



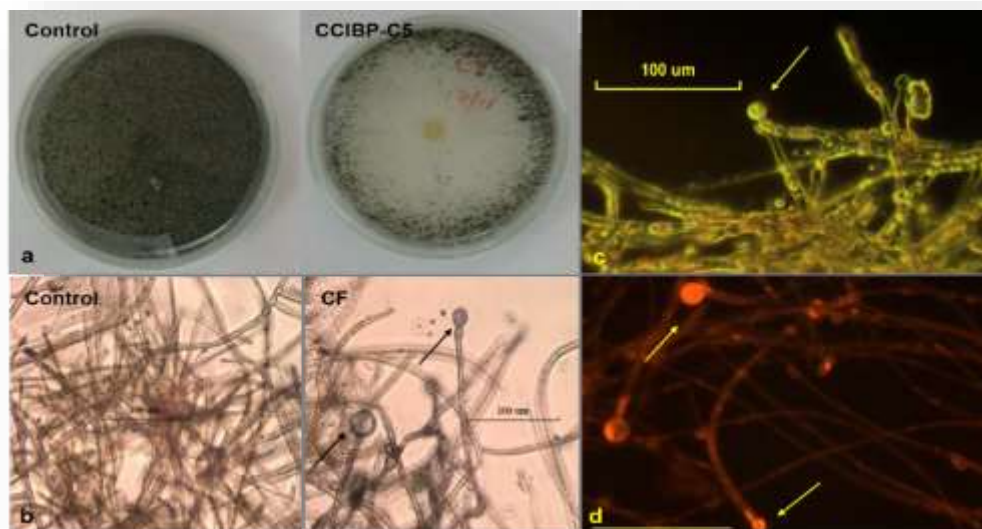
UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



PROPUESTA A PREMIO NACIONAL ANUAL DE LA  
ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA

## Cepas bacterianas con potencial para el manejo de la Sigatoka negra



Santa Clara

2017

**Título:** Cepas bacterianas con potencial para el manejo de la Sigatoka negra

**Entidad ejecutora principal:** Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Cuba. CP 54 830 (UCLV)

**Autor:** Mileidy Cruz-Martín

**Otros autores:** Yelenys Alvarado-Capó, Eilyn Mena Méndez, Mayra Acosta Suárez, Berkis Roque Morales, Tatiana Pichardo Moya

**Colaboradores:** 2

### **Resumen**

El control de la Sigatoka negra representa un gran reto y requiere el desarrollo de programas de manejo integrado que incluyan alternativas biológicas que permitan disminuir el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, el empleo de bioproductos en Cuba para el control de esta enfermedad es limitado. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la enfermedad. Se realizaron aislamientos de la filosfera de *Musa* spp. y se comprobó la presencia de bacterias productoras de metabolitos antifúngicos (volátiles y difundidos) con características promisorias para el control biológico de *M. fijiensis*. Estos resultados constituyen un criterio importante a tener en cuenta para la selección de estas bacterias como agentes de control biológico, ya que, la multiplicidad de dichos mecanismos es importante para el reforzamiento de las propiedades antifúngicas y una mejor eficiencia en el biocontrol. Se seleccionó la cepa de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 para dilucidar los mecanismos de acción implicados en la actividad antifúngica. El filtrado de cultivo esta cepa (FC) inhibió el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis*, y provocó cambios en la morfología y estabilidad membrana citoplasmática. Además, tuvo efecto sobre el patógeno y la expresión de la enfermedad en plantas inoculadas artificialmente el cual dependió del momento de aplicación. A partir de los resultados se demostró la presencia de varios mecanismos involucrados en el biocontrol que se interrelacionan entre sí. Como aporte de este trabajo se cuenta con una colección de cepas bacterianas caracterizadas, con potencial para su empleo en la formulación de bioproductos para el manejo de la Sigatoka negra y protocolos para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* frente de las cepas a *M. fijiensis*. Desde el punto de vista social ha contribuido en la formación de profesionales y estudiantes en el campo de la Biología y Agronomía. Se defendió una tesis de doctorado, dos de maestría en Biotecnología Vegetal y una de Licenciatura en Biología. Los resultados se han publicado en revistas científicas de gran prestigio y se han presentado en eventos científicos. Estos resultados permitieron disponer por vez primera de candidatos bacterianos para el manejo de la Sigatoka negra en Cuba. Teniendo en cuenta las características de las cepas obtenidas en este trabajo, se vienen utilizando también en diferentes investigaciones para validar su empleo como promotoras del crecimiento en la aclimatización de plantas *in vitro* de *Musa* sp. (Biotecnología Vegetal 15(3): 2015) y plantas *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casa de cultivo (Biotecnología Vegetal 15 (2): 115 - 122, 2015).

### **Aporte científico personal de cada autor**

Mileidy Cruz Martín: Diseños de experimentos. Obtención del filtrado de cultivo. Caracterización de la actividad antifúngica. Evaluación de los experimentos *in vitro* y en casa de cultivo. Análisis de los resultados. Elaboración de los informes y artículos para publicaciones y eventos (30%)

Yelenys Alvarado Capó: Diseños de experimentos. Análisis de los resultados. Elaboración de los informes y artículos para publicaciones y eventos (25%)

Eilyn Mena Méndez: Obtención del filtrado de cultivo. Caracterización de la actividad antifúngica. Evaluación de los experimentos *in vitro* y en casa de cultivo. Análisis de los resultados (20%)

Mayra Acosta Suárez: Preparación del inóculo de *M. fijiensis*. Evaluación de experimentos en casa de cultivo. Análisis de los resultados (15%)

Berkis Roque Morales: Obtención de plantas de *Musa* sp. 'Grande naine' por organogénesis y atención de las plantas en casa de cultivo (5%)

Tatiana Pichardo Moya: Participación en las evaluaciones de los experimentos (5%).

### **Colaboradores:**

Ángel Mollineda Trujillo. Centro de Investigaciones Agropecuarias, UCLV. Santa Clara, Cuba

Dr. C. Blondy Cantó Canche: Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mérida, México.

### **Autor para correspondencia:**

Dr. C. Mileidy Cruz Martín

Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

CP 54 830. Teléfono 42 200124

E-mail: [mileidy@ibp.co.cu](mailto:mileidy@ibp.co.cu)

## Comunicación corta del resultado

Entre los principales problemas fitosanitarios del cultivo de plátanos y bananos en Cuba se encuentra la Sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar y está considerada como la más perjudicial a nivel mundial. El control de esta enfermedad representa un gran reto y para su control se requiere del desarrollo de programas de manejo integrado de la enfermedad que incluyan, entre otros, el uso de controles biológicos en combinación con compuestos que promuevan o mejoren los mecanismos de defensa de las plantas. Aunque se ha demostrado que determinados géneros bacterianos, y en particular los *Bacillus*, pueden ser antagonistas *in vitro* de *M. fijiensis*, son discretos los resultados que se tienen sobre el efecto de estos en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*. En tal sentido, una mejor comprensión de las interacciones que allí se establecen, en particular, microorganismo-microorganismo contribuiría a encontrar mejores métodos de control. Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó como objetivo: Determinar el potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *M. fijiensis*.

### Selección de cepas con actividad antifúngica

Se lograron seleccionar 10 aislados de *Bacillus* spp. con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y el 55% de estos produjeron metabolitos difundidos y volátiles con efecto antifúngico (**Biotechnología Vegetal 12 (3):179-182, 2012**). Estos resultados evidenciaron que la microbiota de plátanos y bananos constituye una fuente de posibles candidatos para su uso como controles biológicos (**Biotechnología Vegetal 16(1): 53-61, 2016**).

Se seleccionó la cepa CCIBP-C5 como modelo para realizar los experimentos posteriores y se identificó como *Bacillus pumilus*. Su filtrado de cultivo (FC) afectó las estructuras de reproducción de *M. fijiensis* e inhibió significativamente la germinación de los conidios y el crecimiento *in vitro*. Se constató el estrés oxidativo provocado en el micelio cuando se aplicó el FC que provocó daños a nivel de lípidos y/o proteínas y un cambio en la permeabilidad de las membranas, que permiten explicar en parte las deformaciones observadas en el micelio y las estructuras de reproducción de *M. fijiensis* (**Tropical Plant Pathology. 42:121-125, 2017**). Teniendo en cuenta los daños provocado por el FC a estas estructuras, se pudiera esperar que, en condiciones naturales, pudiera reducir la concentración del inóculo del patógeno capaz de producir infección. Estos hallazgos evidencian el efecto antifúngico del FC y justifican su estudio como agente de biocontrol

### Determinación del efecto de FC sobre la expresión de la enfermedad

El efecto de FC sobre el desarrollo de la enfermedad en casa de cultivo dependió del momento de su aplicación (antes o después de la inoculación de *M. fijiensis*). En las plantas del tratamiento control las hojas se observaron completamente necrosadas a los 70 días posteriores a la inoculación (dpi). En contraste, las plantas en presencia del FC mantenían gran proporción de tejido verde, las lesiones aparecieron de forma aislada y nunca coalescieron. Con una única aplicación del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 (después de inoculado el patógeno), se logró una eficiencia de 33,6 % en el control de la enfermedad a los 70 dpi. Además, se destaca que este resultado se



alcanzó con solo una aplicación y que no contenía preservantes, conservantes ni estabilizantes que lo protegieran de la acción de la luz del Sol, el agua de riego, entre otros factores ambientales a los que estuvo expuesto, lo cual resalta aún más su potencial.

### **Efecto del filtrado de cultivo bacteriano sobre la respuesta de plantas de *Musa***

Además de la acción antifúngica directa del FC sobre *M. fijiensis*, el filtrado bacteriano induce los mecanismos de defensa de la planta: las plantas de 'Grande naine' en condiciones de casa de cultivo aumentaron la actividad de enzimas relacionadas con la respuesta de defensa vegetal así como también mostraron cambios en los niveles de ROS y de compuestos fenólicos cuando se les aplicó el filtrado bacteriano. Estas respuestas fueron detectadas también a nivel histológico, y fueron independiente de la presencia de *M. fijiensis* (**Biotecnología Vegetal, 15(2):97-103, 2015**). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que existió, además de la acción antifúngica directa del FC sobre *M. fijiensis*, una inducción de mecanismos de respuesta de defensa en la planta por el filtrado bacteriano. No siendo necesario para ello la presencia del patógeno. Estos resultados refuerzan el potencial biotecnológico del filtrado del cultivo de la cepa *B. pumilus* CCIBP-C5.

