

# Actividad inhibitoria del compuesto volátil bacteriano dimetilhexadecilamina sobre fitopatógenos

Crisanto Velázquez-Becerra, Lourdes Iveth Macías-Rodríguez, José López-Bucio, Idolina Flores-Cortez, Gustavo Santoyo Pizano y Eduardo Valencia-Cantero

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B5; Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia; Michoacán, México.

## Resumen

Uno de los factores que limitan fuertemente la producción agrícola son las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. El control de estas enfermedades se realiza empleando fungicidas como el Captan, cuyos efectos en la salud humana son controversiales. En el presente trabajo se encontró que la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 produce compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que inhiben el crecimiento de *B. cinerea*. Con el empleo de un análisis de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas, uno de estos VOCs es identificado como dimetilhexadecilamina. Un estándar comercial de dimetilhexadecilamina inhibió totalmente el crecimiento de *B. cinerea* y *P. cinnamomi*, mostrando una actividad inhibitoria 12 veces superior a la mostrada por el Captan. A la misma concentración (30  $\mu\text{M}$ ) la dimetilhexadecilamina también inhibió en crecimiento de *Trichoderma virens*, pero de forma discreta. Estos resultados sugieren que la dimetilhexadecilamina podría usarse como una alternativa al Captan y que *A. agilis* UMCV2 pudiera emplearse como agente de biocontrol de microorganismos fitopatógenos.

**Palabras clave:** Compuestos orgánicos volátiles, dimetilhexadecilamina, *Arthrobacter agilis*, compuesto antifúngico.

## Abstract

Among of the factors that mostly limit the agricultural production are the diseases caused by fungal pathogens, including *Botrytis cinerea* and oomycetes like *Phytophthora cinnamomi*. The common control of these pests is done by employing fungicides such as Captan, whose effects on human health are harmful. In the present study we found that the rhizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 produces different volatile organic compounds (VOCs) that inhibit the growth of *B. cinerea*. By using a gas chromatography analysis coupled to a mass detector, one of these VOCs was identified as dimethylhexadecylamine. The pure compound, dimethylhexadecylamine, strongly inhibited the *B. cinerea* and *P. cinnamomi* growth, showing a twelve-fold higher inhibitory activity compared to Captan. The dimethylhexadecylamine also showed a slight growth inhibition against *Trichoderma virens*. These results suggest that dimethylhexadecylamine could be used as an alternative option to the use of Captan and that *A. agilis* UMCV2 could also be employed as a control agent of plant pathogens.

**Key words:** Volatile organic compounds, dimethylhexadecylamine, *Arthrobacter agilis*, antifungal compound.

## Introducción

En el planeta, la producción agrícola está limitada por factores como la falta de agua, la limitación en la disponibilidad de nutrimentos y las enfermedades de las plantas. Dentro de los fitopatógenos destacan los hongos y los oomicetos, que causan pérdidas anuales que van del 10 al 15% (Oerke, 2006).

Entre los fitopatógenos que causan mayor afectación a los cultivos, están los microorganismos pertenecientes a los géneros *Botrytis* (hongo) y *Phytophthora* (oomiceto) (Elad *et al.*, 2007; Oerke, 2006).

El género *Botrytis* afecta al menos a 235 especies de plantas de interés agronómico u ornamental (Elad *et al.*, 2007), de forma paralela *Phytophthora* está presente en prácticamente todas los países con climas tropicales, subtropicales y templados, las pérdidas en cultivos por causa de *Phytophthora* están por arriba de los 3 mil millones de dólares estadounidenses anuales (Duncan, 1999), en cultivos tan disímiles como cocoteros, papaya, cítricos, aguacate, cacao, tabaco, pimientos, chiles, frijol, soya, chícharo,

cebolla, papa y jitomate entre otros (Gunashekar, 2008).

Para combatir a estos fitopatógenos se han empleado diversas estrategias como la rotación de cultivos, siembra de variedades resistentes y aplicación de fungicidas. Sin embargo estas prácticas de forma aislada rara vez han resultado adecuadas (Gunashekar, 2008).

