



# El Colegio de la Frontera Sur

## **Volátiles de bacterias endófitas de cacao y su efecto sobre *Moniliophthora roreri***

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de  
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Norma de la Cruz López

2014

## **DEDICATORIA**

**A mis hijas:** Que han sido mi motor y mis fuerzas para seguir adelante y mi principal razón para no darme por vencida.

**A mi esposo:** Por el apoyo y amor que me ha brindado.

**A mis padres y hermanos:** Porque a pesar de todo siempre han estado a mi lado, apoyándome y animándome para seguir adelante. Porque sin ustedes este logro no hubiese sido posible.

**A mi tía María de Jesús y mi prima Ángela:** Porque gracias a su apoyo y al cariño brindado a mis bebés, han hecho este camino más llevadero.

**A Lucia (D.E.P.):** Aunque estés lejos, mi corazón nunca olvidará que somos amigas y que estamos unidas por miles de aventuras y desafíos que supimos vencer juntas. Desde aquí te agradezco por siempre tener una palabra de aliento, por siempre tenderme una mano y por tener una sonrisa para mí cuando estaba triste.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la doctora Graciela Huerta Palacios: por sus paciencia, enseñanza y sobre todo por el apoyo y consejos brindados durante todo este tiempo.

A mis asesores: Dra. Karina Guillén Navarro, Dr. Leopoldo Cruz López y Dr. Francisco Holguín Meléndez por los comentarios y aportes hechos al trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT): por otorgarme la beca de maestría.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	I, II
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
Centro de origen y sistemática de <i>Moniliophthora roreri</i> (Cif y Par) .....	4
Rango de hospedantes e importancia económica .....	5
Síntomas de la enfermedad .....	5
Características del hongo en medios de cultivo .....	7
Dispersión de <i>M. roreri</i> .....	7
Compuestos orgánicos volátiles.....	8
Emisión y funciones biológicas de los volátiles .....	8
CAPÍTULO II.....	13
Manuscrito del artículo sometido a la Revista Biological Control .....	13
Volatile of cocoa endophytic bacteria and their effect on <i>Moniliophthora roreri</i> .....	14
CAPÍTULO III.....	46
DISCUSIÓN GENERAL .....	46
CONCLUSIONES .....	49
LITERATURA CITADA.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Tablas

1. Volátiles sintéticos y dosis aplicadas para evaluar su efecto sobre crecimiento micelial y germinación de esporas de *M. roreri*. ..... 35
2. Inhibición de la esporulación de *M. roreri* provocada por los volátiles emitidos por las bacterias endófitas de cacao, a 10 días de confrontación, comparados con el control (esporulación del patógeno en ausencia de las bacterias). ..... 36
3. Volátiles producidos por las cepas bacterianas y área relativa del pico de producción de compuestos volátiles (%). ..... 37
4. Ecuación derivada del análisis Probit y cálculo de la concentración media efectiva ( $EC_{50}$ ) de cinco volátiles sintéticos identificados en el perfil de volátiles de las bacterias endófitas de cacao. ..... 38

### Figuras

1. Inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri* inducido por los volátiles emitidos por las bacterias endófitas de cacao durante cinco días de confrontación ..... 40
2. Inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *M. roreri* inducido por los volátiles producidos por las bacterias endófitas de cacao. A) Testigo, B) *M. roreri* con *B. pumilus*, C) *M. roreri* con *B. muralis*, D) *M. roreri* con *Novosphynghobium sp* ..... 41

3. Inhibición de la germinación de esporas de <i>M. roreri</i> inducido por los volátiles emitidos por las BEC durante tres días de confrontación.....	42
4. Inhibición del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> inducido por los volátiles sintéticos evaluados individualmente y en mezclas. M4): representa la mezcla A (dimetil disulfuro (DMDS), 2,5-dimetilpirazina (2,5-DP), $\alpha$ -pineno y 2-etil-hexanol (2-EH)), M5): representa la mezcla B (dimetil disulfuro (DMDS), 2,5-dimetilpirazina (2,5-DP), $\alpha$ -pineno y 2-etil-hexanol (2-EH) y 2-heptanona (2H)).....	43
5. Inhibición de la germinación de esporas de <i>M. roreri</i> inducido por los volátiles sintéticos evaluados individualmente y en mezclas. M4): representa la mezcla A (dimetil disulfuro (DMDS), 2,5-dimetilpirazina (2,5-DP), $\alpha$ -pineno y 2-etil-hexanol (2-EH)), M5): representa la mezcla B (dimetil disulfuro (DMDS), 2,5-dimetilpirazina (2,5-DP), $\alpha$ -pineno y 2-etil-hexanol (2-EH) y 2-heptanona (2-H)).....	44

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El principal problema fitosanitario que presenta el cultivo del cacao es la moniliasis, enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif y Par), la cual ataca el fruto en cualquier edad de desarrollo, lo que conlleva a reducir su valor comercial y ocasiona pérdidas económicas de hasta el 90% de la producción (Phillips-Mora et al., 2006). Para lograr un control adecuado y efectivo de esta enfermedad es necesario implementar el manejo integrado, ya que la aplicación de un solo método de control es ineficiente para combatirla. Uno de los principales métodos de control es el cultural, que consiste en la poda de árboles, y la remoción de las mazorcas que presentan síntomas aún incipientes de la enfermedad, para evitar el desarrollo de la enfermedad y disminuir la densidad de inóculo. Esta labor debe llevarse a cabo cada ocho días en época de mucha precipitación o en plantaciones de alta productividad (Sánchez et al., 2003). Otro de los métodos recomendados es la aplicación de fungicidas. Sin embargo, su principal limitante es el número de aplicaciones requeridas para mantener bajos niveles de enfermedad y el costo que esto representa. Es frecuente encontrar reportes de fungicidas con baja eficacia para el control de la enfermedad, esto es debido a que se desconoce el momento más adecuado de su aplicación (Palacios, 1990; Phillips et al., 2005). Entre los productos que han mostrado mayor efectividad se encuentran los que están hechos a base de oxicloruro de cobre (OC), pero los resultados, en la mayoría de los casos, fueron variables y antieconómicos cuando se compararon con el control cultural (Argüello, 2000).

Por lo anterior se han buscado nuevas alternativas, como el control biológico, entre ellos los microorganismos endófitos (organismos que colonizan los tejidos: hojas, frutos, tallos y raíces de plantas, sin causar enfermedad aparente). (Stone et al., 2000). Estos tienen la ventaja de estar bien adaptados a las condiciones bajo las cuales se desarrolla el cacao, incrementando las posibilidades de actuar con mayor eficacia contra el patógeno. Sin embargo, una de sus limitantes es de que un endófito aislado de un sitio, difícilmente va a tener la misma eficiencia al ser aplicado en otro sitio diferente al de su origen, es por ello que se recomienda utilizar microorganismos aislados del mismo lugar en donde se quiere o desea aplicar como biocontrolador (Faeth, 2002 ).

Entre los microorganismos mas estudiados se encuentran los hongos como *Trichoderma theobromicola* y *Trichoderma paucisporum*, los cuales han sido aislados como endófitos de cacao en el sur de América y se ha encontrado que producen un antibiótico que inhibe el desarrollo de *M. roreri* *in vitro* y en pruebas con mazorcas (Samuels et al., 2000). Se ha sugerido la utilización de mezclas de cepas de *Trichoderma* spp. con cepas del micoparásito *Clonostachys rosea*, la cual se ha comprobado que puede reducir la enfermedad hasta en un 25% (Krauss y Soberanis, 2001; Mejia et al., 2008).

Otra alternativa de control biológico poco explorada son las bacterias endófitas, muchas de las cuales son capaces de inhibir el crecimiento y germinación de las esporas de hongos utilizando diversos mecanismos, como la producción de sideróforos (Santoyo et al., 2010), de antibióticos como iturina, surfactina, fengicina, etc., (Valencia-Cantero et al., 2005) y enzimas líticas tales como quitinasas o  $\beta$ -1,3-glucanasas (Adhikari et al., 2001; Leelasuphakul et al.,

2006). Por otro lado, diversos autores demostraron que algunas especies de bacterias además de producir enzimas y antibióticos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, también emiten volátiles, que pueden estar implicados en procesos de promoción del crecimiento vegetal (Ryu et al., 2003), desencadenamiento de los mecanismos de inducción de resistencia en plantas (Kloepper et al., 2004) y /o causar fuertes efectos de inhibición del crecimiento y la germinación de esporas de diversos hongos fitopatógenos (Zou et al., 2007). En un trabajo previo De la Cruz (2010) aisló siete bacterias endófitas de cacao (BEC) (*Bacillus amyloliquefaciens* CFFSUR-B35, *Bacillus atrophaeus* CFFSUR-B33, *Bacillus megaterium* CFFSUR33, *Bacillus muralis* CFFSUR-B38, *Bacillus pumilus* CFFSUR-B34, *Bacillus subtilis* CFFSUR-B31 y *Novosphingobium* sp CFFSUR-B36) de hojas y frutos sanos de cacao, estas cepas mostraron actividad antagónica contra *M. roreri* y *Phytophthora* spp reduciendo del 68.0% al 71.5% el crecimiento micelial. No se encontraron reportes sobre los volátiles producidos por bacterias endófitas de cacao (BEC) y mucho menos sobre el efecto que estos puedan tener sobre *M. roreri*, es por ello que los objetivos de este trabajo fueron 1.- Evaluar el efecto de los volátiles bacterianos sobre el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *M. roreri*, 2.- Identificar los volátiles emitidos por las siete cepas de bacterianas endófitas de cacao y 3.- Evaluar el efecto de cinco volátiles sintéticos (dimetil disulfuro, 2,5-dimetilpirazina, α-pineno, 2-heptanona y 2-etil-hexanol sobre el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *M. roreri*.

## **Centro de origen y sistemática de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par)**

La existencia de gran diversidad genética de *M. roreri* al norte de Santander, Colombia, detectada mediante estudios moleculares de la secuencias del transcripto intergénico (ITS) y perfiles de polimorfismos de DNA entre repeticiones de secuencias simples (ISSR) sugiere que esta región es el centro de origen de este patógeno (Phillips, 2003). Esta enfermedad se reportó por primera vez en 1917 en cultivos de cacao de Ecuador, posteriormente se dispersó hacia Venezuela (1941), Perú (1950), Panamá (1956), Guatemala (2002), Belice (2004) y por último a México en 2005 (Phillips-Mora, 2006; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007).

Inicialmente el patógeno fue denominado *Monilia roreri* y se incluyó en la clase: Deuteromycota; orden: Hyphales; género: *Monilia*; especie: *roreri*; debido a que aparentemente carece de un estado meiótico (Telomorfo) (Ciferri y Parodi, 1933). Más tarde, Evans (1978) lo renombró *Moniliophthora roreri* debido a que este hongo presentaba características morfológicas afines a los basidiomicetos, como hifas con septos de tipo doliporo. Posteriormente, varios investigadores realizaron comparaciones de este hongo con otro patógeno conocido como *Crinipellis perniciosa* y encontraron afinidades genéticas, además de similitudes en su patogenicidad al hospedero, tales como alteraciones en el balance hormonal, causando hipertrrofia e hiperplasia al fruto y que ambos atacan a especies de *Theobroma* spp y *Herrania* spp. En 2003 Evans et al. clasificaron formalmente a *M. roreri* dentro del género *Crinipellis* al observar su relación genética mediante análisis de la región ITS, lo que llevó a una nueva combinación llamada *Crinipellis*

*roreri*. Pero, dos años más tarde, Aime y Phillips (2005) por medio de estudios filogenéticos utilizando cinco genes nucleares: región de la subunidad ribosomal larga (28S rDNA), subunidad ribosomal corta (18S rDNA), secuencia de transcripto intergénico (ITS), subunidad larga de la RNA polimerasa II (RPB1) y factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) definieron que *M. roreri* y *C. perniciosa* forman parte de un linaje nuevo y distinto dentro de la familia Marasmiaceae; el cual comprende dentro del género *Moniliophthora* dos especies: *M. roreri* y *M. perniciosa* comb. nov.

