



**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO
DE MAGISTER SCIENTIAE EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**Efecto de filtrados bacterianos con actividad antifúngica
in vitro en la interacción *Musa-M. fijiensis*
en casa de cultivo**

Autora: Ing. Ivian Poveda Martínez
Tutora: Dr. C. Yelenys Alvarado Capó
Consultante: MSc. Mileidy Cruz Martín

Santa Clara, CUBA

RESUMEN

Aunque se ha demostrado que determinados géneros bacterianos pueden ser antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis* aún no se conoce el efecto de factores bióticos en la interacción *Musa-M. fijiensis*. Por ello, este trabajo persiguió determinar el efecto de filtrados bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* en la interacción *Musa-M. fijiensis* en casa de cultivo. Para esto se aislaron bacterias de la filosfera de diferentes cultivares de *Musa* sp. Se seleccionaron e identificaron las cepas que inhibieron el crecimiento del patógeno y se caracterizó su actividad antifúngica. Además, se determinó el efecto de filtrados de cultivo de dos cepas seleccionadas sobre plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo. Fue posible aislar y seleccionar bacterias de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*; principalmente de cultivares resistentes en tejido foliar con síntomas. Se identificaron representantes de tres familias (*Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Micrococcaceae*) y el 45,0% de las cepas pertenecieron a *Bacillaceae*. Se demostró que la actividad antifúngica *in vitro* de las bacterias seleccionadas, puede ser ocasionada por más de un mecanismo de acción. Predominó la inhibición por producción de metabolitos antifúngicos difundidos (80,0% de las cepas) sobre la producción de metabolitos volátiles (60,0%). Se comprobó que el efecto de los filtrados de cultivo sobre el desarrollo de la enfermedad depende de la cepa y del momento de aplicación. El método utilizado permitió detectar una reducción significativa del número de lesiones necróticas. Mediante el empleo de este procedimiento se podrán analizar cepas seleccionadas por su actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y se contribuirá al conocimiento del efecto de factores bióticos (las bacterias o sus filtrados) sobre la interacción *Musa-M. fijiensis*.

1. INTRODUCCION

La producción mundial anual de plátanos y bananos se ubica en el orden de los 86 millones de toneladas métricas de las cuales alrededor de un tercio se produce en África, Asia, América del Sur y el Caribe (FAO, 2007). En Cuba, constituyen importantes renglones alimenticios de la población y ocupan las dos terceras partes del total de la superficie cultivable.

Este cultivo es afectado por la Sigatoka negra, enfermedad causada por el ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* Deighton) y considerada la más perjudicial para el cultivo a nivel mundial (Pasberg-Gaul *et al.*, 2000; Arzanlou *et al.*, 2008).

Este hongo se controla principalmente mediante fungicidas químicos con un alto costo anual de cerca de 350 millones de dólares para América Latina (Peláez *et al.*, 2006).

Según Riveros y Lepoivre (1998) el control químico y la selección de plantas resistentes son las únicas estrategias, por excelencia, para combatir la Sigatoka negra. Sin embargo, el uso del control químico trae problemas colaterales, como es la contaminación ambiental, afectaciones a la salud humana (Orozco, 1998) y la aparición de cepas de *M. fijiensis* resistentes a los fungicidas químicos tradicionalmente usados (Chin *et al.*, 2001). Además, con el incremento a nivel mundial de las demandas por las medidas de seguridad se ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas para el control de la Sigatoka negra (Marín *et al.*, 2003).

En el mercado existen pocos productos biológicos eficaces para el combate contra la Sigatoka negra y los que están disponibles requieren de largos períodos de tiempo para mostrar su acción, muchas veces pierden la actividad biológica y causan un impacto negativo al liberar microorganismos al ambiente creando un desbalance ecológico.

Se han realizado investigaciones con bacterias tales como: *Pseudomonas*, *Serratia entomophyla*, *Serratia marcescens* y *Bacillus cereus*, (Riveros *et al.*, 2003), pero el único producto biológico en el mercado ha sido Serenade®, elaborado a partir de *Bacillus subtilis* para el control de otros hongos fitopatógenos pero con resultados discretos en el control de *M. fijiensis* (Navarro *et al.*, 2004).

Aunque se ha demostrado que determinados géneros bacterianos pueden ser antagonistas de *M. fijiensis* aún no se conoce el efecto de factores bióticos en la interacción *Musa-M. fijiensis*, por lo que identificar metabolitos bacterianos con efecto antagonista pudiera contribuir a diseñar nuevas estrategias de mejoramiento genético y a la formulación de productos biológicos para su control.

Para ello se necesita establecer un protocolo de evaluación de la actividad antifúngica de filtrados de cultivo bacterianos frente a *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Teniendo en cuenta las razones expuestas anteriormente se estableció como **hipótesis** de trabajo:

Mediante la aplicación en plantas de *Musa* inoculadas con *M. fijiensis*, de filtrados de cultivos bacterianos con actividad antifúngica *in vitro*, será posible determinar su efecto en la interacción *Musa-M. fijiensis* en casa de cultivo.

Para dar cumplimiento a esta se plantearon los siguientes **objetivos** de trabajo:

1. Seleccionar e identificar bacterias de la filosfera de *Musa* sp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.
2. Caracterizar la actividad antifúngica de las bacterias seleccionadas.
3. Determinar el efecto de filtrados de cultivos bacterianos sobre *M. fijiensis* en plantas de *Musa* cv. 'Grande naine' inoculadas en casa de cultivo.

La tesis se estructuró en los siguientes acápites: Introducción, Revisión bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y se incluyó Referencias Bibliográficas y Anexos. Dentro del texto se intercalaron tablas y figuras.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bacterias asociadas a las plantas

Las partes de la superficie de las hojas son normalmente colonizadas por una gran variedad de bacterias, levaduras, hongos (Lindow y Brandl, 2003) y en menor proporción, algas, protozoos y nemátodos (Ganamanickam e Immanuel, 2007).

Una gran variedad de especies microbianas han sido aisladas de los tejidos de las plantas y la mayoría han sido recuperados de la superficie de las hojas. La parte aérea colonizada por esos microorganismos es la filosfera y a sus habitantes se denominan epifitos (Lindow y Brandl, 2003).

Al contrario de la rizosfera, la filosfera está sujeta a rápidas fluctuaciones de temperatura, radiación solar y disponibilidad de agua (Beattie, 2007).

La diferencia en la composición de las comunidades bacterianas de las hojas y las raíces se evidencia en los fallidos intentos de establecimiento en las hojas de aquellos géneros microbianos colonizadoras de las raíces tales como: *Rhizobium* (O'Brien y Lindow, 1989).

La microbiota epifila es característica para cada especie, e incluso para cada variedad de planta (Mayea *et al.*, 1998).

Ello se evidencia porque las cantidades de bacterias encontradas en la filosfera dependen de los nutrientes secretados por la planta como productos para el crecimiento y desarrollo. Estas bacterias prefieren ciertos tipos de plantas y ciertas partes de las plantas (Gnanamanickam e Immanuel, 2007).

2.1.1 Bacterias epifíticas como agentes de control biológico

Hirano y Upper (1983) definieron las bacterias epifíticas, de forma práctica, como aquellas bacterias que pueden ser removidas desde la superficie de la planta por lavados de la hoja en un líquido.

Estas bacterias asociadas a las hojas pueden estar localizadas en el tejido laminar y particularmente en las cámaras sub-estomáticas, en espacios intercelulares y en sitios protegidos de la superficie de la hoja (Jacques y Morris, 1995).

Las bacterias que se encuentran en la superficie de las hojas pueden interactuar con la planta de manera beneficiosa o perjudicial. Así, Gnanamanickam e Immanuel (2007) hicieron una descripción de cuatro clases de bacterias epifíticas:

- patógenas de las plantas,
- agentes de control biológico,
- inductoras de escarcha, y
- que forman agregados celulares.

La microbiota epífita puede defender a las plantas de los agentes patógenos al ejercer una acción antagónica contra estos. En este sentido, Jiménez *et al.* (1988), en un estudio sobre control biológico de Sigatoka negra, usando bacterias epifíticas, identificaron 12 bacterias que mostraron antagonismo *in vitro*.

Igualmente, se ha demostrado que *Pseudomonas mycophaga* produce sustancias que inhiben a muchos hongos saprófitos y patógenos (Mayea *et al.*, 1998).

2.1.2 Aislamiento de bacterias de la filosfera

Varios investigadores han aislado bacterias de las partes aéreas de las plantas con el fin de utilizarlas como control biológico de muchos patógenos.

Para el éxito en el aislamiento de estas bacterias es muy importante la selección del método. Como ejemplos de estos se pueden mencionar el aislamiento por lavado de las hojas, por maceración de los tejidos, por impresión de tejidos en un medio de cultivo, etc.

Aislamiento por lavado de las hojas

Un método indirecto de aislamiento muy empleado ha sido por lavados de las hojas en un líquido. Sin embargo, Romantschuk (1992) sugirió que las células mejor adaptadas a la vida en la superficie de la planta no son fácilmente removidas

por lavados si se encuentran adheridas a la superficie como una ventaja selectiva para estas bacterias en su medioambiente, como parece probable.

Cuando se necesita remover o desinfectar la superficie de las plantas hay que tener en cuenta el grado de adhesión de las bacterias a la superficie de la hoja. En este sentido, Compton (1993) señaló que es posible que la adhesión de las bacterias a la superficie aérea pueda depender del contenido de sales minerales presentes en el suelo resultando en diferencias en las poblaciones epifíticas en plantas obtenidas de localidades con diferentes condiciones del suelo. Metales pesados como el cadmio, cobre y mercurio incrementaron la adhesión de bacterias Gram+ y Gram- a la superficie sólida cuando las células fueron suspendidas en un medio líquido.

Por su parte, Epton (1997), planteó que la adhesión de las bacterias a la superficie de la hoja puede ser por mecanismos físico-químicos o por la presencia de estructuras de adhesión. Igualmente, este autor encontró que en *Listeria monocytogenes* la adhesión a las superficies hidrofóbicas es influenciada por el contenido de sales minerales del fluido donde se encuentra suspendida.

Maceración de los tejidos.

Uno de los métodos de aislamiento también empleado es la maceración de los tejidos de la hoja. Este incrementa el número de bacterias recuperadas comparado con el lavado en agitación (Stout, 1960).

Estos métodos pueden ser inapropiados para algunos microorganismos. En este sentido, Dickinson *et al.* (1975) informaron la aparente inhibición de actinomicetos

por lavado. Por su parte, Morris (1985) demostró que poblaciones de *Bacillus* sp. altamente mótils fueron disminuidas por el maceramiento de las hojas comparada con el lavado. Los métodos de maceramiento tienen la gran desventaja de contribuir al vertimiento del contenido celular de la planta en la solución lo cual puede inhibir algunos microorganismos (Jacques y Morris, 1995).

2.2 Antagonismo microbiano

El control de microorganismos patógenos mediante el empleo de otros microorganismos con efecto antagonista es una práctica mundial y la búsqueda de aislados más efectivos en el control biológico es un tema que ocupa a muchos investigadores.

Encontrar alternativas que abaraten el costo de las producciones y que tengan menor repercusión sobre el ambiente ha sido una línea de investigación en los últimos tiempos. A nivel mundial, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar nuevos microorganismos que puedan ser empleados como control biológico, entre estos el empleo de bacterias antagonistas debido a sus potencialidades biocontroladoras tiene un papel importante (González y Fragoso, 2001).

Numerosas investigaciones se conducen para desarrollar productos biológicos con potencial para reemplazar o reducir el uso de productos químicos. Algunas de las bacterias empleadas como antagonistas de hongos fitopatógenos tienen la capacidad de producir sustancias con propiedades antifúngicas.

Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* tiene la propiedad de producir antibióticos y sideróforos que son muy activos (Laha *et al.*, 1996); *Bacillus subtilis*, produce endotoxinas, antibióticos y proteínas con actividad antifúngica (Agrios, 1997) y *Serratia plymuthica* tiene alta actividad quitinolítica y propiedades antifúngicas (Kurze *et al.*, 2001).

2.2.1 Actividad antifúngica

En la naturaleza, muchos microorganismos poseen actividad antifúngica en función de su supervivencia, nutrición u ocupación de un nicho ecológico determinado. Esta puede ser debido a la producción de un variado grupo de sustancias.

La producción de toxinas y otros metabolitos secundarios está relacionada con las condiciones existentes para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Factores como el pH, humedad relativa, temperatura y el medio de cultivo son de gran importancia en este aspecto. Cualquier alteración de ellos puede determinar la producción y viabilidad de las toxinas (Casadesus *et al.*, 1985).

Un ejemplo de esto ha sido observado en la bacteria epifita *Serratia plymuthica* la cual incrementó la producción de componentes antimicrobianos en respuesta a la reducción de niveles de nutrientes en el medio de cultivo (Leifert *et al.*, 1993).

En condiciones de bajas concentraciones de hierro, se ha demostrado que bacterias promotoras del crecimiento privan a los patógenos fúngicos de este elemento esencial (Loper y Henkels, 1999) debido a la producción de sustancias de bajo peso molecular llamadas sideróforos que les permiten adquirir el ión férrico competitivamente (Whipps, 2001).

2.2.2 Métodos de evaluación de actividad antifúngica

El método de evaluación de la actividad antifúngica depende del tipo crecimiento que presente el patógeno. Por ejemplo, Montealegre *et al.* (2003), para evaluar la actividad antifúngica de bacterias aisladas de la rizosfera de tomate (*Lycopersicon esculentum*), emplearon el método de cultivo dual colocando un disco de agar con micelio de *Rhizoctonia solani* en el centro de la placa y a su alrededor, una suspensión de la bacteria antagonista.

Hou *et al.* (2006) para *R. solani* y *Sclerotium sclerotiorum* emplearon alícuotas del cultivo bacteriano y cuñas de medio de cultivo con crecimiento fúngico. Sin embargo, para *Alternaria brassicae* y *Leptosphaeria maculans* asperjaron en el medio de cultivo una solución de esporas y luego añadieron alícuotas del cultivo bacteriano.

Para algunos hongos, entre ellos *Mycosphaerella fijiensis*, se ha hecho difícil estandarizar un método de evaluación de actividad antifúngica *in vitro* debido a sus características de crecimiento en los medios de cultivo. En este sentido, se han desarrollado métodos basados en la inhibición del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas, así como la medición del diámetro de las colonias (Mosquera *et al.*, 2009), los cuales son muy laboriosos y requieren entre 15 y 20 días para mostrar sus resultados. Por ello es necesaria la estandarización de un método de evaluación de actividad antifúngica de bacterias contra *M. fijiensis* que permita mostrar resultados más confiables.

2.2.3 Selección e identificación de bacterias con actividad antifúngica

Un aspecto importante en el uso de bacterias como agentes de control biológico son los criterios de selección empleados. Para entender el modo de acción de los agentes de control biológico hay que tener en cuenta el desarrollo de un método de selección eficiente de las cepas microbianas antagonistas y el desarrollo de métodos apropiados de formulación y producción que aumenten la actividad biocontroladora (Kim y Chung, 2004).

Algunos autores como Basha y Kandamamy (2002) aislaron 168 cepas bacterianas de la rizosfera del sorgo (*Sorghum* spp.) y seleccionaron 12 con actividad inhibitoria frente a *Curvularia lunata*. El aislado que mayor inhibición produjo fue identificado como *Bacillus* sp. según el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Sosa *et al.* (2005) seleccionaron las cepas que presentaron una manifestación diferente en el crecimiento micelial de patógenos en semilleros de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con respecto al control, así como las que presentaron un halo de inhibición de tamaño considerable que impidió el crecimiento y desarrollo del hongo en las que el crecimiento micelial del patógeno fue nulo y aquellas en las que el hongo creció y no se detectó a simple vista.