### **Caracterización del filtrado de cultivo**

Se logró caracterizar el FC, sugiriendo la presencia de compuestos proteicos con efecto antifúngico sobre el micelio de *M. fijiensis* (**Biotecnología Vegetal 14(1):55-59, 2014**). La fracción dializada obtenida mostró similar efecto antifúngico que el FC. La corrida electroforética evidenció la presencia de proteínas en la fracción semipurificada, sugiriendo la excreción de proteínas o sustancias peptídicas al medio de cultivo por parte de la cepa CCIBP-C5. Posteriormente, se comprobó la actividad quitinolítica del FC y no se observó actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa.

Como parte del proceso de caracterización del FC se obtuvieron dos fracciones mediante la extracción con acetato de etilo (fracciones acuosa y orgánica del FC). Ambas fracciones inhibieron el crecimiento del micelio y con ambas se observaron deformaciones similares en el micelio. Los resultados cromatográficos indicaron la presencia de compuestos de naturaleza lipopeptídica. La presencia de lipopéptidos en el FC fue corroborada por espectroscopía infrarroja a partir de metabolitos purificados.

### **Consideraciones generales**

La aplicación del FC de la cepa CCIBP-C5, en plantas de banano con presencia de *M. fijiensis*, logró retardar la evolución de los síntomas, así como redujo la biomasa fúngica inicial, lo que permitió mantener mayor cantidad de tejido fotosintéticamente activo durante el periodo evaluado (70 días) en condiciones de casa de cultivo. El desarrollo de un bioproducto a partir de la cepa CCIBP-C5 podría contribuir al control de la enfermedad en programas de manejo integrado. Atendiendo a los resultados podría considerarse su uso sólo o combinado con otros productos, siempre que se demuestre su eficacia en condiciones de campo, así como su compatibilidad en las formulaciones que se elaboren, para permitir a las plantas llegar a la floración con un mayor número de hojas activas, lograr un mejor llenado del fruto y por tanto disminuir los efectos dañinos de la enfermedad.

La Novedad Científica de este trabajo radica en que demostró el potencial de bacterias cubanas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de control de *M. fijiensis*. Se logró determinar el efecto del filtrado de cultivo de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 sobre el patógeno, las plantas de *Musa* cv. 'Grande naine' en casa de cultivo y la expresión de la enfermedad, así como también se evidenciaron algunos de los mecanismos de acción sobre el patógeno. Con la caracterización del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 se identificó la presencia de compuestos proteicos con actividad antifúngica, así como, de enzimas líticas. La espectroscopía infrarroja reveló la presencia de lipopéptidos en el filtrado de cultivo.

**Beneficio práctico y social:** En general, el control de la Sigatoka negra representa un gran reto y para su control se requiere del desarrollo de programas de manejo integrado de la enfermedad que incluyan, entre otros, el uso de nuevos fungicidas y controles biológicos en combinación con compuestos que promuevan o mejoren los mecanismos de defensa de las plantas. En Cuba es muy limitado el empleo de bioproductos para el control de esta enfermedad, es por ello que el desarrollo de estrategias sostenibles constituye una necesidad. A partir de la selección de cepas con actividad antifúngica, de determinar su efecto sobre el patógeno, la enfermedad y la respuesta en plantas así como las características de estos metabolitos, se podrá elaborar un bioproducto cubano eficaz para insertarlo en el programa de manejo de esta enfermedad.

A partir de los resultados de este trabajo se dispone de una cepa bacteriana aislada de la filosfera de *Musa* spp. productora de metabolitos de tipo lipopéptidos y quitinasas, con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* e inductora de resistencia en plantas de *Musa* cv. 'Grande naine', cuya siguiente evaluación es en campo y la elaboración a escala comercial de un bioproducto para el control de la Sigatoka negra. Se cuenta con una colección de bacterias de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* que pueden también ser evaluadas. Además se desarrollaron protocolos para la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de bacterias y sus metabolitos frente a *M. fijiensis*, así como, su efecto sobre plantas en casa de cultivo. El trabajo también puede contribuir al desarrollo de una metodología para la selección de aislados bacterianos promisorios para el control biológico de patógenos fúngicos.

#### **Publicaciones realizadas y que guardan relación con el trabajo presentado:**

1. Antifungal activity of *Musa* phyllosphere *Bacillus pumilus* strain against *Mycosphaerella fijiensis*. Mileidy Cruz-Martín, *et al.* Trop. plant pathol. (2017) 42:121 – 125
2. Effect of *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 on *Musa*-*Mycosphaerella fijiensis* interaction. Mileidy Cruz-Martín, *et al.* 3 Biotech 2017 (aceptada)
3. Diversidad de cepas bacterianas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet Mileidy Cruz-Martín, *et al.* Biotecnología Vegetal 16(1): 53 - 61, 2016
4. Respuesta histoquímica de plantas de banano cv. 'Grande naine' inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* y filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. Eilyn Mena, Mileidy Cruz-Martín, *et al.*, Biotecnología Vegetal 15(2):97- 103, 2015.
5. Efecto de la temperatura, pH y detergentes sobre la actividad antifúngica de filtrados de cultivo bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Eilyn Mena,

- Mileidy Cruz-Martín, et al. *Biotecnología Vegetal* 14 (1):55-59, 2014
6. Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. Mileidy Cruz-Martín, et al. *Biotecnología Vegetal* 13 (4):219-224, 2013
  7. Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediada por metabolitos difundidos y volátiles. Mileidy Cruz-Martín, et al. *Biotecnología Vegetal* 12 (3): 179-182, 2012

### **Eventos en los que se recogen los resultados del presente trabajo**

- 1- IX Congreso de Biotecnología Vegetal BioVeg (2013)
- 2- II Simposio Internacional de Raíces, Rizomas, tubérculos, plátanos, bananos y papaya (2013)
- 3- VIII Encuentro Latinoamericano del Caribe de Biotecnología. REDBIO (2013)
- 4- X Congreso de Biotecnología Vegetal BioVeg (2015)
- 5- II Simposio Internacional de Salud Agropecuaria SISA 2015
- 6- XII Simposio Internacional Biotecnología Vegetal 2016

### **Tesis defendidas**

- Potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. (Tesis de Doctorado, 2015) IBP, Cuba. Autora: Mileidy Cruz Martín
- Mecanismos de acción del filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 en la interacción *Musa-Mycosphaerella fijiensis*. (Tesis de Maestría en Biotecnología Vegetal, 2016). IBP. Autora: Eilyn Mena Méndez
- Actividad antifúngica de metabolitos bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Tesis de diploma, 2012). Autora: Eilyn Mena Méndez
- Efecto de filtrados bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* en la interacción *Musa-M. fijiensis* en casa de cultivo (Tesis de Maestría en Biotecnología Vegetal 2010). IBP. Autora: Ivian Poveda

### **Premios**

Premio Relevante por el Aporte Medioambiental en el Forum Provincial de Ciencia y Técnica (2016)

Premio Destacado Forum Municipal 2017

**Descripción científico-técnica  
detallada de los resultados**

## INTRODUCCIÓN

En Cuba, los bananos y plátanos (*Musa* spp.) constituyen un renglón priorizado en el programa alimentario nacional. Esto se debe fundamentalmente a las posibilidades de su producción todos los meses del año, su elevado potencial productivo, el arraigado hábito de consumo y la diversidad de usos (Pérez *et al.*, 2014).

Entre los principales problemas fitosanitarios del cultivo de plátanos y bananos se encuentra la Sigatoka negra, causada por el ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar y está considerada como la más perjudicial a nivel mundial. El control de la enfermedad se basa fundamentalmente en la aplicación de productos químicos lo cual acarrea altos costos de producción y, además, un impacto negativo para el medio ambiente. En general, el control de la Sigatoka negra representa un gran reto, debido a factores como la agresividad del patógeno, la naturaleza policíclica de la enfermedad, la alta susceptibilidad de los cultivares más demandados, la presencia de plantas en todos los estados de desarrollo y la producción continua de tejido susceptible a infección (Marín *et al.*, 2003). Según Alvindia (2012) y Álvarez *et al.* (2013) para su control se requiere del desarrollo de programas de manejo integrado de la enfermedad que incluyan, entre otros, el uso de nuevos fungicidas y controles biológicos en combinación con compuestos que promuevan o mejoren los mecanismos de defensa de las plantas.

El empleo de bioporoductos en Cuba para el control de Sigatoka negra es limitado, solo aparece publicado un reporte de Castellanos *et al.* (2009) quienes obtienen resultados discretos en condiciones de campo con el empleo del Gluticid, bioproducto cubano obtenido por vía biotecnológica. El producto es libre de células y contiene metabolitos bioactivos producidos por la rizobacteria *Pseudomonas aeruginosa*, cepa PSS, durante el proceso de fermentación (sideróforos y metabolitos antimicrobianos).

Aunque se ha demostrado que determinados géneros bacterianos, y en particular los *Bacillus*, pueden ser antagonistas *in vitro* de *M. fijiensis*, son discretos los resultados que se tienen sobre el efecto de estos en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*. En tal sentido, una mejor comprensión de las interacciones que allí se establecen, en particular, microorganismo-microorganismo contribuiría a encontrar mejores métodos de control. Sin embargo, el efecto de factores bióticos que no sean la planta o el hongo filamentosos en este patosistema 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 y dentro de ellos, las bacterias, han sido el principal grupo evaluado (Marín *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó la siguiente hipótesis:

A partir de la selección de cepas bacterianas de la filosfera de *Musa* spp. productoras de metabolitos difundidos con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*, de determinar su efecto sobre el patógeno, la expresión de la enfermedad y la respuesta en plantas, así como las características de estos metabolitos, se podría contar con candidatos bacterianos con potencial como agente de biocontrol de *M. fijiensis*.