### **Rango de hospedantes e importancia económica**

Este hongo ataca a 22 especies del género *Theobroma* y a 17 del género *Herrania* el primero de éstos, posee especies de importancia industrial tales como *T. cacao* L, la cual es comercializada a nivel mundial (Evans, 1981). La moniliasis es la enfermedad más importante de cacao y representa una amenaza para la producción de este cultivo (Sánchez et al., 2003). En Colombia se generan pérdidas hasta del 40% de la producción equivalente en términos de grano comercial a 28,000 toneladas; en Centroamérica produjo pérdidas hasta del 80% (Phillips et al., 2005) y en México a solo dos años de su detección se estimó que redujo a un 50% la producción en Tabasco y Chiapas (Arias, 2007).

### **Síntomas de la enfermedad**

Este hongo ataca únicamente a las mazorcas (Evans, 1981) y aún se desconoce dónde permanece durante la temporada de no producción. El periodo de

desarrollo de la enfermedad que va desde la infección por el hongo hasta la manifestación de síntomas externos puede tardar de 40 a 60 días. Esto se debe a que el hongo invade inicialmente el interior del fruto y los síntomas externos pueden aparecer hasta que la mazorca esté completamente desarrollada (Bejarano, 1961).

Sin embargo, este periodo puede acortarse cuando la infección se da en frutos jóvenes o cuando las condiciones ambientales son óptimas (temperatura de 25 a 30 °C, humedad relativa por encima del 80% y precipitación entre 400 -1000 mm por año) (Evans, 1981).

El primer síntoma en frutos jóvenes o chilillos es la aparición de una mancha aceitosa, posteriormente se forman protuberancias, gibas o hinchazones que deforman al fruto. Después se puede presentar una mancha irregular de color marrón en la parte central que puede mostrar un halo amarillento, este síntoma se conoce como mancha chocolate (Porras y Enríquez, 1998). Sobre la mancha chocolate se empieza a desarrollar el micelio del hongo y sobre este micelio crecen una gran cantidad de esporas, formando una masa de color crema o marrón claro. Las mazorcas que permanecen adheridas a los árboles pueden esporular hasta por 9 meses y se van momificando (Enríquez, 2004). Sin embargo, si las condiciones no son las óptimas, puede que el fruto infectado logre desarrollarse hasta alcanzar la madurez y presentar síntomas tardíos de la enfermedad (Bejarano, 1961). Por otro lado, cuando la infección se da en frutos maduros, los síntomas son muy parecidos con la diferencia de que en este caso la mazorca puede o no presentar protuberancias.

## **Características del hongo en medios de cultivo**

Evans (1981) reportó que el crecimiento de *M. roreri* en extracto de malta agar (AEM) es muy lento, ya que después de dos semanas de incubación únicamente crece de 8-15 mm. Además, observó que este hongo presenta un color que va de salmón a rosáceo y en el borde de la colonia un color canela o arcilla, mientras que microscópicamente presenta hifas hialinas y septadas con pared delgada; los conidios tienen forma globosa a subglobosa y algunas veces elipsoides, forman cadenas en sucesiones basipétalas, tienen pared gruesa y se separan fácilmente.

## **Dispersión de *M. roreri***

El principal mecanismo de dispersión de *M. roreri* es mediante sus esporas, las cuales pueden ser transportadas por el viento (Phillips, 2003). *M. roreri* está bien adaptado a este tipo de dispersión gracias a la pared gruesa de sus esporas y a la consistencia polvosa de las masas de éstas (Evans, 1986), aunque Barros (1981) afirma que estas esporas no pueden viajar grandes distancias en el aire debido a su peso. Otro de los mecanismos más comunes y de mayor impacto es el hombre, quien puede diseminar la enfermedad a grandes distancias, al transportar frutos infectados que no presentan síntomas aparentes de la enfermedad (Evans, 1986). Los insectos también pueden ser una fuente de transporte de este patógeno, ya que pueden llevar esporas adheridas en partes de su cuerpo o bien en el tracto digestivo y de esta forma pasar la enfermedad de un fruto a otro (Phillips, 2003).

## **Compuestos orgánicos volátiles**

Los compuestos orgánicos volátiles (COV's) son sustancias químicas que contienen como parte de su estructura al carbono, pero además del carbono es posible hallar en su composición hidrógeno, flúor, oxígeno, cloro, bromo, nitrógeno o azufre. La mayoría de estos compuestos tienden a ser lipofílicos, es decir, que tienen una alta afinidad por los lípidos y son insolubles en agua, por lo que para disolverlos, se deben utilizar solventes orgánicos. Tienen pequeña masa molecular (menor de 300 Da) y alta presión de vapor (0.01 kPa o mas a 20°C), lo que provoca que se evaporen fácilmente a temperatura y presión ambiental (Peñuelas y Lluisá, 2004).

## **Emisión y funciones biológicas de los volátiles**

Estos compuestos son producidos y emitidos por diversas especies vegetales, musgos (Saritas et al., 2001), así como por hongos (Rosecke et al., 2000) y bacterias (Fernando et al., 2005).

En el caso de las plantas, se ha demostrado que los COV's son útiles para la reproducción ya que actúan como atrayentes de insectos polinizadores y dispersores de semillas (Raguso, 2001; Pichersky, 2004). También funcionan como defensa al repeler insectos o detener la colonización por bacterias y hongos fitopatógenos o bien para atraer enemigos naturales de herbívoros (Baldwin, 2002) para la comunicación entre plantas (Dicke y Bruun, 2001) y como termorreguladores (Holopainen, 2004). Los volátiles de mayor relevancia son los

terpenos, seguidos de los derivados de ácidos grasos, bencenoides y fenilpropanoides (Dudareva et al., 2004).

En cuanto a los hongos y bacterias, se ha demostrado que estos microorganismos emiten volátiles que les son útiles para identificarse entre individuos de su misma especie o bien para identificar individuos diferentes a ellos. Así mismo emiten estos compuestos como parte de su mecanismo de defensa al competir por nutrientes o espacio con otros microorganismos (Hynes et al., 2007). Esta capacidad ha sido aprovechada por el ser humano, para combatir o controlar microorganismos fitopatógenos. En el caso de los hongos productores de volátiles, los más estudiados son los del género *Trichoderma* (Dennis y Webster, 1971; Wheatley et al., 1997), *Muscodor albus* (Mercier y Jimenez, 2004), *Fusarium oxysporum* (Freire et al., 2010).

Se han llevado a cabo estudios para identificar los diversos compuestos volátiles emitidos por los hongos, entre los cuales se han identificado al etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentano. Algunos de estos compuestos han sido estudiados y utilizados para controlar el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos (Dos Santos y Dhingra, 1980; Hutchinson 1971). Por ejemplo, se ha descrito que los volátiles producidos por el hongo endófito *Muscodor albus* son efectivos para controlar enfermedades post cosecha causadas por *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Geotrichum* spp, *Monilinia fructicola*, *Penicillium* spp, y *Rhizopus* sp, (Mercier y Jiménez, 2004; Mercier y Smilanick, 2005; Gabler, et al., 2006).

Una amplia variedad de especies bacterianas también son capaces de emitir diversas cantidades y tipos de COV's que comprenden derivados de ácidos grasos, terpenoides, compuestos aromáticos, nitrogenados y sulfurados. Entre las principales especies bacterianas productores de COV's se encuentran las del género *Bacillus*, *Streptomyces* spp, *Serratia* y *Pseudomonas* (Ryu et al., 2003; Chaurasia et al., 2005; Fernando et al., 2005; Kai et al., 2007; Zou et al., 2007). Los compuestos emitidos por estos géneros también han sido utilizados para el control de otros microorganismos y se han observado los diferentes efectos que provocan. Por ejemplo, Moore-Landecker y Stotzky (1973) informaron que los volátiles de un actinomiceto causó acortamiento de los conidióforos de *Aspergillus giganteus*, así como inflamación de vesículas en *Fusarium oxysporum*, *Penicillium viridicatum* y *Trichoderma viride* y aumento de la tabicación de *T. viride*.

Herrington et al., (1985, 1987) demostraron que los volátiles de *Streptomyces griseoruber*, pueden inhibir la germinación de esporas de *Cladosporium cladosporioides*. Uno de los géneros bacterianos más estudiados es *Bacillus*, que ha llamado la atención gracias a su capacidad de emitir compuestos volátiles que pueden actuar de diferentes formas (Leelasuphakul, et al., 2006).

Algunas especies de este género actúan como agentes de control de fitopatógenos, ya que los volátiles producidos por estas bacterias ejercen efectos negativos sobre el crecimiento bacteriano, crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas de hongos. Por ejemplo se ha demostrado que al exponer semillas de *Arabidopsis* infectadas con *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, a volátiles producidos por la cepa GB03 de *B. subtilis* y IN937a de *B. amyloliquefaciens*, se reduce significativamente la severidad de la enfermedad

causada por esta bacteria fitopatógena (Ryu et al., 2003). Así mismo la cepa G8 de *Bacillus subtilis* produce compuestos volátiles que inhiben significativamente el crecimiento micelial y la germinación de los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Por otro lado, los volátiles producidos por *B. amyloliquefaciens* PPCB004 y *B. subtilis* PPCB001 inhiben en un 73.3% el crecimiento micelial de *Penicillium crustosum*, y el 77% y 32% de la germinación de esporas, respectivamente (Arrebola et al., 2010). Kildea et al., (2008) reportan que volátiles producidos por *B. megaterium* MKB135 inhibieron significativamente la producción de biomasa de *Mycosphaerella graminícola* THORN hasta en un 43%.

Se han identificado un gran número de volátiles producidos por estas bacterias, Almenar et al., (2007) reportaron catorce compuestos volátiles producidos por *B. subtilis*, de los cuales 2-etil-hexanol, 2,4-bis (2-metilpropil)-fenol, 4-hydroxybenzaldehído y 2-nananona, muestran efecto antifungoso. Mientras que Arrebola et al., (2010) identificaron 21 compuestos volátiles producidos por la cepa PPCB001, perteneciente a esta misma especie. Esto sugiere que el tipo y cantidad de volátiles producidos varía aún entre cepas que pertenecen a la misma especie. Ellos mismos mencionan que la cepa de *B. amyloliquefaciens* PPCB004, produce ocho tipos diferentes de volátiles siendo el 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) el de mayor predominancia. Por otro lado, Ryu et al., (2003) reportan que tanto *B. subtilis* GB03 como *B. amyloliquefaciens* IN937a actúan como inductores de resistencia al producir 2,3-butanediol y 3-hidroxi-2-butanona (acetoína); con esto mostraron que especies diferentes pueden producir los mismos tipos de volátiles. Entre los compuestos volátiles con actividad antifúngica está el dimetil disulfuro producido por *B. cereus*, que inhibe en un 82% el crecimiento micelial de *Botrytis*.

*cinerea*, cuando es aplicado a altas concentraciones (10 mM) (Huang et al., 2012). Este hongo se ha reportado como patógeno de 235 especies de plantas de interés agronómico u ornamental (Elad et al., 2007).

## CAPÍTULO II

### Manuscrito del artículo sometido a la Revista Biological Control

Biological Control - Submission Confirmation  
BIO-CON (ELS) (bio-con@elsevier.com)

De: ees.bcon.0.2baf8e.4030689f@eesmail.elsevier.com en nombre de BIO-CON (ELS) (bio-con@elsevier.com)

Enviado: miércoles, 03 de septiembre de 2014 17:19:22

Para: ghuerta@ecosur.mx

CC: koala\_piscis@hotmail.com; kguillen@ecosur.mx; lcruz@ecosur.mx

Title: Volatiles of cocoa endophytic bacteria and their effect on Moniliophthora roreri

Regular Article

Corresponding Author: Dr. Graciela Huerta

Authors: Norma De la Cruz; Karina Guillén; Leopoldo Cruz; Francisco Holguín

Dear Dr. Huerta,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Biological Control.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Biological Control as an author:

<http://ees.elsevier.com/bcon/>

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Biological Control. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Biological Control, Editorial Office

Elsevier

E-mail: bio-con@elsevier.com

1      **Volatiles of cocoa endophytic bacteria and their effect on *Moniliophthora***

2                                  *roreri*

3

4

5      Norma De la Cruz-López, Graciela Huerta-Palacios\*, Karina Guillén-Navarro,

6      Leopoldo Cruz-López, Francisco Holguín-Meléndez

7

8      El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antiguo Aeropuerto, Km. 2.5, C.P. 30700,

9      Tapachula, Chiapas, Mexico.

10

11

12

13     \*Corresponding author. Address: El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antiguo

14     Aeropuerto Km. 2.5, C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, Mexico; Telephone: +52

15     (962) 6289800; fax: +52 (962) 62 89806. *E-mail* address: [ghuerta@ecosur.mx](mailto:ghuerta@ecosur.mx)

16     (Graciela Huerta-Palacios).

