

Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*

Evaluation of fungicidal activity and identification of volatile organic compounds released by *Trichoderma viride*

*Diana C. Sinuco**, *Andrés C. Pérez***, *Nubia Moreno****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65969

Resumen

Los metabolitos secundarios producidos por hongos son ampliamente diversos en estructura y función, lo que provee una fuente de compuestos con actividad biológica para aplicaciones en agricultura, farmacia y procesamiento de alimentos. Entre los metabolitos secundarios se encuentran compuestos orgánicos volátiles (COVs) a los cuales se atribuye un papel determinante en la comunicación entre microorganismos. En este trabajo empleamos una cámara de ensayos comunicada por el espacio de cabeza para evaluar la actividad debida únicamente a COVs. Los resultados indican que los COVs liberados por *T. viride* afectan el crecimiento de los hongos fitopatógenos evaluados. En el caso de *Fusarium* sp. se afectaron los halos de crecimiento y para *Colletotrichum gloeosporioides* se observaron cambios morfológicos en su color. Para identificar los COVs responsables de esta actividad, se usaron 3 técnicas de extracción: Headspace dinámico (HSD), headspace estático (HSE) y extracción líquido-líquido (ELL) y el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS). Mediante el muestreo del HSD y HSE se encontraron alcoholes y lactonas, mientras que en ELL los compuestos mayoritarios fueron alcoholes y varios ácidos orgánicos. Entre los compuestos determinados por las tres técnicas se encuentran alcohol bencílico, alcohol 2-feniletílico, 6-pentil-2H-piran-2-ona y gama-butirolactona. Esta última identificada por primera vez en *T. viride*. La comparación de las tres técnicas de extracción permitió establecer que HSD es el método de extracción de COVs que mejor simula la situación presentada en la cámara de evaluación de actividad biológica, permitiendo así identificar los COVs responsables de la actividad antifúngica detectada.

Palabras clave: Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, gama-butirolactona.

Abstract

The secondary metabolites produced by fungi widely vary in structure and function, providing a rich source of biologically active compounds with applications in farming, pharmacology and food processing. Volatile organic compounds (VOCs) are a biologically relevant class of secondary metabolites, since they are suspected of playing a crucial role in the communication between microorganisms. In this work, we use a test headspace chamber to evaluate the VOCs mediated antifungal activity of *T. viride* against *Fusarium* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides*. We observed that VOCs produced by *T. viride* interact with both fungi affecting the growth halos of *Fusarium* sp. and modifying the colour of *Colletotrichum gloeosporioides*. The VOCs responsible for this activity

* Dr. Sci. Profesora Asociada. Grupo Bioprospección de compuestos volátiles. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, Colombia. dcsinucol@unal.edu.co (autor para correspondencia)

** Químico Farmacéutico. Grupo Bioprospección de compuestos volátiles. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, Colombia. acperezc@unal.edu.co

*** MSc., Profesora Titular, Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioprocesos y Bioprospección, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia. ncmorenos@unal.edu.co.

were identified using three extraction techniques: Dynamical Headspace (DHS), Static Headspace (SHS) and liquid-liquid extraction (LLE), all of them analyzed via gas chromatography coupled to mass spectrometry (GCMS). DHS and SHS identified alcohols and lactones as VOCs, while with LLE we found a large number of alcohol components and several organic acids. All three techniques identified benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, 6-pentyl-2H-pyran-2-one and, for the first time associated to *T. viride*, gamma-butirolactone. After comparison between these extraction techniques, we established that DHS provides the most accurate simulation of biological activity in the test chamber, which reflects in a reliable identification of the VOCs with antifungal activity.

Key words: Volatile Organic Compounds (VOCs), *Fusarium* sp., *Colletotricum gloeosporioides*, gamma-butirolactone.