Una alternativa para combatir a las enfermedades causadas por estos fitopatógenos es emplear microorganismos promotores del crecimiento vegetal que antagonicen a los agentes infecciosos. Dentro de los más empleados están los hongos del género *Trichoderma*, que antagonizan a otros hongos mediante procesos de micoparasitismo y la producción de toxinas antifúngicas (Howell, 2003). Adicionalmente, existe una amplia variedad de bacterias capaces de antagonizar hongos por mecanismos diversos, como son la producción de sideróforos (Santoyo *et al.*, 2010) producción de antibióticos (Valencia-Cantero *et al.*, 2005) y competencia por espacios de colonización en las raíces (Handelsman y Stabb, 1996). Recientemente se ha demostrado

✉ **Autor de correspondencia:** Eduardo Valencia-Cantero. Instituto Investigaciones Químico Biológicas; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B5; Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia; Michoacán, México; Tel.: 5.443.3265788; Fax: 5.443.3265788. Email: vcantero@umich.mx

que algunas bacterias producen compuestos orgánicos volátiles (VOCs) con un fuerte efecto antifúngico (Xu *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2007) sin embargo la identificación de dichos VOCs y el estudio de su actividad antifúngica como compuestos puros no ha sido siempre posible (Kai *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008).

*Arthrobacter agilis* UMCV2 es una bacteria que fue aislada de la rizósfera de plantas de maíz, su efecto promotor del crecimiento vegetal ha sido caracterizado en plantas de frijol y de alfalfa, (Valencia-Cantero *et al.*, 2007; Velázquez-Becerra *et al.*, 2007) ya sea por su capacidad para solubilizar hierro, condiciones de escasez de este metal o por su capacidad para producir compuestos orgánicos volátiles que estimulan el crecimiento vegetal (Velázquez-Becerra *et al.*, 2010). En nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que *A. agilis* UMCV2 es capaz de producir compuestos volátiles que promueven el crecimiento vegetal en plantas leguminosas. (Velázquez-Becerra *et al.*, 2010). El objetivo del presente trabajo fue identificar un compuesto orgánico volátil producido por *A. agilis* UMCV2 que presenta actividad supresora sobre los fitopatógenos *B. cinerea* y *P. cinamomi* pero que tiene una actividad sensiblemente menor sobre el hongo promotor del crecimiento *T. virens*.

## Materiales y Métodos

### Microorganismos usados

Se utilizó el hongo fitopatógeno de *B. cinerea*, el oomiceto fitopatógeno *P. cinnamomi* (Damian-Badillo *et al.*, 2010), el hongo promotor del crecimiento vegetal *T. virens* Gv 29-8 (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) y la rizobacteria *A. agilis* UMCV2 (Valencia-Cantero *et al.*, 2007). Los hongos y el oomiceto se mantuvieron en medio papa dextrosa agar (PDA). Para ser propagados o inoculados, un fragmento cuadrado de micelio de 0.25 cm de lado de un cultivo ya establecido fue cortado y colocado sobre una placa nueva de PDA e incubado a 25 °C en la oscuridad. Por su parte, *A. agilis* UMCV2 fue mantenida en agar nutritivo (AN), sembrada por estriado e incubada a 25 °C en oscuridad.

### Efecto de los VOCs de *A. agilis* en el crecimiento de *Botrytis cinerea*

Para la determinación del efecto de los volátiles de *A. agilis* sobre *B. cinerea* se emplearon cajas Petri divididas (100 x 15 mm, Becton-Dickinson and Co. cat. 351003) de manera que se evitó el contacto de ambos microorganismos y de sus metabolitos no volátiles. En una mitad de la caja con medio PDA se inoculó un fragmento de un cultivo de *B. cinerea*, en la otra mitad de la caja con AN se estrió (o no se estrió para el caso de la condición control) a la bacteria *A. agilis* UMCV2. Las cajas fueron incubadas por cinco días después de los cuales se midió el diámetro mayor de las colonias de *B. cinerea*.

### Análisis de compuestos orgánicos volátiles de *A. agilis* UMCV2

Para efectuar el análisis cromatográfico de los VOCs de *A. agilis* UMCV2, la bacteria se estrió en cajas Petri con AN que inmediatamente fueron selladas con parafilm (Parafilm® de Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, E.U.A.) incubándose a 25 °C por 72 h. Se realizó un análisis cromatográfico de los

compuestos orgánicos volátiles producidos por *A. agilis* UMCV2 con la técnica de microextracción en fase sólida o SPME (por sus siglas en inglés **S**olid **P**hase **M**icro **E**xtraction). Se realizó una perforación de 1 mm de diámetro a las cajas para introducir una fibra azul (PDMS/DVB) (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.) por 30 min a 30 °C, posteriormente los compuestos fueron desadsorbidos por 30 s en puerto de inyección del cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (Agilent 6850 Series II; Agilent, Foster City, CA, U.S.A.). Se empleó una columna capilar de 25 m x 0.52 mm, grosor de 0.32 µm (HP-FFAP, Agilent), y helio ultra puro (1 ml/min) como gas acarreador. Las rampas de temperatura fueron las siguientes: Tiempo inicial 40 °C, tiempo 1: 3 min, R1 3 °C/min, tiempo final 180 °C, tiempo 2: 5 min, tiempo post-corrída 230 °C/3min, tiempo máximo 240 °C, tiempo de equilibrio 3 min. El tiempo de corrída fue de 57 min. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus espectros de masa con la base de datos (NIST/EPA/NIH, "Chem Station" Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002).