17

18

19

20

21

22

23

24

25    **Abstract**

26    Several studies have reported that endophytic bacteria produce anti-fungal  
27    volatiles. In this work, we evaluated volatiles produced by seven cocoa endophytic  
28    bacteria strains on the fungi *Moniliophthora roreri* (Cif and Par). We also identify  
29    those volatiles and tested them individually and in a blend on *M. roreri*. Bacteria  
30    volatiles were tested using confrontation trails in a bi-partite Petri dish against  
31    mycelium and fungal spores. Cocoa endophytic bacteria strains were *Bacillus*  
32    *amyloliquefaciens* CFFSUR-B35, *Bacillus atrophaeus* CFFSUR-B33, *Bacillus*  
33    *megaterium* CFFSUR-B32, *Bacillus muralis* CFFSUR-B38, *Bacillus pumilus*  
34    CFFSUR-B34, *Bacillus subtilis* CFFSUR-B31 and *Novosphingobium* sp CFFSUR-  
35    B36. The volatiles were extracted by Solid Phase Microextraction. All bacteria  
36    strains produced volatiles that inhibited mycelial growth and spore germination in  
37    different levels. A total of 14 compounds were identified by comparison with  
38    spectral data from the computer library (NIST 2002). *B. pumilus* CFFSUR-B34, *B.*  
39    *muralis* CFFSUR-B38 and *Novosphingobium* sp CFFSUR-B36 volatiles produced  
40    inhibited more than 35% of mycelial growth, above 81% of sporulation and more  
41    than 74% of spore germination of *M. roreri*. However, when synthetic compounds  
42    were evaluated individually and by mixture, 2-ethyl-hexanol at 100000 ppm  
43    inhibited 100% of mycelial growth on *M. roreri*, followed by mixtures of four and five  
44    compounds and they also inhibited 89-97% of spore germination. Therefore, it is  
45    important to note that synergetic interaction with volatiles must be carefully  
46    evaluated due to the lack of knowledge on natural volatiles emission dynamic  
47    related to changes on organism growth.

48    **Keywords:** Volatiles; Cocoa endophytic bacteria; Biological control; *M. roreri*

49 **1. Introduction**

50 Moniliasis is one of the main diseases of cocoa plantations in Mexico caused by  
51 the fungi *Moniliophthora roreri* (Cif and Par), which affects cocoa production  
52 (Phillips-Mora et al., 2006). Thus, the alternative against this phytopathogen is the  
53 integrated pest management, which includes cultural practices as pruning (regular  
54 shading in order to diminish humidity), periodic removal of infected fruits and  
55 fungicides application (Sánchez et al., 2003). However, there is a trend to use  
56 alternatives with less environmental impact in order to increase natural control of  
57 infestations in fields. One of these alternatives is to evaluate the antagonistic effect  
58 of some fungus in the laboratory, to identify and to increase the most effective ones  
59 against pathogens (Clarke et al., 2006; De la Cruz, 2010; Mejia et al., 2008). Within  
60 the fungus with a greater potential are species of *Trichoderma* (Aneja et al., 2005),  
61 *Clonostachys* (Mejia et al., 2008) and *Gliocladium* (Rubini et al., 2005). Another  
62 unexplored alternative for biological control is endophytic bacteria which can inhibit  
63 mycelial growth and spores germination by different mechanisms such as  
64 siderophores production (Santoyo et al., 2010), antibiotics as iturin, surfactin and  
65 fengycin (Valencia-Cantero et al., 2005) and lytic enzymes such as chitinase and  
66 β-1,3-glucanase (Adhikari et al., 2001; Leelasuphakul et al., 2006). Thus, several  
67 authors have reported that these bacteria produce a great amount of volatiles that  
68 inhibit phytopathogen growth (Zou et al., 2007). Volatiles of *Bacillus*  
69 *amyloliquefaciens* PPCB004 and *Bacillus subtilis* PPCB001 strains inhibited 73.3%  
70 of mycelial growth and 77 and 32% of spore germination of *Penicillium crustosum*,  
71 respectively (Arrebolá et al., 2010). In addition, Kildea et al. (2008) reported that  
72 *Bacillus megaterium* MKB135 volatiles inhibited significantly *Mycosphaerella*

73 *graminicola* biomass production. Moreover, *B. subtilis* GB03 and *B.*  
74 *amyloliquefaciens* IN937a volatiles reduce *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*  
75 damages on *Arabidopsis* seeds significantly (Ryu et al., 2003). Nevertheless,  
76 volatiles type and their quantity vary even within the same species strains; e. g.  
77 Almenar et al. (2007) reported that *B. subtilis* produce 14 volatiles, from which 2-  
78 ethyl-hexanol, 2,4-bis-(2-methylpropyl)-phenol, 4-hydroxybenzaldehyde and 2-  
79 nonanone showed antifungal effect; meanwhile, Arrebola et al. (2010) reported that  
80 PPCB001 strains (same species) produced 21 volatiles. Even so, different species  
81 can produce the same volatiles, such as strains of *B. amyloliquefaciens* PPCB004  
82 which showed 8 different volatiles, being 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) the main  
83 compound. On the other hand, Ryu et al. (2003) reported that *B. subtilis* GB03 and  
84 *B. amyloliquefaciens* IN937a work as inductors of resistance when producing 2,3-  
85 butanediol and 3-hydroxy-2-butanone (acetoin). De la Cruz (2010) isolated seven  
86 cocoa endophytic bacteria (CEB) (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B.*  
87 *megaterium*, *B. muralis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* and *Novosphingobium* sp) from  
88 cocoa leaves and healthy fruits, which showed antagonist effect against *M. roreri*  
89 and *Phytophthora* spp by reducing 68.0% to 71.5% the mycelial growth. Thus, the  
90 aims of this study were to: 1. - evaluate the effect of bacteria volatiles on *M. roreri*  
91 mycelial growth and spore germination, 2. - identify the volatiles released of the  
92 seven cocoa endophytic bacteria strains and 3. - evaluate the effect of five  
93 synthetic compounds on mycelial growth and spore germination of *M. roreri*.

94

## 95 **2. Materials and Methods**

### 96 **2.1 Origin of cocoa endophytic bacteria (CEB)**

97 Seven cocoa endophytic bacteria strains were obtained from Phytopathology strain  
98 collection at El Colegio de la Frontera Sur (CFFSUR), identified as *B.*  
99 *amyloliquefaciens* CFFSUR- B35, *B. atrophaeus* CFFSUR-B33, *B. megaterium*  
100 CFFSUR-B32, *B. muralis* CFFSUR-B38, *B. pumilus* CFFSUR-B34, *B. subtilis*  
101 CFFSUR-B31 and *Novosphingobium* sp CFFSUR-B36, which were activated on  
102 nutritive agar (pH 7), incubated at 28 °C and a 12 h light/12 h dark photoperiod.  
103

## 104 **2.2 Isolation and multiplication of *M. roreri***

105 Fungi *M. roreri* was isolated from cocoa infected fruits exhibiting initial moniliasis  
106 symptoms (small fruits with protuberances). Small pieces of protuberances were  
107 removed, and sterilized in sodium hypochlorite (3%) for 1 min, followed by three  
108 washing in sterile distilled water, which were transferred to Petri dishes containing  
109 potato dextrose agar (PDA) (Evans et al., 2003). Identification was carried out by  
110 comparing with correspondent keys (Barnett and Hunter, 1972).

111 Before performing confrontation trials (seven and 15 days), strains were  
112 cultured on V8 juice agar (200 ml of juice V8, 4.5 g of CaCO<sub>3</sub>, 15 g of agar per liter)  
113 incubated at 28 °C and a 12 h light/12 h dark photoperiod, in order to obtain  
114 mycelium and spores.

115

## 116 **2.3 Bacterial volatiles effect on mycelial growth and spores production of *M.*** 117 ***roreri***

118 The effect of bacteria strain volatiles on mycelial growth of the phytopathogen  
119 fungus was evaluated in 100 x15 mm Petri dishes with two compartments; one of  
120 them with V8 juice agar (*M. roreri* culture) and the other one with nutritive agar

121 (NA) (bacteria culture). Four days before confrontation, it was necessary to  
122 inoculate mycelium discs with 5 mm diameter on V8 juice agar to ensure active  
123 pathogen. Bacteria were inoculated by spreading 100  $\mu$ l of  $1 \times 10^8$  bacteria ml $^{-1}$ ,  
124 then Petri dishes were sealed with plastic self-adhesive (clean pack) and plastic  
125 paraffin film (parafilm M) and incubated at 28 °C, 12 h light/12 h dark photoperiod  
126 up to five days when the pathogen radial growth was measured on bacteria  
127 treatments and in control (Arrebola et al., 2010). Control Petri dish was only  
128 inoculated with *M. roreri*.

129 The percentage inhibition of radial mycelial growth was calculated according  
130 to the formula: Inhibition (%) = [(D1- D2)/ D1 X 100]. Where D1 is the diameter of  
131 pathogen mycelial growth on control treatment and D2 is the diameter of pathogen  
132 mycelial grown on bacteria volatiles presence (Arrebola et al., 2010; Trivedi et al.,  
133 2008).

134 In order to estimate the effect of volatiles produced by bacteria on *M. roreri*  
135 spore production, the amount of spores produced at the end of the confrontation  
136 trials was estimated. Spores were harvested by placing 2 ml of distilled water on *M.*  
137 *roreri* compartment, and with an inoculation loop, the fungus colony was scraped  
138 until a spore suspension was obtained, which was taken with a micropipette and  
139 then placed in a flask. The number of spores per ml was quantified in a Neubauer  
140 chamber at 40X with a compound microscope Dialux 20 EB.

141 The design of this experiment was completely randomized with four  
142 repetitions by treatment. This trial was performed twice. Bacteria volatiles effect  
143 data were analyzed by one-way ANOVA and the results of bacteria with the most

144 effective volatiles to inhibit *M. roreri* mycelial growth and/or sporulation were  
145 analyzed by a Tukey test  $\alpha=0.01$ .

146

147 **2.4 Bacteria volatiles effect on spore germination of *M. roreri***

148 The effect of the metabolites volatiles produced by seven bacteria strains on *M.*  
149 *roreri* spore germination was evaluated with the same methodology previously  
150 mentioned (2.3), but the mycelial disc was replaced by a suspension of 200  $\mu\text{l}$  with  
151  $3 \times 10^6$  spores pathogen  $\text{ml}^{-1}$ . Plates were sealed with plastic self-adhesive (clean  
152 pack) and plastic paraffin film (parafilm M) and incubated at 28 °C, 12 h light/12 h  
153 dark photoperiod for three days.

154 Then, to evaluate volatiles effect, the number of germinated spores was  
155 quantified by microscope camp, considering germinated spores those which germ  
156 tube reached a greater length to the double of spore diameter. A camera (Moticam  
157 2500, Motic Inc. Ltd. Hong Kong) was adapted to a Nikon microscope to take  
158 pictures of five microscope camp at 40X. The germination inhibition index was  
159 calculated by using this formula (Arrebola et al., 2010; Trivedi et al., 2008):  
160 inhibition index =  $[(C - T) / C] \times 100$ : Where: C= average of germinated spores by  
161 repetition in control treatment and T= average of germinated spores on treatment  
162 with bacteria producing volatiles. The design of this experiment was completely  
163 randomized with three repetitions by treatment. Data were analyzed by one-way  
164 ANOVA and the most effective treatments were selected by a Tukey test  $\alpha 0.01$ .