Recibido: enero 18 de 2017 **Aprobado:** mayo 25 de 2017

Introducción

Hoy en día los estudios dirigidos hacia la bioprospección de especies de origen natural, desencadenan esfuerzos de extracción, análisis e identificación de centenares de compuestos. Sin embargo, no basta con identificar un gran número de metabolitos, sino de establecer la actividad biológica potencial de dichas fuentes naturales de compuestos que pueden tener diversas aplicaciones. Entre estas aplicaciones, se destaca el control biológico de patógenos en plantas, como alternativa al uso de fungicidas, pues resulta amigable con el medio ambiente, seguro y puede proveer protección del cultivo a largo tiempo (Kanchiswamy, et al., 2015).

En este sentido los microorganismos producen mezclas de compuestos volátiles que pueden ser usadas como estrategia para la protección de cultivos. Hongos del género *Trichoderma* producen metabolitos secundarios que han sido usados como agentes biofertilizadores, bioprotectores y biocontroladores en agricultura, contra diferentes hongos fitopatógenos como *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Colletotricum* y *Fusarium* (Sivan & Chet, 1989; Ahmed, et al., 1999, Harman, et al., 2004). Estos hongos fitopatógenos causan pérdidas en cultivos de importancia económica para el país como banano (Ploetz, 2015), uchuva (González & Barrero, 2011), tomate (González, et al., 2012), entre otros.

Los mecanismos empleados por especies *Trichoderma* en control biológico de enfermedades de plantas pueden deberse a: A. una competencia física por el espacio y los nutrientes del medio; B. la producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica o antifúngica; C. parasitismo directo o D. inducción de resistencia (Howell, 2003).

En cuanto a la producción de metabolitos secundarios, algunos estudios han señalado el papel de los com-

puestos orgánicos volátiles (COVs) liberados por *T. viride* como responsables de diversos tipos de actividad. Así se han identificado alcohol isobutílico, alcohol isopentílico y 3-metilbutanal y se han asociado con la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Hung et al., 2013). También se ha detectado la presencia de la lactona 6-pentil-2H-piran-2-ona a la cual se atribuye la actividad nematocida de *T. viride* (Yang et al., 2012). En otras especies *Trichoderma* se han identificado compuestos C8 tales como 3-octanone, 1-octen-3-ol y 3-octanol como responsables del característico aroma (Stoppacher et al., 2010).

En este trabajo se propone un ensayo que permita establecer la actividad biológica debida únicamente a COVs liberados por el hongo *T. viride* frente a hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B y se comparan 3 métodos de extracción de COVs liberados por el hongo *T. viride*.

Materiales y métodos

Cultivo de bacterias. El cultivo del hongo biocontrolador *Trichoderma viride* (facilitado por el laboratorio de fermentaciones del grupo de bioprocesos y bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia) y los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B, aislados en el año 2014 a partir de hojas de plantas de ñame variedad criollo (*Dioscorea alata*) que presentaban síntomas de antracnosis (lesiones necróticas y manchas a nivel foliar) en fincas productoras de ñame del departamento de Córdoba (Colombia), se realizaron mediante la inoculación de un disco de 7 mm con crecimiento micelial de cada uno de los hongos en evaluación en medio sólido papa dextrosa agar (PDA). Tras la inoculación todos los medios fueron incubados en oscuridad a 25°C por 8 días. Los cultivos monospóricos obtenidos, fueron caracterizados morfológicamente mediante descripción macro y microscópica del patógeno, in-

cluyéndose color y forma de la colonia, aspecto y color del micelio; forma, tamaño, segmentación y esporulación de la conidia (Sutton, 1992; Barnet & Hunter, 1998; Beltrán, 2000).

Evaluación de actividad antifúngica. Con el fin de evaluar el efecto en el crecimiento de hongos fitopatógenos debido únicamente a los COVs liberados por *T. viride*, se diseñó una cámara formada por la unión de dos cajas de Petri de polietileno (8,8 cm de diámetro) con fraccionamientos internos de tres cubículos. Las cajas abiertas fueron colocadas una sobre la otra de tal forma que compartieran un cubículo vacío. En los dos cubículos restantes y opuestos se sembró el hongo fitopatógeno a evaluar, mientras que en los espacios enfrentados de la segunda caja se sembró *T. viride*, usando como medio de cultivo PDA.