### Efecto de la dimetilhexadecilamina sobre el crecimiento de *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *T. virens*

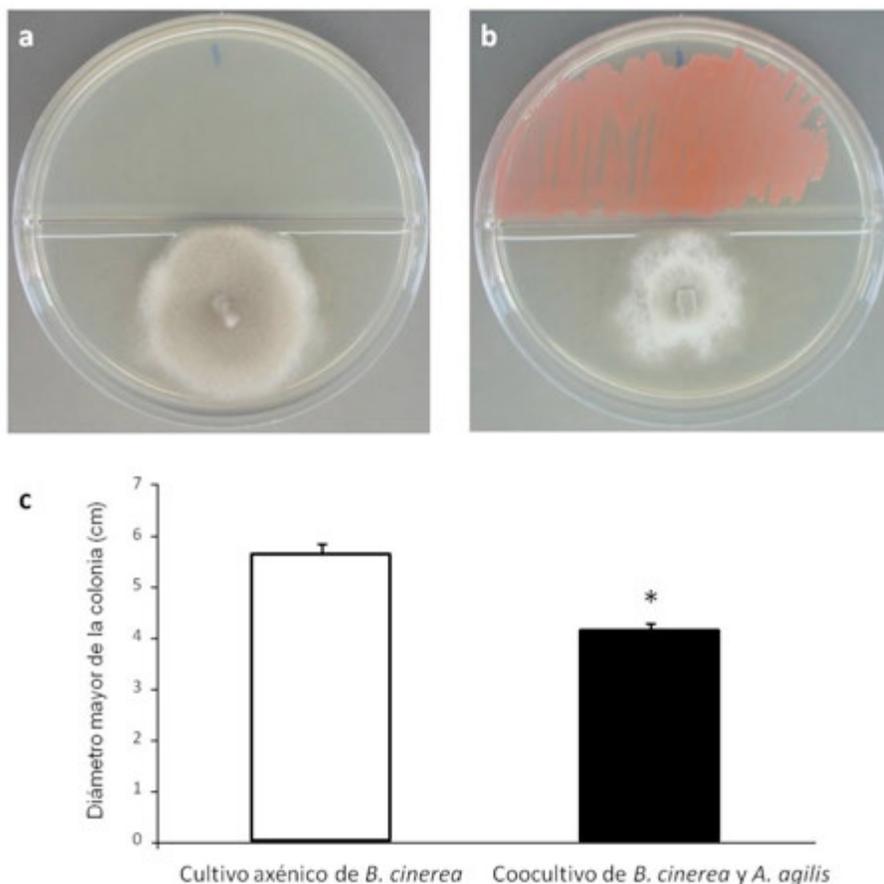
*B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *T. virens* se crecieron en medio papa dextrosa agar (PDA) por un periodo de 5 días a 25 °C en la oscuridad. Posteriormente se tomó un fragmento cuadrado de micelio de cada microorganismo, de 0.25 cm de lado y se sembró nuevamente en medio PDA adicionado con dimetilhexadecilamina o el fungicida Captan [N-(triclorometil) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida] en concentraciones de 0, 30, 60, 120 y 240 µM también por un periodo de 5 días en la oscuridad. Después de este tiempo, se midió el diámetro mayor de las colonias del hongo u oomiceto, cómo parámetro de crecimiento los microorganismos. El porcentaje de inhibición sobre los microorganismos se calculó como sigue: porcentaje de inhibición =  $[1 - (\text{diámetro mayor de la colonia} / \text{diámetro mayor de los controles})] \times 100$ .

### Análisis estadístico.

Todos los experimentos se repitieron de forma independiente dos veces y tuvieron al menos 4 réplicas cada vez. Los resultados se analizaron mediante una prueba de t de Student en el caso de comparación de dos medias, o una prueba de ANOVA y una separación de medias por prueba de Duncan para comparaciones múltiples ( $p < 0.05$ ).

## Resultados

Algunos trabajos han descrito el efecto inhibitorio de los VOCs producidos por bacterias rizosféricas sobre hongos del suelo (Zuo *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Con el fin de determinar el efecto de los VOCs de la rizobacteria *A. agilis* sobre el hongo fitopatógeno *B. cinerea*, se realizó un cocultivo *A. agilis* y *B. cinerea* en cajas divididas de forma que se evitó el contacto físico entre los dos microorganismos y sus metabolitos no volátiles. Después de 5 días de incubación fue claro que las colonias de *B. cinerea* crecidas en cocultivo con *A. agilis* tuvieron un crecimiento 30 % menor, que aquellas colonias del hongo crecidas en ausencia de la bacteria, lo que mostró que los VOCs de *A. agilis* producen inhibición en *B. cinerea* (**Figura 1**).