165

166 **2.5 5 Headspace-Solid-phase microextraction (HS-SPME) and identification  
167 of volatiles**

168 A suspension of  $1 \times 10^8$  bacteria ml<sup>-1</sup> was inoculated on glass flasks with nutritive  
169 agar, which were sealed with aluminum foil and parafilm, and then they were  
170 incubated at 28 °C for 24 h. The Polydimethylsiloxane-Divinylbenzene 100 µ  
171 (PDMS-DVB) coated fiber which was exposed 30 min. Flasks were kept at 27±1  
172 °C. HS-SPME analysis was performed using a Gas Chromatograph-Mass  
173 Spectrometer (GC/MS Varian, CP3800 model) equipped with a capillary column 25  
174 m, 0.32 mm i.d.; 0.2 µm film thickness, VARIAN, with a stationary phase CP-  
175 WAX57CB. The carrier gas was helium at the constant flow of 1 ml/min. The  
176 temperature program started at 40 °C, hold 1 min, to 75 °C at 10 °C/min, then from  
177 75 °C to 200 °C at 15 °C/min. Each bacteria strain volatiles were SPME repeated  
178 ten times (Xu et al., 2004). The provisional identification of the compounds was  
179 performed by comparison using the data base of National Institute of Standards  
180 and Technology (NIST 2002). Mass spectral identifications were confirmed by  
181 comparison of retention times and mass spectra of synthetic standards.

182

183 **2.6 Determination of the median effective concentration (EC<sub>50</sub>) of five  
184 synthetic volatiles on mycelial growth of *M. roreri***

185 Five synthetic compounds were used to determine which bacteria volatiles inhibit  
186 *M. roreri* growth; dimethyl disulphide, 2,5-dimethylpyrazines, α-pinene, 2-  
187 heptanone and 2-ethyl-hexanol (Aldrich, Toluca, Mexico). They were evaluated  
188 under laboratory conditions.

189 To determine the required concentration to inhibit 50% of mycelial growth on  
190 *M. roreri*, each synthetic compound was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to  
191 obtain a stock solution of 200000 ppm, accurately measured volumes of this

192 solution were diluted in distilled water to get solution having concentrations of 100,  
193 1000, 10000 and 100000 ppm of each synthetic compound. These solutions were  
194 confronted with *M. roreri* in the two compartments Petri dishes. One compartment  
195 contained V8 juice agar, and a disc of fungus mycelium of 5 mm diameter with was  
196 inoculated, in the other compartment a disc of filter paper of 3 cm diameter  
197 containing 200 µl of the compound to evaluate. Petri dish control was inoculated  
198 only with the pathogen fungus. Plates were sealed with plastic self-adhesive (clean  
199 pack) and plastic paraffin film (parafilm M) and incubated at 28 °C, 12 h light/12 h  
200 dark photoperiod. Data were registered as mentioned before in section 2.3.

201 The design of this experiment was completely randomized with four  
202 repetitions by treatment. This trial was performed twice. In order to obtain the  
203 effective concentration of inhibition at 50% on *M. roreri* mycelial growth, data were  
204 analyzed by Probit method.

205

## 206 **2.7 Synthetic volatiles effect on *M. roreri* mycelial growth and spores**

### 207 **germination**

208 To determine the effect individual and mixtures of synthetic volatiles on *M. roreri*,  
209 each compound was diluted on DMSO to get a stock solution 200000 ppm, which  
210 was diluted with distilled water to get 10000 and 100000 ppm solutions (up and  
211 down concentrations of concentration that inhibit 50% of *M. roreri* growth). Trials  
212 with synthetic volatiles mixtures were performed to evaluate the effect of four and  
213 five synthetic compounds at 10000 and 100000 ppm (details are shown in Table  
214 1).

215 Confrontation trials were performed using the methodology before  
216 described. The percentage of inhibition on *M. roreri* mycelial growth and spores  
217 germination were used to estimate the volatiles effect. A factorial analysis was  
218 performed for each variable and to select the most effective treatment by Tukey  
219 test  $\alpha$  0.01.

220

### 221 **3. Results**

#### 222 **3.1 Anti-fungus activity of bacterial volatiles on the mycelial growth, 223 production and spore germination of *M. roreri***

224 The confrontation trials between *M.roreri* and CEB (Fig. 1) showed that the seven  
225 analyzed strain produced volatiles which decreased in a different degree the  
226 mycelial growth of fungus ( $F = 64.778$ ;  $fd = 6, 21$ ;  $p <0.01$ ). The volatiles produced  
227 by *B. pumilus* CFFSUR-B34, *B. muralis* CFFSUR-B38 and *Novosphingobium* sp  
228 CFFSUR-B36 presented the greatest percentages of inhibition (37.5%, 37.48%  
229 and 35.53% respectively). Its effect was significantly different ( $p <0.01$ ) to the  
230 inhibition caused by volatiles produced by the rest of bacterial, this one was inferior  
231 to 15.5%. Likewise, it was observed that the volatiles produced by CEB besides to  
232 inhibit the mycelial growth, reduce the sporulation of *M.roreri* (Table 2, Fig. 2). *B.*  
233 *muralis* CFFSUR-B38, *B. pumilus* CFFS81UR-B34 and *Novosphingobium* sp  
234 CFFSUR-B36 decreased the production of this spore fungus in more than 81%.

235 The confrontation trials between *M.roreri* spores and CEB (Fig. 3) showed  
236 that inhibition of spores germination was significantly superior ( $p <0.01$ ) in  
237 presence of volatiles produced by *B. pumilus* CFFSUR-B34, *B. muralis* CFFSUR-  
238 B38 and *Novosphingobium* sp CFFSUR-B36 (82.8%, 74.79% y 81.67%

239 respectively) to the inhibition caused by the rest of bacteria, which inhibited less  
240 than 20%.

241

### 242 **3.2 Volatiles produced by seven bacterial strains**

243 By using SPME and GC/MS, the compound volatiles produced by the seven  
244 bacterial species grown during 24 hours in nutritive agar were quantified and  
245 identified. A total of 14 compounds were identified (Table 3). The strains of *B.*  
246 *atrophaeus* CFFSUR-B33, *B. megaterium* CFFSUR-B32, and *B. muralis* CFFSUR-  
247 B38 produced 14 volatiles in different amounts, meanwhile the *Novosphingobium*  
248 CFFSUR- B36 and *B. subtilis* CFFSUR-B31 only produced 13 compounds. The  
249 strains of *B. amyloliquefaciens* CFFSUR-B35 and *B. pumilus* CFFSUR-B34  
250 produced 11 and 10 respectively. The *B. subtilis* CFFSUR-B31 strain produced a  
251 greater amount of volatiles while *B.pumilus* produced the least number and  
252 amount. From the 14 identified volatiles, only eight were produced by all the  
253 analyzed strains, from this dimethyl disulphide, dimethyl trisulphide and copaene  
254 were produced in a greater amount (Table 3).

255

### 256 **3.3 EC<sub>50</sub> of synthetic volatiles on mycelium growth *M. roreri***

257 The dual confrontation trials of *M. roreri* with four concentrations (100, 1000, 10000  
258 y 100000 ppm) of individual of five synthetic volatiles in a bi-partite Petri dishes  
259 allowed to determine the EC<sub>50</sub> for each one. It can be observed that the most toxic  
260 product to mycelium growth of *M. roreri* was 2-ethyl-hexanol since this showed the  
261 lowest EC<sub>50</sub> (73278.5 ppm), followed by dimethyl disulphide (76650.8 ppm) (Table  
262 4).

263 **3.4 Effectiveness of five synthetic volatiles on mycelium growth of *M. roreri***  
264 The test of individual dimethyl disulphide, 2,5-dimethylpyrazine,  $\alpha$ -pinene, 2-  
265 heptanone and 2-ethyl-hexanol at 10000 and 100000 ppm and its mixture, using  
266 200  $\mu$ l on filter paper discs during five days showed that all the tested combinations  
267 were able to inhibit in a different degree ( $F= 183.72$ ;  $df = 6, 98$ ;  $p <0.01$ ) the  
268 mycelium growth and the sporulation of the analyzed fungus, presenting greater  
269 efficiency at 100000 ppm (Fig. 4).

270 2-ethyl-hexanol at 100000 ppm was significantly more effective ( $p <0.01$ ) to  
271 inhibit mycelial growth of *M. roreri* (100%), followed by the mixture of dimethyl  
272 disulphide, 2,5-dimethylpyrazine,  $\alpha$ -pinene and 2-ethyl-hexanol (blend A) and by  
273 dimethyl disulphide, 2,5-dimethylpyrazine,  $\alpha$ -pinene, 2- heptanone and 2-ethyl-  
274 hexanol (blend B) at 100000 ppm, that inhibited the 73% and 74% of fungus  
275 growth, respectively. At 10000 ppm, the blends was more effective than when they  
276 were individually evaluated to the same concentration and its effect was  
277 significantly different ( $p <0.05$ ) to the rest of the treatments. Blend A inhibited the  
278 57% and mix B the 60% of growth, meanwhile the separated compounds inhibited  
279 less than 20% (Fig. 4)

280  
281 **3.5 Activity of five synthetic volatiles about spore germination of *M. roreri***  
282 The test of individual five synthetic volatiles and the blend A and B at 10000 and  
283 100000 ppm, using 200  $\mu$ l in filter paper discs for 72 hours showed that four out of  
284 five compounds inhibited more than 49% ( $F = 26.206$ ;  $df = 6, 125$ ;  $p <0.01$ ) from  
285 the spore germination of *M. roreri* (Fig. 5). The blend A (10000 and 100000 ppm),

286 blend B (10000 and 100000 ppm) and the 2-ethyl-hexanol at 100000 ppm,  
287 inhibited from 95 to 97% and 89% of the spores germination, respectively (Fig. 5).

288

#### 289 **4. Discussion**

290 Previous reports showed anti-fungus effect of fungus and endophytic bacteria on  
291 *M. roreri*, which has been attributed to metabolites not volatiles such as enzymes,  
292 antibiotics or siderophores (Aneja et al., 2005; Evans et al., 2003; Krauss y  
293 Soberanis 2001). However, these bacteria produce volatiles with suppressor  
294 activity on fungus growth, (Xu et al., 2004 and Zou et al., 2007). In this study, we  
295 reported that *B. muralis* CFFSUR-B38 and *Novosphingobium* sp CFFSUR-B36  
296 strains (endophytic of cacao leaves) produce volatiles with anti-fungus effect on *M.*  
297 *roreri*. We observed that *B. muralis*, *B. pumilus* and *Novosphingobium* sp volatiles  
298 were more effective to inhibit mycelial growth, sporulation and spores germination  
299 of *M. roreri*, than *B. subtilis* strains when they were confronted in bi-partite Petri  
300 dishes. It has been reported widely that a diffente strain of *B. subtilis* produces  
301 volatiles that inhibit mycelial growth of *P. crustosum*, *P. digitatum*, *Sclerotinia*  
302 *sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* (Arrebola et al., 2010; Chen et al., 2008; Wei-Wei  
303 et al., 2008).

304 The number and type of volatiles identified in this study for *B. subtilis*, *B.*  
305 *amylolyquefaciens*, *B. pumilus* and *B. megaterium* strains were different than those  
306 for the same species in literature. We identified 13 compounds for *B. subtilis*  
307 volatiles, however previous works reported 14 to 21 compounds, where 2-ethyl-  
308 hexanol is the one which coincides (Almenar et al., 2007; Arrebola et al., 2010); for  
309 *B. amylolyquefaciens* and *B. pumilus* we reported 10 and 11 compounds

310 respectively, but other studies registered eight and 12, being all different; and for *B.*  
311 *megaterium* we identified 14 compounds, but the references reported 17, where  
312 only dimethyl disulphide is common in both studies (Huang et al., 2010). These  
313 differences were also observed by Wei-Wei et al. (2008), who found differences of  
314 two strains of the same species *B. pumilus* BSH-4 y ZB13, four of them common  
315 and 10 were different. Therefore, these differences may be related to culture  
316 conditions where bacteria were grown (Fernando et al., 2005; Ryu et al., 2003),  
317 growth phase of culture when the extraction was made (Ryu et al., 2004; Fernando  
318 et al., 2005), temperature ranks and type of column used for GC-MS analysis (Kai  
319 et al., 2009; Wei-Wei et al., 2008).