Para demostrar esta hipótesis el trabajo tuvo como objetivos:

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar cepas de *Bacillus* spp. de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis* por la producción de metabolitos difundidos al medio de cultivo.
2. Determinar el efecto de filtrados de cultivo de cepas de *Bacillus* spp. sobre el patógeno, la expresión de la enfermedad y la respuesta de plantas de banano cv. 'Grande naine' en casa de cultivo.
3. Caracterizar el filtrado de cultivo con actividad antifúngica *in vitro* frente *Mycosphaerella fijiensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa de *Mycosphaerella fijiensis*

La cepa de *M. fijiensis* empleada fue la CCIBP-Pf-83 perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) la cual fue previamente caracterizada y evaluada su agresividad y patogenicidad en condiciones de casa de cultivo (Cruz-Martín, 2003). La suspensión micelial se obtuvo a partir de un cultivo de *M. fijiensis* en Caldo Papa Dextrosa (PDB) (BioCen) incubado durante 15 días en agitación a 120 rpm y 28°C. Se decantó el medio de cultivo y se homogeneizó el micelio en batidora (*Rose Scientific*), durante un minuto con medio de cultivo PDB fresco y se filtró por tamiz de 40,0 µm.

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) (susceptible a la Sigatoka negra), propagadas *in vitro* vía organogénesis según el protocolo descrito por Orellana (1994). Las plantas se mantuvieron en fase de aclimatización durante 90 días hasta alcanzar como mínimo 20 cm de altura y tres hojas activas.

### Filtrado de cultivo bacteriano

En todos los ensayos los filtrados de cultivo de las cepas bacterianas se prepararon según resultados previos (Cruz-Martín *et al.*, 2009; Mena, 2012) que se describen brevemente. Se inocularon 100 mL de medio de cultivo Caldo Nutriente (CN) (BioCen) con un mililitro de cultivos de las cepas bacterianas (CN, 30°C, oscuridad y agitación por 16-20 h) ajustados a  $DO_{600}=0,1$  ( $\sim 5,0 \times 10^9$  ufc mL<sup>-1</sup>). Se incubaron durante 48 h (120 rpm y 30°C) y posteriormente se centrifugaron por 15 min a 4°C y 10 000 g (*Eppendorf*). Para eliminar las células bacterianas, el sobrenadante fue esterilizado por filtración (0,22 µm) y se conservó a 4°C. El sobrenadante libre de células bacterianas se denominó filtrado de cultivo bacteriano (FC).

### Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 20,0 para

Windows. Las pruebas utilizadas para cada ensayo, previa comparación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se detallan en cada acápite.

### **3.1 Selección de bacterias de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis***

#### **3.1.1 Aislamiento de bacterias de la filosfera**

Con el objetivo de aislar bacterias de la filosfera de *Musa* spp. se seleccionaron de mayo a junio de los años 2008 y 2009, plantas de diferentes cultivares crecidas en campo. Se tomaron fragmentos de tejido de la tercera y cuarta hoja, con síntomas (lesiones necróticas, estados 3-5 de la escala propuesta por Fouré (1985)) 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 de 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 (Santa Clara, Santo Domingo, Cascajal y Camajuaní), 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 (Morris *et al.*, 1997). Para ello, se cortaron fragmentos de tejido de forma circular de aproximadamente 90,0 mm de diámetro, con síntomas 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 Agar para Conteo en Placas (ACP) (BioCen). Se presionaron ligeramente sobre el medio de cultivo y se mantuvieron impresas durante 10 min. Luego se extrajeron y se procedió a la incubación de las placas a 30°C y oscuridad durante 24 h.

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). Se informaron como número de colonias cm<sup>-2</sup> de tejido.

Para la comparación estadística de los valores obtenidos del número de colonias aisladas entre cultivares, fue utilizada la prueba de Kruskal-Wallis/ Mann-Whitney 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 análisis.

Con el objetivo de seleccionar aquellos aislados con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*, se enfrentaron al aislado de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 por el método de cultivo dual.

Las placas de Petri para el cultivo dual se prepararon como se describe a continuación. En un erlenmeyer con 200 mL de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (BioCen) fundido (~ 40°C) se añadieron 20,0 mL de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (para una concentración final de 5,0x10<sup>5</sup> fragmentos de micelio mL<sup>-1</sup>).

Se homogenizó la mezcla y se vertió en placas de Petri de 90,0 mm de diámetro (25 mL x placa). A las 24 h de incubación a 28°C y oscuridad, se inocularon las bacterias mediante punción (ocho aislados por placa de Petri) a partir de colonias aisladas crecidas en AN con 24 h de incubación a 30°C y oscuridad.

Como control se empleó agua desionizada estéril en lugar de los aislados bacterianos. Se emplearon dos réplicas por cada aislado y el ensayo se repitió dos veces.

La evaluación se realizó diariamente hasta las 96 h 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 actividad antifúngica *in vitro* de los aislados bacterianos.

### **3.1.2 Caracterización de los aislados**

Los aislados que mostraron actividad antifúngica *in vitro* se caracterizaron morfológica, cultural y fisiológicamente. 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 en medio de cultivo AN 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). Los aislados bacterianos seleccionados por su actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* y que fueron caracterizados, se incorporaron como cepas a la Colección de cultivos Microbianos del IBP con la nomenclatura CCIBP- Código de la cepa. Para los estudios posteriores se seleccionaron aquellas cepas que por sus características se identificaron como pertenecientes a la familia *Bacillaceae*.

### **3.1.3 Caracterización de la actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis***

Con el objetivo de caracterizar la actividad antifúngica de las cepas de *Bacillus* spp. seleccionadas en el acápite 3.1.2 se realizaron ensayos de cuantificación de la inhibición del crecimiento del patógeno. Además, se determinó si las cepas eran productoras de metabolitos difundidos y/o volátiles con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.

#### *Cuantificación de la actividad antifúngica*

Para la cuantificación de la actividad antifúngica de las cepas, se empleó el método de cultivo dual y como inóculo fúngico, suspensiones miceliares de *M. fijiensis*.

A partir de cada cultivo bacteriano crecido en AN, 30°C y oscuridad durante 24 h se seleccionaron colonias con idénticas características culturales, se resuspendieron en agua destilada estéril y cada suspensión resultante fue ajustada a DO<sub>600</sub>=0,1 (*Eppendorf Biophotometer*).

Las placas de Petri (90,0 mm) con el inóculo fúngico se prepararon como se describió en el acápite 3.1.1. Cuando las placas estuvieron secas, se añadieron en el centro de la placa 7,0 µL de cada suspensión bacteriana (una cepa por placa de Petri).

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



La evaluación se realizó mediante la medición del halo de inhibición (mm) del crecimiento del patógeno a las 72 h de incubación. Se midió el radio del halo de inhibición hasta la zona donde se observaba aclaramiento del micelio y se realizaron ocho mediciones por halo. Se emplearon tres réplicas por cada cepa bacteriana y el ensayo se repitió tres veces. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

#### *Producción de metabolitos antifúngicos difundidos*

Para determinar si la inhibición del crecimiento fúngico 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 CN y se ajustaron a  $DO_{600}=0,1$  ( $\sim 5,0 \times 10^9$  ufc  $mL^{-1}$ ) (los inóculos iniciales fueron de colonias crecidas en AN, 30°C y oscuridad durante 24 h).

En una placa de Petri (150,0 mm de diámetro) se añadió medio de cultivo PDA mezclado con una suspensión micelial de *M. fijiensis* (concentración final de  $5,0 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $mL^{-1}$ ). Las placas se incubaron a 28°C y oscuridad durante 24h. Pasado este tiempo, se colocó un filtro de acetato de celulosa (*Sartorius*) de 0,22  $\mu m$  encima del medio de cultivo. Sobre su superficie se depositaron las suspensiones bacterianas (3,0  $\mu L$  por cepa) separadas por al menos 2,0 cm (12 cepas por placa). Las placas se incubaron durante otras 48 h a 28°C y oscuridad.

Como control negativo se depositaron 3,0  $\mu L$  de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana y como control del crecimiento bacteriano se siguió el mismo procedimiento sin utilizar membrana. Se realizaron dos réplicas con dos repeticiones para cada cepa y se clasificaron como positivas las cepas bacterianas que produjeron halo de inhibición del crecimiento fúngico.

#### *Producción de metabolitos antifúngicos 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 AN, en la tapa de otra placa de Petri se añadió medio de cultivo PDA mezclado con una suspensión micelial de *M. fijiensis* (concentración final de  $5,0 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $mL^{-1}$ ). Luego se inocularon 50,0  $\mu L$  de suspensión bacteriana ajustada a  $DO_{600}=0,1$  (preparada en agua estéril a partir de colonias crecidas en AN, 30°C y oscuridad durante 24 h) sobre el medio de cultivo AN. 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  $\mu L$  de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h en oscuridad.

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 informaron como positivas aquellas cepas en las que se inhibió el crecimiento fúngico o su crecimiento

fue menor que el control y como negativas en las que no se observó inhibición del crecimiento fúngico.

Teniendo en cuenta los resultados de la caracterización de la actividad antifúngica de las cepas de *Bacillus* spp. se seleccionaron dos para continuar los estudios.

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

Con el objetivo de determinar el efecto de filtrados de cultivos bacterianos en la interacción *Musa-M. fijiensis* se realizaron ensayos *in vitro* y en casa de cultivo que se describen a continuación.

A partir de este momento se incluyó como control, la cepa de *Bacillus subtilis* (CCIBP-M27) perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Laboratorio de Microbiología del IBP. Esta especie bacteriana es utilizada en la elaboración de Serenade®, producto biofungicida, utilizado para el manejo de la Sigatoka negra (Edgecomb y Manker, 2006) así como ha sido referida en la literatura científica con propiedades antifúngicas frente a una amplia gama de microorganismos fitopatógenos (García-Gutiérrez *et al.*, 2013). Las características de esta cepa se describen en el Anexo 1.

#### **3.2.1 Determinación del efecto de los filtrados de cultivo sobre el patógeno**

##### **3.2.1.1 Efecto sobre germinación de ascosporas y conidios**

###### *Ascosporas*

El efecto de los filtrados de cultivo, de las dos cepas seleccionadas en el acápite anterior, sobre la germinación de ascosporas de *M. fijiensis* se determinó según el método empleado por Mosquera *et al.* (2009) con algunas modificaciones. La descarga de ascosporas de hojas de plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) con síntomas en estado 5-6, según la escala de Fouré (1985), se realizó sobre portaobjetos con medio de cultivo PDA mezclado con los filtrados de cultivo de las dos cepas seleccionadas. Se evaluaron los FC en una dilución de 1:10 teniendo en cuenta resultados de ensayos previos (Cruz-Martín *et al.*, 2013). Pasadas dos horas, se retiraron los fragmentos de hojas y se incubaron los portaobjetos a 28°C y oscuridad durante 24 h. Luego, se procedió a evaluar la germinación de las ascosporas (microscopio óptico Olympus, 400x) tomando como criterio de ascospora germinada la emisión de al menos un tubo germinativo. Se cuantificaron las ascosporas germinadas en cuatro campos. Se determinó el porcentaje de germinación de ascosporas en presencia de los filtrados de cultivo y se compararon con el control sin presencia de los filtrados bacterianos. El ensayo se repitió tres veces con dos réplicas de cada filtrado.