**Figura 1. Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por los VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2.** Empleando cajas petri divididas, se sembró en un lado de la caja un fragmento de 0.25 cm de lado de un cultivo en crecimiento de *B. cinerea* y en el otro se estrió a la bacteria *A. agilis* UMCV2. Después de cinco días de incubación se midió el diámetro mayor de las colonias de *B. cinerea*. Los paneles **a** y **b** muestran imágenes representativas del crecimiento del hongo después de cinco días de incubación. El panel **c** muestra el valor numérico del diámetro mayor de las colonias del hongo al finalizar el experimento. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student ( $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ), el asterisco denota significancia estadística entre tratamientos.

Una vez determinado el efecto de los VOCs de *A. agilis* sobre *B. cinerea*, se realizó un análisis cromatográfico de los mismos mediante la técnica de SPME. De esta manera se detectaron 5 compuestos principales (Tabla 1), de entre estos llamó nuestra atención la dimetilhexadecilamina, debido a que es un lípido aminado y este tipo de compuestos han sido reportados como compuestos con actividad antifúngica (Xu et al., 2004).

Con la intención de determinar si la actividad antifúngica de los VOCs de *A. agilis* UMCV2 se debía a la dimetilhexadecilamina, se probó este compuesto en forma pura (estándar comercial Sigma CAS: 112-69-6) a diferentes concentraciones de (0, 30, 60 120 y 240  $\mu\text{M}$ ) sobre el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *B. cinerea*, pero también el del oomiceto fitopatógeno *P. cinnamomi* y del hongo promotor del crecimiento *T. virens*. Como punto de

referencia, con los productos antifúngicos usados en las prácticas agrícolas, se probaron las mismas concentraciones de Captan que es un fungicida comercial ampliamente utilizado contra estos fitopatógenos (Mullin et al., 2010).

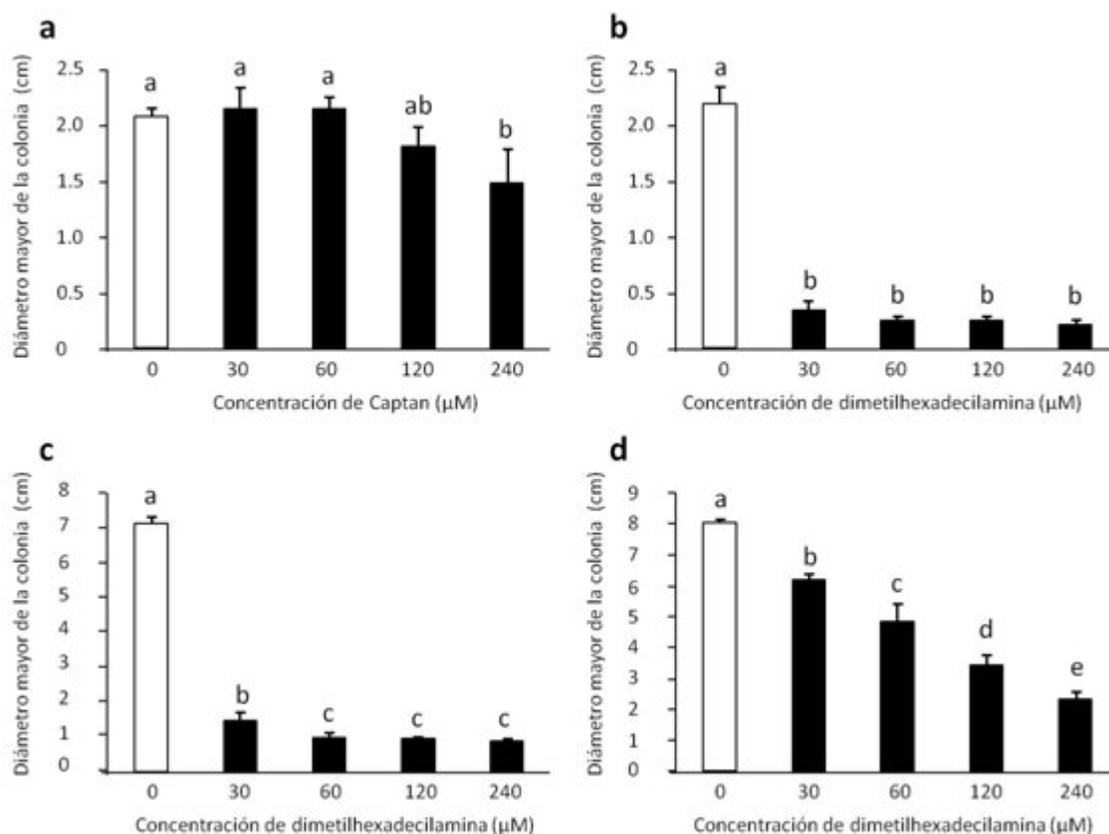
La dimetilhexadecilamina inhibió fuertemente el crecimiento tanto del hongo fitopatógeno *B. cinerea* como del oomiceto *P. cinnamomi*. En caso de *P. cinnamomi*, la inhibición fue superior al 80 % a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  mientras que concentraciones superiores mostraron inhibiciones del crecimiento cercanas al 100 % (figuras 2 y 3). En el caso de *B. cinerea* la inhibición fue aun mayor, una concentración de 30  $\mu\text{M}$  inhibió completamente el crecimiento de *B. cinerea* que fue incapaz de crecer sobre la placa de PDA que contenía el compuesto (figuras 2 y 3). Un experimento adicional mostró que una concentración de dimetilhexadecilamina de 20  $\mu\text{M}$  fue capaz de inhibir el crecimiento de *B. cinerea* en aproximadamente 40 % (datos no mostrados). La potencia inhibitoria de la dimetilhexadecilamina fue comparada con la del fungicida comercial Captan. Bajo las condiciones experimentales en las que se realizó el trabajo, el Captan no logró producir un efecto inhibitorio sobre *B. cinerea* superior al 40 % aún en la concentración de 240  $\mu\text{M}$  (figuras 2 y 3). Este último resultado muestra que al menos para el caso de *B. cinerea* y en nuestras condiciones experimentales, la potencia inhibitoria de la dimetilhexadecilamina es un orden de magnitud más alta que la potencia del Captan, uno de los fungicidas preventivos más ampliamente usados.