320 On the other hand, when we evaluated the effect of individual and mixtures  
321 of synthetic compounds on mycelial growth and spores germination of *M. roreri*, we  
322 found that 2-ethyl-hexanol was better inhibitor than dimethyl disulphide, the last  
323 one widely studied and reported as the best inhibitor of mycelial growth and spores  
324 germination of other fungus (Fernando et al., 2005; Kai et al., 2010; Li et al., 2010).  
325 Apparently the effect of 2-ethyl-hexanol on sporulation of *M. roreri* was fungistatic  
326 because when the trials were finished and we removed the discs with volatiles, the  
327 mycelium increased the sporulation (data not shown). It might be that the anti-  
328 fungic effect of dimethyl disulphide has been overestimated in published results  
329 (Groenhagen et al., 2013; Li et al., 2010), because when we diluted it with ethanol,  
330 mycelial growth of *M. roreri* was inhibited in 70%, while when DMSO was used to  
331 dilute it only inhibited 20%. Ethanol inhibited 30% of mycelial growth in the same  
332 fungus (data not shown). Determining and using lethal concentration 50 in trials

333 with volatiles instead of using technical grade compounds showed us a clearer  
334 idea of anti-fungic effect of these products.

335 High doses of synthetic volatiles are required to inhibit 50% of mycelial  
336 growth of *M. roreri*, showed that none of five synthetic volatiles evaluated caused  
337 similar effect a *B. muralis*, *B. pumilus* and *Novosphingobium* sp strains. Arrebola et  
338 al. (2010) and Kai et al. (2009) mentioned that the number and quantity of volatiles  
339 identified for each strain is not always proportional to the effect on pathogen.

340 Our results suggest that the observed effect could be related to the  
341 synergetic action of volatile mixture. We think that to define interactions between  
342 volatiles is one of the first steps before setting their use, since there is no  
343 knowledge about natural dynamic that induce changes on organism growth.

344 In this work, we identified 14 different volatiles, where 2-ethyl-hexanol, dimethyl  
345 trisulphide, benzothiazole, and 1,2,4-trimethyl benzene. These compounds have  
346 been reported with antifungal effect (Almenar et al., 2007; Fernando et al., 2005;  
347 Yuan et al., 2012), while dimethyl disulphide and benzaldehyde besides this  
348 effects, they have showed a nematicidal action and induction to systemic  
349 resistance in plants (Fernando et al., 2005; Gu et al., 2007). It was not possible to  
350 evaluate the effect of all identified compounds on mycelial growth and spore  
351 germination of *M. roreri* because they were not available.

352

353 **Acknowledgements**

354 To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the scholarship granted to  
355 NDL (389003)

356

357 **5. References**

- 358 Adhikari, T.B., Joseph C.M, Yang G, Phillips D.A., Nelson L.M., 2001. Evaluation of  
359 bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control  
360 of seedling disease of rice. Can. J. Microbiol. 47, 916-924.
- 361 Almenar, E., Valle, V.D., Catala, R., Gavara, R., 2007. Active package for wild  
362 strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). J. Agric. Food Chem. 55, 2240–2245.
- 363 Aneja, M.T., Gianfagna, J., Hebbar, P.K. 2005., *Trichoderma harzianum* produces  
364 nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two  
365 cacao pathogens. Physiol. Mol. Plant P. 67, 304-307.
- 366 Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L., 2010. Effect of volatile compounds  
367 produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. Biol. Control.  
368 53, 122–128.
- 369 Barnett, H.L. y Hunter B., 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess  
370 Publication Minneapolis, Minnesota.
- 371 Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., Yu, Z., 2008. Antagonistic effects  
372 of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal  
373 growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnol. Lett. 30, 919-923.
- 374 Clarke, B.B., White Jr, J.F., Hurley, R.H., Torres, M.S., Sun, S., Huff, D.R., 2006.  
375 Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues.  
376 Plant Dis. 90, 994-998.
- 377 De la Cruz N.L., 2010. Actividad antagónica de microorganismos endófitos de  
378 cacao a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp. (Tesis). Tapachula,  
379 Chiapas. Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas.

- 380 Evans, H.C., Holmes A.K., Thomas E.S., 2003. Endophytes and mycoparasites  
381 associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and  
382 a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa  
383 diseases. Mycol. Prog. 2, 149-160.
- 384 Fernando, D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S., 2005. Identification and  
385 use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biol.  
386 Biochem. 37, 955-964.
- 387 Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S.,  
388 Weisskopf, L., 2013. Production of bioactive volatiles by different  
389 *Burkholderia ambifaria* strains. J. Chem. Ecol. 39, 892-906.
- 390 Gu, Y.Q., Mo, M.H., Zhou, J.P., Zou, C.S., Zhang, K.Q., 2007. Evaluation and  
391 identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. Soil  
392 Biol. Biochem. 39, 2567-2575.
- 393 Huang, Y., Xu, C., Ma, L., Zhang, K., Duan, C., Mo, M., 2010. Characterization of  
394 volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal  
395 activity against *Meloidogyne incognita*. Eur. J. Plant Pathol. 126, 417–422.
- 396 Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., Piechulla, B., 2009. Bacterial  
397 volatiles and their action potential. App. Microbiol. Biotechnol. 81, 1001-  
398 1012.
- 399 Kai, M., Crespo, E., Cristescu, S.M., Harren, F.J.M., Francke, W., Piechulla, B.,  
400 2010. *Serratia odorifera*: analysis of volatile emission and biological impact  
401 of volatile compounds on *Arabidopsis thaliana*. App. Microbiol. Biotechnol.  
402 88, 965-976.

- 403 Kildea, S., Ransbotyn, V., Khan, M.R., Fagan, B., Leonard, G., Mullins, E.,
- 404 Doohan, F.M., 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol
- 405 of septoria tritici blotch of wheat. Biol. Control 47, 37–45.
- 406 Krauss, U., Soberanis, W., 2001. Biocontrol of Cocoa pod diseases with
- 407 mycoparasite mixtures. Biol. Control. 22, 149-158.
- 408 Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., Hsiang, T., 2010. Fumigant activity of
- 409 volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on
- 410 *Citrus microcarpa*. Postharvest Biol. Tec. 58, 157-165.
- 411 Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., Phongpaichit, S., 2006. Purification,
- 412 characterization and synergistic activity of 1,3-glucanase and antibiotic
- 413 extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast
- 414 and sheath blight pathogens. Enzym. Microb. Technol. 38, 990-997.
- 415 Mejia, L.C., Rojas, E., Maynard, Z., Arnold, A.E., Hebbar, P.K., Samuels, G.,
- 416 Robbins, N., Allen, E.H., 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of
- 417 *Theobroma cacao* pathogens. Biol. Control. 46, 4-14.
- 418 Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, C.F., López, A.P., Hernández, J., Aime, M.C.,
- 419 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis
- 420 disease) of cacao in Mexico. Plant Pathol. 55, 584.
- 421 Rubini, M.R., Silva-Riveiro, R.T., Pomilla, A.W., Maki, C.S., Araujo, W.L., Dos
- 422 Santos, D.R., Azevedo, J.L., 2005. Diversity of endophytic fungal community
- 423 of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis*
- 424 *perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. Int. J. Biol. Sci. 1, 24-
- 425 33.

- 426 Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Pare, P.W., Kloepper,  
427 J.W., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. The  
428 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100, 4927-4932.
- 429 Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Pare, P.W., 2004.  
430 Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol.  
431 134, 1017-1026.
- 432 Sánchez, L., Gamboa, E., Rincón, J., 2003. Control químico y cultural de la  
433 moniliásis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.)  
434 en el estado Barinas. Rev. de la Fac. de Agronomía 20, 188-194.
- 435 Santoyo, G., Valencia, E., Orozco, MC., Peña, J.J., Farias, R., 2010. Papel de los  
436 sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens*  
437 ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. Rev. Terra Latinoamericana. 28, 53-60.
- 438 Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L.M., 2008. In vitro evaluation of antagonistic  
439 properties of *Pseudomonas corrugata*. Microbiol. Res. 163, 329-336.
- 440 Valencia-Cantero, E., Villegas, J., Sánchez, J.M., Peña, J.J., Farías, R., 2005.  
441 Inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de  
442 *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. Rev.  
443 Terra Latinoamericana. 23, 65-72.
- 444 Wei-Wei, L., Wei, M.U., Bing-Yu, Z.H.U., You-Chen, D.U., Feng, L.I.U., 2008.  
445 Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and  
446 *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. Agric. Scien. in China  
447 7, 1104-1114.
- 448 Xu, C., Mo, M., Zhang, L., Zhang, K., 2004. Soil volatile fungistasis and volatile  
449 fungistatic compounds. Soil Biol. Biochem. 36, 1997-2004.

450 Yuan, J., Waseem, R, Shen Q., Huang, Q., 2012, Antifungal activity of *Bacillus*  
451 *amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f.  
452 sp. Cubense. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5942-5944  
453 Zou, C., Zhou, J.P., Zhang, K.Q., 2007. Possible contributions of volatiles  
454 producing bacteria to soil fungistasis. Soil Biol. Biochem. 39, 2371-2378

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

## 6. Tables Captions

469   **Table 1** Volatiles compounds synthetic and doses used to evaluate their effect on  
470   mycelial growth and spores germination of *M. roreri*

471

472   **Table 2** Sporulation inhibition of *M. roreri* induced by cocoa endophytic bacteria  
473   volatiles, to 10 confrontation days, compared with control (pathogen sporulation  
474   without bacteria)

475

476   **Table 3** Volatiles produced by bacteria strains and its percentage relative peak  
477   area

478

479   **Table 4** Equations derived from Probit analysis and the calculated mean effective  
480   concentrations ( $EC_{50}$ ) for five synthetic volatiles identified on cocoa endophytic  
481   bacteria volatiles profile

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498 **Table 1**

499

Synthetic volatile	10000 ppm	100000 ppm	10000 ppm	100000 ppm	10000 ppm	100000 ppm	
Dimethyl disulphide	T1 <sup>a</sup>	T2 <sup>a</sup>		T11 <sup>b</sup>	T12 <sup>b</sup>	T13 <sup>c</sup>	T14 <sup>c</sup>
2,5-Dimethyl pyrazine	T3 <sup>a</sup>	T4 <sup>a</sup>		T11 <sup>b</sup>	T12 <sup>b</sup>	T13 <sup>c</sup>	T14 <sup>c</sup>
α-Pinene	T5 <sup>a</sup>	T6 <sup>a</sup>	T11 <sup>b</sup>	T12 <sup>b</sup>	T13 <sup>c</sup>	T14 <sup>c</sup>	
2-Ethyl-hexanol	T7 <sup>a</sup>	T8 <sup>a</sup>	T11 <sup>b</sup>	T12 <sup>b</sup>	T13 <sup>c</sup>	T14 <sup>c</sup>	
2-Heptanone	T9 <sup>a</sup>	T10 <sup>a</sup>			T13 <sup>c</sup>	T14 <sup>c</sup>	

500 T= Treatment

501 <sup>a</sup>= 200 µl of solution applied502 <sup>b</sup>= 200 µl of composed mixture by 50 µl each volatile at a particular concentration503 <sup>c</sup>= 200 µl of five composed mixture by 40 µl each volatile at a particular  
504 concentration

505

506 **Table 2.**

507

Strains	Sporulation (spores/ml) <sup>a</sup>	Inhibition (%)*
Control	1.10 x 10 <sup>7</sup>	
<i>B. subtilis</i>	6.90 x 10 <sup>6</sup>	37.41 b
<i>B. megaterium</i>	7.38 x 10 <sup>6</sup>	33.08 b
<i>B. atrophaeus</i>	8.45 x 10 <sup>6</sup>	23.37 b
<i>B. pumilus</i>	1.69 x 10 <sup>6</sup>	84.72 a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7.69 x 10 <sup>6</sup>	30.22 b
<i>Novosphingobium</i>	1.24 x 10 <sup>6</sup>	88.71 a
<i>B. muralis</i>	2.02 x 10 <sup>6</sup>	81.66 a

508 \*Averages with different letters are significantly different (p &lt;0.01)

509 <sup>a</sup> Spores obtained by rinsing of *M. roreri* colony, with 2 ml of sterilized water

510

511 **Table 3**

Synthetic	<i>B.</i>	<i>B.</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>B.</i>	<i>B.</i>	<i>B.</i>	<i>B.</i>
volatile <sup>a</sup>	<i>muralis</i>	<i>pumilus</i>	<i>sp</i>	<i>megaterium</i>	<i>atrophaeus</i>	<i>subtilis</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
<b>Dimethyl</b>							
disulphide	58.6	13.2	11.4	32.1	25.0	14.0	13.8
<b>Dimethyl</b>							
trisulphide	10.6	0.0	29.9	11.0	14.8	33.5	0.0
Pyrazine	2.2	21.3	2.5	2.0	2.3	1.8	6.6
Benzonitrile	3.6	18.6	0.0	3.8	4.1	3.8	6.4
Dimethyl	2.9	0.0	10.2	2.0	1.1	9.0	0.0
tetrasulphide							
Benzothiazole	1.7	0.0	4.9	1.9	3.4	3.0	0.0
α-Pinene	5.0	20.4	5.6	5.2	6.9	6.0	8.4
2-Heptanone	0.3	0.8	0.2	0.1	0.8	0.4	0.6
<b>2,5-Dimethyl</b>							
pyrazine	0.8	2.9	0.4	0.6	0.9	0.7	0.5
2-Ethyl-hexanol	11.2	7.4	8.3	6.8	13.7	11.6	12.8
<b>2-Ethyl- 3methyl-</b>							
pyrazine	0.5	2.0	2.5	3.0	2.7	0.0	17.1
<b>1,2,4- Trimethyl-</b>							
benzene	0.5	2.3	2.7	3.6	2.6	2.8	3.1
Benzyl alcohol	0.4	0.0	6.6	7.2	2.8	1.6	5.8
Copaene	1.6	11.3	14.7	20.7	19.0	11.6	24.9

512 <sup>a</sup>The identification of the compounds was based on comparison with spectral data

513 from the National Institute of Standards and Technology computer library (2002).