En el espacio vacío se abrieron 4 orificios de 2mm diámetro con el fin de asegurar la interacción únicamente por el espacio aéreo entre las cajas (*headspace HS*). Las cajas permanecieron unidas con Parafilm® a 25°C durante 7 días. Se realizaron mediciones y observaciones a los 2 y 3 días después de la siembra. Cada ensayo se realizó por triplicado. En las mismas condiciones se sembraron 100 µl de Banagen 250 EC como control positivo y un blanco para cada hongo fitopatógeno.

Medición de cambios en el crecimiento de microorganismos. Para el análisis de los cambios observados en el crecimiento de los microorganismos se midieron los halos de crecimiento y los cambios morfológicos presentados durante el crecimiento de los hongos fitopatógenos a los 2 y 3 días de incubación respectivamente.

Para la medición de los halos de crecimiento se tomó registro fotográfico de las cajas de Petri y la imagen se sometió al análisis de dimensiones mediante el programa Imagin J (Image Processing and Analysis in Java - software libre).

Extracción de COVs. En este trabajo se compararon tres métodos de extracción de COVs: HS estático (HSE), HS dinámico (HSD) y Extracción líquido-líquido (ELL) para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

A. HSE: En este caso se utilizó la misma cámara diseñada para la evaluación de actividad antifúngica. En dos compartimentos de la caja de Petri se sembró el hongo *T. viride* y en el cubículo restante se depositaron 100mg de Hayesep® a una temperatura de 25°C

y durante 7 días, tiempo en el que el hongo *T. viride* completa su fase de crecimiento.

B. HSD: Para este método, *T. viride* fue cultivado en medio líquido en un fermentador esterilizado equipado con una bomba Heidolph Pump Drive 5006 empleado para el suministro del medio de cultivo en el sistema cerrado. Sobre esta fase acuosa se hizo pasar una corriente de aire purificado con un cartucho de carbón activado de 0,32µm. Los volátiles arrastrados por la corriente de aire se retuvieron en un cartucho empacado con Hayesep® durante 7 días con flujo constante de aire (50ml/min) y a temperatura ambiente. Los volátiles retenidos se eluyeron con 1ml de n-hexano.

C. ELL: El medio de cultivo obtenido luego del muestreo por HSD se sometió a extracción continua L-L usando una mezcla pentano:diclorometano 1:1 durante 24 h. Luego de este tiempo la fase orgánica se concentró por destilación fraccionada a 40°C hasta un volumen de 0,5ml aproximadamente.

Análisis de compuestos volátiles por GC-MS. Los análisis cromatográficos se realizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) (Shimadzu QP5000), empleando una columna FFAP (J& W Scientific, 30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm df) y en análisis complementarios se usó una columna DB-5 (J& W Scientific, 30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm df). El programa de temperatura para las dos columnas fue el siguiente: 40 °C durante 3 minutos, luego calentamiento a 4°C/min hasta 180 °C, y calentamiento a 10°C/min hasta 250 °C en la que se mantuvo durante 5 minutos. La ionización fue en modo impacto electrónico con un potencial de ionización de 70 eV, en un rango de masas entre 40 y 350 uma. La presión en la cabeza de la columna fue de 1,5 kPa y flujo de helio de 1,3 ml/min. Las muestras se inyectaron en un puerto de inyección split-splitless a 250°C en modo splitless durante 1min. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus índices de retención calculados usando una mezcla de alcanos C6-C26 en las dos columnas y sus espectros de masas con los presentes en la base de datos NIST/EPA/NIH Mass Spec Library Version 2.0 y el uso de sustancias de referencia cuando fue posible.

Resultados y discusión

Evaluación de la actividad antifúngica. Mediante la cámara de ensayo propuesta, fue posible evidenciar un efecto de los COVs liberados por *T. viride* en el crecimiento *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y en la morfología de *Colletotrichum gloeosporioides* 26B.