###### *Conidios*

Los conidios de *M. fijiensis* se obtuvieron en medio de cultivo V8 modificado según método propuesto por Acosta-Suárez *et al.* (2004). Para la evaluación del efecto de los filtrados bacterianos sobre la germinación de conidios se partió de una suspensión de conidios en agua destilada estéril ( $10^5$  conidios mL<sup>-1</sup>) a la que se añadieron los FC para una dilución de 1:10. La suspensión conidial en presencia de los filtrados bacterianos se incubó a 28°C y oscuridad durante 48 h. Pasado este tiempo se evaluó la germinación de 60 conidios por réplica mediante conteo en

cámara de Neubauer. Se determinó el porcentaje de germinación de conidios en presencia de los filtrados de cultivo y se compararon con el control sin presencia de los filtrados bacterianos. Se evaluaron tres réplicas por FC y el experimento se repitió tres veces.

Los valores obtenidos en cuanto a la germinación de ascosporas y conidios fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

### **3.2.1.2 Efecto sobre el micelio**

Se determinó el efecto de los filtrados de cultivo bacterianos sobre el crecimiento y morfología del micelio así como sobre el daño oxidativo y la integridad de la membrana (pérdida de electrolitos) de *M. fijiensis*.

#### *Crecimiento*

Se evaluó el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* en presencia de los filtrados de cultivo bacterianos de cada cepa mediante el método propuesto por Cruz-Martín *et al.* (2013) en placas de 96 pocillos. Se emplearon suspensiones miceliales a una concentración de  $10^5$  fragmentos de micelio  $\text{mL}^{-1}$  en medio de cultivo PDB. A las suspensiones miceliales se les añadieron los filtrados bacterianos en una dilución de 1:10 y se incubaron en estático a 28°C y oscuridad durante 48 h. Como control se emplearon suspensiones miceliales en presencia de medio de cultivo CN. Pasado el tiempo de incubación se realizaron lecturas de absorbancia a 595nm con un espectrofotómetro (Opsys MR).

Además, se realizaron observaciones microscópicas del micelio de los dos tratamientos (FC y control) primero con microscopio de campo claro (Olympus) (400x) y luego con microscopio de fluorescencia, después de realizar tinción con rojo congo (0,1M) (colorante fluorescente que tiene afinidad por la quitina). Para esto último, se empleó el procedimiento descrito por Moreno *et al.* (2006). Al micelio incubado con los filtrados de cultivo se le adicionó el colorante y al cabo de 10 min se observó en microscopio de fluorescencia (Nikon) con filtros G-2E/C Trit C (Ex 526-553 nm) y se comparó con el control.

#### *Daño oxidativo*

Para evaluar el daño oxidativo en el micelio de *M. fijiensis* por la aplicación de los filtrados de cultivo bacterianos se determinaron los niveles de lipoperoxidación lipídica y de oxidación de proteínas como se describe a continuación.

Se inocularon enermeyer de 125 mL que contenían 20,0 mL de medio de cultivo PDB, con una suspensión micelial de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 hasta lograr una concentración final de  $10^5$  fragmentos de micelio  $\text{mL}^{-1}$ . Los frascos fueron incubados a 28°C en agitación (120 rpm) durante 48 h. Luego de ese tiempo, el micelio fue colectado por centrifugación y se reinoculó en medio de cultivo PDB que contenía los filtrados de cultivo bacterianos en una dilución de 1:10. Posteriormente, fue incubado a 28°C, 120 rpm y oscuridad durante 48 h. Luego del periodo de incubación el micelio fue separado del medio de cultivo por centrifugación para realizar las determinaciones de malondialdehído (MDA) y productos avanzados de la oxidación

de proteínas (PAOP). El control consistió en la incorporación de medio de cultivo CN en lugar de los FC.

La lipoperoxidación de membranas fue estimada por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) basado en la producción de MDA, según el método modificado por Choi *et al.* (1996). La concentración de MDA en el micelio fue calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de  $156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Se determinó, además, el contenido de MDA en el medio de cultivo, considerando una proporción de 5/2 (v/v) de la alícuota del medio de cultivo con respecto a la solución de TBA. Los resultados se mostraron como la suma del MDA del micelio+ MDA en medio de cultivo y se expresaron como  $\mu\text{g}$  de MDA por  $\mu\text{g}$  de proteínas.

El contenido de proteínas en las muestras fue determinado mediante el método Bradford modificado, para lo cual la mezcla de reacción contenía 1,0 mL de reactivo Bradford comercial (Bio-Rad), 20,0  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y 80,0  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,15 M (Bradford, 1976). Se utilizó una curva de calibración confeccionada con albúmina de suero bovino (BSA) (del inglés: *Bovine Serum Albumin*) (Fluka)  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  como estándar.

La determinación de PAOP se realizó según el método espectrofotométrico descrito por Matteucci *et al.* (2001). La concentración de PAOP se calculó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón cloramina T (Merck). Los valores se expresaron en unidades de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cloramina.

#### *Efecto sobre la integridad de la membrana citoplasmática*

El efecto de los filtrados de cultivos bacterianos, sobre la integridad de la membrana se evaluó mediante la determinación de las concentraciones de iones potasio ( $\text{K}^+$ ) en el medio de cultivo según Thomas (1985).

Fragmentos de micelio de *M. fijiensis* de 48 h de cultivo fueron inoculados en 2,0 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl 5 mM (pH 7) hasta obtener una concentración de  $5,0 \times 10^5$  fragmentos  $\text{mL}^{-1}$ . A la suspensión micelial obtenida se le adicionaron los FC (1:10) y se incubaron en estático a  $28^\circ\text{C}$  y oscuridad durante 48 h. Se emplearon como control suspensiones miceliales a las que se le adicionó CN a igual dilución (1:10). Al cabo de este tiempo las suspensiones miceliales fueron centrifugadas ( $10\,000 \text{ g} \times 5 \text{ min}$ ) para obtener el medio de cultivo de incubación.

La concentración de potasio en el medio de cultivo así como la de los filtrados de cultivo de cada cepa se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (SP9 UNICAM). Los resultados de la pérdida de iones  $\text{K}^+$  se obtuvieron por la resta de los valores registrados en el medio de cultivo menos el aporte de estos iones presentes en el FC.

### **3.2.2 Efecto de los filtrados de cultivo bacterianos sobre la expresión de la enfermedad**

Para evaluar el efecto de los filtrados de cultivo de las cepas de *Bacillus* spp. con actividad antifúngica *in vitro* sobre la expresión de la enfermedad se evaluaron variables epifitológicas, componentes de la resistencia y se cuantificó la biomasa fúngica en plantas inoculadas en casa de cultivo. Se emplearon para ellos, plantas cultivadas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) inoculadas con suspensiones miceliales de *M. fijiensis*. Para la inoculación artificial de *M.*

*fijiensis* en casa de cultivo se tuvo en cuenta el protocolo descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010).

### 3.2.2.1 Determinación del efecto de filtrados de cultivo bacterianos sobre la expresión de la enfermedad en plantas de ‘Grande naine’

Con el objetivo de determinar el efecto de los filtrados de cultivo de las dos cepas bacterianas y la cepa control, sobre el desarrollo de la enfermedad en plantas se evaluaron variables epifitológicas y componentes de la resistencia.

Se emplearon dos tratamientos por cada una de las cepas: 1) inoculación de los filtrados de cultivo bacterianos de cada cepa tres días antes de la inoculación con *M. fijiensis* (A) y 2) la aplicación de los filtrados de cultivo tres días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis* (D). Además, se emplearon como controles plantas inoculadas con *M. fijiensis* (CI) y plantas inoculadas solo con medio de cultivo CN (control) para un total de ocho tratamientos.

La inoculación se realizó por la superficie abaxial de las hojas y con la ayuda de un pincel tanto para la inoculación con *M. fijiensis* como para los filtrados de cultivo. Se inocularon las tres primeras hojas de cinco plantas para cada uno de los tratamientos (n=15). Se esperaron dos horas hasta que se secaran las hojas, al cabo de este tiempo se elevó la humedad relativa al 100% durante tres días y luego se garantizó una humedad por encima del 70%. Diariamente se registró la temperatura y humedad mediante un Termo-higrómetro electrónico (EM-913).

Las plantas se ubicaron en una distribución completamente al azar en la casa de cultivo. La evaluación del desarrollo de la enfermedad se realizó cada siete días hasta los 70 días posteriores a la inoculación (dpi). Para ello se utilizó la escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003).

Según lo propuesto por Leiva-Mora *et al.* (2010) en cada tratamiento se determinaron las variables epifitológicas: período de incubación (PI) (días), tiempo de evolución de los síntomas (TES) (días), tiempo de desarrollo de la enfermedad (TDE) (días) y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). Esta última variable se calculó de acuerdo con la fórmula propuesta por Shaner y Finney (1977):

$$\sum_{i=1}^n [(Y_{i+n} + Y_i) / 2] [X_{i+1} - X_i]$$

Donde:  $Y_i$  = expresa la severidad (en función del índice de infección en por ciento acorde con la escala),

$X_i$  = tiempo (días) a la  $i$ -ésima observación

y  $n$  = número total de observaciones.

El índice de infección (II) se calculó según la fórmula:

$$II (\%) = 100 \times \frac{nb}{(N - 1)T}$$

donde  $n$  = número de hojas en cada nivel de la escala

$b$  = valor de la escala

$N$  = 6 (grados de la escala)

$T$  = número total de hojas evaluadas por plantas, y se utilizará la escala evaluativa que aparece en la figura 4.

**Período de Incubación (PI):** tiempo entre la inoculación y la aparición de las primeras lesiones puntiformes por el envés de la hoja (días).

**Tiempo de Evolución de los Síntomas (TES):** 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 (TDE):** período entre la inoculación y la aparición de lesiones maduras (manchas necróticas con centros secos).