514 **Table 4.**

Synthetic volatile	EC <sub>50</sub> (ppm)	Equation	Fiducially limits 95%
Dimethyl disulphyde	76650.8	$y = -5.49 + 2.92(\log(dose)) - 1.21(\log(dose))^2 + 0.17(\log(dose))^3$	68872.5 - 84994.9
$\alpha$ -Pinene	400751.4	$y = -5.13 + 2.63(\log(dose)) - 0.83(\log(dose))^2 + 0.09(\log(dose))^3$	346214.3 - 461023.4
2-Heptanone	122926.9	$y = -9.22 + 7.14 (\log(dose)) - 2.39(\log(dose))^2 + 0.26(\log(dose))^3$	102988.3 - 144904.5
2-5 Dimethyl pyrazine	122033.2	$y = -16.43 + 12.83(\log(dose)) - 3.79(\log(dose))^2 + 0.37(\log(dose))^3$	107040.7 - 138000.3
2-Ethyl- hexanol	73278.5	$y = -0.89 - 1.60(\log(dose)) + 0.36(\log(dose))^2$	38134.2 - 132250.2

515

516

517

518       **7. Figure captions**

519       **Figure 1.** Mycelial growth inhibition of *M. roreri* induced by cocoa endophytic  
520       bacteria volatiles to five confrontation days

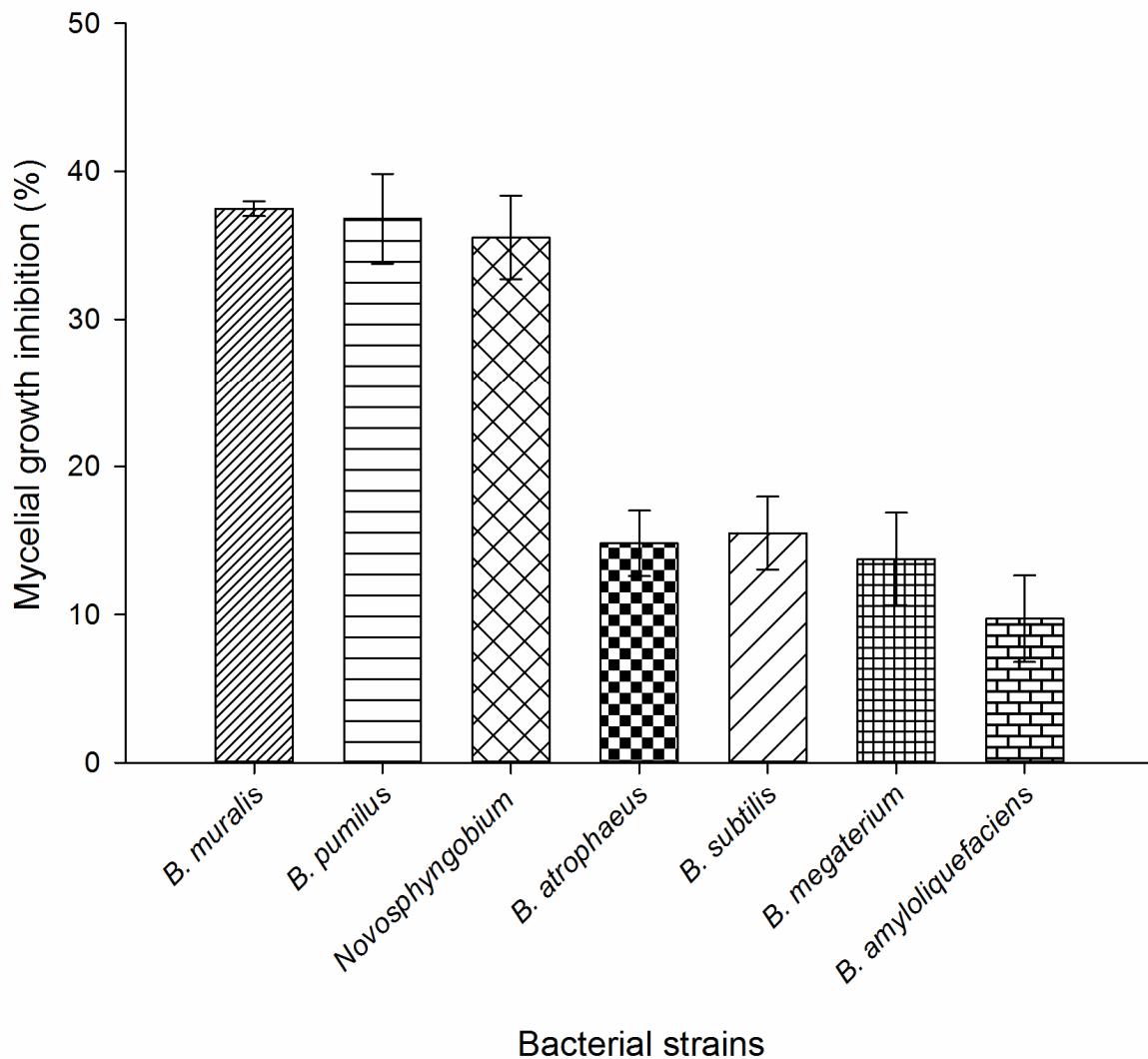
521       **Figure 2.** Mycelial growth and sporulation inhibition of *M. roreri* induced by cocoa  
522       endophytic bacteria volatiles. A) Control, B) *M. roreri* with *B. pumilus*, C) *M. roreri*  
523       with *B. muralis*, D) *M. roreri* with *Novosphyngobium* sp

524       **Figure 3.** Spores germination inhibition of *M. roreri* induced by cocoa endophytic  
525       bacteria volatiles to three days of confrontation

526       **Figure 4.** Mycelial growth inhibition of *M. roreri* induced by synthetic volatiles  
527       individually evaluated and in mixture. M4 refers to mix A (dimethyl disulphide  
528       (DMDS), 2,5-dimethylpyrazine (2,5-DP),  $\alpha$ -pinene and 2-ethyl-hexanol (2-EH)), and  
529       M5 refers to mix B (dimethyl disulphyde (DMDS), 2,5-dimethylpyrazine (2,5-DP),  $\alpha$ -  
530       pinene y 2-ethyl-hexanol (2-EH) and 2-heptanone (2-H)).

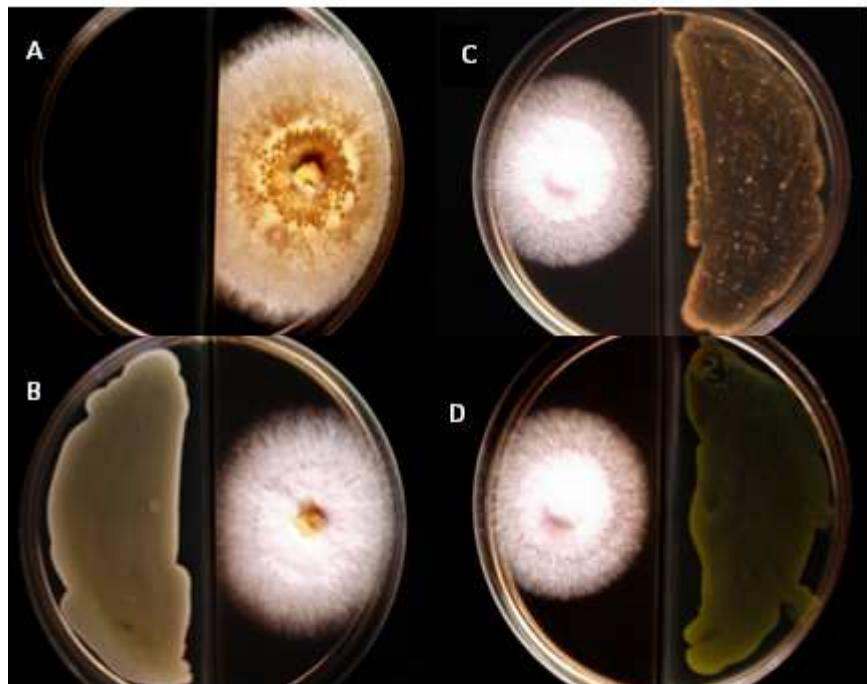
531       **Figure 5.** Spores germination inhibition of *M. roreri* induced by synthetic volatiles  
532       individually evaluated and in mixture. M4 refers to mix A (dimethyl disulphide  
533       (DMDS), 2,5-dimethylpyrazine (2,5-DP),  $\alpha$ -pinene and 2-ethyl-hexanol (2-EH)), M5  
534       refers to mix B (dimethyl disulphyde (DMDS), 2,5-dimethylpyrazine (2,5-DP),  $\alpha$ -  
535       pinene y 2-ethyl-hexanol (2-EH) and 2-heptanone (2-H)).