Tabla 1. Resultados de la medición de halos de crecimiento de *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) frente a los COVs liberados por *T. viride*.

Tiempo de exposición	Halos de crecimiento (cm) ± s. (%CV)		
	COVs. <i>T. Viride</i>	Control positivo	Blanco
Día 2	2,67±0,15 (5,6)*	2,59±0,11 (9,3)**	3,17±0,19 (5,8)
Día 3	4,65±0,08 (1,7)	4,43±0,43 (9,6)**	4,90±0,46 (9,4)

Diferencias significativas Prueba t-student * (p=0,10); ** (p=0,05).

En la tabla 1 se presentan los resultados de las mediciones de los halos de crecimiento a los 2 y 3 días de exposición de *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) frente a los COVs liberados por *T. viride*.

A los 2 días de exposición, se observó que el halo de crecimiento de *Fusarium* sp. se ve disminuido en un 13% en comparación con el crecimiento del blanco, una cifra importante frente a la establecida para el control positivo que presentó una disminución en el halo de crecimiento del 18%. Estos crecimientos presentan diferencias significativas frente al crecimiento del blanco, a un nivel del 90% de confianza entre el crecimiento por exposición a COVs de *T. viride* y del 95% para el fungicida comercial. Al tercer día, la disminución en el halo de crecimiento es del 10% para el fungicida comercial y del 5% en las muestras con exposición a los COVs de *T. viride*. Aunque la inhibición del halo de crecimiento no es significativamente diferente con respecto al blanco, se conserva una

actividad biológica debida a los COVs. Después del 4 día no fue posible medir halos de inhibición por cuanto el crecimiento del blanco alcanzó el máximo tamaño permitido por la caja de Petri.

Para el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* 26B en la actividad sobre el crecimiento no se observó una diferencia significativa entre los halos de crecimiento de las muestras expuestas a COVs, fungicida y blanco. Sin embargo; se observaron cambios morfológicos que solamente fueron evidentes 7 días después de su inoculación.

En la figura 1 se presenta el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 26B en presencia de COVs liberados por *T. viride* y se compara contra el crecimiento de un control positivo y un blanco.

Las observaciones hechas al cabo de 7 días de crecimiento, permitieron evidenciar que en el blanco (C)