En el 2007, Rhaman *et al.*, de 76 aislados bacterianos de la fructosfera de papaya (*Carica papaya* L.), seleccionaron 27 con características inhibitorias frente a *Colletotricum gloeosporoides* utilizando el método de cultivo dual. Las cuatro cepas que mayor porcentaje de inhibición mostraron fueron identificadas por el sistema BIOLOG como *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Varios autores mencionan que la selección *in vitro* no tiene adecuada correlación con la respuesta en el campo.

Knudsen *et al.* (1997), señalaron que la selección de microorganismos para uso en el biocontrol basado en métodos *in vitro* como pruebas de antibiosis en placas de agar, pueden no concordar con resultados en campo.

Massomo *et al.* (2004) demostraron que solo el 35% de las cepas que mostraron actividad *in vitro* contra *Xanthomonas campestris* redujeron la incidencia y severidad de la pudrición negra en plantaciones de col (*Brassica oleracea*).

2.2.4 Mecanismos de acción de bacterias antagonistas

Los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico.

Varios mecanismos pueden operar simultáneamente o diversos mecanismos deben operar bajo condiciones ambientales diferentes (Knudsen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998).

Los mecanismos de control biológico con cepas bacterianas pueden incluir metabolitos bacterianos que afectan al patógeno o inducir resistencia sistémica en la planta (Kloepper *et al.*, 1999).

En este sentido, Massomo *et al.* (2002) refirieron que la supresión de la podredumbre negra en campos de col (*Brassica oleracea*) era debida, entre otros mecanismos, a la inducción de resistencia en el hospedero.

En investigaciones realizadas por Wulff *et al.* (2003), se observó que la aplicación de cepas de *Bacillus* BB en las raíces de col (*Brassica oleracea*) tuvo una

protección a largo plazo en la planta contra *X. campestris* y la presencia del *Bacillus* fue seguida de la acumulación de un material aparentemente originado por la planta lo cual indicó la inducción de resistencia.

Estos mecanismos se clasifican en base a su modo de acción, tales como: la colonización de las raíces, parasitismo degradativo, antibiosis o antagonismo competitivo (Kim y King, 1994; Lim y King, 1997) y predación e inducción de resistencia (Fernández-Larrea, 2001).

Por ejemplo, Butt *et al.* (1999) destacaron que *B. subtilis* es una especie conocida como antagonista de muchos patógenos vegetales. Este antagonismo es logrado a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por los nutrientes, la exclusión de sitios, la colonización del patógeno y la liberación de compuestos celulares durante el crecimiento, en orden de eliminar o reducir los competidores en su medio ambiente inmediato.

Los mayores constituyentes de la pared celular de muchos hongos son quitina y β -1,3 glucano (Ait-Lahsen, 2001; Hong y Meng, 2003) y muchas bacterias epifíticas producen enzimas que degradan estas paredes interfiriendo con los procesos normales de patogénesis.

Basado en esto, la producción de quitinasas, glucanasas, celulasas, lipasas y otras enzimas líticas pueden contribuir a una efectiva actividad biocontroladora (Beattie, 2007).

Por ejemplo, se han encontrado enzimas que degradan varias sustancias requeridas para la patogenicidad de muchos hongos tales como: el ácido fusárico

para *Fusarium oxysporum* (Utsumi *et al*, 1991), exudados volátiles para *Pythium ultimum* (Paulitz, 1991) y ácidos grasos de semillas y raíces (McKellar y Nelson, 2003).

Un estudio realizado por Basha y Kandasamy (2002) demostró que la cepa de *Bacillus* BC121 mostró actividad antagonista debido a un mecanismo de tipo quitinolítico y de hiperparasitismo, los cuales han sido probados como mecanismos efectivos en el control de patógenos.

Así mismo, varios trabajos han demostrado la lisis de paredes del hongo con quitinasas y β -1,3-glucanasas de microorganismos como un mecanismo de acción (Hong y Meng, 2003).

2.2.5 Género *Bacillus* como antagonista

Varias investigaciones han demostrado que el género *Bacillus* posee características especiales que lo convierten en un potencial agente biocontrolador para muchos patógenos que afectan a las plantas. Debido a estas características, es el género bacteriano más empleado como agente de control biológico.

Las especies de *Bacillus* poseen características especiales, tales como: la formación de endosporas termorresistentes a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos grasos y los desinfectantes químicos (Krieg y Holt, 1986), la tolerancia al pH, temperatura y condiciones osmóticas extremas (Basha y Kandasamy, 2002) lo cual les permite ocupar un lugar importante como agentes de control biológico.

Son colonizadores eficaces debido a que son productores de sustancias que le proporcionan la capacidad de conquistar determinados ambientes agrícolas y por ende, impiden el establecimiento de microorganismos patógenos (Todar, 2003); estas sustancias aisladas, purificadas y producidas a gran escala son una valiosa alternativa del control químico (Sosa *et al.*, 2005).

Dos Santos y de Melo (1993) demostraron el carácter antagónico de las bacterias del género *Bacillus* sobre diferentes hongos fitopatógenos, cuando aislaron *Bacillus* spp. antagonista de *Rhizoctonia solani*.

Al respecto, Turner y Backman (1991) y Podile *et al.* (1996), encontraron que especies de *Bacillus* que han sido encontradas colonizando la superficie de las raíces, incrementan el crecimiento de la planta y pueden causar lisis del micelio de hongos fitopatógenos.

Igualmente, *Bacillus subtilis* y otras cepas de *Bacillus* spp. producen sustancias volátiles (Fiddaman y Rossall, 1993), así como varios péptidos, proteínas (Kim y Chung, 2004) y metabolitos antimicrobianos que pueden estar involucrados en la supresión de enfermedades (Schmidt *et al.*, 2001; Wulff *et al.*, 2002) tales como: lipopéptidos cíclicos, surfactina, iturina y ferguncyn (Stein, 2005).

2.2.6 Utilización de metabolitos y filtrados de cultivo

Para el control biológico de microorganismos patógenos se han empleado cultivos microbianos, filtrados de cultivo o propiamente los metabolitos secundarios que intervienen en la inhibición del crecimiento. La selección de uno u otro para la

formulación de un producto biológico y el éxito de su uso dependen de muchos factores.

Utilizando filtrados de cultivos bacterianos se ha logrado la inhibición del crecimiento del micelio y de la producción de sustancias tóxicas de hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Munimbazi y Bullerman (1998) con el uso de filtrados de cultivo de *Bacillus pumilus* comprobaron la inhibición de la producción de aflatoxinas y micelio de especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Con ello demostraron que a medida que aumentaba la producción de metabolitos disminuía la producción de micotoxinas y micelio.

Igualmente, Kim y Chung (2004) utilizaron un filtrado de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Colletotrichum lagenarium* y demostraron que la cepa que inhibió el crecimiento del patógeno coincidió con la cepa cuyo filtrado de cultivo inhibió el crecimiento del patógeno.

También, los filtrados de cultivo de *Burkodelia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* lograron reducir significativamente el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides* en un 59,2 y 16,9% respectivamente (Rahman *et al.*, 2007).

Por otra parte, metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis* han sido usados satisfactoriamente para el control de diversas bacterias y hongos patógenos de plantas incluyendo *Rhizoctonia solani* y *Pseudomonas solanacearum* (Shoda y Ano, 1994), *Xanthomonas oryzae* (Lin *et al.*, 2001), *Fusarium graminearum* (Chan *et al.*, 2003), *Botrytis cinerea* (Touré *et al.*, 2004) y *Sclerotium sclerotiorum* (Souto *et al.*, 2004).

Varios lipoéptidos cíclicos han sido asociados con la supresión de patógenos de plantas. Por ejemplo, se ha encontrado que el fengicin inhibe a *Pyricularia oryzae* (Loeffler *et al.*, 1986) y las iturinas y surfactinas han mostrado ser activas contra *R. solani* (Asaka y Shoda, 1996).

Para demostrar lo anterior, Tsuge *et al.* (2001), hicieron una disrupción genética de la biosíntesis de la iturina y observaron un decrecimiento de la capacidad de la cepa RB14 de *Bacillus subtilis* para suprimir el crecimiento de *R. solani*.

Estudios con un mutante de *B. subtilis* subsp. *amyloliquefaciens* cepa FZB42 indicaron que fengicin y bacilomicina D actúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento de *F. oxysporum in vitro* (Koumoutsi *et al.*, 2004).

También, Hou *et al.* (2006) purificaron y caracterizaron varios lipopéptidos (fenguncin A y B) con actividad antifúngica en fracciones del exudado de una cepa de *B. subtilis*.

Algunos autores han encontrado que las condiciones óptimas para la proliferación *in vitro* de los microorganismos no son necesariamente las óptimas para la producción de compuestos bioactivos. Sin embargo, otros autores plantean que existe una relación positiva entre ambas variables (Companioni, 2005).

Es importante que al estudiar la utilización de los filtrados de cultivo tanto de hongos como de bacterias se tenga en cuenta la relación entre la proliferación *in vitro* de los microorganismos y su capacidad para producir compuestos bioactivos. En este sentido, Sutherland y Pegg (1995) observaron una correspondencia entre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum var. lycopersici* y la mortalidad de

protoplastos de tomate (*Solanum lycopersicum*) después de la aplicación de filtrados del cultivo del hongo.

Otros autores como Tapia *et al.* (1998) observaron el máximo crecimiento de *Fusarium subglutinans* a los 21 días de cultivo lo que coincidió con la mayor fitotoxicidad del filtrado del cultivo en las plantas de piña (*Ananas comosus*).

Otro aspecto importante que influye en la toxicidad del filtrado y en la producción de compuestos bioactivos es la influencia del microambiente físico-químico. Un ejemplo de esto es el papel del pH del medio de cultivo en la producción de toxinas por *F. oxysporum* (Sutherland y Pegg, 1995). También la presencia de trazas de elementos, particularmente zinc, y fuentes de carbono influyen en la estabilidad genética de las bacterias, afectando a su vez la habilidad para producir metabolitos secundarios (Duffy y Défago, 2000).

2.3 Empleo de bacterias para el control de la Sigatoka negra

Los plátanos y bananos constituyen uno de los principales renglones alimenticios en la población cubana, pero es un cultivo muy afectado por enfermedades como la denominada Sigatoka negra, causada por el hongo ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), la cual se considera la enfermedad foliar más destructiva y costosa de estos cultivos a nivel mundial (Arzanlou *et al.*, 2008).

En la búsqueda de soluciones alternativas que puedan incluirse en el manejo integrado de la enfermedad, las bacterias han sido el principal grupo de microorganismos evaluados para el control biológico de *M. fijiensis* (Marín *et al.*,

2003). *Pseudomonas* sp., *Serratia entomophyla*, *Serratia marcescens* y *Bacillus cereus* han sido analizadas para el control de *M. fijiensis*. Serenade® ha sido el único producto biológico con resultados discretos en el control de la enfermedad.

Este es un producto elaborado a partir de *Bacillus subtilis* que posee tres grupos de lipopéptidos que actúan sinérgicamente en la destrucción del tubo germinativo de ascosporas del patógeno y las membranas miceliales (Edgecomb y Manker, 2006).

2.3.1 Interacción *Musa-M. fijiensis*

Los genotipos de bananos se agrupan en tres categorías: altamente resistentes (interacción incompatible), parcialmente resistentes y susceptibles (interacción compatible) (Carlier *et al.*, 2002).

En la interacción incompatible, se muestra resistencia a la enfermedad, se bloquea el desarrollo de los síntomas y no ocurre esporulación sexual o asexual del hongo. (Hoss *et al.*, 2000). Un ejemplo de esto es la interacción 'Calcutta 4' (*Musa* AA)-*M. fijiensis* (De Lange, 1996).

En la interacción compatible ocurre el desarrollo completo de la enfermedad y está asociada a necrosis de los tejidos y esporulación del hongo. Un ejemplo de lo anterior lo constituyen las plantas del subgrupo Cavendish (Grande naine, *Musa* AAA) (Hoss *et al.*, 2000).

Aunque es limitado el conocimiento que se tiene de la interacción *Musa-M. fijiensis*, se han realizado importantes investigaciones encaminadas a una mayor comprensión de este patosistema.

En este sentido se han logrado avances, como la estandarización de un método basado en diluciones en microplatos que permite evaluar en forma sencilla la actividad de diversos compuestos antifúngicos contra *M. fijiensis* (Peláez *et al.*, 2006), la estandarización de una nueva metodología para el aislamiento de ARN total de hongos filamentosos empleando *M. fijiensis* (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2008). No obstante, es necesario seguir avanzando en la búsqueda de respuestas que aclaren aún más la comprensión de los factores que interfieren en esta interacción.

2.3.2 Efecto de factores abióticos en la interacción *Musa-M. fijiensis*

Algunos factores climáticos son determinantes en la velocidad de evolución de los síntomas de la enfermedad. Su comportamiento está ligado al clima, especialmente precipitaciones y temperatura (Riveros y Arciniegas, 2003).

En este sentido, Mayea *et al.* (1983) plantearon que la infección fundamental que realizan los conidios se lleva a cabo en la época lluviosa y con altas temperaturas y que en la formación de los conidios y las ascosporas se necesita un medio acuoso, ya sea producto del rocío o de las lluvias.

Por su parte, el viento se ha considerado como el principal medio de transportación de los conidios y ascosporas hacia las plantas de *Musa* spp. cercanas (Burt, 2003).

Guzmán (2003) planteó que los conidios y las ascosporas del hongo se producen abundantemente durante períodos de alta humedad, sobre todo si una película de agua está presente en la hoja. Además, señaló que la temperatura tiene un efecto cuadrático sobre la germinación de los conidios y las ascosporas.

2.3.3 Efecto de factores bióticos en la interacción *Musa-M. fijiensis*

El efecto de otros factores bióticos que no sean la planta o el hongo filamentoso en la interacción *Musa-M. fijiensis* han sido poco abordados en las investigaciones científicas. Los esfuerzos en este sentido se han encaminado fundamentalmente a la identificación de microorganismos capaces de contribuir a las estrategias de control.

Por ejemplo, González *et al.* (1996) identificaron 120 cepas de microorganismos quitinolíticos provenientes de hojas de banano con habilidad para producir quitinasa, entre ellos sobresalió *Serratia marcescens* como un potencial agente biocontrolador contra *M. fijiensis*.

Osorio *et al.* (2004), realizaron pruebas de antagonismo sobre ascosporas de *M. fijiensis* con bacterias quitinolíticas aisladas del filoplano del banano en un ensayo *in situ* sobre discos de hojas de plantas. Estos autores encontraron que algunos de los aislados inhibieron la germinación de las ascosporas o deformaron sus tubos germinativos, hasta en un 40 y 85% respectivamente. Tal efecto, en parte, fue explicado por la actividad de las enzimas quitinolíticas sobre la pared del hongo.

Igualmente, Salazar *et al.* (2006) han realizado investigaciones con bacterias antagonistas productoras de quitinasas y glucanasas aisladas de la filosfera de bananos y plátanos.

Por su parte, Zuluaga *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la inducción de resistencia con bacterias quitinolíticas en el control de la Sigatoka negra y demostraron que la aplicación de estos inductores solos o mezclados con

fungicidas convencionales permiten una reducción entre el 46 y el 100 % de la cantidad de fungicidas convencionales utilizados en el control de la enfermedad.

Aunque se han logrado avances en la búsqueda de controles biológicos eficientes en el combate contra la Sigatoka negra, en el mercado existen pocos productos eficaces y los que están presentes requieren de largos períodos de tiempo para ejercer su acción, muchas veces pierden la actividad biológica y causan un impacto negativo al liberar microorganismos al ambiente creando un desbalance ecológico.

La evaluación de bioproductos y fungicidas de origen orgánico cada día cobra mayor importancia. Todo ello encaminado a la confección de un bioproducto menos agresivo con el ambiente, a la búsqueda de plantas resistentes a la Sigatoka negra y a una mejor comprensión de la interacción planta-patógeno.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV).