536



**Figure 1.**

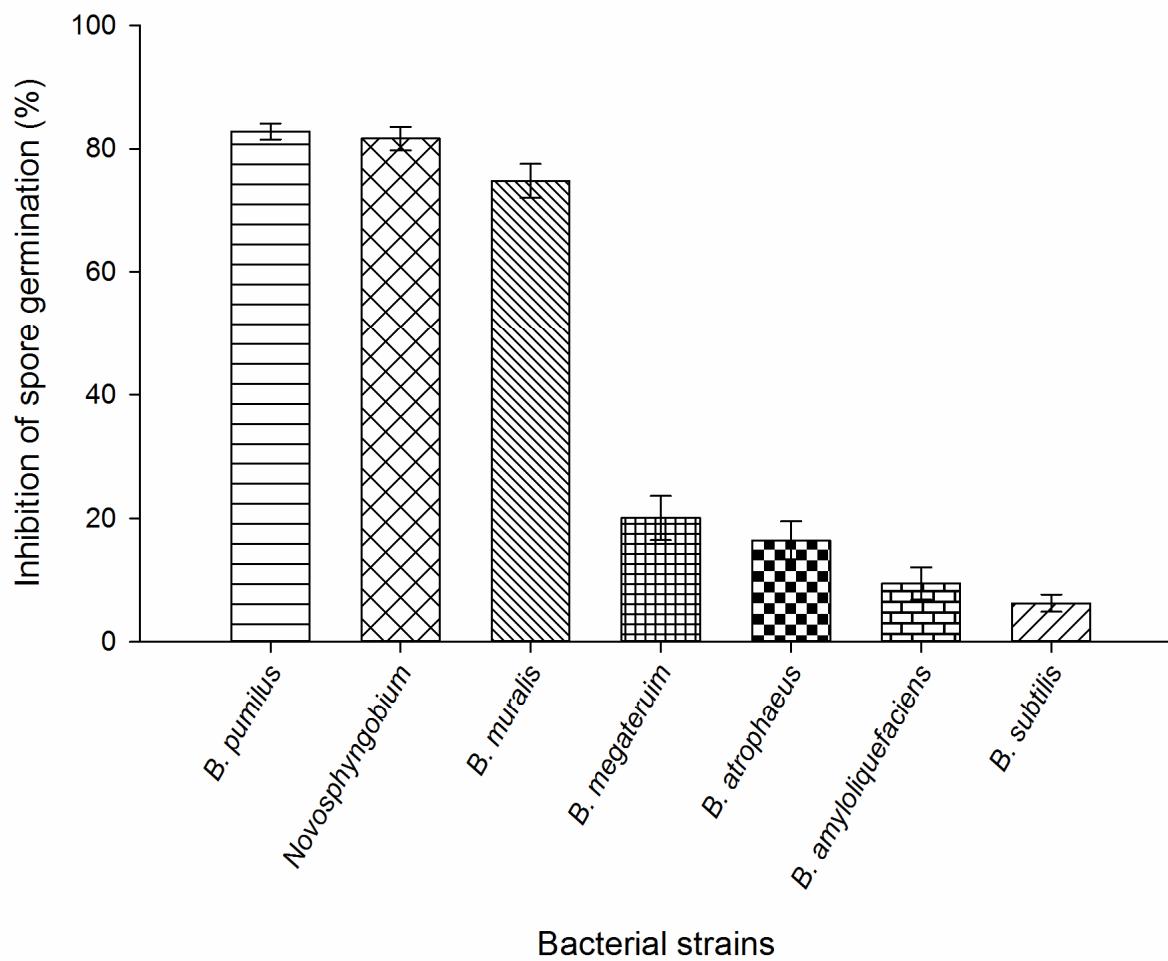
537



538

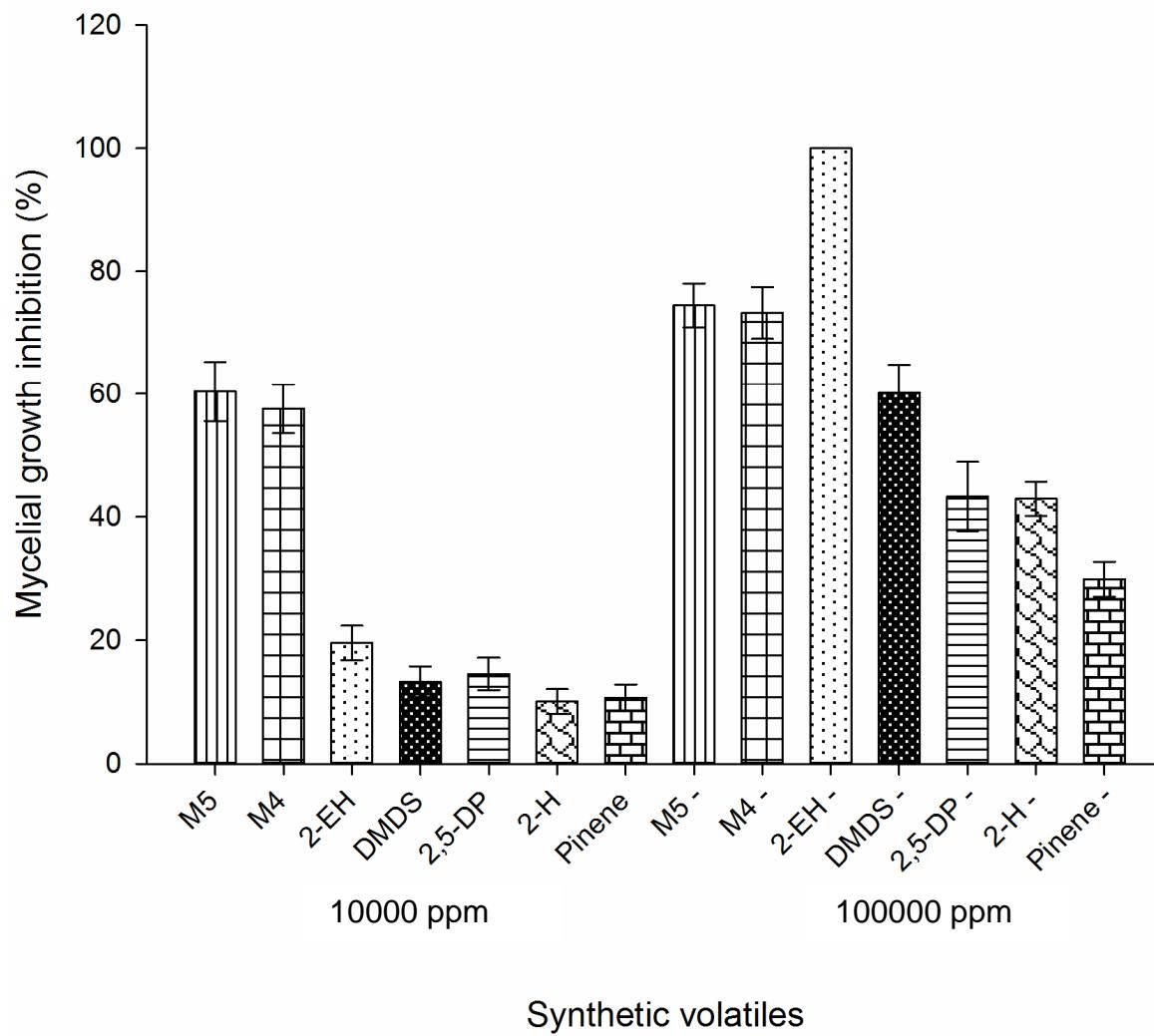
**Figure 2.**

539



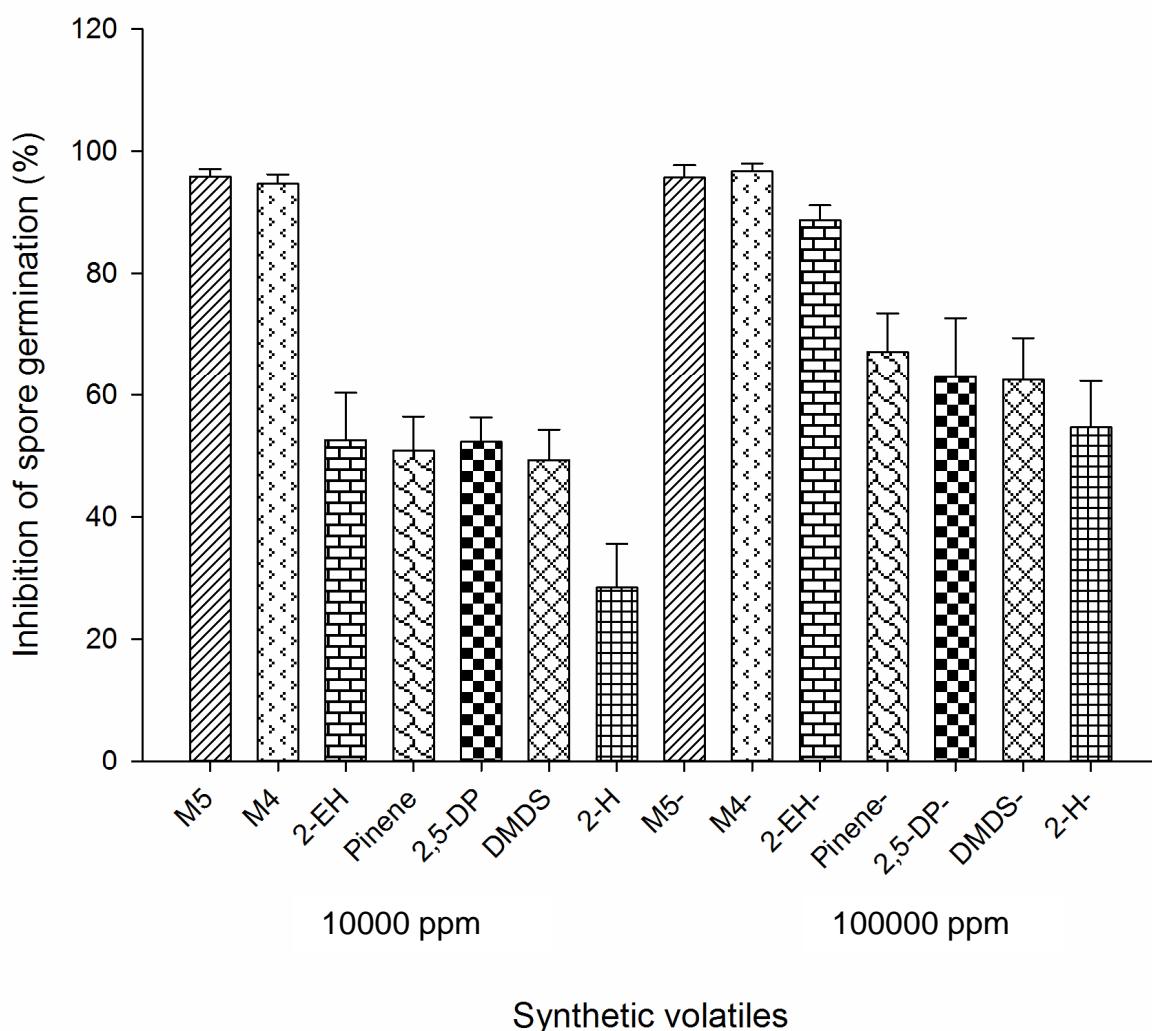
**Figure 3.**

540



**Figure 4.**

541



**Figure 5.**

542

543

544

545

546

547

548

549

550 **Highlights**

- 551       • All cocoa endophytic bacteria studied produced volatile compounds
- 552       • Volatiles bacterial inhibited mycelial growth and spore germination of *M.*
- 553           *roreri*
- 554       • A total of 14 compounds were identified
- 555       • 2-Ethyl-hexanol at 100,000 inhibited 100% of *M. roreri* mycelial growth
- 556       • The mixtures of synthetic volatiles inhibited 97-89% of spore germination

557

558

## CAPÍTULO III

### DISCUSIÓN GENERAL

La monilisisis del cacao es una enfermedad fúngica provocada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Phillips-Mora et al., 2006) el cual ataca las mazorcas de cacao provocando pérdidas de hasta el 80% en la producción de este grano. En un trabajo previo encontramos que las bacterias endófitas de cacao inhibieron el crecimiento micelial de *M. roreri*, cuando fueron confrontadas en cajas de Petri con agar papa dextrosa (De la cruz, 2010). La identificación de las especies a las que pertenecen las cepas bacterianas estudiadas y la revisión bibliográfica mostró que cepas pertenecientes a estas especies pero provenientes de otros cultivos, producen volátiles capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que causan daño en postcosecha, tales como: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Geotrichum* spp, *Monilinia fructicola*, *Penicillium* spp (Mercier y Smilanick, 2005; Gabler et al., 2006; Schnabel y Mercier, 2006). Debido a que no se encontraron reportes de volátiles producidos por bacterias endófitas de cacao (BEC) y mucho menos del efecto que estos pueden producir sobre *M. roreri*, fue de interés para nosotros identificar y evaluar los volátiles que producen las BEC sobre el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *M. roreri*, y evaluar el efecto de cinco volátiles sintéticos. Los ensayos de confrontación de *Bacillus amyloliquefaciens* CFFSUR-B35, *Bacillus atrophaeus* CFFSUR-B33, *Bacillus megaterium* CFFSUR-B32, *Bacillus muralis* CFFSUR-B38, *Bacillus pumilus* CFFSUR-B34, *Bacillus subtilis* CFFSUR-B31 y *Novosphingobium* sp CFFSUR-B36 con micelio y esporas de *M. roreri*, mostraron que todas estas bacterias endófitas

de cacao, produjeron volátiles que inhibieron el crecimiento micelial y la germinación de esporas en diferente grado. Estos resultados confirman que estas bacterias también producen volátiles con actividad supresora del crecimiento de *M. roreri*. Y además podrían presentar otro mecanismos antifúngicos como la producción de sideróforos (Santoyo et al., 2010), antibióticos como iturina, surfactina y fengicina (Valencia-Cantero et al., 2005) y enzimas líticas tales como quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas (Adhikari et al., 2001; Leelasuphakul et al., 2006).