Además, se evaluó como componente de la resistencia el número de lesiones necróticas por hoja. Los valores obtenidos en cuanto a ABCPE y el número de lesiones necróticas fueron comparados con el control inoculado y analizados estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

Finalmente se determinó la eficacia del control (EF) en casa de cultivo de los tratamientos ensayados a los 70 dpi según Fu *et al.* (2010).

$$EF(\%) = 100 \times \frac{(II\ c - II\ t)}{II\ t}$$

donde:

II c = Índice de infección del control inoculado

II t = Índice de infección de los tratamientos

A partir de los resultados se seleccionó el tratamiento (FC y momento de la aplicación) que mejor control mostró de la enfermedad para incluirlo en los restantes experimentos.

### **3.2.2.2 Cuantificación de la biomasa de *M. fijiensis* en plantas de *Musa* inoculadas artificialmente**

Para evaluar el efecto del filtrado de cultivo en el incremento de la biomasa fúngica en plantas inoculadas artificialmente se realizó este experimento. La biomasa de *M. fijiensis* se cuantificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *Polimerase Chain Reaction*) en tiempo real y se utilizó el gen de  $\beta$ -tubulina de *M. fijiensis* según lo referido por Arzanlou *et al.* (2007).

Para la interpretación de los resultados se empleó el método de curva estándar de concentraciones conocidas de ADN de micelio de *M. fijiensis* de 15 días de cultivo en PDB (oscuridad, 120 rpm, 28°C). Para la purificación de ADN fúngico se siguió el protocolo descrito por Johanson y Jeger (1993), se ajustó a una concentración de 50,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y se realizaron cinco diluciones decimales (1, 1:10, 1:100 1:1000 y 1:10000).

Las muestras de las plantas inoculadas en presencia y ausencia del FC fueron tomadas a los 0, 6, 10 días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis*. En cada tratamiento se pulverizaron las tres hojas inoculadas mezcladas y se empleó cada planta como réplica. La extracción del ADN de las plantas se realizó, de acuerdo con el protocolo descrito por Murray y Thompson (1980), a partir de 0,25 g de masa fresca. El ADN fue cuantificado por Nanodrop (*Thermo scientis*) y se ajustó la concentración de todas las muestras a 50,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Se realizó la mezcla de reacción

tanto de las muestras de ADN del micelio de *M. fijiensis* como de las plantas inoculadas de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de reacción para los ensayos de tiempo real para una reacción de 15 µL de volumen final.

<i>Componentes PCR en Tiempo Real (µL)</i>	
H <sub>2</sub> O UP	3,5
Taqman	1,5
Master Mix TaqMan (2X)	7,5
Cebadores	0,5
Templado ADN	2,0
Volumen final	15,0

Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron: 2 min a 50° C, 10 min a 92° C de desnaturalización inicial y 40 ciclos de 15 seg a 92 °C para la desnaturalización y un minuto a 60°C para el alineamiento y elongación del producto. Se emplearon los cebadores y sonda TaqMan para el gen de β-tubulina de *M. fijiensis* referidos por Arzanlou *et al.* (2007).

Se comparó la biomasa fúngica presente en las plantas inoculadas artificialmente (control) con aquellas que inoculadas donde se aplicó el filtrado de cultivo seleccionado. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

Se procedió a la identificación de la cepa bacteriana seleccionada. Se tuvo en cuenta la caracterización cultural, morfológica y molecular realizada en el acápite 3.1 y se realizó el perfil bioquímico mediante las galerías de API 20E y API 50CHB (bioMerieux-ViTek). La identificación se realizó a partir de la base de datos (v4.1), con la ayuda del programa de identificación apiwebTM, donde se introdujeron los resultados de las pruebas (positiva o negativa).

### **3.2.3 Efecto del filtrado de cultivo bacteriano sobre la respuesta de plantas de *Musa***

Se evaluó el efecto de la aplicación del FC seleccionado sobre la respuesta de las plantas en los primeros días posteriores a la inoculación. Se emplearon plantas de banano cv. ‘Grande naine’ obtenidas por cultivo *in vitro* y la inoculación se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el acápite 3.2.2. En todos los ensayos donde se tomaron muestras, estas consistieron en tres plantas seleccionadas al azar por cada tratamiento, se trasladaron al laboratorio y se cortaron las tres hojas inoculadas. Se conservaron en congelación (-80°C) o se procesaron inmediatamente en dependencias de los análisis.

#### **3.2.3.1 Detección histoquímica de compuestos relacionados con la respuesta de defensa en plantas**

Se realizaron ensayos para la detección histoquímica de compuestos relacionados con la respuesta de defensa en plantas tales como: deposición de calosa,

acumulación de anión superóxido, presencia de lignina y compuestos fenólicos. El procedimiento para la inoculación y los tratamientos fueron los descritos en el acápite anterior.

Se tomaron al azar, seis fragmentos de 10 cm<sup>2</sup> de la zona media la tercera hoja inoculada de cada tratamiento a los 3, 6, 10, 14 dpi.

Se cortaron en fragmentos de 1cm<sup>2</sup> y fueron utilizados como muestras para las distintas determinaciones.

Para la detección de calosa, las muestras fueron fijadas en solución amortiguadora de Fosfato de sodio y formaldehído al 10% y deshidratadas con gradientes de alcohol etílico.

Las deposiciones de calosa se visualizaron con una tinción diferencial, mediante el protocolo del ácido periódico 0,5% y el reactivo de Schiff (Merck) propuesto por McManus y Mowry (1964). Las muestras fueron observadas en microscopio óptico (Olympus) con amplificación de 400x y fotografiadas con cámara (Nikon) acoplada al equipo. La presencia de calosa se determinó por la aparición de áreas de color rosa y se observaron tres fragmentos seleccionados al azar por tratamiento.

Para la detección del anión superóxido las muestras fueron infiltradas con solución de NBT (6mM) durante 24 h en oscuridad. La formación de un compuesto de color azul oscuro en el tejido fue indicativo de la presencia del anión superóxido.

Para la detección de compuestos fenólicos se empleó el método colorimétrico descrito por Reeve (1951). Las muestras se colocaron en placas de Petri y se agregó una gota de nitrato de sodio acuoso al 10% (v/v), una gota de ácido acético acuoso al 10% (v/v) y luego una gota de urea acuosa al 20% (m/v). Después de 3 min, se adicionaron dos gotas de NaOH 2N. Los fragmentos vegetales se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos, para ser observados al microscopio óptico Olympus (200x). Se observaron tres fragmentos seleccionados al azar que en presencia de los compuestos fenólicos se observa una coloración roja intensa. Las observaciones fueron fotografiadas inmediatamente.

Las deposiciones de lignina en las paredes celulares se visualizaron utilizando una tinción con solución de fluoroglucina al 1% (m/v) en etanol al 70%, durante cinco minutos (Southerton y Deverall, 1990). Se adicionaron dos gotas de ácido clorhídrico (2N), se enjuagó, se colocó un cubreobjeto y se observó utilizando un microscopio Olympus (400x). Se observaron tres fragmentos por tratamiento, seleccionados al azar. En presencia de lignina se observan áreas de color rojo/rosado (Gahan, 1984). Las observaciones fueron fotografiadas inmediatamente.

### **3.2.3.2 Cuantificación de compuestos enzimáticos y no enzimáticos en hojas de plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* en presencia del filtrado de cultivo bacteriano**

Este estudio se realizó para determinar el efecto del FC sobre la respuesta en plantas de banano cv. 'Grande naine' (compuestos enzimáticos y no enzimáticos) en casa de cultivo en los primeros días posteriores a la inoculación (dpi).

Se colectaron muestras a los 0,3, 6, 10 y 14 días posteriores a la inoculación (dpi) que consistieron en tres plantas por tratamiento de las cuales se tomaron las tres hojas inoculadas.



Los tratamientos en este ensayo fueron: 1) Aplicación del FC, al tiempo de aplicación seleccionado en el acápite 3.2.2.1 en presencia de *M. fijiensis*. 2) Aplicación del FC, al tiempo de aplicación seleccionado sin la presencia de *M. fijiensis*. 3) Plantas inoculadas con *M. fijiensis* (Control inoculado) y 4) Plantas sin inocular (Control).

Se utilizaron 15 plantas por tratamiento y se ubicaron completamente al azar en casa de cultivo.

### **Actividad enzimática**

Para determinar la actividad enzimática (fenilalanina amonio-liasa,  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa, guayacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa) de las plantas en presencia de los FC se utilizaron las hojas de tres plantas por tratamiento. Se homogeneizaron 0,5 g del tejido en nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo preenfriados. Se extrajeron en 2 mL de solución amortiguadora de Sodio-fosfato 0,1 M (pH 7,0), con la adición de inhibidor de proteasa (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich). El homogenizado fue centrifugado a 10 000 g durante 20 min, a 4°C y el sobrenadante fue usado como extracto enzimático para las determinaciones de la actividad enzimática que fueron realizadas por espectrofotometría. Se utilizaron tres réplicas de cada muestra. El contenido de proteínas en las muestras fue determinado mediante el método Bradford modificado, descrito anteriormente.

La actividad enzimática fenilalanina amonio-liasa (PAL) (EC 4.3.1.24) se cuantificó mediante el método descrito por Ross y Sederoff (1992) que se describe brevemente. La mezcla de reacción contenía 50  $\mu$ L de extracto enzimático, 250  $\mu$ L de solución amortiguadora de Tris-HCl a 50 mM (pH 8,8) y 300  $\mu$ L de L-fenilalanina (Fluka) a 1mM, luego fue incubada a temperatura ambiente por 30 min. La reacción se detuvo adicionando HCl a 2N. Posteriormente, se agregaron 1,4 mL de tolueno, se mezcló vigorosamente durante 30 segundos, se centrifugó (1 000 g, 5 min) y se separó la fracción de tolueno que contenía el ácido trans-cinámico. Se registró absorbancia a 290nm contra un blanco de tolueno. Se utilizó una curva patrón con concentraciones conocidas de ácido cinámico (Sigma) en tolueno (Fluka), y se siguió el procedimiento descrito anteriormente. La actividad enzimática se expresó como moles de ácido cinámico liberado  $\text{min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  de proteína.