Aislado de *M. fijiensis*

El aislado de *M. fijiensis* empleado en todos los ensayos fue el CCIBP-Pf-83 perteneciente a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Microbiología Aplicada del IBP. Para su cultivo el aislado fue inoculado en Enlermeyers de 100,0 mL de volumen con 50,0 mL de medio de cultivo Caldo

Papa Dextrosa (PDB) (BioCen) e incubado en agitación a 120 rpm y 28°C, durante 15 días.

Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos de las variables estudiadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 16 para Windows. En cada acápite se detalla el procedimiento utilizado para el análisis de las diferentes variables. En todos los casos se utilizó la posibilidad de generar hasta 10 000 muestras con distribución similar a la real mediante la técnica de Monte Carlo, con una significación del 99,0% de confianza.

3.1 Selección e identificación de cepas bacterianas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

3.1.1 Aislamiento de bacterias de la filosfera de plátanos y bananos

Con el objetivo de aislar bacterias de la filosfera *Musa* sp. se seleccionaron de mayo a junio plantas de *Musa* crecidas en campo.

Se tomaron fragmentos de tejido de la tercera y cuarta hojas, con síntomas y sin síntomas de la enfermedad, de tres cultivares parcialmente resistentes a la Sigatoka negra [(‘FHIA-18’ (AAAB), ‘FHIA-21’ (AAAB) y Bluggoe (ABB)] y tres susceptibles [(‘Parecido al rey’ (AAA), ‘Cavendish enano’ (AAA) y ‘Cavendish gigante’ (AAA)].

Las muestras se colectaron en parcelas de productores particulares de diferentes regiones de la provincia Villa Clara, se colocaron individualmente en bolsas de

polietileno y se llevaron inmediatamente al laboratorio para ser procesadas. Estas plantaciones no habían sido sometidas a la aplicación de fungicidas.

Para el aislamiento de las bacterias de la filosfera de las plantas se empleó el método de impresión de la hoja sobre medio de cultivo sólido. Para ello se cortaron fragmentos de tejido de 90,0 mm de diámetro con síntomas (lesiones necróticas, estados 3-5 de la escala propuesta por Fouré (1985) y sin síntomas de cada uno de los cultivares (tratamientos) y se colocaron sobre la superficie de placas de Petri de 90,0 mm de diámetro con medio de cultivo con Agar para Conteo en Placas (ACP) (BioCen). Se presionaron ligeramente sobre el medio de cultivo y se mantuvieron impresas durante 10 minutos. Luego se extrajeron y se procedió a la incubación de las placas a 30 °C y oscuridad durante 24 horas (Figura 1).



Figura 1. Esquema empleado para el aislamiento de bacterias de la filosfera de plantas de *Musa* sp.

Pasado el tiempo de incubación se cuantificó el número de colonias crecidas por cada tratamiento. Se compararon los resultados entre cultivares y para cada cultivar por tipo de tejido (con síntomas y sin síntomas). Los resultados se informaron como número de colonias/cm² de tejido.

Para la comparación estadística de los valores obtenidos entre cultivares fue utilizada la prueba de Kruskal-Wallis y dentro de cada cultivar entre tipo de tejido

se empleó la prueba de Mann-Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

Las colonias con características culturales diferentes en cada tratamiento se aislaron y purificaron por agotamiento por estrías. Luego se transfirieron a tubos de ensayo con cuñas de medio de cultivo Agar Nutriente (AN) (BioCen) y se conservaron a 4°C para su posterior empleo.

3.1.2 Selección de cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

Con el objetivo de seleccionar aquellas cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*, las obtenidas en el acápite anterior se enfrentaron al patógeno por el método de cultivo dual.

Se prepararon suspensiones miceliales de *M. fijiensis* (CCIBP-Pf83) a una concentración de $5,0 \times 10^5$ fragmentos de micelio/mL y como inóculo se emplearon cultivos bacterianos de 24 horas de crecidos en medio de cultivo AN.

Las placas de Petri (90,0 mm) para el cultivo dual se prepararon como se describe a continuación. En un Erlenmeyer con 200,0 mL de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (BioCen) fundido a 40°C se añadieron 20,0 mL de una suspensión micelial de *M. fijiensis* ($5,0 \times 10^5$ fragmentos de micelio/mL). Se homogenizó la mezcla y se vertió en placas de Petri de 90 mm de diámetro. A las 24 horas de incubación a 28°C, se inocularon las bacterias mediante punción (ocho aislados por placa de Petri).

Como control se empleó agua desionizada estéril en lugar del crecimiento bacteriano. Se emplearon dos réplicas por cada cepa bacteriana y se repitió dos veces.

La evaluación se realizó diariamente hasta las 96 horas mediante la observación de la presencia o no de halo de inhibición del crecimiento del patógeno alrededor del sitio de inoculación, lo cual se tomó como criterio de selección de las cepas bacterianas para su posterior identificación.

3.1.3 Identificación de las cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

Se realizó una caracterización morfológica, cultural y fisiológica de las cepas que mostraron actividad antifúngica *in vitro* para identificarlas.

Para ello se llevaron a cabo observaciones microscópicas (morfología, agrupación, motilidad, presencia de endosporas y respuesta a la tinción de Gram), se describieron los caracteres culturales y se determinó la respuesta a pruebas bioquímicas (catalasa, prueba de oxidación/fermentación, producción de indol, hidrólisis de la caseína, el almidón y la gelatina, prueba de Vogues-Proskauer) acorde con los protocolos descritos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg y Holt, 1984,1986).

La identificación de las cepas se realizó hasta la categoría familia.

3.2 Caracterización de la actividad antifúngica de cepas bacterianas

Con el objetivo de caracterizar la actividad antifúngica de las cepas bacterianas se emplearon todas las que se seleccionaron en el acápite 3.1.2 Para ello se

compararon los halos de inhibición del crecimiento del patógeno y se determinó si la inhibición era ocasionada por metabolitos antifúngicos difundidos al medio de cultivo o volátiles.

3.2.1 Comparación de la actividad antifúngica de cepas bacterianas frente a *M. fijiensis*

Para comparar la actividad antifúngica de las cepas frente a *M. fijiensis* se empleó el método de cultivo dual descrito anteriormente, pero como inóculo bacteriano se empleó una suspensión ajustada a $DO_{600}=1$ (Eppendorf biofotometer) ($\sim 5,0 \times 10^9$ ufc/mL) a partir de cultivos bacterianos de 24 horas de crecidos en medio de cultivo AN.

La preparación de las placas de Petri (90,0cm) se realizó de igual forma a la descrita en el acápite 3.1.2. A las 24 horas de incubación a 28°C, se añadieron 7,0 μ L de la suspensión bacteriana en el centro de la placa (un aislado por placa de Petri).

Como control se emplearon 7,0 μ L de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron nuevamente a 28°C durante 72h.

La evaluación se realizó mediante la medición del halo de inhibición (cm) del crecimiento del patógeno. Se emplearon dos réplicas por cada cepa bacteriana y se repitió dos veces.

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

3.2.2 Inhibición por producción de metabolitos difundidos

Para determinar si la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción de metabolitos antifúngicos difundidos por las cepas, se siguió el protocolo propuesto por Montealegre *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

Las suspensiones bacterianas fueron crecidas durante 24 h en Caldo Nutriente (CN) (BioCen) y se ajustaron a $DO_{600}=1$ ($\sim 5,0 \times 10^9$ ufc/mL).

En una placa de Petri (150,0 mm de diámetro) se añadió medio de cultivo PDA mezclado con una suspensión micelial de *M. fijiensis* ($5,0 \times 10^5$ fragmentos de micelio/mL). Las placas se incubaron a 28 °C y oscuridad durante 24 h. Pasado este tiempo, se colocó un filtro de acetato de celulosa (Sartorius) de 0,22 μm encima del medio de cultivo. Sobre su superficie se depositaron las suspensiones bacterianas (3,0 μL por cepa) separadas por al menos 2,0 cm. Las placas se incubaron durante 48 horas más a 28 °C y oscuridad.

Como control negativo se depositaron 3,0 μL de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana y como control del crecimiento bacteriano se empleó el mismo método, sin utilizar membrana. Además se incluyó la cepa *Bacillus subtilis* (CCIBP-M27) perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Laboratorio de Microbiología del IBP, por ser una especie bacteriana referida en la literatura científica con propiedades antifúngicas. Se realizaron dos réplicas con dos repeticiones para cada cepa bacteriana.

Se clasificaron como positivas las cepas bacterianas que produjeron halo de inhibición del crecimiento del patógeno. Además, se realizó observación microscópica de las hifas del patógeno presentes en la zona de inhibición.

3.2.3 Inhibición por producción de metabolitos volátiles

Para determinar si la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción de metabolitos volátiles por las cepas, se siguió el protocolo propuesto por Montealegre *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

En una tapa de una placa de Petri de 50,0 mm de diámetro se añadió medio de cultivo Agar Nutriente (BioCen), en la tapa de otra placa de Petri se añadió medio de cultivo PDA con una suspensión micelial de *M. fijiensis* ($5,0 \times 10^5$ fragmentos de micelio/mL). Luego se inocularon 50,0 μ L de suspensión bacteriana sobre el medio de cultivo Agar Nutriente.

Cuando la humedad del inóculo fue absorbida completamente, se colocaron las dos tapas una frente a la otra y se sellaron con Parafilm[®] para aislar la atmósfera interior de la exterior y evitar así la pérdida de los metabolitos producidos. Como control se emplearon 50,0 μ L de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación se observó el crecimiento de *M. fijiensis* y se comparó con el control en ausencia de la suspensión bacteriana. Se dieron como positivas aquellas cepas en las que se inhibió el crecimiento del patógeno o su crecimiento fue menor que el control y como negativas en las que no se observó

inhibición del crecimiento fúngico. Además, se realizó observación microscópica de las hifas del patógeno en las que presentaron inhibición.

3.3 Determinación del efecto de filtrados de cultivo bacterianos sobre plantas de *Musa* sp. inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo

Con el objetivo de obtener filtrados de cultivo con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* y determinar su efecto sobre plantas de *Musa* inoculadas en casa de cultivo se realizó el siguiente experimento.

Para ello se emplearon dos cepas: una cepa con actividad antifúngica por producción de metabolitos difundidos y *Bacillus subtilis* (CCIBP-M27).

3.3.1 Determinación del tiempo de incubación

Para determinar el tiempo de incubación de las suspensiones bacterianas se elaboró la curva de crecimiento. Además, se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación y se comprobó su actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.

Como inóculo inicial para la curva de crecimiento se tomó 1,0 mL de la suspensión bacteriana ajustada a $DO_{600}=1$ y se añadió en un Erlenmeyer con 50,0 mL de Caldo Nutriente (BioCen) que se incubó a 30 °C hasta 72 horas.

Las evaluaciones se realizaron cada seis horas y en cada una se realizó conteo de viables mediante diluciones decimales y siembra por diseminación con espátula de Drigalsky. Se realizaron dos réplicas por tiempo de incubación y por dilución. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 horas y se procedió al conteo de colonias

crecidas. Los resultados se informaron como ufc/mL y se realizó una curva de crecimiento del log de ufc/mL en el tiempo.

Para comprobar la actividad antifúngica, de los cultivos bacterianos se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 h de incubación que se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se esterilizó por filtración (0,22 µm).

La actividad antifúngica *in vitro* de cada filtrado se determinó mediante el método de dilución en Agar [dilución 1:1; filtrado y medio de cultivo PDA más suspensión micelial de *M. fijiensis* ($5,0 \times 10^5$ fragmentos de micelio/mL)]. Como control se empleó una dilución 1:1 de caldo nutriente.

La evaluación se realizó hasta las 72 h mediante la observación de la presencia o no de crecimiento micelial contra el control.

3.3.2 Determinación del efecto de los filtrados cultivo bacterianos sobre plantas inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo

Con el objetivo de determinar el efecto de filtrados de cultivo bacterianos, con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*, en la interacción de este patógeno y plantas de *Musa* sp. en casa de cultivo se desarrolló este experimento.

Material vegetal

Se utilizaron plantas de 'Grande naine' (*Musa* AAA) propagadas *in vitro* vía organogénesis según el protocolo descrito por Orellana (1994).

El material vegetal para el establecimiento *in vitro* de 'Grande naine' provino de la empresa "La Cuba", Ciego de Ávila.

Las plantas se sembraron en bolsas de polietileno con sustrato compuesto por 50,0% de casting, 30,0% de compost y 20,0% de zeolita y se mantuvieron en fase de aclimatización durante 45 días. Posteriormente, se transfirieron a macetas plásticas de 20,0 cm de diámetro con 500,0 mL de capacidad con igual sustrato por 45 días hasta alcanzar como mínimo 20,0 cm de altura y tres hojas activas.

Las plantas se colocaron en una casa de cultivo con luz solar, con una media en la intensidad luminosa de $3\ 841\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (medido con Extech Light Meter 401025, USA) y riego por aspersión tres veces al día.

La preparación de la suspensión micelial de *M. fijiensis* así como el proceso de inoculación artificial se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Alvarado *et al.* (2003), que se describe brevemente.

Preparación de la suspensión micelial

Se tomó un fragmento de micelio de la cepa CCIBP-Pf83 crecida en tubos de ensayo con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), conservados a 4 °C y se inoculó en Erlenmeyer (250,0 mL de volumen) con 100,0 mL de medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB) (Difco), pH 5,6. Los frascos se colocaron en una zaranda (Gerhardt), a 28 °C y 120 rpm durante 14 días. Después de transcurrido este tiempo se eliminó el medio de cultivo por decantación, se tomó 1.0 g de micelio y se homogeneizó con 30,0 mL de agua destilada estéril utilizando una batidora (Ultraturrax T25), durante 1 min. Posteriormente se filtró (40,0 μm), se determinó la concentración mediante observación en un microscopio óptico Olympus (100x), usando una cámara de Neubauer y se ajustó con agua destilada estéril hasta aproximadamente $5,0\times 10^5$ fragmentos de micelio/mL. Finalmente, se

le adicionó gelatina al 1,0% (p/v) para aumentar la adhesión del inóculo a la superficie de la hoja.

Para la obtención de los filtrados de cultivo bacterianos se procedió de forma similar a la descrita en el acápite 3.3.1 al tiempo de incubación seleccionado.

Se emplearon dos tratamientos: 1) inoculación de los filtrados de cultivo bacterianos tres horas antes de la inoculación con *M. fijiensis* y 2) la aplicación de los filtrados de cultivo tres días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis*.

La inoculación se realizó por la parte abaxial de las hojas y con la ayuda de un pincel tanto para la inoculación con *M. fijiensis* como con los filtrados de cultivo.

Se inocularon las tres primeras hojas de cinco plantas. Se emplearon como controles cinco plantas inoculadas con *M. fijiensis* sin presencia de filtrados de cultivo y cinco plantas inoculadas solo con Caldo nutriente.

Las plantas se ubicaron completamente al azar en casa de cultivo.

La evaluación del desarrollo de la enfermedad se realizó cada siete días hasta los 63 días posteriores a la inoculación (dpi). Para ello se utilizó la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003) (Tabla 1). En cada tratamiento se calculó la frecuencia de aparición de los síntomas y se determinó el período de incubación (días), el tiempo de evolución de los síntomas (días) y tiempo de desarrollo de la enfermedad (días).

Período de incubación: Tiempo entre la infección y la aparición de las primeras lesiones puntiformes por el envés de la hoja (días).

Tiempo de evolución de los síntomas: número de días entre la aparición de los primeros síntomas (lesiones puntiformes) y la aparición de manchas necróticas con centros secos.

Tiempo de desarrollo de la enfermedad: período entre la inoculación y la aparición de lesiones maduras (manchas necróticas con centros secos).