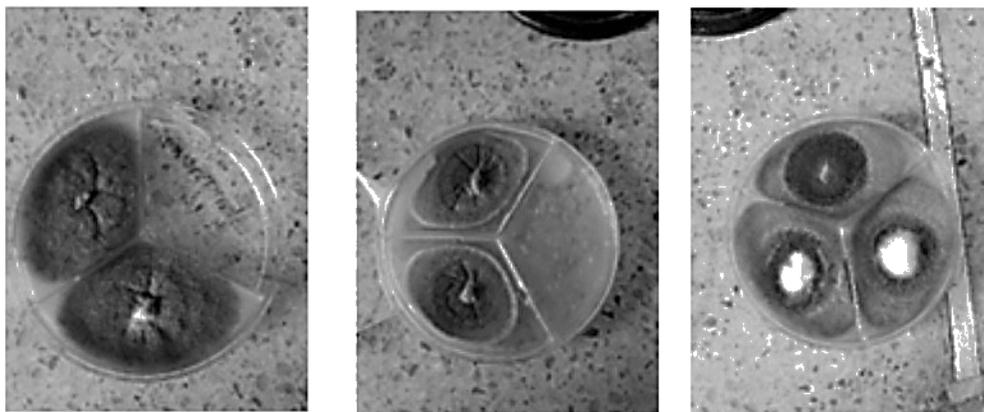
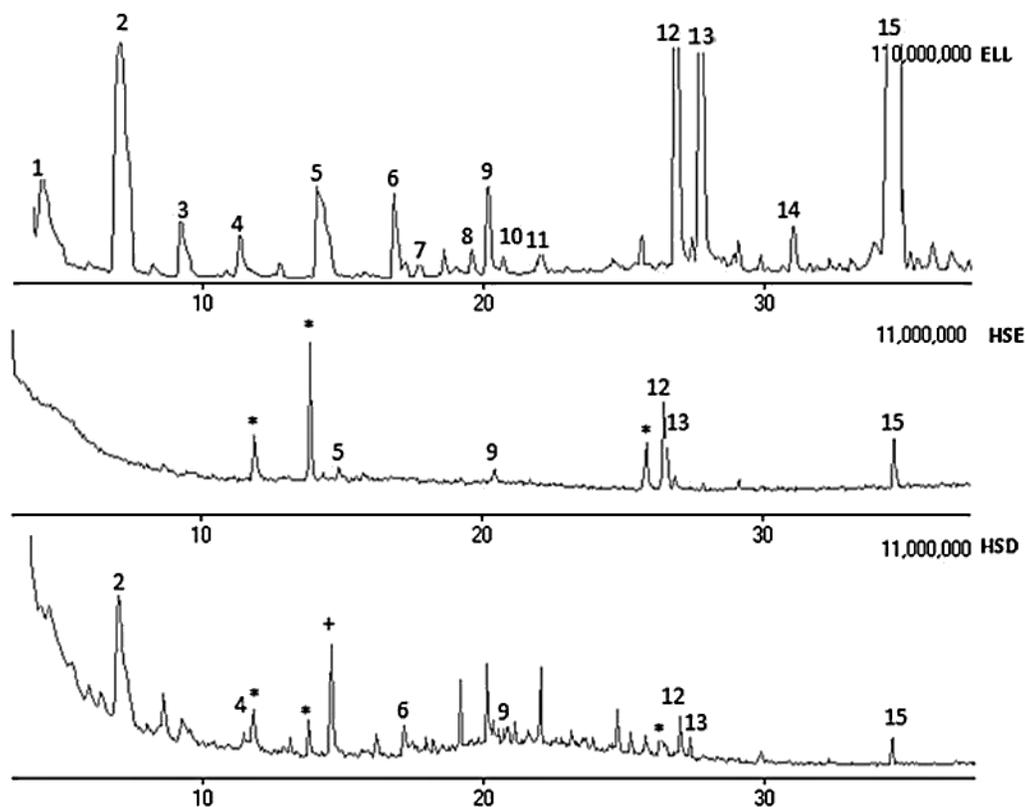


Figura 1. Comparación del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 26B expuesto a COVs liberados por *T. viride* (A); expuesto a un fungicida comercial (B) y un blanco de crecimiento (C) durante 7 días.



Los números corresponden a los indicados en la tabla 2. * señales que aparecen en el blanco de Hayesep y + en el solvente.

Figura 2. Análisis GCMS de COVs liberados por *T. Viride* mediante tres técnicas de extracción.

se presenta un mayor crecimiento de micelio y se forma una capa de color blanco esponjosa, ausente por completo en las muestras expuestas a COVs liberados por *T. viride* (A) y fungicida (B).

Estas observaciones cuantitativas y cualitativas del comportamiento de *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B frente a COVs liberados por *T. viride* coinciden con las observadas en otros estudios en los cuales se establece una inhibición del crecimiento de hongos causantes de la pudrición de la madera (*Serpula lacrymans*) frente a COVs liberados por especies del género *Trichoderma* (Bruce et al., 2000, Humpris et al., 2002).

Extracción e identificación de COVs. Una vez establecida la actividad biológica de los COVs liberados por *T. viride*, en el crecimiento y la morfología de *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B, se evaluaron 3 métodos de extracción, para establecer el más adecuado para la identificación de los compuestos responsables de esta actividad.

Un ensayo preliminar por microextracción en fase sólida (SPME), para la extracción de compuestos volátiles a los 2, 3 y 7 días de inoculación usando una fibra DVB/CAR/PDMS (50/100 μ m, Supelco), permitió la identificación de 6-pentil-2H-piran-2-ona únicamente a los 7 días de inoculación. Durante los días 2 y 3 no fue posible extraer ningún compuesto en cantidades que superaran el límite de detección del GCMS. Por esta razón los métodos de extracción de COVs se evaluaron cumplidos los 7 días de crecimiento de *T. viride*.