La actividad enzimática  $\beta$ -1,3 glucanasa (EC 3.2.1.39) se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico (Pan *et al.*, 1991), a través de la determinación de los residuos de azúcares reducidos liberados. Se utilizó laminarín (Sigma) como sustrato y glucosa (Spectrum) como estándar. La mezcla de reacción consistió en 62,5  $\mu$ L de extracto enzimático y 62,5  $\mu$ L de laminarín al 4%, posteriormente se incubó a 40°C, durante 10 min. La reacción se detuvo con la adición de 375  $\mu$ L de ácido dinitrosalicílico (300 mL de NaOH al 4,5% en 880 mL que contenían 8,8 g de ácido dinitrosalicílico y 22,5 g de tartrato de sodio-potasio) y se calentó por 5 min en baño de agua hirviendo. La solución coloreada resultante se diluyó con agua destilada (1:10), se mezcló vigorosamente y se registró la absorbancia a 500nm. El extracto enzimático mezclado con el laminarín al tiempo cero, se usó como blanco. La actividad enzimática se expresó como  $\mu\text{g}$  de glucosa liberada  $\text{min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  de proteínas. La actividad enzimática quitinasa (EC 3.2.1.14) se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico (Tikhonov *et al.*, 2002) con algunas modificaciones, a través de la determinación de los residuos de N-acetilglucosamida mediante espectrofotometría.

Se utilizó quitina coloidal (Sigma) como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 500  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 100  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 M pH 4,7 y 150  $\mu\text{L}$  de la solución de quitina coloidal. Se incubó a 40°C, durante 24 h y posteriormente se centrifugó a 12 000 g durante cinco minutos a 6°C. Se extrajo el sobrenadante y se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de ácido dinitrosalicílico (300 mL de NaOH al 4,5% en 880 mL que contenían 8,8 g de ácido dinitrosalicílico y 22,5 g de tartrato de sodio-potasio) y 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 5M y se calentó por cinco minutos en baño de agua hirviendo, a la solución coloreada resultante se le midió la absorbancia a 582 nm.

La mezcla de reacción a tiempo cero, se usó como blanco. En paralelo se construyó una curva patrón con concentraciones conocidas de quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma) (50-400 U  $\text{mg}^{-1}$ ), bajo las mismas condiciones. La actividad enzimática se expresó como U de quitinasa  $\mu\text{g}$  de proteína.

La actividad guayacol peroxidasa (EC 1.11.1.7) fue determinada mediante un ensayo colorimétrico según Cakmak *et al.* (1993) que se describe a continuación. La mezcla de reacción contenía 1,5 mL de guayacol al 0,05%, 0,5 mL del extracto enzimático y 0,5 mL de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 1%. Se registró la oxidación del guayacol a 470 nm ( $\xi = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), a intervalos de 20 segundos durante 3 min. El extracto enzimático fue calentado en agua hirviendo durante 5 min y fue usado como blanco. La actividad enzimática se expresó como  $\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteínas.

Para determinar la actividad ascorbato peroxidasa (APX) (EC 1.11.1.11) se midió la descomposición del ascorbato a 290 nm durante un minuto. La mezcla de reacción contenía 1 mL de fosfato de sodio 0,1M, 5,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, 40  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM y 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático. La actividad de la enzima se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Gil-ad *et al.*, 2000). Se utilizaron como blanco los mismos reactivos y solución amortiguadora en lugar de la muestra. Se expresó como unidades de enzima (U) por  $\mu\text{g}$  de proteína.

La actividad superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se determinó según Ehsani-Moghaddam *et al.* (2006), mediante espectrofotometría a  $\text{DO}_{560\text{nm}}$ . La mezcla de reacción estaba compuesta por 790  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora (que contenía 86  $\text{mg L}^{-1}$  de Nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich), 234  $\text{g L}^{-1}$  de Tris-HCl y 11,4  $\text{g L}^{-1}$  de EDTA) ajustado a pH 7,5, 400  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 10  $\mu\text{L}$  de riboflavina (44  $\text{mg L}^{-1}$ ). Las muestras se iluminaron con lámpara fluorescente UV (365nm) durante 30 min. La actividad enzimática se determinó como las unidades de enzima que causan el 50% de inhibición del NBT. Se expresó como unidades de enzima (U) por  $\mu\text{g}$  de proteína.

### **Compuestos no enzimáticos**

El efecto de los FC sobre compuestos no enzimáticos (anión superóxido y contenido de fenoles totales) se determinó como se describe a continuación.

Para determinar el contenido de anión superóxido se empleó el método descrito por Doke (1983) que se basa en la reducción del NBT. Las muestras de tejido de cada tratamiento se homogeneizaron en nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo preenfriados. Se adicionaron 2 mL de solución amortiguadora de Sodio-fosfato 0,1 M (pH 7). El homogenizado fue centrifugado a 10 000 g durante 20 min, a 4°C y el sobrenadante fue usado como extracto vegetal. El extracto vegetal (30,0  $\mu\text{L}$ ) se

incubó con 3 mL de tampón fosfato de potasio 0,01 M (pH 7,8) que contenía 0,05% de NBT y  $\text{NaN}_3$  (azida sódica) a 10 mM, durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se calentó a 85°C por 15 min y luego se enfrió a temperatura ambiente. El contenido del anión superóxido se expresó como el incremento de la absorbancia a 580 nm en una hora, por gramo de tejido.

El contenido de fenoles totales se obtuvo mediante la técnica propuesta por Bray y Thorpe (1954). Para ello, se tomaron 0,5 g de tejido de hojas de cada tratamiento, pulverizado con nitrógeno líquido y se les agregaron 10 mL de etanol 80% para la extracción. Las muestras se calentaron a 50°C durante 30 min y se centrifugaron a 8000 g durante 10 min a 4°C. Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se enrasó hasta 3 mL con agua destilada, se agregó 1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma) y 2 mL de carbonato de sodio al 20% (m/v). Las muestras se calentaron durante 10 min en baño de agua hirviendo y posteriormente se enfriaron en agua corriente. La solución se diluyó hasta 10 mL con agua destilada y la intensidad del color azul se midió a 750 nm contra el blanco (1 mL de etanol al 80% en lugar del extracto y se siguió todo el procedimiento descrito anteriormente). Se empleó ácido gálico (Sigma) como estándar a partir del cual se calculó la concentración de fenoles totales de la muestra. El contenido de fenoles se expresó como mg de fenoles por gramo de tejido.

Los valores obtenidos en el estudio bioquímico tanto de enzimas como compuestos no enzimáticos fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

### **3.3 Caracterización del filtrado de cultivo de la cepa bacteriana con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis***

Se realizaron ensayos previos de caracterización del FC (Mena *et al.*, 2014) que evidenciaron la presencia de metabolitos de naturaleza proteica relacionados con la inhibición del crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis*. Además, teniendo en cuenta que la mayoría de los metabolitos antifúngicos producidos por *Bacillus* spp. son de naturaleza peptídica (Klopper *et al.*, 2004), en este acápite se semipurificaron estos metabolitos y se evaluó su actividad antifúngica. También se determinó la presencia actividad lítica y de lipopéptidos en el FC.

#### **3.3.1 Semipurificación de proteínas**

El filtrado de cultivo fue sometido a una precipitación con sulfato de amonio (70%) durante 24 h en agitación a 4°C, luego fueron centrifugados durante 15 min a 4°C y 10 000 g (*Eppendorf*).

El sobrenadante se desechó y el precipitado fue resuspendido en 2 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio (0,01 M, pH=7) y dializado extensivamente mediante membranas de diálisis de 12 kDa (Sigma-Aldrich) contra la solución amortiguadora. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford anteriormente descrito.

Se realizó una electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (12%) (SDS-PAGE) de acuerdo con el procedimiento propuesto por Laemmli y Favre (1973). Después de la electroforesis, el gel fue teñido con el reactivo

*Coomassie Brilliant Blue (Spectrum)*. Para determinar el peso molecular de los metabolitos de naturaleza proteica extraídos de los filtrados bacterianos se compararon las bandas de la corrida electroforética con el marcador de peso molecular de proteínas proporcionado por FERMENTA (11-170 kDa). Los resultados se muestran en las bandas obtenidas en la corrida electroforética.

Se evaluó la actividad antifúngica de la fracción resultante de la precipitación con sales y se comparó con la del filtrado de cultivo. Para ello se empleó el método propuesto por Cruz-Martín *et al.* (2013). Se emplearon tres réplicas de cada uno (precipitado con sales, filtrado de cultivo y control) y se repitió dos veces. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza. Además, se realizaron observaciones microscópicas de las hifas de *M. fijiensis* incubadas conjuntamente con los metabolitos semipurificados, para describir sus características.

### **3.3.2. Actividad de enzimas líticas**

Se determinó la actividad quitinasa y glucanasa del dializado obtenido en el acápite anterior. La actividad quitinasa se determinó según método propuesto por Tikhonov *et al.* (2002). Los valores fueron obtenidos por extrapolación en una curva con concentraciones conocidas de quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma) (50-400 U mg<sup>-1</sup>), bajo las mismas condiciones. La actividad enzimática se expresó como U de quitinasa µg<sup>-1</sup> de proteína.

La actividad enzimática β-1,3 glucanasa se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico (Pan *et al.*, 1991), a través de la determinación de los residuos de azúcares reducidos liberados. Se utilizó laminarin (Sigma) como sustrato y glucosa (Spectrum) como estándar. La actividad enzimática se expresó como U de enzima µg<sup>-1</sup> de proteína.

### **3.3.3 Presencia de lipopéptidos**

Se realizó la extracción, separación e identificación de lipopéptidos presentes en el filtrado de cultivo teniendo en cuenta los protocolos propuestos por Smyth *et al.* (2010). En cada paso del análisis se comprobó la actividad antifúngica. A las fracciones obtenidas, se le adición una suspensión micelial de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83. Las muestras fueron incubadas a 28°C y oscuridad durante 48 h y se realizó observación microscópica de las hifas de *M. fijiensis*.

Se realizó una extracción de líquido-líquido a partir de 50 mL del filtrado bacteriano, con acetato de etilo. Se realizaron tres extracciones (2:1, 1:1 y 1:1 v/v). Se incluyó el medio de cultivo sin inocular como control. A la fracción orgánica se les retiró el solvente por rotoevaporación a 40°C y la fracción acuosa fue liofilizada.