Tabla 1. Descripción de los estados de desarrollo de los síntomas en plantas de *Musa* spp. propagadas *in vitro* inoculadas con suspensión micelial de *M. fijiensis* de acuerdo con Alvarado *et al.* (2003)

Estado	Descripción de los síntomas	
0	Hoja sin síntoma.	
1	Hoja con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz.	
2	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz.	
3	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz.	
4	Hoja con manchas negras (elípticas o redondeadas) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene áreas de tejido verde.	
5	Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo.	

Además, se cuantificó el número de lesiones necróticas por tratamiento en las hojas de las plantas inoculadas.

Los valores obtenidos fueron comparados con el control y analizados estadísticamente mediante la prueba de Mann-Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

Un esquema general de trabajo se muestra en la figura 2.

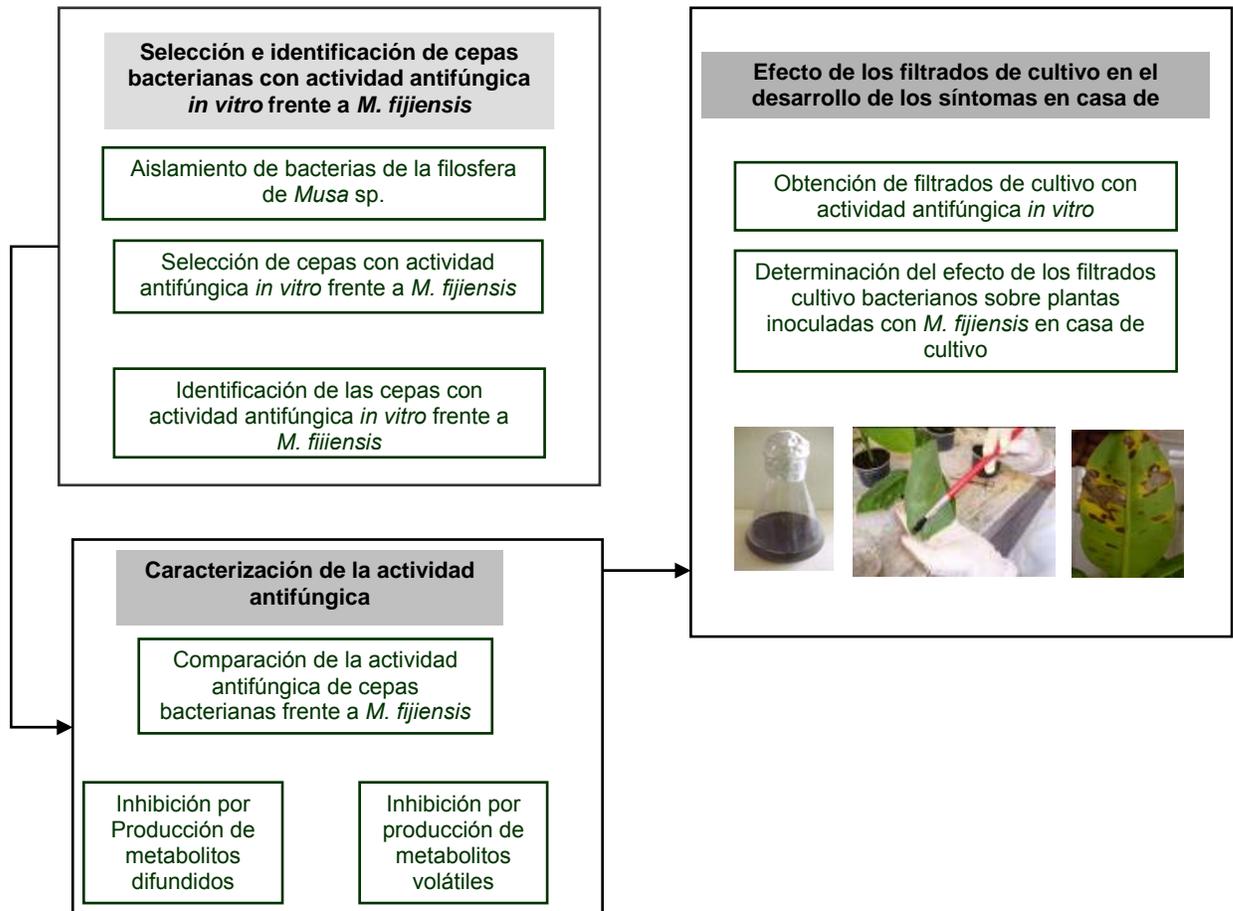


Figura 2. Esquema general de trabajo para determinar el efecto de filtrados bacterianos con actividad antifúngica en la interacción *Musa-M. fijiensis* en casa de cultivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Selección e identificación de cepas bacterianas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

4.1.1 Aislamiento de bacterias de la filosfera de plátanos y bananos

Se observaron diferencias significativas entre todos los cultivares en cuanto al número de colonias/cm² aisladas de tejidos con síntomas y sin síntomas de *Sigatoka negra* (Figura 3).

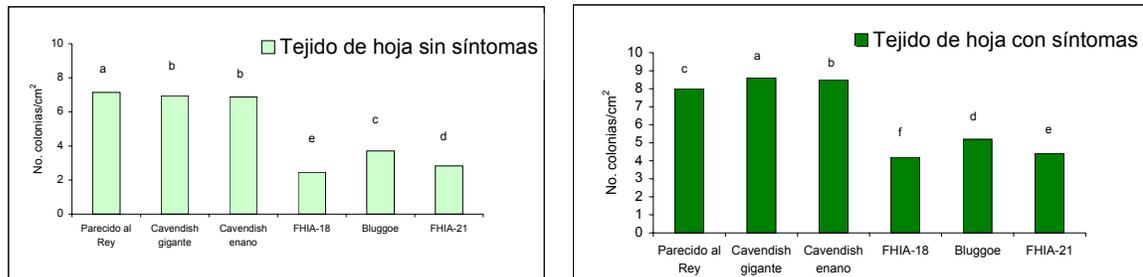


Figura 3. Número de colonias de bacterias epifitas aisladas de hojas de plantas *Musa* spp. cultivadas en campo e infectadas naturalmente con *M. fijiensis*. A. En tejido de hojas sin síntomas. B. En tejido de hojas con síntomas. Barras con letras diferentes en una misma figura difieren por prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,01$

Según Beattie (2007) la filosfera está sujeta a rápidas fluctuaciones de temperatura, radiación solar y disponibilidad de agua, lo que hace de este un ambiente desfavorable para la vida. Sin embargo, estos resultados permiten comprobar que en la filosfera de las plantas de *Musa* de los cultivares utilizados se encuentra una gran cantidad de bacterias.

Se ha informado que las bacterias son los mayores colonizadores de las hojas, frecuentemente se encuentran en números promedios entre 10^6 y 10^7 células/cm² de hoja (Hirano y Upper, 2000; Lindow y Brandl, 2003).

Las proporciones del número total de aislados dependen en parte de los métodos y condiciones usados para su aislamiento e identificación. Una vez definida la

estrategia de muestreo, se pueden usar varios métodos de aislamiento. Estos pueden ser: directos, indirectos, cualitativos o generales o específicos para grupos particulares de microorganismos (Jacques y Morris, 1995). En este experimento solo se aislaron las bacterias cultivables que se encontraban en la superficie de las hojas. Aunque se obtuvieron colonias aisladas, el método empleado (impresión de la hoja sobre medio de cultivo sólido) no permite precisar la localización de las bacterias o afirmar que cada colonia tuvo su origen en una sola célula, por ello no es posible informar los resultados como ufc/cm² o células/cm². El uso de otros métodos de aislamiento tales como: el lavado de las hojas o la maceración del tejido podrían incrementar el número de microorganismos aislados. Sin embargo, muchos componentes del tejido de las plantas de *Musa*, pueden interferir con estos propósitos, principalmente fenoles.

Se comprobó que en los cultivares susceptibles el número de colonias/cm² de tejido fue significativamente mayor tanto en tejido con síntomas como sin síntomas (Figura 3). Esta observación debe ser corroborada en un mayor número de cultivares. No se encontraron referencias que contribuyan a explicar este fenómeno.

Gnanamanickam e Immanuel (2007) plantearon que las cantidades de bacterias encontradas en la filosfera dependen de los nutrientes secretados por la planta como resultado del crecimiento y desarrollo de esta. En este estudio se constató que también puede depender del cultivar y de la presencia o no de síntomas de la enfermedad para un mismo cultivar. En todos los cultivares el número de

colonias/cm² aisladas fue significativamente superior en el tejido con síntomas (Figura 4).

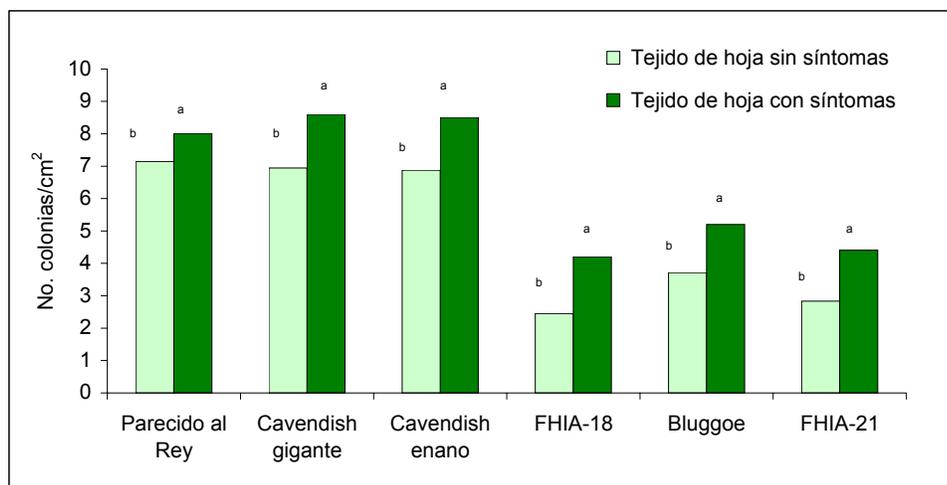


Figura 4. Comparación entre cultivares del número de colonias de bacterias epifíticas aisladas de hojas de plantas *Musa* spp. cultivadas en campo con o sin presencia de síntomas de Sigatoka negra. Barras con letras diferentes en un mismo cultivar difieren por prueba de Mann-Whitney para $p < 0,01$

En este sentido, Suda *et al.* (2009) encontraron un incremento en la cantidad de bacterias encontradas en hojas de plantas de Pepino (*Cucumis sativa*) y de Bonetero del Japón (*Euonymus japonicus* Thunb) cuando estas presentaban enfermedades foliares como Mildium polvoriento (*Podosphaera xanthii* y *Erysiphe cichoracearum* respectivamente) que en aquellas que no presentaban síntomas. Además, destacaron diferencias entre el tipo de bacterias encontradas. Según estos autores, estos cambios se deben, quizás a la secreción por parte del patógeno de metabolitos que directamente afectan la composición de las bacterias y/o que el patógeno fúngico altera las condiciones físico-químicas y fisiológicas de las hojas que influyen en la colonización y el crecimiento de las bacterias epifíticas.

Con el método empleado (impresión de la hoja en agar) se lograron aislar de la filosfera de los cultivares de *Musa* utilizados, 317 cepas bacterianas con diferentes caracteres culturales sobre el medio de cultivo Agar para Conteo en Placas.

4.1.2 Selección de cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

Del total (317) se seleccionaron 20 cepas bacterianas aisladas de la filosfera de bananos y plátanos con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* (Figura 5).

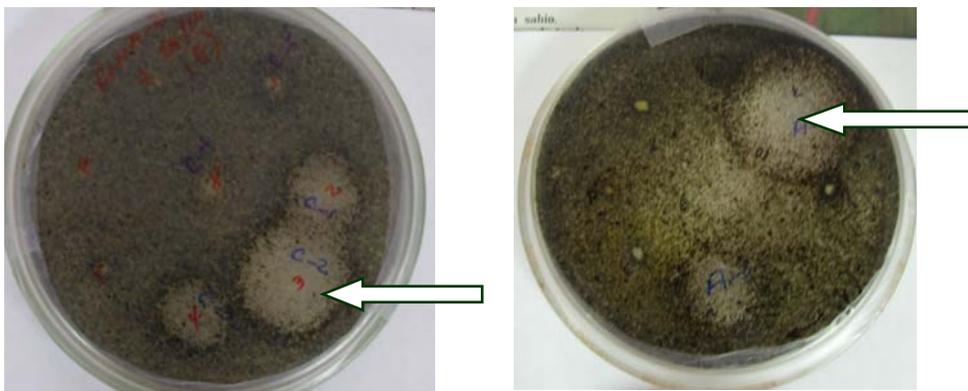


Figura 5. Halos de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* a las 72 horas de incubación ocasionados por cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. Cultivo dual en medio de cultivo PDA; inoculación de las bacterias por punción. Placas de Petri de 90,0 mm de diámetro.

De las cepas con actividad antifúngica, el 80,0% provenía de tejidos con síntomas de Sigatoka negra y el 75,0% de cultivares resistentes. De estos últimos, el 50,0% del cultivar Bluggoe. Esto sugiere una prevalencia de cepas con propiedades antifúngicas en lesiones de cultivares resistentes, sin embargo, se requieren otros experimentos para confirmarlo.

El hecho de encontrar 20 aislados bacterianos de la filosfera de *Musa* sp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* indica que la microbiota epifita de este cultivo tiene potencialidades para defender a las plantas de los agentes

patógenos. Otros autores han informado resultados similares. Por ejemplo, Gidekel *et al.* (1999) plantearon factible el control biológico de *Venturia inaequalis*, causante de la sarna del manzano (*Malus domestica*), a través de microorganismos epifitos seleccionados.

Igualmente, Visintin *et al.* (2000), encontraron microorganismos residentes de hojas y frutos de cítricos que fueron seleccionados por su capacidad biocontroladora *in vitro* sobre *Penicillium digitatum*.

También en *Musa*, Osorio *et al.* (2004) y Salazar *et al.* (2006) refirieron presencia de bacterias epifitas con potencial biorregulador contra *M. fijiensis* en la filosfera de plantaciones comerciales de banano y plátano en Costa Rica y en Urabá, Colombia. Además, Alvindia y Natsuaki (2009) lograron reducir significativamente la incidencia de la podredumbre de la corona en bananos aplicando, poscosecha, *Bacillus amyloliquefaciens* aislado del fructoplano. Estos autores demostraron así, que la microbiota nativa puede influir en el crecimiento de los patógenos y reducir las enfermedades foliares de los cultivos.

Una ventaja del método de cultivo dual empleado para evaluar actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*, es que se pueden colocar hasta ocho cepas por placa de Petri de 90,0 mm de diámetro por lo que resultó apropiado para realizar muestreos masivos de cepas. Sin embargo, es un método cualitativo ya que no se cuantifica la concentración del inóculo bacteriano, por tanto, no pueden compararse los halos de inhibición del crecimiento del patógeno.

Varios autores señalan que los microorganismos que pueden crecer en la filosfera pueden ser mejores candidatos de control biológico que

aquellos que no pueden. Este hallazgo implica que las bacterias asociadas con hojas de bananos y plátanos pueden ser eficaces como antagonistas contra las enfermedades foliares.

4.1.3 Identificación de las cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

Del total de cepas (20), el 80,0% fueron Gram+ y el 20,0% fueron Gram- y predominó la morfología bacilar (95,0%); sólo un aislado presentó forma de cocos. Se identificaron tres familias. El 45,0% de las cepas seleccionadas correspondieron a la familia *Bacillaceae*; el 15,0% a *Pseudomonadaceae*; el 5,0% a *Micrococcaceae* y el 35,0% se agruparon como otros bacilos Gram+ no formadores de esporas.