Posteriormente, como una forma de evaluar el efecto de

**Tabla 1. VOCs producidos por *A. agilis* UMCV2 en cultivos puros**

Compuesto	Cantidad normalizada de VOCs (%) <sup>a</sup>
2,5-Dimethyl pirazina	23.6
Acido acético	13.4
Dimetilhexadecilamina	2.1
3-Metil quinolina	10.6
2,4-Di-tertbutil-fenol	50.2

<sup>a</sup> Cantidad normalizada de VOC = (área del pico del compuesto volátil) / (área total de todos los compuestos volátiles). Los valores representan la media de cuatro réplicas.



**Figura 2. Efecto del Captan y la dimetilhexadecilamina en el crecimiento de *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *T. virens*.** Fragmentos de 0.25 cm de cultivos activos fueron sembrados en cajas petri con medio PDA adicionado con distintas concentraciones de Captan o dimetilhexadecilamina. Después de 5 días de incubación se midieron los diámetros mayores de las colonias. Los páneles muestran los crecimientos de las colonias de: **a**, *B. cinerea* en medio adicionado con Captan, **b**, el crecimiento de *B. cinerea* en medio adicionado con dimetilhexadecilamina, **c**, *P. cinnamomi* en medio adicionado con dimetilhexadecilamina y **d**, *T. virens* en medio adicionado con dimetilhexadecilamina. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza seguido de una prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ), dentro de cada panel las barras calificadas con la misma letra son estadísticamente similares.

la dimetilhexadecilamina sobre un hongo considerado como benéfico para el crecimiento vegetal, se decidió probar su efecto sobre *T. virens*.

*T. virens* es un organismo micoparásito presente en el suelo y ampliamente usado como agente de biocontrol (Howell, 2003). Fue notorio que el efecto de la dimetilhexadecilamina fue menor sobre *T. virens* que sobre los microorganismos fitopatógenos. Una concentración de 30 μM de dimetilhexadecilamina que prácticamente detuvo el crecimiento de *P. cinnamomi* y *B. cinerea* (80 y 100 % de inhibición respectivamente) produjo una inhibición promedio de un 22 % en *T. virens* comparada con los controles sin el compuesto, mientras que la concentración más alta probada (240 μM) produjo una inhibición de 70 % sobre *T. virens*.