En la figura 2 se observa la corriente total iónica (TIC) de los COVs obtenidos para los tres métodos de extracción y su análisis por GC-MS.

La identificación de los COVs se realizó por comparación del criterio cromatográfico (índice de retención en dos columnas ortogonales) y el criterio espectral (espectro de masas) de los compuestos y sustancias de referencia cuando fue posible. Para ello se estimó que hubiese un factor de coincidencia mayor o igual

al 90% con referencia a los datos publicados en la librería NIST y una desviación relativa de los índices de retención experimental menor o igual al 2% en las dos fases estacionarias empleadas.

En la tabla 2 se presentan los compuestos identificados bajo este criterio, la cuantificación porcentual y las referencias bibliográficas en las cuales han sido identificados previamente los compuestos volátiles en otras especies del género *Trichoderma* u otros microorganismos.

Mediante ELL se extrajeron 15 compuestos distribuidos principalmente en alcoholes (52,2%), lactonas (32,8%) y ácidos orgánicos (8,9%). Los métodos de extracción del *headspace*, presentan una menor eficiencia en la recuperación de volátiles. En HSD se determinaron 7 compuestos de los cuales los mayoritarios fueron 3-metil-1-butanol y 1-hexanol; mientras

que por HSE se detectaron 5 compuestos principalmente alcoholes aromáticos y 6-pentil-2H-piran-2-ona.

En la ELL se identificaron 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol y 3-hidroxi-2-butanona (acetoina), que han sido asociados con la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* por COVs de *T. viride* (Hung, et al., 2013, Ryu et al., 2003). Se identificó como componente mayoritario del extracto LL, 6-pentil-2H-piran-2-ona, una lactona insaturada a la cual se atribuye la actividad nematocida de *T. viride* (Yang et al., 2012), la bioactividad presentada por *T. harzianum* y *T. koningii*, así como efectos en el crecimiento de tomate (Vinale et al., 2008).

Vale la pena mencionar, que en ELL se identificaron una serie de ácidos orgánicos que no fueron detectados en la extracción del *headspace*: Esto puede corroborar el hecho que los ácidos son metabolitos generados por las condiciones propias de fermentación del

Tabla 2. Identificación tentativa de compuestos orgánicos volátiles liberados por *T. viride* mediante tres métodos de extracción.

No.	Compuesto	IR FFAP	IR DB-3	ELL ^a	HSD ^a	HSE ^a	Microorganismo en el que se ha detectado ^b
				%	%	%	
1	2-metil-1-propanol	1099	647	4,1			<i>T. viride</i> (Hung et al., 2013)
2	3-metil-1-butanol	1205	736	21,8	63,7		<i>T. viride</i> (Mueller et al., 2013; Hung et al., 2013); <i>T. virens</i> (Crutcher, et al., 2013)
3	3-hidroxi-2-butanona (acetoina)	1262	718	3,2			<i>T. viride</i> (Hung et al., 2013)
4	1-Hexanol ^c	1360	851	1,4	9,5		<i>T. viride</i> (Mueller et al., 2013)
5	Ácido acético ^c	1450	600	6,7		0,3	<i>Candida tropicalis</i> (Bunge et al., 2008); <i>Bacillus</i> spp. (Schulz and Dickschat, 2007)
6	Benzaldehído ^c	1495	960	2,6	6,1		<i>Trichoderma</i> spp. (Wheatley et al., 1997)
7	Ácido 2-metil-propánico	1523	668	0,3			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y1001 (Bruce et al., 2004)
8	Ácido butanóico ^c	1619	681	0,4			<i>Lactobacillus casei</i> (Tracey y Britz, 1989)
9	γ-butirolactona	1633	1299	2,4	2,1	0,3	<i>Fusarium graminearum</i> (Busko et al., 2014)
10	Ácido 3-metil-butanoico	1662	873	0,1			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y1001 (Bruce et al., 2004)
11	Ácido hexanóico	1829	1019	0,6			<i>Streptomyces</i> spp. (Schulz y Dickschat, 2007)
12	Alcohol benzílico	1865	1039	12,5	8,9	46,5	<i>Bjerkandera adusta</i> CBS 595.78 (Lapadatescu et al., 2000)
13	Alcohol 2-feniletílico	1925	1118	12,2	3,9	22,6	<i>T. atroviride</i> (Stoppacher et al., 2010); <i>T. virens</i> (Crutcher, et al., 2013)
14	Ácido octanóico	2083	1279	1,2			<i>Lactobacillus casei</i> (Tracey y Britz, 1989).
15	6-pentil-(2H)-piran-2-ona	2210	1469	30,4	5,8	30,3	<i>T. virens</i> (Crutcher, et al., 2013); <i>Trichoderma</i> spp. (Yang, et al., 2012)