El predominio de bacterias pertenecientes a la familia *Bacillaceae* puede deberse en parte a la presencia de características especiales como la formación de endosporas y la producción de sustancias con actividad antifúngica que les permiten la subsistencia y competencia en condiciones ambientales desfavorables. Según Setlow (2006), la formación de una spora genera un tipo de células que pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo con poco o nada de nutrientes y le confieren resistencia a la radiación, el calor y productos químicos. Varios autores han señalado las ventajas que tienen especies de esta familia debido a la presencia de esporas resistentes a pH, temperatura y condiciones osmóticas extremas, Basha y Kandasamy, 2007). El género *Bacillus* se describe en la literatura científica como productor de una amplia gama de compuestos con actividad antifúngica tales como: subtilina,

bacilina y bacilomicina, los cuales se encuentran dentro de la familia de las iturinas (Alippi y Mónaco, 1994). Estos autores plantearon la presencia de un gran número de metabolitos antifúngicos excretados, por cepas de este género.

Además, Todar (2003) refirió que el predominio de bacterias con propiedades antifúngicas pertenecientes al género *Bacillus* y su colonización eficaz se debe a que son productores de sustancias que le proporcionan la capacidad de conquistar determinados ambientes agrícolas y por ende, impiden el establecimiento de microorganismos patógenos.

En este estudio se comprobó que las cepas bacterianas aisladas de la filosfera de bananos y plátanos son capaces de degradar varios sustratos diferentes. De ellas, el 20,0% hidroliza el almidón, el 65,0% hidroliza la caseína, el 60,0% hidroliza la gelatina y el 35,0% produce indol. Estas características evidencian que poseen capacidades metabólicas diversas. En Anexos (1-5) se muestran los resultados de la identificación de cada una de las cepas bacterianas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* y su procedencia.

Una característica común de las cepas seleccionadas fue la presencia de pigmentos (colonias de color amarillo claro, amarillo, rosado y blanco). Predominaron las colonias de color amarillo claro (75,0%). Los microorganismos epifitos están expuestos a la luz y son resistentes a los rayos solares. Las bacterias pigmentadas son un ejemplo de estos. Ellas raramente son halladas en la rizosfera de la planta, dominan la superficie de las hojas. La radiación solar directa influye en la ecología de la filosfera (Sundin y Jacobs, 1999; Jacobs y Sundin, 2001).

A partir de los resultados anteriores se demostró que es posible aislar bacterias con propiedades antifúngicas de la filosfera de *Musa*, principalmente de cultivares resistentes en tejido foliar con síntomas. De estas, el 45,0% correspondieron a la familia *Bacillaceae*.

4.2 Caracterización de la actividad antifúngica de cepas bacterianas

4.2.1 Comparación de la actividad antifúngica de cepas bacterianas frente a *M. fijiensis*

El método empleado permitió comparar la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas bacterianas frente al aislado CCIBP-*Pf83* de *M. fijiensis* (Figura 6) y se constataron diferencias significativas en el diámetro del halo de inhibición ocasionado por las cepas evaluadas (Tabla 2).

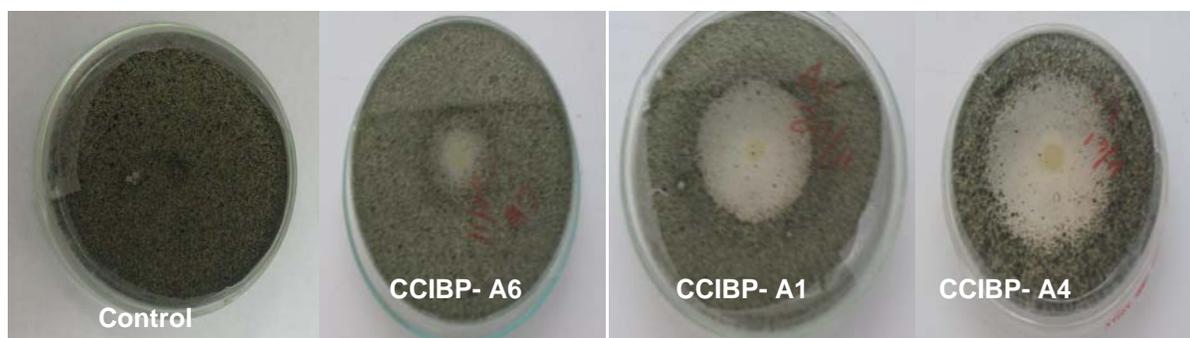


Figura 6. Actividad antifúngica *in vitro* de diferentes aislados bacterianos frente a *M. fijiensis* en cultivo dual en medio de cultivo PDA, después de 72h de incubación a 28°C y oscuridad.

Tabla 4. Actividad antifúngica de diferentes aislados bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis* (CCIBP-*Pf83*) en cultivo dual a las 72h de incubación.

Cepas	Diámetro del halo de inhibición(cm)	
	Media	Rangos medios
CCIBP-A1	3,7	20,0ef
CCIBP-A2	4,0	25,5e
CCIBP-A3	4,0	25,5e

CCIBP-A4	6,4	62,5a
CCIBP-A6	2,7	5,5g
CCIBP-B1	2,8	7,5g
CCIBP-B2	4,3	28,5de
CCIBP-B3	5,8	54,5b
CCIBP-B4	5,5	48,0c
CCIBP-C1	4,3	33,3d
CCIBP-C2	4,5	35,6d
CCIBP-C3	6,4	62,5a
CCIBP-C4	5,4	45,5c
CCIBP-C5	7,3	62,5a
CCIBP-C6	2,3	6,5g
CCIBP-F1	5,4	46,0c
CCIBP-B.1	3,5	17,0f

Valores de rangos medios con letras desiguales difieren por la prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,01$.

Las cepas CCIBP-A4, CCIBP-C3 y CCIBP-C5 produjeron los mayores halos de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*.

Excepto para las cepas CCIBP-A5, CCIBP-B5 y CCIBP-C7, cuyas características del crecimiento (cubre toda la superficie de la placa en 24 h) no permitieron medir el diámetro del halo de inhibición ocasionado, con este método se pudo distinguir con claridad un halo de inhibición del crecimiento fúngico medible en solo 24 horas a partir de la inoculación, el cual se observó con mayor definición a las 48 horas (Figura 7).

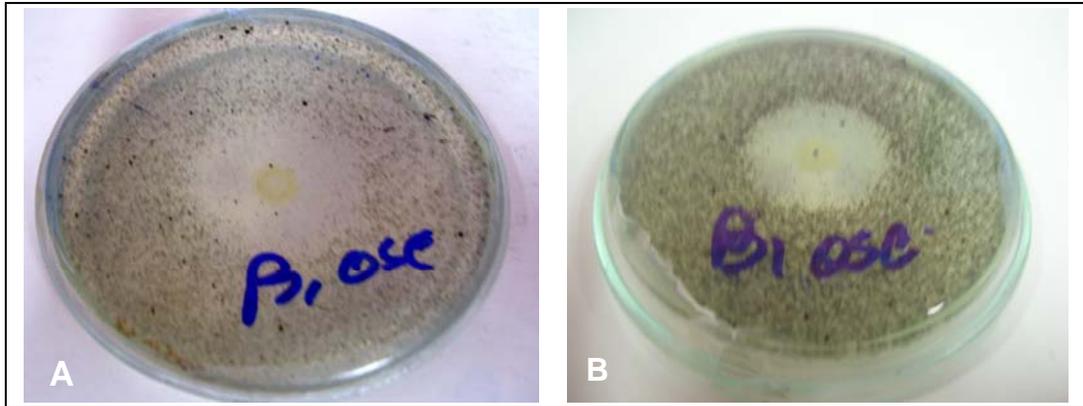


Figura 7. Halo de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* a diferentes tiempos de incubación a partir de la inoculación con la cepa bacteriana CCIBP-B.1 A) 24 h B) 48 h.

Una de las características que distinguen a *M. fijiensis* es su hábito de crecimiento lento, duro y compacto en medios de cultivo sólidos, lo que resulta una desventaja cuando se van a realizar ensayos de actividad antifúngica, ya sea de controles biológicos como de nuevos productos químicos. Teniendo en cuenta lo anterior, el método empleado, brinda resultados más confiables y rápidos en relación con el método tradicionalmente usado para la evaluación de la actividad antifúngica frente a este patógeno, basado en la medición del diámetro de la colonia (Mosquera *et al.*, 2009).

Por otra parte, en algunas cepas se observó la formación de un doble halo de inhibición (Figura 8). En la zona más cercana al crecimiento bacteriano se inhibió completamente el crecimiento fúngico, sin embargo a continuación solo se apreció micelio sumergido y no crecimiento del micelio aéreo. Estas características pueden estar relacionadas con los mecanismos de antagonismo de las cepas. Se requieren estudios posteriores para dilucidarlos.

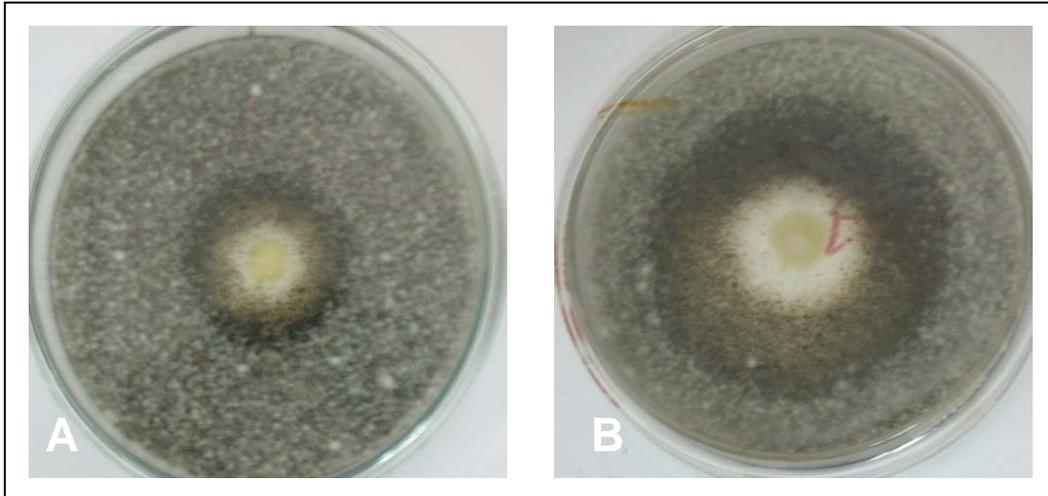


Figura 8. Halo doble de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* observado a las 96 h después de la inoculación con dos cepas bacteriana. A) CCIBP-A6, B) CCIBP-C4.

4.2.2 Inhibición por producción de metabolitos difundidos

Se logró determinar que la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción de metabolitos antifúngicos difundidos en el 80,0% las cepas. El método empleado resultó efectivo para caracterizar la actividad antifúngica de las 20 cepas evaluadas frente a *M. fijiensis* (Figura 9).

A excepción de cuatro cepas: CCIBP-A3, CCIBP-A6, CCIBP-B2 y CCIBP-C1, el resto mostró actividad antifúngica por presencia de metabolitos difundidos.



Figura 9. Actividad antifúngica por producción de metabolitos difundidos de cepas bacterianas frente a *M. fijiensis* en cultivo dual en PDA después de 72 h de incubación. Placas de Petri de 150,0 mm.

Mediante este método no existió contacto físico entre las cepas bacterianas analizadas y el micelio fúngico, por lo que en los casos en que se observaron halos de inhibición se sugiere la presencia y excreción de metabolitos antimicrobianos por la bacteria. Estos resultados coinciden con los informados por Montealegre *et al.* (2003) al evaluar cepas de *Bacillus subtilis* y *B. lentimorbus* frente a *R. solani* 618.

Además, Rhaman *et al.* (2007) con este método, demostraron que el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides* fue completamente inhibido por sustancias difundidas por *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* después de siete días de incubación.

El daño causado por los metabolitos bacterianos en el micelio fue comprobado microscópicamente. Estos estudios revelaron la presencia de hifas de aspecto anormal con deformaciones en sus extremos (Figura 10).

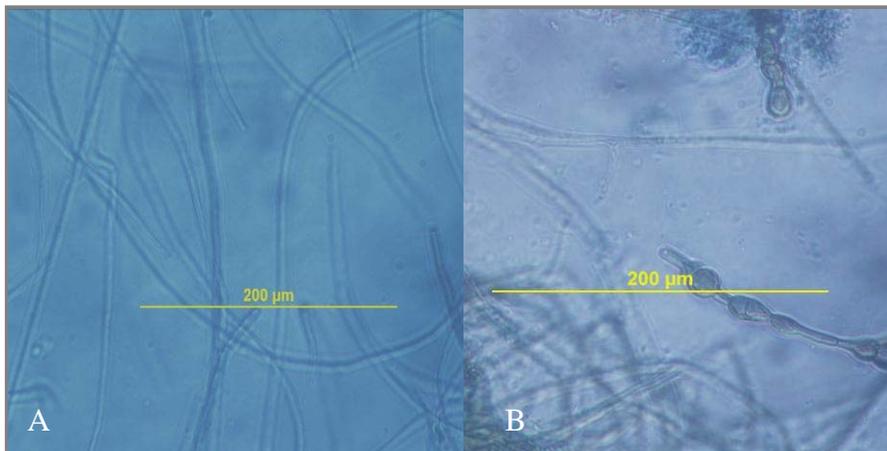


Figura 10. Antagonismo de la cepa CCIBP B.1 frente a *Mycosphaerella fijiensis* A) Micelio de *M. fijiensis* control B) Deformaciones de las hifas de *M. fijiensis* en presencia de metabolitos difundidos

Los metabolitos excretados por los antagonistas tienen efecto sobre la estructura del micelio de los hongos fitopatógenos. Silva *et al.* (2001) como resultado del tratamiento de *Rhizoctonia solani* con *Bacillus subtilis* y *Bacillus lentimorbus*, observaron deformaciones del micelio del patógeno pero no se detectó la presencia de enzimas involucradas en el biocontrol como glucanasas, proteasas y quitinasas.

De igual forma, deformaciones similares se refirió en observaciones microscópicas de antagonismo de cepas de *Bacillus* sp. frente a *Curvularia lunata* (Bahsa y Kandasamy, 2002) así como en hifas de *Fusarium graminearum* frente a filtrados de cultivo de *B. subtilis* y se atribuyeron a que probablemente los metabolitos antifúngicos actuaron en la membrana celular del hongo y alteraron su permeabilidad (Chan *et al.*, 2003).

Riveros *et al.* (2003) demostraron claras alteraciones de las estructuras de *Mycosphaerella fijiensis* por tratamiento con los filtrados de los cultivos líquidos de cepas de *Bacillus* sp. y *Serratia* sp. aisladas de la filosfera de tomate y banano.

4.2.3 Inhibición por producción de metabolitos volátiles

Se comprobó que la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción de metabolitos volátiles en el 60,0% de las cepas (Figura 11).

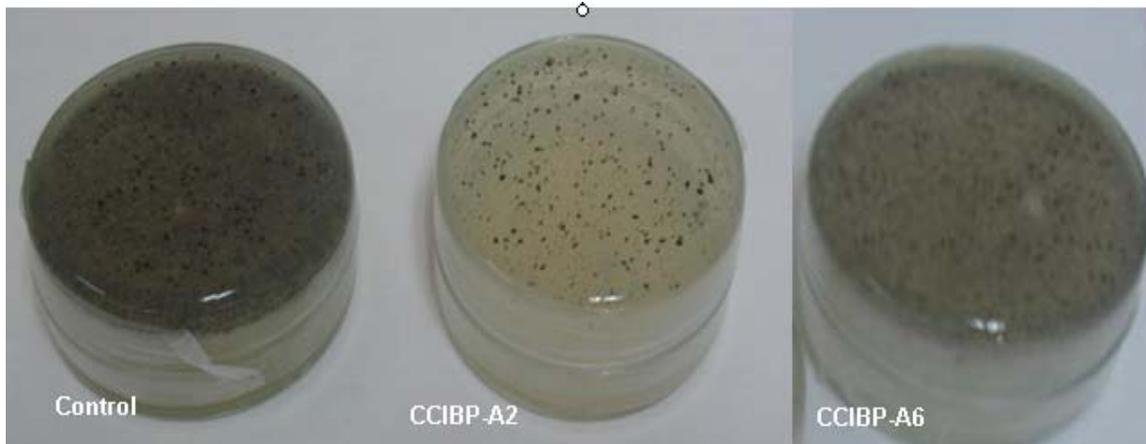


Figura 11. Actividad antifúngica de cepas bacterianas frente a *M. fijiensis* por producción de metabolitos volátiles a las 48 horas de incubación.

