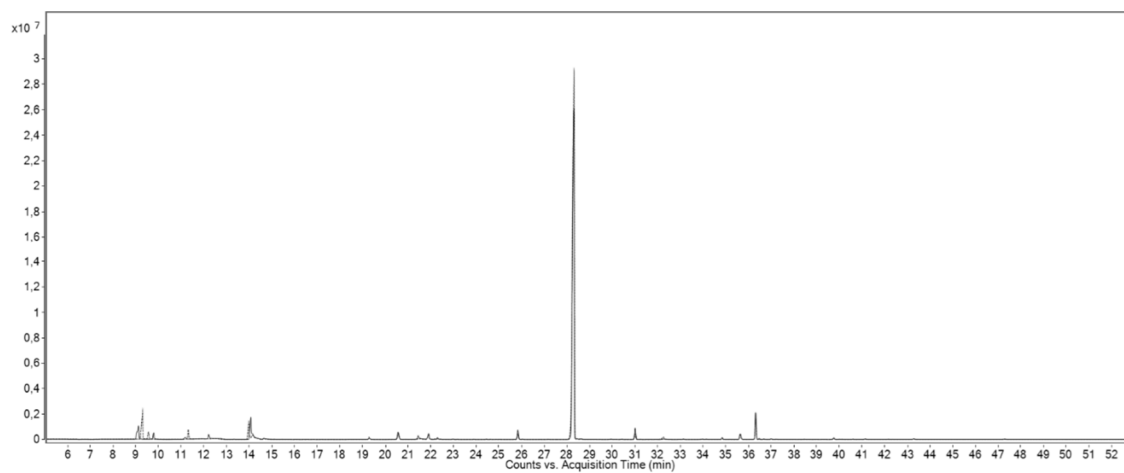


Fig. 3

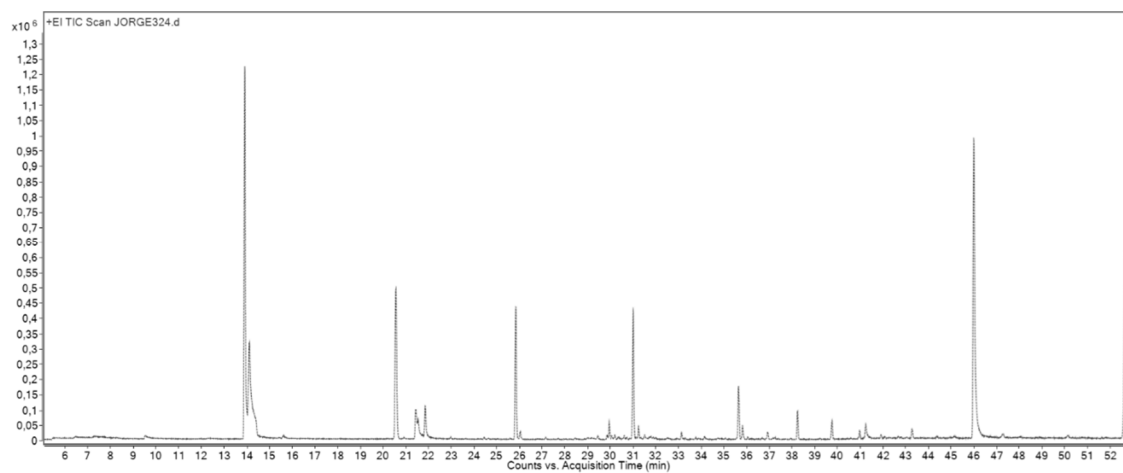


Fig. 4

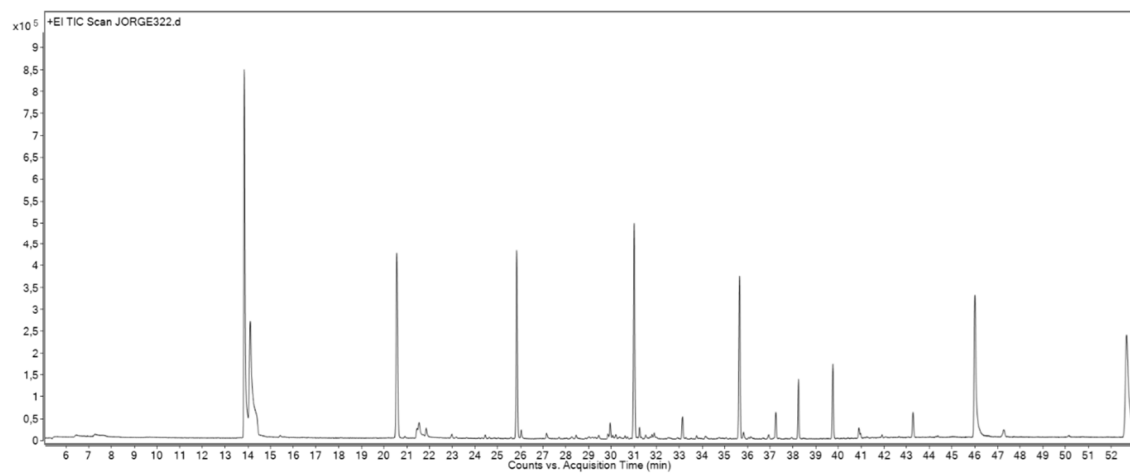


Fig. 5

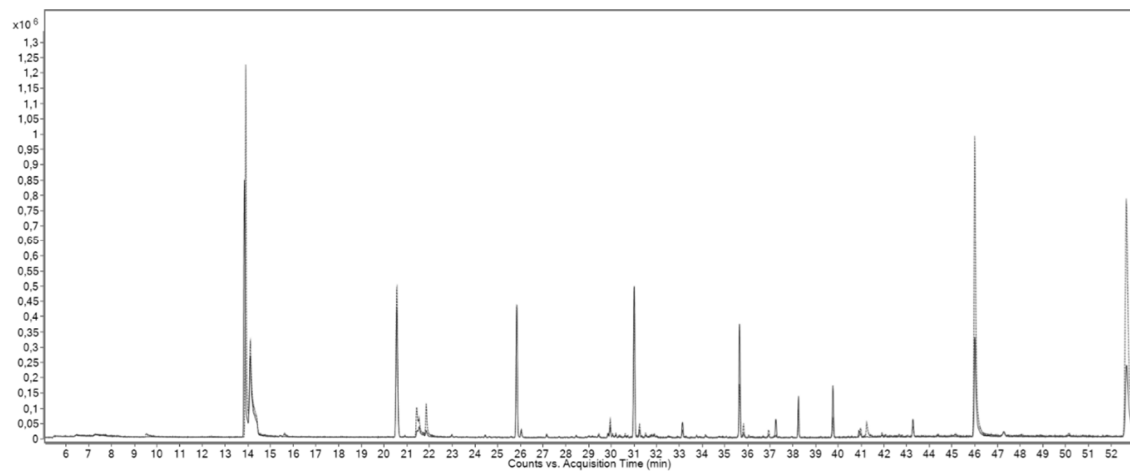


Fig. 6