a. Cuantificación por porcentaje de área. b. Consulta de la base de datos <http://bioinformatics.charite.de/mvoc/index.php?site=ergebnis> c. compuestos identificados inequívocamente por comparación de índices de retención y espectro de masas contra sustancias de referencia.

proceso de fermentación y al metabolismo de bacterias (Lemfack *et al.*, 2014) y no al metabolismo de *T. viride*.

De otra parte, en los métodos de extracción del *headspace* de *T. viride*, estos pueden representar una manera más cercana al ambiente al cual se encuentran expuestos los hongos fitopatógenos evaluados. La extracción en estos métodos depende de la afinidad de los COVs por el material sorbente utilizado. En este caso, el Hayesep® demostró una mayor afinidad por compuestos de naturaleza polar, que puede ser más eficiente cuando se hace en medio líquido y por el paso de una corriente de aire purificado, que favorece el desplazamiento de los compuestos volátiles al *headspace*. Adicionalmente a los COVs extraídos por HSE, en HSD se logran extraer 3-metil-1-butanol, 1-hexanol y benzaldehído.

Otros COVs como 3-metilbutanal, detectado por el método de purga y trampa (Hung *et al.*, 2013), así como algunos monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos detectados por HS-SPME en cultivos de otras especies *Trichoderma* (Stoppacher *et al.*, 2010) no fueron detectados en ninguno de los tres métodos de extracción aquí evaluados.

Finalmente, dado que la evaluación de la actividad biológica fue realizada en medio sólido, es posible asociar los COVs identificados mediante HSE con dicha actividad. Es así como las lactonas γ -butirolactona y 6-pentil-2H-piran-2-ona y los alcoholes bencílico y 2-feniletílico, pueden ser responsables de los efectos en el crecimiento de *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y en los cambios morfológicos de *Colletotrichum gloeosporioides* 26B. La γ -butirolactona se caracteriza por una percepción olfativa que se relaciona con el aroma del coco (Schulz & Dickschat, 2007) y ha sido identificada en hongos del género *Fusarium graminearum* (Busko *et al.*, 2014). Este compuesto, hasta donde se conoce, es la primera vez que se identifica entre los COVs de *Trichoderma viride*. Sin embargo, se deben hacer ensayos de actividad con los compuestos aquí identificados.

Conclusiones

Al observar los resultados y los datos arrojados por los análisis efectuados, se puede concluir que los COVs liberados por *T. viride* y concentrados en el *headspace* de la cámara de ensayos propuesta, tienen un efecto en el crecimiento de *Fusarium* sp. DC9 (FIF025) y en los cambios morfológicos de *Colletotrichum gloeosporioides* 26B.

Se determinó que HSD es el método de extracción de COVs con mayor eficiencia y que mejor simula la situación presentada en la cámara de evaluación de actividad biológica. El uso de Hayesep® como material sorbente permitió la extracción y posterior identificación tentativa de los COVs liberados por *T. viride*: γ -butirolactona, 6-pentil-2H-piran-2-ona, alcohol bencílico, alcohol 2-feniletílico, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol y benzaldehído como posibles responsables de la actividad biológica mencionada. Los ensayos de actividad con los compuestos individuales se encuentran en desarrollo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento por el apoyo de la División de Investigación Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia quien financió la ejecución parcial de este trabajo mediante el proyecto código Hermes 23888.