Otros autores han empleado este método con buenos resultados para evaluar la capacidad de producción de metabolitos volátiles por otras bacterias. Por ejemplo, Rahman *et al.* (2007) demostraron que *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* produjeron metabolitos volátiles. En este caso la cepa *B. cepacia* presentó el mayor efecto inhibitorio *in vitro* frente a *Colletotrichum gloeosporoides*.

De las 20 cepas evaluadas, 11 presentaron los dos mecanismos de acción (55,0%) y 2 ninguno de ellos. Estos resultados evidencian que la microbiota epifítica de plátanos y bananos no solo es diversa en representantes sino en sus características y constituye una fuente de posibles candidatos para su uso como controladores biológicos.

Algunos autores como Knudsen *et al.* (1997) y Chen *et al* (1998) han determinado que varios mecanismos de acción pueden operar simultáneamente o la manifestación de un mecanismo u otro puede estar en correspondencia con las condiciones ambientales. Esto pudiera constituir un reforzamiento de las

propiedades antifúngicas ya que la multiplicidad de estos mecanismos es importante para la selección de bacterias como agentes de control biológico.

Como resultado del estudio microscópico de los aislados con actividad antifúngica se observaron diferencias en cuanto al aspecto del micelio del control y el micelio en presencia del inóculo bacteriano. Entre estas se encontraron deformaciones de las hifas y encrespamientos (Figura 12).



Figura 12. Deformaciones del micelio de *M. fijiensis* en la zona de inhibición del crecimiento en presencia de la cepa CCIBP-A6 aislada de la filosfera de *Musa* sp.

Similares resultados fueron obtenidos por Fiddaman y Rossal (1993) que observaron deformación y además vacuolización de las hifas en *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* como resultado del tratamiento con *B. subtilis*. Esta cepa secretó un metabolito volátil con propiedades fungicidas.

Sariah (1994) señaló que las malformaciones observadas en el micelio probablemente eran debidas al efecto tóxico de las sustancias antagónicas interfiriendo con los procesos normales de crecimiento.

En las cepas seleccionadas por sus propiedades antifúngicas frente a *M. fijiensis* se comprobó que pueden presentar más de un mecanismo de acción. Además, la

magnitud de la inhibición del crecimiento del patógeno dependió de la cepa. Estas provocaron deformaciones en las hifas tanto por producción de metabolitos difundidos como volátiles.

4.3 Determinación del efecto de filtrados de cultivos bacterianos sobre plantas de *Musa* sp. inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo

4.3.1 Determinación del tiempo de incubación

Se confeccionó la curva de crecimiento de las cepas CCIBP-B.1 (cepa con actividad antifúngica por producción de metabolitos difundidos) y *Bacillus subtilis* (CCIBP-M27) a partir de cultivos en Caldo Nutriente, en las que se observaron las diferentes fases de crecimiento (Figura 13).

Ya a las 24 horas de incubación todas las cepas se encontraban al final de la fase exponencial o principio de la estacionaria, lo cual corrobora lo factible de este medio de cultivo para el crecimiento y desarrollo de las cepas bacterianas en estudio.

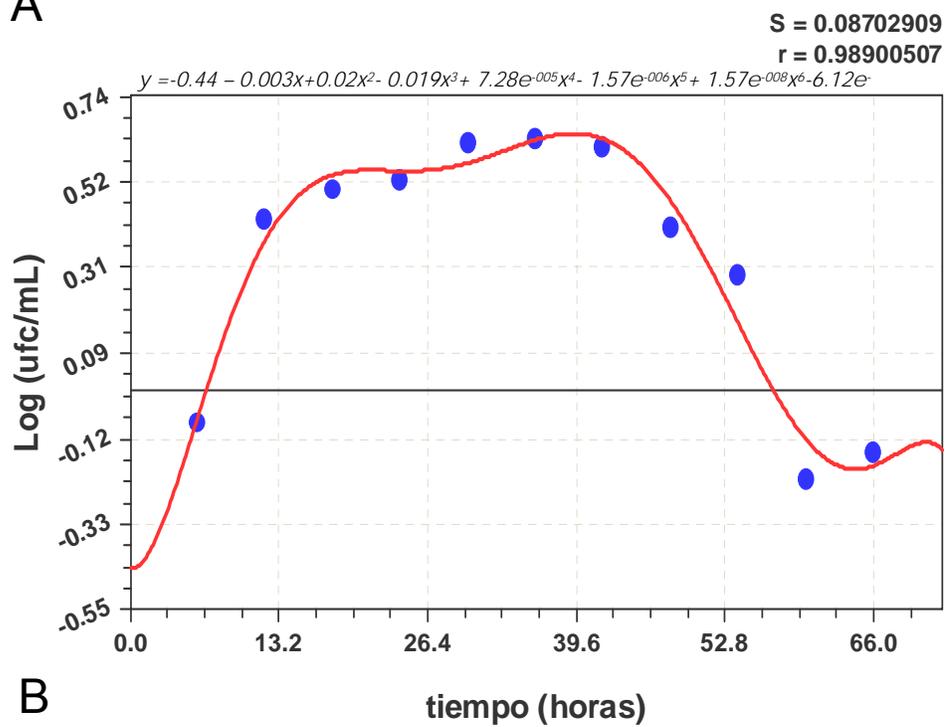
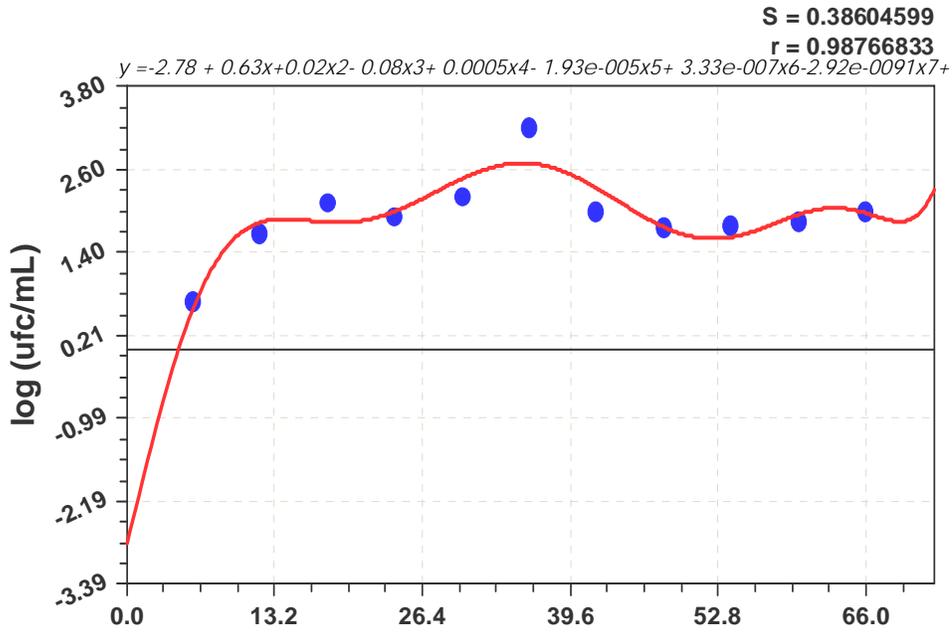


Figura 13. Curvas de crecimiento de dos cepas bacterianas crecidas en Caldo Nutriente e incubadas a 30°C y oscuridad. A) CCIBP-B.1, B) CCIBP-M27

Al comprobar la actividad antifúngica, se determinó que los filtrados de cultivo obtenidos después de 24 horas de incubación, produjeron inhibición del crecimiento del patógeno en relación con el control (Figura 14). Varios son los autores que refieren la producción de metabolitos en esta fase. Por ejemplo, Gilois *et al.* (2007), determinaron mediante electroforesis bidimensional (2-DE) la concentración de 22 proteínas extracelulares de *Bacillus cereus* en la fase de transición entre crecimiento vegetativo y la fase estacionaria.

Estos resultados indican que a partir de las 24 horas se pueden utilizar los filtrados de cultivo que contienen metabolitos difundidos con propiedades antifúngicas. Sin embargo, a las 72 horas de incubación se observó en las dos cepas evaluadas (CCIBP-M27 y CCIBP-B.1) una inhibición total del crecimiento fúngico, lo que sugiere la presencia de una mayor concentración de metabolitos antifúngicos o una mayor variedad de estos.

A partir de estos resultados se seleccionó 72 h como tiempo de incubación para obtener los filtrados de cultivo de las cepas en estudio.

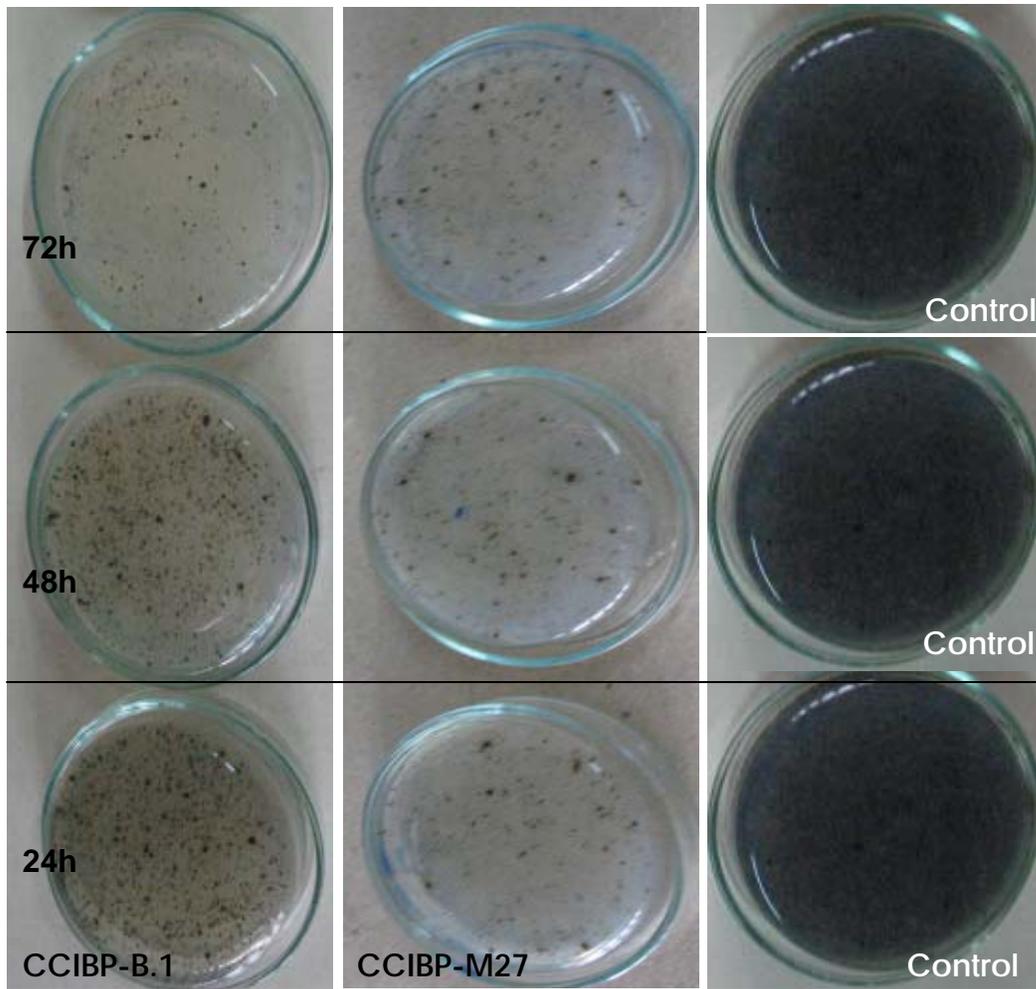


Figura 14. Actividad antifúngica de filtrados de cultivo bacterianos frente a *M. fijiensis* en diferentes tiempos de incubación. A) CCIBP-B.1, B) CCIBP-M27

4.3.2 Determinación del efecto de los filtrados cultivo bacterianos sobre plantas inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo

Al evaluar el efecto de los filtrados de cultivo de las cepas CCIBP-B.1 y CCIBP-M27 sobre las plantas inoculadas con *M. fijiensis* se constataron diferencias.

La frecuencia de aparición de los estados de síntomas en las hojas (según escala cualitativa propuesta por Alvarado *et al.*, 2003) varió con los tratamientos. A los 63

días después de la inoculación se comprobó que había disminuido en un 16,7% la presencia de hojas con síntomas en estado 5 (Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo), con respecto al control, en el tratamiento con la aplicación del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-M27 después de la inoculación del patógeno (Figura 15). En el resto de los tratamientos las variaciones en la frecuencia de aparición de los estados de síntomas no estuvieron asociadas a menores afectaciones de las plantas. En las variables epifitológicas periodo de incubación (14 días), Tiempo de evolución de los síntomas (28 días) y Tiempo de desarrollo de la enfermedad (42 días) no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

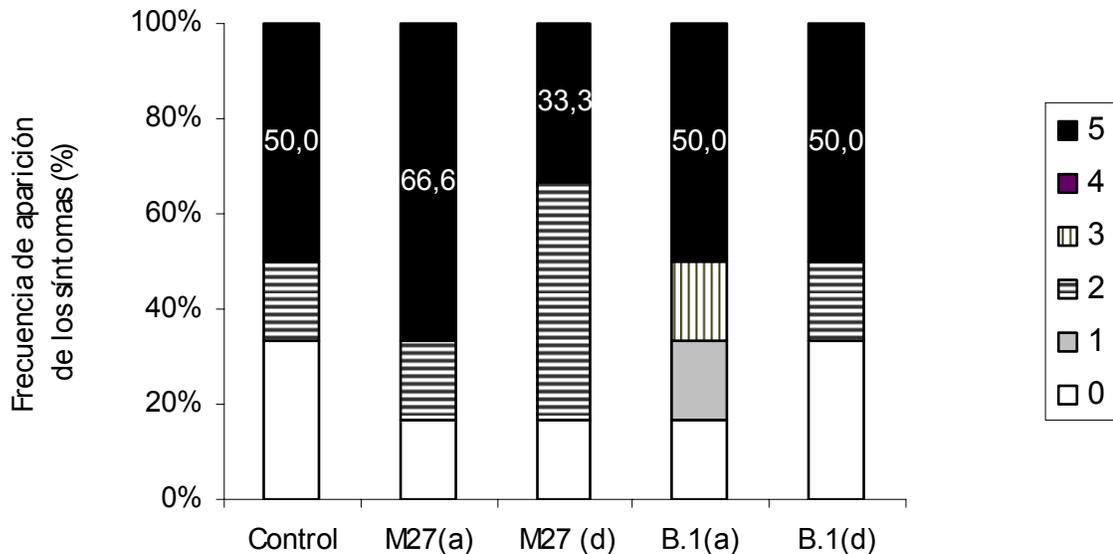


Figura 15. Frecuencia de aparición de estados de síntomas ocasionados por *M. fijiensis* en plantas de Grande naine (*Musa AAA*) inoculadas en casa de cultivo. Estados de síntomas acorde a la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003). M27(a), B.1(a). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-M27 y CCIBP-B.1 tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. M27(b), B.1(b). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-M27 y CCIBP-B.1 tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*.

Sin embargo, se encontró una reducción significativa en el número de lesiones necróticas a partir de los 42 días, lo que indica que el filtrado tuvo un efecto retardante sobre el desarrollo de la enfermedad (Figura 16).