Los extractos obtenidos fueron separados por cromatografía de capa delgada (TLC). Se utilizó como fase móvil: butanol: ácido acético: agua (4:1:1 v/v/v). Se emplearon placas de sílica gel 60F254 (KinLab) y se aplicaron 2,0 µL por muestra. El revelado de las placas se realizó con ninhidrina disuelta en acetona al 0,2% (detección de grupos aminos libres) y vapores de yodo (detección de lípidos). Las placas con ninhidrina se calentaron a 110°C durante 15 min (Das *et al.*, 2008).

Los compuestos que fueron separados mediante esta técnica fueron extraídos de la TLC por raspado y se extrajeron con butanol.

Los compuestos detectados con mayor intensidad en ambas fracciones fueron analizados por espectroscopía Infrarroja para determinar los grupos funcionales y los enlaces químicos presentes. Para ello, se empleó un espectroscopio FTIR marca RayleLEIGH modelo WQF-510 y un marco de lectura desde 400  $\text{cm}^{-1}$  hasta los 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Selección de bacterias de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

#### 4.1.1 Aislamiento de bacterias de la filosfera

Mediante el método empleado se obtuvieron de la filosfera de los seis cultivares de *Musa* utilizados 317 aislados bacterianos, con diferentes caracteres culturales sobre el medio de cultivo Agar para Conteo en Placas.

Se observaron diferencias significativas entre todos los cultivares en cuanto al número de colonias  $\text{cm}^{-2}$  aisladas de tejidos con síntomas y sin síntomas de Sigatoka negra (Figura 5).

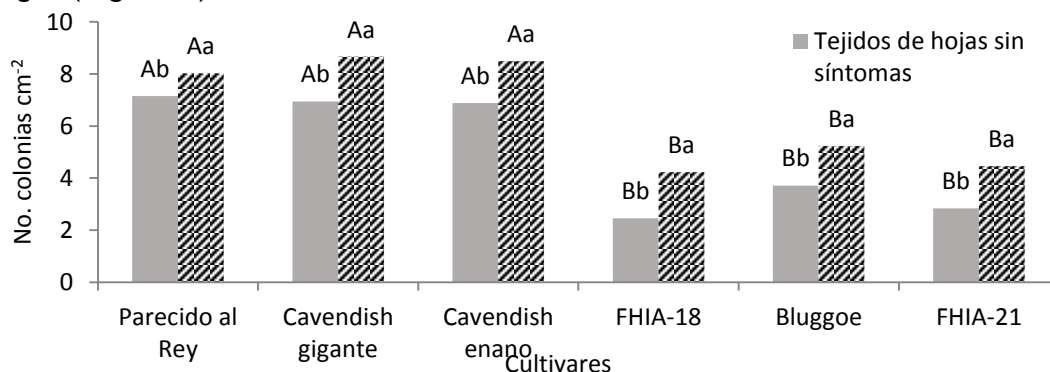


Figura 5. Número de colonias de bacterias aisladas de la filosfera de plantas de *Musa* spp. cultivadas en campo e infectadas naturalmente con *Mycosphaerella fijiensis*. Barras con letras mayúsculas indican diferencias entre cultivares por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,01$  y letras minúsculas indican diferencias en un mismo cultivar por prueba de Mann-Whitney para  $p < 0,01$ .

Se comprobó que en los cultivares susceptibles el número de colonias  $\text{cm}^{-2}$  de tejido fue significativamente mayor tanto en tejido con síntomas como sin síntomas (Figura 5). Estos resultados coinciden con lo referido por Vorholt (2012) quien plantea que el genotipo de las plantas es un factor importante relacionado con la composición de las comunidades bacterianas presentes en la filosfera.

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 encuentran 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  $\text{cm}^{-2}$  de hoja (Vorholt, 2012) y estas dependen de los nutrientes secretados por la planta como resultado de su crecimiento y desarrollo (Gnanamanickam e Immanuel, 2007). En este estudio se constató que la concentración de bacterias también puede depender de la presencia o no de síntomas de la enfermedad para un mismo cultivar. En todos los cultivares el número de colonias  $\text{cm}^{-2}$  aisladas fue significativamente superior en el tejido con síntomas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ceballos *et al.* (2012), quienes encontraron diferencias significativas entre el número de bacterias antagonistas de *M. fijiensis* respecto a la posición de la hoja. Estos autores observaron un predominio de bacterias en las hojas más viejas y asociaron el aumento de la microbiota a la presencia de la enfermedad.

Lo anterior coincide también con hallazgos previos en otros cultivos. Por ejemplo, Suda *et al.* (2009) encontraron un incremento en la cantidad de bacterias en hojas de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) y de bonetero del Japón (*Euonymus japonicus* Thunb) cuando estas presentaban enfermedades foliares como Mildiu polvoriento (*Podosphaera fusca* (Fr.) y *Erysiphe cichoracearum* (DC.) 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 la microbiota 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. Lo anterior fue comprobado por Rodríguez-Gaviria y Cayón (2008), en el patosistema *Musa-M. fijiensis*, quienes encontraron variaciones en los niveles de almidón, azúcares totales y reductores, en relación con la severidad de la infección en hojas de plantas de 'Grande naine' (*Musa* AAA) y estas transformaciones pueden favorecer el establecimiento de las bacterias.

Con el método empleado se observaron halos de inhibición del crecimiento fúngico ocasionados por las bacterias inoculadas (Figura 6). Se lograron seleccionar 19 aislados (6,0%) con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. De estos, el 78,9% provenía de tejidos con síntomas de Sigatoka negra y el 73,6% de cultivares resistentes (Anexo 2).

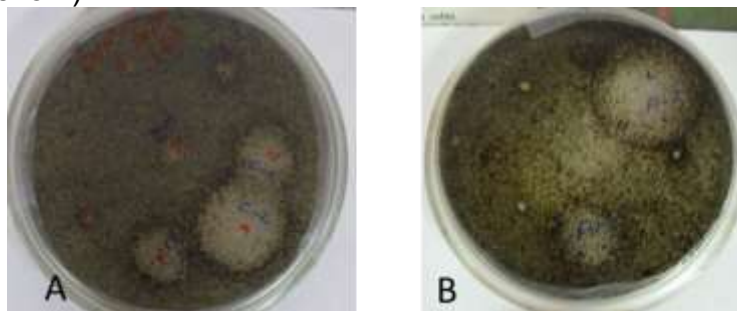


Figura 6. Halos de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* a las 72 h de incubación ocasionados por aislados bacterianos de la filosfera de *Musa* spp. Cultivo dual en medio de cultivo PDA con inoculación de las bacterias por punción. Placas de Petri de 90,0 mm de diámetro. A) Cara superior de la placa B) Reverso de la placa.

El hecho de encontrar 19 aislados bacterianos de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* indica que la microbiota de este cultivo tiene potencialidades para defender a las plantas de los agentes patógenos. Otros autores han informado resultados similares. Por ejemplo, Osorio *et al.* (2004) y Salazar *et al.* (2006) refirieron presencia de bacterias epifitas con potencial biorregulador contra *M. fijiensis* en plantas 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 (*Fusarium semitectum* (Berk y Ravenel) y *Colletotrichum musae* (Berk y Curtis)) en bananos con la aplicación poscosecha de *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) 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. También en otro patosistema, Chowdappa *et al.* (2013) plantearon factible el control biológico de *Alternaria solani* (Sorauer) y *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, causante del tizón temprano y tardío del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a través de microorganismos epifitos seleccionados. Estos 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 aisladas en este acápite, asociadas con hojas de bananos y plátanos, podrían emplearse como antagonistas contra *M. fijiensis*.

#### **4.1.2 Caracterización de los aislados**

Como resultado del estudio microscópico y tintorial de las cepas analizadas se obtuvo que del total de aislados (19), el 89,4% fueron Gram+ y predominó la morfología bacilar (94,7%); sólo un aislado presentó forma de cocos.

Se identificaron tres familias. El 52,6% de los aislados seleccionados (10) correspondieron a la familia *Bacillaceae*, el 10,5% a *Pseudomonadaceae* (2), el 5,3% a *Micrococcaceae* (1) y el 31,5% (6) 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 a la producción de sustancias con actividad antifúngica que les permiten la subsistencia y competencia en condiciones ambientales desfavorables. En este sentido, Todar (2003) refirió que el predominio de bacterias asociadas a plantas 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 adición a lo anterior, Setlow (2006) apuntó que la formación de una espora 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. Por otra parte, 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, 2002).

Los 19 aislados caracterizados, se incorporaron a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP con la nomenclatura CCIBP- Código de la cepa (Ej.CCIBP-C5).

Para continuar los ensayos de este trabajo de tesis se seleccionaron las 10 cepas pertenecientes a la familia *Bacillaceae*: CCIBP-A2, CCIBP-A3, CCIBP-A5, CCIBP-B1, CCIBP-B.1; CCIBP-B2, CCIBP-B3, CCIBP-B4, CCIBP-B5 y CCIBP-C5.

Además, en este estudio se comprobó que las bacterias aisladas de la filosfera de bananos y plátanos fueron capaces de degradar varios sustratos diferentes. El 20,0% de los aislados hidrolizó el almidón, el 65,0% la caseína, el 60,0% la gelatina y el 35,0% produjo indol (Anexos 3-6) Estas características evidenciaron que poseen capacidades metabólicas diversas.

#### 4.1.3 Caracterización de la actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*

##### *Cuantificación de la actividad antifúngica*

El método de cultivo dual empleado permitió cuantificar la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas bacterianas del género *Bacillus* frente *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 (Figura 7).



Figura 7. Actividad antifúngica *in vitro* de diferentes cepas de *Bacillus* spp. frente a *M. fijiensis* en cultivo dual en medio de cultivo PDA después de 72h de incubación a 28°C y oscuridad.

Se observaron halos de inhibición a las 72 h de incubación que variaron en diámetro en dependencia de la cepa evaluada, estos oscilaron entre 28,7 y 40,6 mm. Se constataron diferencias significativas entre las cepas según los diámetros de los halos de inhibición obtenidos (Tabla 2).

Una de las características que distingue a *M. fijiensis* es su hábito de crecimiento en medios de cultivo sólidos que se caracteriza por ser lento, con micelio duro y compacto. Esto resulta una desventaja cuando se van a realizar ensayos de actividad antifúngica, ya sea de controles biológicos como de nuevos productos químicos ya que no es posible medir acertadamente si se afecta o no su crecimiento. Teniendo en cuenta lo anterior, el método empleado, brinda resultados más confiables y rápidos en relación con el tradicionalmente usado para la evaluación de la actividad antifúngica frente a este patógeno que se basa en la medición del diámetro de la colonia (Mosquera *et al.*, 2009).