## Discusión

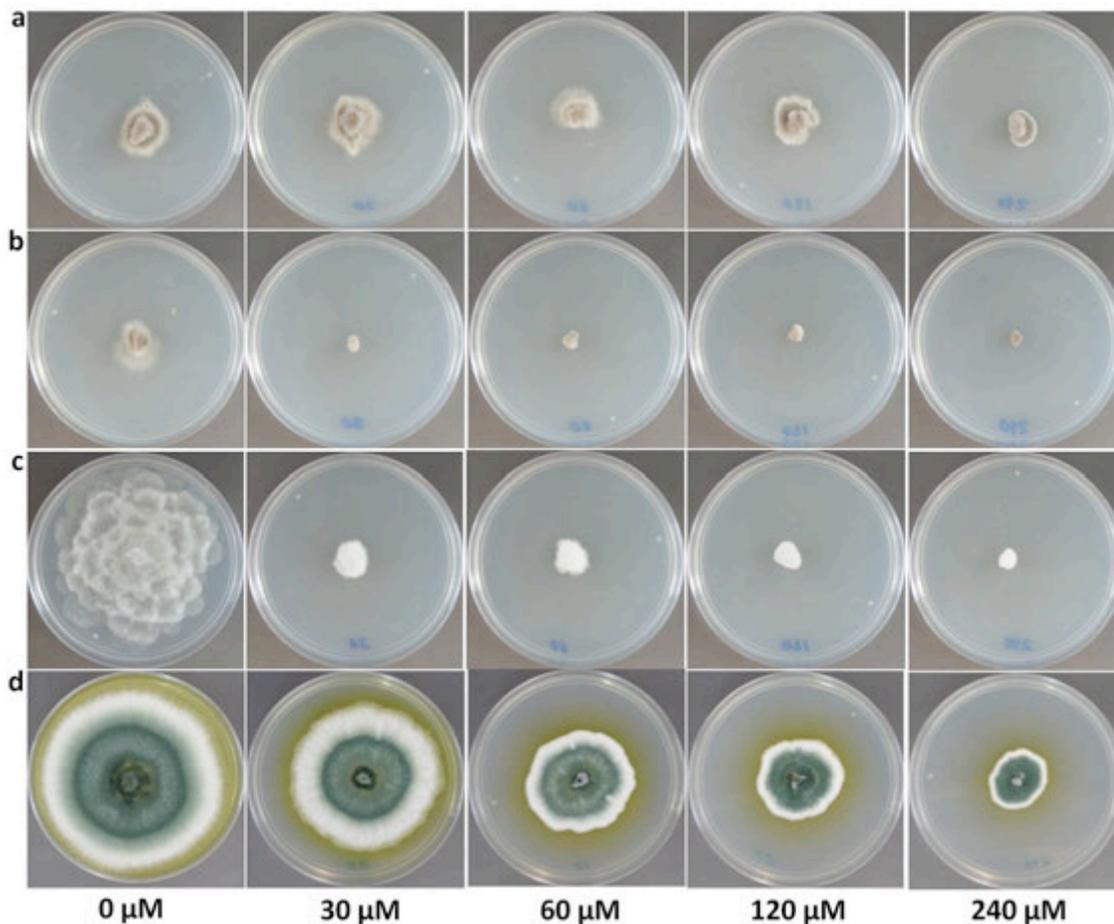
El estudio de las propiedades fungistáticas de los VOCs bacterianos es un área en desarrollo. Existen algunos trabajos pioneros que muestran que las bacterias del suelo en su conjunto (Xu *et al.*, 2004) y algunos aislados bacterianos en particular (Zou *et al.*, 2007) son capaces de producir VOCs con actividades supresoras contra los hongos nematófagos *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydospora* y *Clonostachys rosea*.

Con esto en mente, en el presente trabajo se probó el efecto fungistático de los VOCs de *A. agilis* UMCV2, una bacteria aislada de la rizosfera de maíz que ha mostrado promover el

crecimiento vegetal de frijol (Valencia-Cantero *et al.*, 2007) y alfalfa (Velázquez-Becerra *et al.*, 2010), además de haberse demostrado su capacidad para vivir como endófito al colonizar la raíz y los tejidos aéreos de varias leguminosas sin ser deletéreo (Aviles-García *et al.*, 2010).

El cocultivo de *A. agilis* UMCV2 en cajas divididas, en donde compartieron el espacio de cabeza pero no el medio de cultivo con *B. cinerea*, condujo a una inhibición de 30 % en el crecimiento del micelio del hongo, si se le compara con los controles crecidos en cajas divididas sin la presencia de la bacteria. Lo anterior prueba que *A. agilis* produjo al menos un VOC con propiedades fungistáticas, si bien probablemente en concentraciones menores a las requeridas para efectuar una inhibición total.