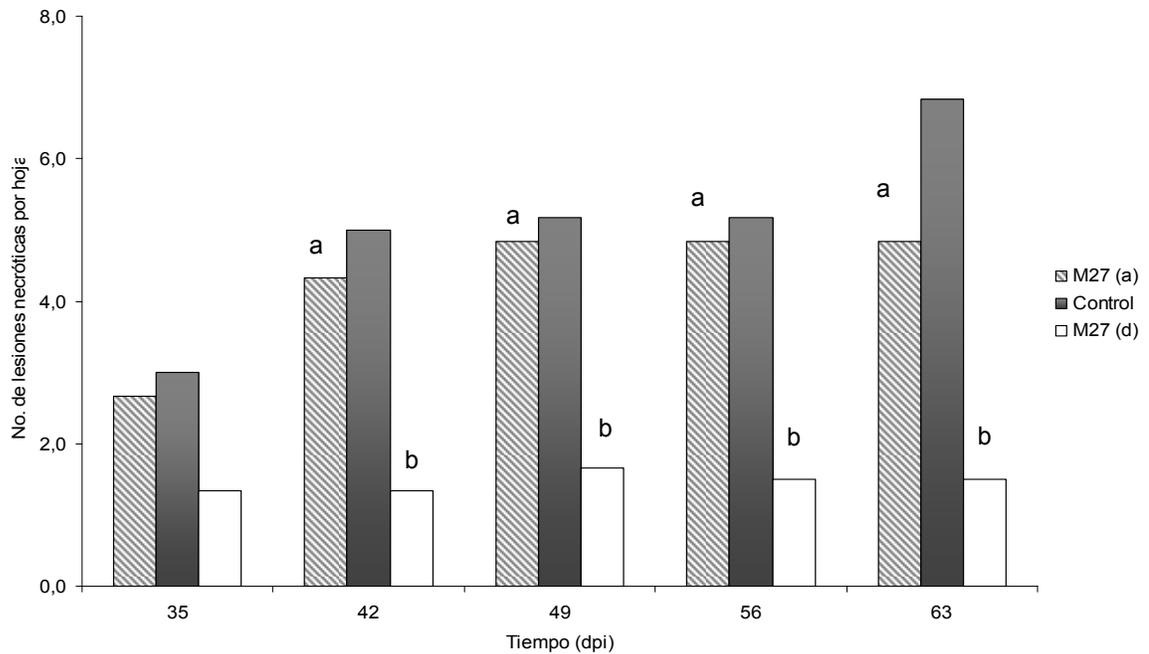


Figura 16. Número de lesiones necróticas por hoja ocasionadas por *M. fijiensis* a partir de los 42 días posteriores a la inoculación (dpi) en presencia de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-M27. M27(a): tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. M27(b): tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*. Medias con letras diferentes sobre barras a un mismo tiempo (dpi) difieren para por la prueba de Mann-Whitney para $p < 0,01$ con respecto al control.

Con el filtrado de la cepa CCIBP-B.1 sucedió lo contrario a la cepa CCIBP-M27, a partir de los 49 días fue encontrada una reducción significativa del número de lesiones necróticas cuando el filtrado fue aplicado antes de la inoculación del patógeno (Figura 16). Esta diferencia entre las cepas puede estar relacionada con los mecanismos de acción. En este estudio se comprobó que la cepa CCIBP-M27

inhibe el crecimiento de *M. fijiensis in vitro* tanto por producción de metabolitos volátiles como por metabolitos difundidos, sin embargo CCIBP.B.1 solo por producción de los últimos. No obstante, otros mecanismos pueden estar presentes o la acción no solo puede ser sobre el patógeno sino también sobre la planta. Ambas cepas pertenecen a la familia *Bacillaceae* y se conoce de la versatilidad metabólica de sus representantes (Krieg y Holt, 1986).

Al respecto, Massomo *et al.* (2004) encontraron diferentes efectos en el desarrollo de la enfermedad de la pudrición negra en cultivos de col (*Brassica oleraceae*) al utilizar diferentes cepas antagonistas y diferentes métodos de aplicación de estas.

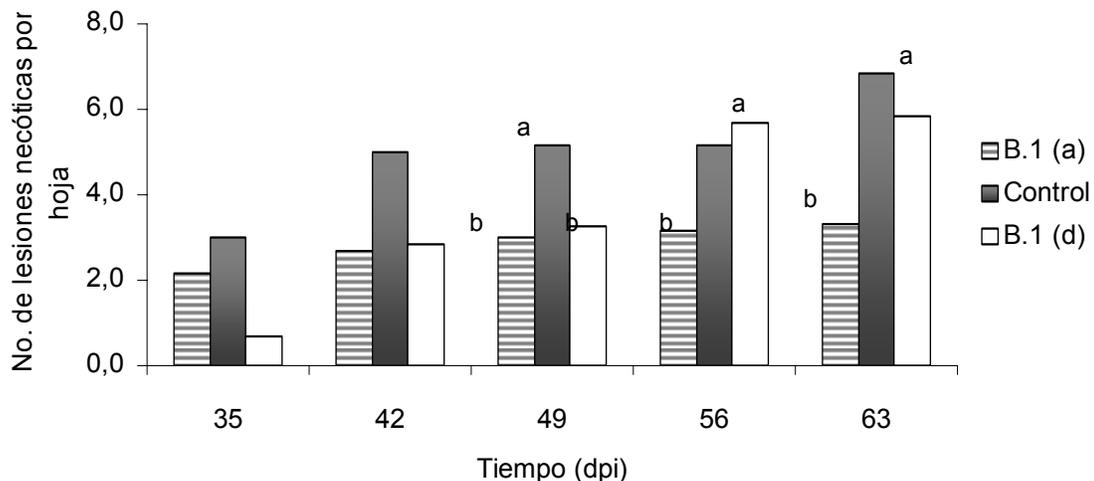


Figura 17. Número de lesiones necróticas por hoja ocasionadas por *M. fijiensis* a partir de los 42 días posteriores a la inoculación (dpi) en presencia de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-B.1 B.1(a): tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. B.1(b): tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*. Medias con letras diferentes sobre barras a un mismo tiempo (dpi) difieren por la prueba de Mann-Whitney para $p < 0,01$ con respecto al control.

En la figura 18 se muestra el efecto de los diferentes tratamientos aplicados sobre plantas de *Musa* inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo a los 63 días con

respecto al control inoculado con *M. fijiensis* y al control sin inocular. Puede observarse que el tratamiento con el filtrado de la cepa CCIBP-M27 tuvo un mejor efecto en el desarrollo de la enfermedad.



Figura 18. Efecto del filtrado de cultivo aplicado en las plantas inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo en cada uno de los tratamientos a los 63 días posteriores a la inoculación. M27(a), B.1(a). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-M27 y CCIBP-B.1 tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. M27(b), B.1(b). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-M27 y CCIBP-B.1 tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*.

Algunos autores como Knudsen *et al.* (1997) señalan que la selección de microorganismos para uso en el biocontrol basado en métodos *in vitro* como

pruebas de antibiosis en placas de agar, pueden no concordar con resultados en campo.

Según Visintin *et al.* (2000) la selección *in vivo* permite observar la actividad del potencial biocontrolador en un medio similar al que se desenvolverá en el campo.

Massomo *et al.* (2004) demostraron que sólo el 35,0% de las cepas que mostraron actividad *in vitro* contra *Xanthomonas campestris* redujeron la incidencia y severidad de la pudrición negra en plantaciones de col (*Brassica oleracea*).

Sin embargo, con este estudio se demostró que los filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-M27 con actividad antifúngica *in vitro*, en casa de cultivo aplicados después de la inoculación de *M. fijiensis* mostraron evidencias de control del patógeno.

En la selección preliminar de agentes biocontroladores potenciales como solución alternativa para el control de enfermedades es importante no solo encontrar al agente biocontrolador sino un método eficiente para detectarlo (Visintin *et al.*, 2000). Los resultados de este experimento demostraron que mediante la aplicación de filtrados de cultivo, con actividad antifúngica *in vitro*, a plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* en casa de cultivo, es posible comprobar *in vivo* su efecto en esta interacción. Además, la efectividad de la aplicación depende de la cepa y posiblemente de los mecanismos de acción sobre el patógeno (inhibición del crecimiento) o la planta (inducción de resistencia). Mediante el empleo de este procedimiento se podrán analizar el resto de las cepas seleccionadas por su actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y se contribuirá al conocimiento del efecto de factores bióticos (las bacterias o sus filtrados) sobre esta interacción.

5. CONCLUSIONES

- Fue posible aislar y seleccionar bacterias de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*; principalmente de cultivares resistentes en tejido foliar con síntomas. Se identificaron representantes de tres familias (*Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Micrococcaceae*). El 45,0% de las cepas pertenecieron a *Bacillaceae*.
- Se demostró que la actividad antifúngica *in vitro* de las bacterias seleccionadas, medida como inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*, puede ser ocasionada por más de un mecanismo de acción. Predominó la inhibición por producción de metabolitos antifúngicos difundidos (80,0% de las cepas) sobre la producción de metabolitos volátiles (60,0%). En todos los casos se observaron deformaciones en las hifas.
- Mediante la aplicación de filtrados de cultivo bacterianos, con actividad antifúngica *in vitro*, a plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* en casa de cultivo, se comprobó que el efecto sobre el desarrollo de la enfermedad depende de la cepa y del momento de aplicación. No se detectó reducción en el tiempo del periodo de incubación, tiempo de evolución de los síntomas y tiempo de desarrollo de la enfermedad, sin embargo, el método utilizado permitió detectar una reducción significativa del número de lesiones necróticas.

6. RECOMENDACIONES

- Continuar los aislamientos de bacterias de la filosfera de otros cultivares de *Musa* para corroborar la prevalencia de cepas con propiedades antifúngicas en lesiones de cultivares resistentes.
- Realizar experimentos que permitan explicar la formación de un doble halo de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* y su relación con los mecanismos de antagonismo de las cepas.
- Determinar, sobre plantas de *Musa* inoculadas con *M. fijiensis*, el efecto de los filtrados de cultivo del resto de las cepas seleccionadas por su actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.
- Optimizar los parámetros de producción de filtrados de cultivo bacterianos de las cepas (CCIBP-B.1 y CCIBP-M27) y las condiciones para aumentar su efectividad biocida para sentar las bases de la formulación de un bioproducto.

Anexo 1. Procedencia de los aislados con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

CEPA	CULTIVAR	SINTOMAS	LOCALIDAD
CCIBP-A1	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-A2	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-A3	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-A4	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-A5	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-A6	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-B1	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-B2	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-B3	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-F1	Bluggoe	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-B4	Cavendish	sin síntomas	Santa Clara
CCIBP-B5	Cavendish	sin síntomas	Santa Clara
CCIBP-C7	Cavendish	con síntomas	Camajuaní
CCIBP-B,1	Cavendish	sin síntomas	Santa Clara
CCIBP-C5	FHIA-18	con síntomas	Cascajal
CCIBP-C6	FHIA-19	sin síntomas	Cascajal
CCIBP-C1	FHIA-21	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-C2	FHIA-22	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-C3	FHIA-23	con síntomas	Santa Clara
CCIBP-C4	Parecido al Rey	con síntomas	Santo Domingo

Anexo 2. Principales características de las cepas de la familia *Bacillaceae* aisladas de la filosfera de *Musa* sp.

Características	CCIBP-A2	CCIBP-A3	CCIBP-B1	CCIBP-B2	CCIBP-B3
	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Color colonia en AN	claro	claro	claro	claro	claro
	Células	Células	Células	Células	Células
Agrupación	solas	solas	solas	solas	solas
Catalasa	+	+	+	+	+
Espora					
Forma	Esférica	Esférica	Esférica	Esférica	Esférica
Posición	Central	Central	Central	Central	Central
Deformación esporangio	-	-	-	-	-
Hugh y Leifson					
oxidativo	-	-	-	-	-
fermentativo	-	-	x	x	x
Indol	-	-	+	+	-
Hidrólisis almidón	-	-	-	-	-
Hidrólisis caseína	+	+	+	+	+
Hidrólisis gelatina	-	-	+	+	+
Voges Proskauer	-	+	-	-	-

Características	CCIBP-B4	CCIBP-B5	CCIBP-B.1
	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Color colonia en AN	claro	claro	claro
		Células	Células
Agrupación	Parejas	solas	solas
Catalasa	+	+	+
Espora			
Forma	Esférica	Esférica	Esférica
Posición	Central	Central	Central
Deformación esporangio	-	-	-

Hugh y Leifson			
oxidativo	-	x	-
fermentativo	x	-	x
Indol	-	-	-
Hidrólisis almidón	-	+	-
Hidrólisis caseína	-	+	-
Hidrólisis gelatina	+	+	-
Voges Proskauer	-	-	-

Anexo 3. Principales características de las cepas de la familia *Pseudomonadaceae* aisladas de la filosfera de *Musa* sp.

Características	CCIBP-A1	CCIBP-A5	CCIBP-C6
Color colonia en AN	Amarillo claro	Amarillo oscuro	Blanco
Motilidad	X	X	X
Catalasa	+	+	+
Hugh y Leifson			
oxidativo	X	X	X
fermentativo	-	-	-
Indol	-	-	-
Hidrólisis almidón	-	+	-
Hidrólisis caseína	-	+	-
Hidrólisis gelatina	-	+	-
Voges Proskauer	-	-	-

Anexo 4. Principales características de la cepa de la familia *Micrococcaceae* aislada de la filosfera de *Musa* sp.

Características	CCIBP-C7
Color colonia en AN	Amarillo claro
Agrupación	Tétradas

Catalasa	+
Hugh y Leifson	
oxidativo	-
fermentativo	-
Indol	-
Hidrólisis almidón	-
Hidrólisis caseína	-
Hidrólisis gelatina	-
Voges Proskauer	-

Anexo 5. Principales características de otros bacilos Gram+ no formadores de esporas aislados de la filosfera de *Musa* sp.

Características	CCIBP-A4	CCIBP-A6	CCIBP-C1	CCIBP-C2	CCIBP-C3
	Amarillo	Amarillo	Amarillo		Amarillo
Color colonia (AN)	claro	oscuro	claro	Rosado	claro
Catalasa	+	+	+	+	+
Hugh y Leifson					
oxidativo	-	-	-	-	-
fermentativo	X	X	X	X	X
Indol	-	+	+	-	+
Hidrólisis almidón	+	-	-	-	-
Hidrólisis caseína	+	-	+	-	+
Hidrólisis gelatina	+	-	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	+

Características	CCIBP-C4	CCIBP-C5	CCIBP-F1
	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Color colonia (AN)	claro	claro	oscuro
Catalasa	+	+	+
Hugh y Leifson			
oxidativo	-	-	-

	fermentativo	X	X	X
Indol	+	+	+	-
Hidrólisis almidón	-	-	-	-
Hidrólisis caseína	-	+	+	+
Hidrólisis gelatina	-	+	+	-
Voges Proskauer	-	+	+	-

7. REFERENCIAS

- Agrios, G. (1997). Plant Pathology 4th Ed., Academic Press, San Diego, pp. 635.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., De la Cruz, J., Monte, E. y Llobell, A. (2001). An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 67:5833-5839.
- Alippi, A. y Mónaco, C. (1994). Antagonismo *in vitro* de especies de *Bacillus* contra *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. 70:91-95.
- Alvarado, Y., Leiva, M., Rodríguez, M.A., Acosta, M., Cruz, M., Portal, O., Kosky, R.G., García, L., Bermúdez, I. y Padrón, J. (2003). Early evaluation of Black leaf streak resistance by using mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. En: (Jacome, L., Lepoivre, P., Martin, D., Ortiz, R., Romero, R. y Escalante, J.V. (eds.)). Pp. 169-175. INIBAP, Montpellier.
- Alvinda, D.G. y Natsuaki, K.T. (2009). Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. Crop Protection. 28:236–242.
- Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Fullerton, R.A., Abeln, E.C.A., Carlier, J., Zapater, M.F., Buddenhagen, I.W., Viljoen, A. y Crous, P.W. (2008). Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs of banana. Persoonia. 20:19-37.
- Asaka, O. y Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Environ. Microbiol. 62:4081-4085.
- Basha, S. y Kandasamy, U. (2002). Antagonismo of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current Science. 82(12):1457-1463.