Referencias bibliográficas

- Ahmed, A.S., Perez-Sanchez, C., Egea, C., & Candela, M.E. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology*, 48(1), 58-65.
- Barnet, H.L., & Hunter, B.B. (1998) *Illustrated Genera of imperfect fungi*. Minnesota, United States: Burgess Publishing Company, 218 p.
- Beltrán, J.D. (2000) Caracterización y diagnóstico del género *Colletotrichum*. causante de la antracnosis en ñame y otros cultivos. En: M. Guzman, G. Buitrago (Eds), Ñame: Producción de semillas por Biotecnología (pp. 54-65), Bogotá, Colombia, Unibiblos.
- Bruce, A., Verrall, S., Hackett, C. A., & Wheatley, R.E. (2004). Identification of volatile organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi. *Holzforschung*, 58(2), 193-198.
- Bruce, A., Wheatley, R.E., Humphris, S.N., Hackett, C.A., & Florence, M.E.J. (2000). Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *Holzforschung*, 54(5), 481-486.
- Bunge, M., Araghipour, N., Mikoviny, T., Dunkl, J., Schnitzhofer, R., Hansel, A., & Märk T.D. (2008) On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2179-2186.

- Buško, M., Kulik, T., Ostrowska A., Góral, T., & Perkowski, J. (2014). Quantitative volatile compound profiles in fungal cultures of three different *Fusarium graminearum* chemotypes. *FEMS Microbiology Letters*, 359(1), 85-93.
- Crutcher, F.K., Parich, A., Schuhmacher, R., Mukherjee, P., Zeilinger, S., & Kenerley, C. (2013) A putative terpene cyclase, vir 4, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics and Biology*, 56, 67-77.
- González, C. & Barrero, L. (2011), Estudio de la marchitez vascular de la uchuva para el mejoramiento genético del cultivo, Bogotá, Colombia: Ed. Kimpres Ltda. 44 p.
- González, I, Arias, Y., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* - Tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87 (1), 4-10.
- Humphris, S.N., Bruce, A., Buultjens, E., & Wheatley, R.E. (2002). The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), 215-219.
- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J.W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology*, 6(1), 19-26.
- Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., & Maffei, M.E. (2015). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science*, 20(4), 206-211.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quééré, J.L., & Bonnarne P. (2000). Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Applied Environmental Microbiology*, 66(4), 1517-22.
- Lemfack, M.C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., & Piechulla, B. (2014) mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, 42(1), D744-D748.
- Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., Zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J.P., & Rosenkranz, M. (2013). Volatile profiles of fungi—chemotyping of species and ecological functions *Fungal Genetics and Biology*, 54(1), 25-33.
- Ploetz, R.C. (2015). Management of *Fusarium wilt* of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73(1), 7-15.
- Ryu, C. Farag, M.A., Hu, C., Reddy, M.S., Wei, H., Pare, P.W., & Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(8), 4927-4932.
- Schulz, S., & Dickschat, J.S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4), 814-842.
- Sivan, A., & Chet, I. (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 135(3), 675-682.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193.
- Sutton, B. (1992) The genus *Glomerella* and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*, 7(1), 69-76.
- Tracey, R.P., & Britz, T.J. (1989). Freon 11 extraction of volatile metabolites formed by certain lactic Acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 55(6), 1617-23.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalbert, E.L., Marr, R., Barbeti, M.J., Li, H., Woo S.L., & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 80-86.
- Wheatley, R., Hackett, C., Bruce, A., & Kundzewicz, A. (1997). Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. Inhibitory to wood decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(2-3), 199-205.
- Yang, Z., Yu, Z., Lei L., Xia, Z., Shao, L., Zhnag, K., & Li, G. (2012). Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15 (4), 647-650.