Con la intención de conocer la identidad del o los VOCs causantes de la inhibición sobre *B. cinerea*, se realizó un análisis cromatográfico de los compuestos presentes en el espacio de cabeza de cajas Petri con los cultivos puros de *A. agilis*, exponiendo una fibra adsorbente en dicho espacio, de forma que solo los compuestos capaces de volatilizarse a temperatura ambiente pudieran entrar en contacto con la fibra. El análisis cromatográfico mostró la presencia de 2,5-Dimethyl pirazina en proporciones elevadas dentro del perfil de los VOCs de *A. agilis* (Tabla 1), este compuesto es producido por una gran cantidad de bacterias del suelo, sin embargo no ha mostrado actividad fungistática (Zu *et al.*, 2007). Otro VOC que llamó nuestra atención fue la dimetilhexadecilamina (N,N-dietilhexadecanamina), un lípido



**Figura 3. Imágenes representativas de cultivos de *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *T. virescens* crecidos en medio adicionado con Captan o dimetilhexadecilamina.** Fragmentos de 0.25 cm de cultivos activos fueron sembrados en cajas petri con medio PDA adicionado con distintas concentraciones de Captan o dimetilhexadecilamina. Después de 5 días se registraron las imágenes presentadas. La fila **a** muestra el aspecto de las colonias de *B. cinerea* en medio adicionado con Captan, la fila **b**, el aspecto de *B. cinerea* en medio adicionado con dimetilhexadecilamina, la fila **c** el aspecto de *P. cinnamomi* en medio adicionado con dimetilhexadecilamina y la fila **d** el aspecto de *T. virescens* en medio adicionado con dimetilhexadecilamina. Cada imagen es representativa de 4 repeticiones.

aminado con una cadena saturada de 16 carbonos, esto debido a que existen reportes que señalan que lípidos aminados tienen efectos fungistáticos.

Xu *et al.*, (2004) encontraron que la trimetilamina y la N,N-dimetilhexadecilamina estuvieron presentes en 30 suelos con fuerte actividad fungistática y que en forma pura, estas mismas sustancias también inhibieron la germinación de las esporas de los hongos nematófagos *P. lilacinus*, *P. chlamydospora* y *C. rosea*. En un trabajo posterior Zou y *et al.*, (2007) probaron los VOCs dominantes de 32 aislados bacterianos con actividad inhibitoria sobre esporas y micelio de esos mismos hongos, y determinaron que la 1-butanamina, también tiene actividad antifúngica. La misma dimetilhexadecilamina ha sido reportada como parte de la mezcla de VOCs producida por *Bacillus subtilis* G8, una rizobacteria capaz de inhibir el crecimiento micelial de diversos hongos fitopatógenos, si bien no se había atribuido papel alguno a la dimetilhexadecilamina en esta actividad antifúngica (Liu *et al.*, 2008).

En el presente se mostró que efectivamente, el VOC dimetilhexadecilamina ejerció una fuerte inhibición en el crecimiento del hongo fitopatógeno *B. cinerea*, así como sobre el oomiceto fitopatógeno *P. cinnamomi*. Con el fin de tener un punto de referencia para probar la potencia antifúngica de la dimetilhexadecilamina, en este trabajo se empleó el fungicida comercial Captan. En nuestras condiciones experimentales, la

dimetilhexadecilamina mostró una potencia aproximadamente 12 veces mayor que el Captan si se considera que a una concentración de 20 μM de dimetilhexadecilamina y una de 240 μM de Captan produjeron una inhibición semejante sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* (40 % de inhibición aproximadamente). Estos resultados abren la posibilidad del empleo de la dimetilhexadecilamina como alternativa al uso de fungicidas sintéticos como el Captan, cuyos efectos carcinogénicos en mamíferos ha sido demostrada y su efecto en seres humanos es controversial (Arce *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista biotecnológico, es muy interesante constatar que el efecto inhibitorio de la dimetilhexadecilamina fue sensiblemente menor sobre el hongo promotor del crecimiento vegetal *T. virescens*. Una concentración de dimetilhexadecilamina de 30 μM, casi totalmente inhibitoria de *B. cinerea* y *P. cinnamomi*, produjo un efecto muy discreto sobre *T. virescens*. Esta circunstancia inesperada, muestra que la dimetilhexadecilamina no es igualmente activa contra todos los hongos, también puede ser ventajosa, ya que es posible considerar el uso de dimetilhexadecilamina en estrategias multifactoriales de control de plagas y enfermedades, que también contemplen a hongos benéficos como los del género *Trichoderma*.