- Beattie, G. (2007). Plant-Associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. En: Gnanamanickan, S.S. (Ed.). Plant-Associated bacteria, pp. 1-56.
- Burt, A. (2003). Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. En: *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease, San José. Costa Rica. INIBAP.
- Butt, T.M., Raíz, J.G. y Powel, K.A. (1999). Microbial pesticides: The European scene. En: Biopesticides. Used and delivery. Hill, F.R. & Menn, J.J. (Eds.). Humana Press, N.J., pp. 23-24.
- Carlier, J., De-Waele, D. y Escalant, J.V. (2002). Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedad de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos. Evaluación del comportamiento (Vézina, A. y Picq, C. (eds.)). Guías técnicas INIBAP6. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.
- Casadesus, L., Rojas, T., Brisuela, A.L. y Sánchez, A.Y. (1985). Micología. Universidad de La Habana. Pp. 601-675.
- Chan, Y.K., McCormick, W.A. y Seifert, K.A. (2003). Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. Can. J. Microbiol. 49:253-262.
- Chen, C.Q., Belanger, R.R., Benhamou, N. y Paulitz, T.C. (1998). Induced systemic resistance (ISR) by *Pseudomonas* spp. impairs pre- and post-infection development of *Pythium aphanidermatum*. Eur. J. Plant Pathol. 104:877-886.
- Chin, K.M., Wirz, M y Laird, D. (2001). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from Banana to Trifloxystrobin. Plant Dis. 85:1264-1270.
- Companioni, B. (2005). Utilización de filtrados de cultivo para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 en el cultivo del banano. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas.
- Compton, M.E. y Gray, D.J. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of watermelon. Plant Cell Rep. 12:61-65.
- De Langhe, E. (1996). Banana and plantain: The earliest fruit crop. En: INIBAP Annual Report, 1995. Montpellier, France, INIBAP. Pp. 6-8.
- Dickinson, C.H., Austin, B. y Goodfellow, M. (1975). Quantitative and qualitative studies of phylloplane bacteria from *Lolium perenne*. J. Gen. Microbiol. 91:157-166.

- Dos Santos, T. y de Melo, I. (1993). Influence of antagonist microorganisms on pre-and post-emergence damping-off in *Eucalyptus* caused by *Rhizoctonia solani* and *Cylindrocarpon scoparium*. *Summa Phytopathologica*. 19(2):127-129.
- Duffy, B.K.Y. y Défago, G. (2000). Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes Turing inoculum production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3142-3150.
- Edgecomb, D.W. y Manker, D. (2006). *Bacillus subtilis* strain QST 713, bacterial disease control in fruit, vegetable and ornamental production. En: Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. 408:167-169.
- Epton, H.S.A. (1997). Epiphytic bacteria: activities, risks and Benefits. En: Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Cassells, A.C. (ed.). Pp. 299-308.
- FAO (2007) Waicent. Portal del Centro de Información Agraria Mundial.
- Fernández-Larrea, V.O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)* 62:96-100.
- Fiddaman, P.J. y Rossal, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 74:119-126.
- Fouré, E. (1985). Black leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA-CIRAD, París.
- Gidekel, M., Gutiérrez, A., Zurita, A., Barrientos, L., Torres, A., Ellena, M., Valladares, I., Herrera-Estrella, A., Velásquez, J.C. y Pérez, L.M. (1999). Biological alternatives to chemical control of phytopathogenic fungi in apple (*Malus domestica* Borkh.). Towards a bio-intensive management. *Fitopatología* 34:200.
- Gilois, N., Ramarao, N., Bouillaut, L., Perchat, S., Aymerich, S., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D. y Gohar, M. (2007). Growth-related variations in the *Bacillus cereus* secretome. *Proteomics*, 7:1719–1728.
- Gnanamanickam, S. y Immanuel, J.E. (2007). Epiphytic bacteria, their ecology and functions. En: Plant-Associated bacteria. Gnanamanickam, S.S. (Ed.). Pp. 131-153.
- González, R., Bustamante, E., Shannon, Ph., Okumoto, S., Leandro, G. (1996). Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en bananos. *Manejo Integrado de plagas*, 40:6-11.
- González, V. y Fragoso, S. (2001). *Bacillus subtilis*. [En línea] En: <http://www2.cbm.vam.es/microali/pdfs/B.subtilis.pdf>. Consultado el 23 de septiembre de

- Guzmán, M. (2003). Epidemiología de la Sigatoka negra y el sistema de preaviso biológico. En: Actas del taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas". Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624–653.
- Hirano, S.S. y Upper, C.D. (1983). Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28:155-177.
- Hong, T.Y. y Meng, M. (2003). Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. *Appl. Microbiol.* 61:472-478.
- Hoss, R., Helbig, J. y Bochow, H. (2000). Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopatology.* 148:387-394.
- Hou, K., Boyetchko, S., Brkic, M., Olson, O., Ross, A. y Hegedus, D. (2006). Characterization of the antifungal activity of a *Bacillus* spp. Associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biotechnological Products and Processes Engineering.* 72:644-653.
- Jacobs, J.L y Sundin, G.W. (2001). Effect of Solar UV-B Radiation on a Phyllosphere Bacterial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12):5488-5496.
- Jacques, M.A. y Morris, C.E. (1995). A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiology Ecology.* 18:1-14.
- Jimenez, J.M., Galindo, J.J. y Ramírez, C. (1987). Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *Diformis* mediante bacterias epífitas. Memorias de la VII Reunión Internacional de ACORBAT, Costa Rica. Pp. 105-109.
- Kim, P.I. y Chung, K. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters* 234:177-183.
- Kim, Y.S. y Kim, S.D. (1994). Antifungal mechanism and properties of antibiotic substance produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biological control agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4:296-304.
- Kloepper, J., Rodríguez-Kabana, R., Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E. y Fernández, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potencial extension to systemic and foliar diseases. *Plant pathol.* 28:21-26.

- Knudsen, I.M.B, Hockenhull, J., Jensen, D.F., Gerhardos, B., Hokeberg, M. y Tahvonen, R. (1997). Selection of biocontrol agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Plant Pathol.* 103:775-784.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J. y Borris, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186:1084-1096.
- Krieg, N.R. y Holt, J. (Eds.) (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th edition. Vol. I Williams & Wilkins, New York.
- Krieg, N.R. y Holt, J. (Eds.) (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th edition. Vol. II Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kurze, S., Bahl, H., Dahl, R. y Berg, G. (2001). Biological control of fungal strawberry diseases. *Plant Disease*, pp. 529.
- Laha, G. S., Sing, R. P. y Verna, J.P. (1996). Role of growth promoting rhizobacteria in plant disease management. En: Agnihotri, V.P., Prakash O., Kishum R. y Misra K. (eds.). *Disease Scenario in Crop Plants. Cereals, Pulses, Oilseeds and Crop*. Int' I Books and Periodical, New Delhi, India, 11:233-241.
- Leifert, C., Sigee, D.C., Stanley, R., Knight, C. y Epton, H.A.S. (1993). Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola* on Dutch white cabbage by bacterial antagonist and cold-store temperatures. *Plant Pathol.* 42:270-279.
- Lim, H.S. y Kim, S.D. (1997). Role of siderophores in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of bean by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 7:13-20.
- Lin, D., Qu, L.J., Gu, H. y Chen, Z. (2001). A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Appl. Microbiol.* 91:1044-1050.
- Lindow, S. E. y Brandl, M.T. (2003) *Microbiology of the Phyllosphere*. Applied and environmental microbiology. 69(4):1875–1883.
- Loeffler, W., Tschen, J.S.M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Wu y T.G. (1986). Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115:204-213.
- Loper, J.E. y Henkels, M.D. (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5357-5363.

- Marín, D., Romero, R., Guzmán, M. y Sutton, T. (2003). Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant disease*, 87(3):208-222.
- Massomo, S.M.S. (2002). Black rot of cabbage in Tanzania: characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, and disease management strategies. PhD tesis. The royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Massomo, S.M.S., Mortensen, C.N., Mabagala, R.B., Newman, M.A. y Hockenhull, J. (2004). Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phytopathology*. 152:98-105.
- Mayea, S., Carone, M., Novo, R., Silveira, E., Soria, M., Morales, Y. y Valiño, A. (1998). *Microbiología Agropecuaria II*. Pp. 231-247. Editorial Félix Varela. La Habana.
- Mayea, S., Herrera, L. y Andreu, C.M. (1983). *Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba*. Pp. 153-163. Editorial Félix Varela. La Habana.
- McKellar, M.E. y Nelson, E.B. (2003). Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed-colonizing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:452-460.
- Montealegre, J., Reyes, R., Pérez, L.M., Herrera, R., Silva, P. y Besoain, X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2):115-126.
- Morris, C.E. (1985). Diversity of epiphytic bacteria on snap bean leaflets based on nutrient utilization abilities: biological and statistical considerations. PhD. Thesis, 210 pp. University of Madison, Wisconsin.
- Mosquera, O., Echeverry, L. y Osorio, J. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia et Technica XV* (41):232-236.
- Munimbazi, C. y Bullerman, L.B. (1998). Isolation and parcial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of applied Microbiology*, 84:959-968.
- Navarro, M., Manker, D. y Edgecomd, D. (2004). SERENADE (*Bacillus subtilis* cepa QST713) fungicida biológico, una alternativa en el manejo integrado de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Publicación especial. XVI Reunión internacional ACORBAT. Oaxaca, México. 26 sept – 1 oct 2004, pp. 229.
- O'Brien, R.D. y Lindow, S.E. (1989). Effect of plant species and environmental conditions on Ice Nucleation Activity of *Pseudomonas syringae* on leaves. *Phytopathology*. 79:619-627.

- Orellana, P. (1994). Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba. 120 p.
- Orozco-Santos M. (1998). Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. Folleto técnico No. 1.
- Osorio, I., Patiño, L.F., Bustamante, E. y Rodríguez, P. (2004). Selección y evaluación de bacterias quitinolíticas provenientes de la zona de Urabá, para el control de la Sigatoka negra. En. Boletín Técnico de Cenibanano. (6):8-13.
- Pasberg-Gauhl, C., Gauhl, F. y Jones, D. (2000). Fungal disease of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak. Distribution and economic importance. En: Jones, D. (ed.). Disease of banana, abaca and enset. CABI, Publishing. Pp. 37-44. Londres
- Paulitz, T.C. (1991). Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. Phytopathology, 81:1282-1287.
- Peláez, J., Vásquez, L.E., Díaz, T.J., Castañeda, D.A., Rodríguez, E. y Arango, R.E. (2006). Use of a microtitre plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Rev. Nac. Agr. Medellín. 59(2):3425-3433.
- Podile, A.R. y Prakash, A. (1996). Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. Can. J. Microbiol. 42(6):533-538.
- Rahman, M., Kadir, J., Mahmud, T., Rahman, R. y Begum, M. (2007). Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporoides* in Papaya. Asian Journal of Plant Science, 6(1):12-20.
- Riveros A. y Lepoivre, P. (1998). Inductores exógenos asociados con los mecanismos de defensa a la Sigatoka negra del banano. En: memorias primer Simposio Internacional sobre Sigatoka negra. Pp. 126-132. Resúmenes. XIII Reunión ACORBAT. Guayaquil. Ecuador.
- Riveros, A., Giraldo, C. y Gamboa, A. (2003). Microbial control of Black leaf streak disease. En: Jacome, L., Lepoivre, P., Marín, D., Ortiz, R., Romero, R. y Escalant, V. (eds.) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and Outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. Pp. 287-298.
- Riveros, A.S. y Arciniegas, A.M. (2003). Productos naturales como biofungicidas e inductores de resistencia para el manejo de la Sigatoka negra. En: Actas del taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas". Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003.
- Romantschuck, M. (1992). Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. Ann. Rev. Phytopathol. 30:225-243.

- Salazar, L.M., Patiño, L.F. y Bustamante, E. (2006). Sustratos foliares para el incremento de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas en la filosfera de banano. Rev. Fac. Nac. Agraria. Medellín. 59(2):3449-3465.
- Sánchez-Rodríguez, A., Portal, O., Rojas, L.E., Ocaña, B., Mendoza, M., Acosta, M. y Hofte, M. (2008). An Efficient Method for the Extraction of High-Quality Fungal Total RNA to Study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. Interaction. Mol. Biotechnol. 40 (3): 299-305
- Sariah, M. (1994). Potential of *Bacillus* spp. as a biocontrol agent for anthracnose fruit rot of chilli. Malays. Applied Biol., 23:53-60.
- Schmidt, C., Lorenz, D. y Wolf, G. (2001). Biological control of the Grapevine dieback fungus *Eutypa lata* I: screening of bacterial antagonist. J. Phytopathol. 149:427-435.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of Applied Microbiology. 101 (3):514-525.
- Shoda, M. y Ano, T. (1994). Basic analysis of *Bacillus subtilis* NB22 and its application to biological control. Bioprocess Technol. 19:641-664.
- Silva, P., Montealegre, J., Besoain, X. y Pérez, L. (2001). Efecto de bacterias biocontroladoras sobre germinación y desarrollo de tomate y sobreexpresión de proteínas de defensa. En: XI Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Pp. 129. Santa Cruz, Chile
- Sosa, A. I., Pazos, V. y Torres, D. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. Centro Agrícola. 32 (3):25-29.
- Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M y García, A.F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. J. Appl. Microbiol. 97:1247-1256.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. Mol. Microbiol. 56:845-857.
- Stout, J.D. (1960). Bacteria of soil and pasture leaves at Claudlands showgrounds. Agric. Res. 3:413-430.
- Suda, W., Nagasaki, A. y Shishido, M. (2009). Powdery Mildew-Infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. Microbes Environ. 24(3):217-223.
- Sundin, G. W. y Jacobs, J. L. (1999). Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). Microb. Ecol. 38:27-38.

- Sutherland, M.L. y Pegg, G.F. (1995). Purification of a toxin from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Synd. & Hans race 1. *Phys. Mol. Plant. Pathol.* 46:243-254.
- Tapia, R., Santos, R., Quincoses, M., Peña L.M., Borrás, O., Companioni, B., Blanco, M. y González, J.L. (1998). Estandarización del proceso de producción de metabolitos de *Fusarium subglutinans* y la evaluación de su efecto en callos de piña. *Cultivos Tropicales.* 19(2):51-55.
- Todar, K. (2003). The genus *Bacillus*. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. y Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl Microbiol* 96: 1151-1160.
- Tsuge, K., Akiyama, T. y Shoda, M. (2001). Cloning, sequencing and characterization of the Iturin A operon. *J. Bacteriol.* 183:6265-6273.
- Turner, J.T. y Backman, P.A. (1991). Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant disease.* 75:347-353.
- Utsumi, R., Yagi, T., Katayama, S., Katsuragi, K., Tachibana, K. y Toyoda, H. (1991). Molecular cloning and characterization of the fusaric acid-resistance gene from *Pseudomonas cepacia*. *Agric. Biol. Chem.*, 55:1913-1918.
- Visintin, G., Gioco, I., García, B. y Falico, L. (2007). Bioactividad de microorganismos nativos sobre infecciones en naranjas de *Penicillium digitatum* resistente y sensible a fungicidas. *Cienc. Docencia Tecnol. (Entre Ríos)* [online]. (34):229-242.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lubeck, M y Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 51:574-584.
- Wulff, E.G., Van Vuurde, J.W.L. y Hockenhull, J. (2003). The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. *Plant soil.* 255:463-474.
- Zuluaga, C. M., Patiño, L.F. y Collazos, J.C. (2007), Integración de inducción de resistencia con bacterias quitinolíticas en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. *Revista Nacional de la Facultad de Agronomía Medellín* 60(2). 3891-3905.