Los volátiles producidos por *B. pumilus* CFFSUR-B34, *B. muralis* CFFSUR-B38 y *Novosphingobium* sp CFFSUR-B36 inhibieron el crecimiento micelial de *M.roreri*, pero el efecto fue más fuerte sobre la esporulación y germinación de esporas de este patógeno. Debido a que las esporas son la principal fuente de dispersión de este patógeno (Phillips-Mora, 2003), el uso de bacterias endófitas como parte del manejo integrado de la moniliasis puede tener gran potencial. Por otro lado, estas bacterias tienen la ventaja de que se pueden establecer fácilmente en el cultivo, debido a que fueron aisladas de hojas y frutos de cacao, producen metabolitos no volátiles y volátiles que afectan el crecimiento de *M. roreri*. Se ha reportado que algunas bacterias endófitas tienen la capacidad de actuar como promotoras del crecimiento de plantas, ya sea ayudándolas en la fijación de nutrientes (Wakelin, et al., 2004), o en la producción de ácido indol acético (Lee et al., 2004) o como inductoras de resistencia (Kloepper y Ryu, 2006).

Al evaluar el efecto individual de cinco volátiles sintéticos (disponibles en el laboratorio) sobre el crecimiento micelial y germinación de esporas de *M. roreri*, encontramos que el 2-etil-hexanol fue mejor inhibidor del crecimiento micelial y

germinación de esporas. Sin embargo, las altas dosis requeridas para inhibir el cincuenta por ciento del crecimiento micelial de *M. roreri*, muestra que ninguno de los cinco volátiles sintéticos por si solos fueron capaces de causar efecto similar al producido por las cepas de *B. muralis*, *B. pumilus* y *Novosphingobium* sp. Por otro lado, los resultados al evaluar los volátiles en mezcla sugieren que el efecto puede deberse a la acción sinérgica de una mezcla de volátiles. Por lo que pensamos que es de suma importancia evaluar al resto de los volátiles identificados así como definir las interacciones entre volátiles antes de proponer su uso; ya que se desconoce cuál es la dinámica natural que induce cambios sobre el crecimiento de *M. roreri*.

Los efectos de los volátiles pueden aprovecharse de dos formas una de ellas es la aplicación de las cepas bacterianas para incrementar sus poblaciones y la otra es la aplicación del volátil sintético. De acuerdo a nuestros datos, parece ser que la primera de ellas es la de mayor potencial, debido a que además de la producción de volátiles podrían ejercer otros de los mecanismos antes mencionados, haciendo más eficiente y seguro (con bajo riesgo de aparición de resistencia) el control de este patógeno en cacao. Por lo anterior, pensamos que es de importancia realizar pruebas a nivel de campo para evaluar la efectividad de estas bacterias, estimando su eficiencia, permanencia y costos de aplicación.

## **CONCLUSIONES**

1. Las siete cepas bacterianas evaluadas producen volátiles que inhiben en diferente grado el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *M. roreri*
2. *B. pumilus*, *B. muralis* y *Novosphingobium* sp, inhibieron eficientemente el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *M. roreri*
3. Es el primer reporte sobre volátiles producidos por bacterias del genero *Novosphingobium* sp
4. Se identificaron un total de 14 volátiles diferentes
5. Los cinco volátiles sintéticos evaluados inhiben en diferente grado el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *M. roreri*
6. Ninguno de los volátiles sintéticos mostro efecto similar al de las bacterias a bajas dosis
7. Las bacterias endófitas de cacao pueden tener potencial como agentes de control biológico

## LITERATURA CITADA

- Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G., Phillips, D.A. y Nelson, L.M. 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can. J. Microbiol.* 47, 916-924.
- Almenar, E., Valle, V.D., Catala, R. y Gavara, R. 2007. Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). *J. Agr. Food Chem.* 55, 224-2245.
- Aime, M.C. y Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycol.* 97, 1012-1022.
- Arias, S. 2007. Crisis sector cacaotero local por plaga. In *Tabasco hoy*. Revisado en mayo 20012, [http://www.tabascohoy.com.mx/nota.php?id\\_nota=134104](http://www.tabascohoy.com.mx/nota.php?id_nota=134104)
- Arrebola, E., Sivakumar, D. y Korsten, L. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biol. Control* 53, 122–128.
- Argüello, O. 2000. Manejo integrado de la monilia del cacao (*Theobroma cacao* L.). En: *Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de cacao*. Bucaramanga. Colombia. Corpoica, Regional Siete. p. 74-84.
- Baldwin, I.T., Kessler, A. y Halitschke, R. 2002. Volatile signaling in plant- plant herbivore interactions: what is real? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 1-4.
- Barros, O. 1981. Avances en la represión de la moniliasis del cacao. Proceedings of the Eighth International Cocoa Research Conference. Cocoa Producers' Alliance, Cartagena, Colombia.

- Bejarano, G. 1961. Métodos de inoculación artificial y factores favorables para la infección de *Monilia roreri* Cif y Par. Tesis Ing. Agr. Quito, Universidad Central. p.69.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B. y Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformation in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol Res.* 160, 75-81.
- Ciferri, R. y Parodi, E. 1933. Descrizione del fungo che causa la "Moniliasi" del cacao. *Phytopathol.* 5, 539-542.
- De la Cruz N.L. 2010. Actividad antagónica de microorganismos endófitos de cacao a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp. (Tesis). Tapachula, Chiapas. Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas.
- Dennis, C. y Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Mycol. Soc.* 11, 223-246.
- Dick, M. y Bruun, J. 2001. Chemical information transfer between plants: back to the future. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 981-994.
- Dos Santos, A.F. y Dhingra, O.D. 1980. Pathogenicity of *Trichoderma* spp on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* 60, 472-475.
- Dudareva, N., Pichersky, E. y Gershenson, J. 2004. Biochemistry of plant volátiles. *Plant Physiol.* 122, 627-633.
- 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.

Enríquez, G.A. 2004. Cacao Orgánico: Guía para productores ecuatorianos. Quito, EC. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (Manual 54) 360 p.

Evans, H.C. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Can. J. of Botany. 56.

Evans, H.C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. Phytopathol. 24, 1-44.

Evans, H.C. 1986. A reassessment of *Moniliophthora* (*Monilia*) pod rot of cocoa. Cocoa Growers' Bulletin 37, 34-43.

Evans, H.C., Holmes, A.K. y Thomas, E.S. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. Mycol. Prog. 2, 149-160.

Faeth, S.H. 2002. Are endophytic fungi defense plant mutualist?. Oikos 98, 25-36.

Fernando, D., Ramarathnam, R. y Krishnamoorthy, A.S. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biol. Biochem. 37, 955-964.

Freire, E.S., Campos, V.P., Oliveira, D.F., Pohlit, A.M., Noberto, N.P., Faria, M.R., Pinho, R.S.C., Rezende, E.L. y Pfenning, L.H. 2010. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. J. Nematol. 44, 321-328.

Gabler, F.M., Fassel, R., Mercier, J. y Smilanick, J.L. 2006. Influence of temperature, inoculation interval, and dosage on biofumigation with *Muscodorus albus* to control postharvest gray mold on grapes. Plant Dis. 90, 1019-1025.

- Herrington, P.R., Craig, J.T., Chea, C.Y. y Sheridan, J.E. 1985. Inhibition of spore germination by volatiles from *Streptomyces griseoruber*. *Soil Biol. Biochem.* 17, 897-898.
- Herrington, P.R., Craig, J.T. y Sheridan, J.E. 1987. Methyl vinyl ketone: a volatile fungistatic inhibitor from *Streptomyces griseoruber*. *Soil Biol. Biochem.* 19, 509-512.
- Holapainen, J.K. 2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends Plant Sci.* 9, 529-53.
- Huang, C.J., Tsay, J.F., Chang, S., Yu., Yang, H.P., Wu, W.S. y Chen, C.Y. 2012. Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Manag. Sci.* 68, 1306-1310.
- Hutchinson, S.A. 1971. Biological activity of volatile fungal metabolites. *Trans Br Mycol. Soc.* 57, 185-200.
- Hynes, J., Muller, C.T., Jones, T.H. y Boddy, L. 2007. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *J. Chem. Ecol.* 33, 43-57.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. y Piechulla, B. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187, 351-360.
- Kildea, S., Ransbotyn, V., Khan, M.R., Fagan, B., Leonard, G., Mullins, E. y Doohan, F.M. 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. *Biol. Control* 47, 37-45.
- Kloepper, J.W., Ruy, C.M. y Zhang, S.A. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathol.* 94, 1259-1266.

- Kloepper, J.W. y Ryu, C.M. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *Microbial Root Endophytes*. *Soil Biol.* 9, 33-52.
- Krauss, U. y Soberanis, W., 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biol. Control* 22, 149-158.
- Lee, S., Flores, E.M., Contreras, Z.M., Garcia, F.L., Escamilla, J.E y Kennedy, C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. *J Bacteriol.* 186, 5384-5391.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. y Phongpaichit, S., 2006. Purification, characterization and synergistic activity of 1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight pathogens. *Enzyme Microb. Tech.* 38, 990-997.
- Mejia, L.C., Rojas, E., Maynard, Z., Arnold, A.E., Hebbar, P.K., Samuels, G., Robbins, N. y Allen, E.H. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control* 46, 4-14.
- Mercier, J. y Jiménez, J.I. 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodorus albus*. *Postharvest Biol. Tec.* 31, 1-8.
- Mercier, J. y Smilanick, J.L. 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodorus albus*. *Biol. Control* 32, 401-407.
- Moore-Landecker, E. y Stotzky, G. 1973. Morphological abnormalities of fungi induced by volatile microbial metabolites. *Mycol.* 65, 519-530.
- Palacios, P. 1990. Efecto de fungicidas y remoción de frutos enfermos, en el control de la moniliasis y mazorca negra del cacao, en la zona Atlántica. Universidad de Costa Rica. Turrialba (Tesis) p 81.

- Peñuelas, J. y Llusiá. 2004. Plant VOC emission: marking use of the unavoidable. Trends Ecol. Evol. 9, 402-404.
- Phillips-Mora, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao fungus *Moniliophthora roreri* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence [Doctoral dissertation]. Reading, UK: Univ. Reading. p 349.
- Phillips-Mora, W., Castillo, J., Krauss, U., Rodríguez, E. y Wilkinson, M. J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. Plant Pathol. 54, 483-490.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, C.F., López, A.P., Hernández, J. y Aime, M.C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliaisis disease) of cacao in Mexico. Plant Pathol. 55, 584.
- Phillips-Mora, W. y Wilkinson, M. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential of damage. Phytopathology 97, 1644-1647.
- Pichersky, E. 2004. Plant scents. Am. Sci. 92, 514-521.
- Porras, V. H. y Enríquez, G. 1998. Spread of monilia pod rot of cocoa through Central America. IICA, San José, Costa Rica.
- Raguso, R.A. 2001. Floral scent. Olfaction, and scent-driven foraging behaviour. In: cognitive ecology of pollination, animal behavior and floral evolution. Chittka L, Thomson JD (eds). Cambridge Universiy Press.UK. p 83-105.

- Rosecke, J., Pietsch, M. y König, W.A. 2000. Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochem.* 54, 747-750.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Pare, P.W. y Kloepffer, J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *The Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4927-4932.
- Samuels, G. J., Pardo-Schlutheiss, R., Hebbar, K. P., Lumsden, R. D., Bastos, C. N., Costa, J. C. y Becerra, J. L. 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. Nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.* 104, 760-764.
- Sánchez, L., Gamboa, E. y Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en el estado Barinas. *Rev. Fac. Agro.* 20, 188-194.
- Santoyo, G., Valencia, E., Orozco, M.C., Peña, J.J. y Farias, R. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Rev.Terra Lat.* 28, 53-60.
- Saritas, Y., Sonwa, M.M., Iznaguen, H., König, W.A., Muhle, H. y Mues, R. 2001. Volatile constituents in mosses (Musci). *Phytochem.* 57, 443-457.
- Stone, J.K., Bacon, C.W. y White, J.F. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York, pp 3-30.
- Valencia-Cantero, E., Villegas, J., Sánchez, J.M., Peña, J.J. y Farías, R. 2005. Inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Rev. Terra Lat.* 23, 65-72.

Wakelin, S., Warren, R., Harvey, P. y Ryder, M. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. Biol Fert. Soils. 40, 36-43.

Wheatley, R., Hackett, C., Bruce, A. y Kundzewicz, A. 1997. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi, Int. Biodeter. Biodegr. 39, 199-205.

Zou, C., Zhou, J.P. y Zhang, K.Q. 2007. Possible contributions of volatiles producing bacteria to soil fungistasis. Soil Biol. Bioch. 39, 2371-2378.