Otra alternativa a explorar, es emplear no a la dimetilhexadecilamina directamente, sino a la bacteria que la produce como una estrategia de control biológico. Los

experimentos de cocultivo de *B. cinerea* y *A. agilis* UMCV2, mostraron que la concentración de los VOCs producidos por *A. agilis* no fue suficientemente elevada para provocar una inhibición total del hongo *in vitro*, sin embargo *in vivo* pudiera ser diferente. Por un lado, sería esperable que en la rizósfera la bacteria y el hongo entraran en contacto físico, lo que podría incrementar el efecto de la dimetilhexadecilamina sobre los fitopatógenos. Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición bacteriana de hongos fitopatógenos es más fuerte cuando las bacterias se establecen con antelación al hongo en un cultivo, con tiempo para producir sus metabolitos antes que el patógeno lo haga (Valencia-Cantero *et al.*, 2005). En el caso de *A. agilis* UMCV2, esto también es una ventaja potencial, ya que *A. agilis* UMCV2 es una bacteria que además de ser rizosférica es endofítica (Aviles-García *et al.*, 2010) y podría inocularse preventivamente en una planta antes de que fuera infectada. Es claro que los puntos anteriores son hipótesis de trabajo, mismas que actualmente se consideran someter a prueba.

En conclusión, en el presente trabajo se identificó a la dimetilhexadecilamina, un VOC producido por la rizobacteria *A. agilis* UMCV2, capaz de inhibir completamente en dosis bajas el crecimiento de *B. cinerea*, uno de los hongos fitopatógenos más ampliamente distribuido y a *P. cinnamomi*, un oomiceto igualmente importante como fitopatógeno. El hecho de que la dimetilhexadecilamina tenga efectos discretos sobre el hongo benéfico *T. virens* y sea producida por una bacteria endofítica, sugiere que podría ser utilizada en estrategias integrales de control de enfermedades como bioinoculante, hipótesis que actualmente está siendo probada.

## Referencias

- Arce, G.T., Gordon, E.B., Cohen, S.M. y P. Singh. (2010). Genetic toxicology of folpet and captan. *Critical Reviews in Toxicology* 40: 546–574.
- Aviles-García, M.E., Santoyo-Pizano, G., Flores-Cortes. I. y E. Valencia-Cantero (2010). *Arthrobacter agilis* UMCV2 como endófito de leguminosas. *Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Microbiología. Morelia Michoacán 29 de Junio al 2 de Julio 2010. Pág 50.*
- Cohen, S.M., Gordon, E.B., Singh, P., Arce, G.T. y A. Nyska (2010). Carcinogenic mode of action of folpet in mice and evaluation of its relevance to humans. *Critical Reviews in Toxicology* 40: 531–545.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L.I., Cortés-Penagos, C. y J. López-Bucio (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*<sup>[C]</sup><sub>[W][OA]</sub>. *Plant Physiology* 149: 1579-1592.
- Damian-Badillo, L.M., Martínez-Muñoz, R.S., Salgado-Garciglia, R. y M.M. Martínez-Pacheco (2010). *In vitro* actioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9: 136-142.
- Duncan, J. (1999). *Phytophthora* an abiding threat to our crops. *Microbiology Today* 26: 114-116.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. 2007. *Botrytis* spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems – An Introduction. In Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (Eds), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, pp 1-8. Springer. Dordrecht Holanda.
- Gunashakaran M. 2008. Integrated Management in *Phytophthora* diseases. En: Advances in soil Born plant diseases. Naik M K and Devika Rani G S. (Eds). Pp 371-413. New Indian Publishing Agency. New Dehli.
- Handelsman, J. y E.V. Stabb (1996). *Biocontrol of soilborne plant pathogens. The Plant Cell* 8:1855–1869.
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. y B. Piechulla (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology* 187: 351–360.
- Liu, W., Mu, W., Zhu, B. y F. Liu. (2008). Antifungal activity and components fVOC produced by *Bacillus subtilis* G8. *Current Research in Bacteriology* 1:28-34.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., Vanengelsdorp, D. y J.S. Pettis (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 19: 5:e9754.
- Oerke, E.C. (2006). *Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science* 144: 31-43.
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Peña-Cabriales, J.J. y R. Fariás-Rodríguez (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagonista de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana* 28: 53-60.
- Valencia-Cantero, E, Villegas-Moreno, J., Sánchez-Yáñez, J.M., Peña-Cabriales, J.J. y R. Fariás-Rodríguez (2005). Inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* Zum80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana* 23: 65-72.
- Valencia-Cantero, E., Hernandez-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J.E., Alfaro-Cuevas, R. y J. López-Bucio (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant and Soil* 291: 263-273.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I. y E. Valencia-Cantero (2010). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. *Plant and Soil*, En prensa. DOI: 10.1007/s11104-010-0583-z.
- Xu, C., Mo, M., Zhang, L. y K. Zhang (2004). *Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. Soil Biology and Biochemistry* 36: 1997-2004.
- Zou, C.S., Mo, M.H., Gu, Y.Q., Zhou, J.P. y K.Q. Zhang (2007). Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2371-2379.