De las diez cepas evaluadas, cuatro (40,0%) produjeron ambos tipos de metabolitos y una (CCIBP-B2) ninguno de ellos bajo las condiciones evaluadas. Estos resultados evidenciaron que la microbiota 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 controles biológicos.



Tabla 2. Actividad antifúngica *in vitro* de diferentes cepas de *Bacillus* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* CCIBP-Pf-83 en cultivo dual a las 72h de incubación.

Cepas	Halos Inhibición (Radio, mm)		Metabolitos	
	Medias	Rangos medios	difundidos	volátiles
CCIBP-A2	28,7	72,5 c	+	+
CCIBP-A3	33,0	95,1 b	-	+
CCIBP-A5	32,0	92,4 b	+	-
CCIBP-B1	29,4	88,2 c	+	+
CCIBP-B.1	29,5	78,7 c	+	-
CCIBP-B2	29,7	73,3 c	-	-
CCIBP-B3	40,6	155,8 a	+	-
CCIBP-B4	34,5	119,7 b	+	+
CCIBP-B5	33,8	105,9 b	+	+
CCIBP-C5	35,7	109,3 b	+	-

Valores de rangos medios con letras desiguales indican diferencias entre las medias según Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0,05$ .

Se logró determinar que hubo inhibición del crecimiento del patógeno por la producción de metabolitos antifúngicos difundidos en el 80,0% las cepas. A excepción de: CCIBP-A3, y CCIBP-B2 el resto mostró actividad antifúngica por presencia de metabolitos difundidos. El método empleado resultó efectivo para caracterizar la actividad antifúngica de las diez cepas evaluadas frente a *M. fijiensis* (Tabla 2, Figura 8).



Figura 8. Actividad antifúngica por producción de metabolitos difundidos de cepas bacterianas de *Bacillus* spp. 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 otros autores al emplear un método similar. Por ejemplo, Montealegre *et al.* (2003) al evaluar cepas de *B. subtilis* y *Bacillus lentimorbus* (Dutky) frente a *Rhizoctonia solani* Kühn (cepa 618). Además, Rahman *et al.* (2007) con este método, demostraron que el

crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides* (Pers.) fue completamente inhibido por sustancias difundidas por *Burkholderia cepacia* (Yabuuchi) y *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) después de siete días de incubación.

Se comprobó además, que la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción de metabolitos volátiles en el 50,0% de las cepas (Figura 9).

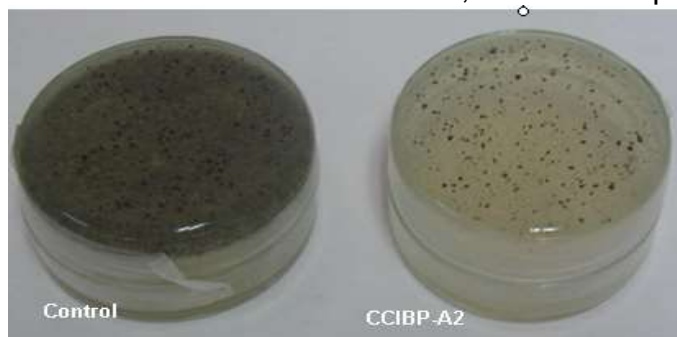


Figura 9. Actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* spp. frente a *M. fijiensis* CCIBp-Pf-83 por producción de metabolitos volátiles a las 48 h de incubación.

Muchas especies de *Bacillus* han sido considerados como inocuas para la salud humana. Abundantes ejemplos son referidos en la literatura científica sobre su capacidad de sintetizar varias sustancias que han sido empleadas con éxito en la agricultura y la industria (Stein, 2005). Por ejemplo, los metabolitos secundarios producidos por cepas de este género, han sido estudiados como potentes antimicrobianos frente a disímiles microorganismos fitopatógenos (Beric *et al.*, 2012). Sumado a esto, la capacidad de crecer rápido en medios de cultivo sintéticos y de producir esporas, extremadamente resistentes, hacen de estas bacterias candidatos ideales como agentes de biocontrol. Según Cawoy *et al.* (2011), cerca de la mitad de los bioproductos, presentes en el mercado, fueron obtenidos a partir de especies de *Bacillus*. Teniendo en cuenta estos criterios, los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento fúngico, así como por presencia de metabolitos difundidos con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* se seleccionaron las cepas de *Bacillus* CCIBP-B3 y CCIBP-C5 para realizar los experimentos posteriores.

Los resultados de este acápite evidenciaron que en la filosfera de *Musa* spp. existen bacterias con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y que fue posible aislar candidatos bacterianos con esta propiedad. Entre las bacterias aisladas predominaron las del género *Bacillus* capaces de producir metabolitos difundidos con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.

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

### **4.2.1 Determinación del efecto de los filtrados de cultivo sobre el patógeno**

#### **4.2.1.1 Efecto sobre germinación de conidios y ascosporas**

Los filtrados de cultivo evaluados no inhibieron la germinación de ascosporas de *M. fijiensis* a la concentración evaluada. Sin embargo, se observaron deformaciones en los tubos germinativos como hinchamiento en los bordes apicales.

Este resultado se corresponde con afectaciones a nivel de organelos en ascosporas de *M. fijiensis* en presencia del filtrado de cultivo bacteriano de los géneros *Bacillus* y *Serratia*, que fueron descritos por Riveros *et al.* (2003), quienes observaron en microscopio electrónico fuerte presencia de glóbulos osmofílicos electrodensos en comparación con el control. Estos autores demostraron el efecto inhibitor de bacterias quitinolíticas y glucanolítica sobre la germinación de ascosporas y el crecimiento de colonias de este patógeno. Las deformaciones observadas también fueron descritas por Osorio *et al.* (2004), en un ensayo *in situ* sobre discos de hojas con bacterias quitinolíticas aisladas del filoplanio de banano. Tal efecto, en parte, fue explicado por la actividad de las enzimas quitinolíticas sobre la pared del patógeno. Similares deformaciones encontradas en las ascosporas y el tubo germinativo han sido descritas en otros patógenos ante la presencia de lipopéptidos bacterianos (Souto *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2011).

A diferencia de las ascosporas, la germinación de conidios *in vitro* se vio afectada significativamente por la presencia de los filtrados bacterianos (Figura 10).

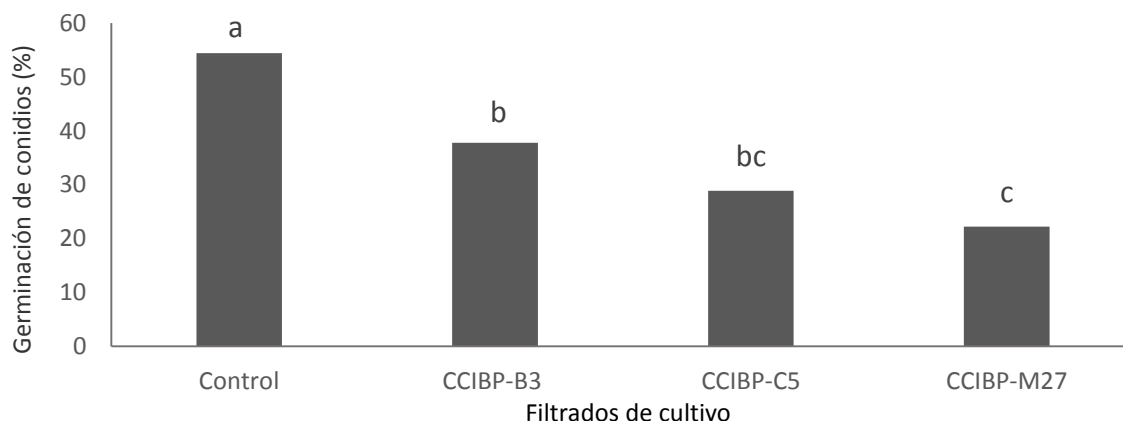


Figura 10. Efecto de filtrados de cultivo bacterianos sobre la germinación de conidios a las 48h de incubación. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$  ( $n=9$ ). Cepa control *Bacillus subtilis* CCIBP-M27.

La germinación de conidios disminuyó significativamente cuando fueron expuestos durante 48 h a los FC de las tres cepas. Se observaron deformaciones en los conidios y en el tubo germinativo en presencia del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5, así como de la cepa control *B. subtilis* (Figura 11).

En correspondencia con los resultados obtenidos, varios autores han encontrado inhibición de la germinación de conidios de otros hongos patógenos al ser tratados con filtrados de cultivo bacterianos. Por ejemplo, Romero *et al.* (2007a) encontraron deformaciones en la morfología de conidios de *P. fusca* en presencia de lipopéptidos de *B. subtilis*. En este caso, la microscopía electrónica reveló depresiones, pérdida de turgencia y ausencia de apresorios.

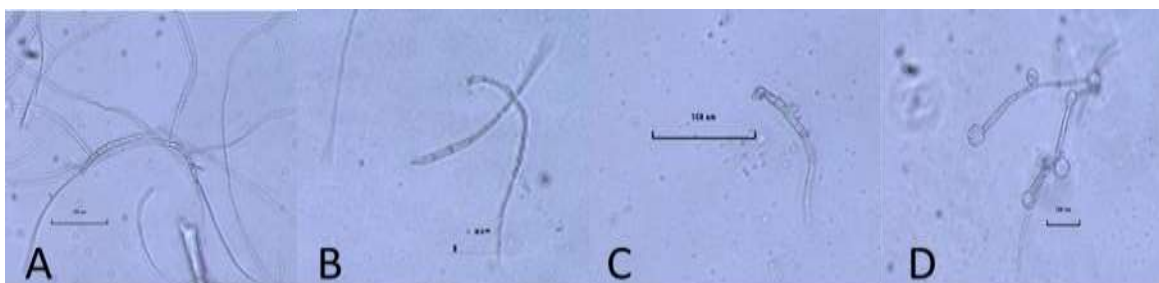


Figura 11. Deformaciones del micelio y conidios de *M. fijiensis* observado a las 48 h de incubación en presencia del filtrado de cultivo de las cepas una concentración de 1:10 (v/v): A) Control, B) CCIBP-B3, C) CCIBP-C5 y D) Cepa control *B. subtilis* CCIBP-M27.

Deformaciones similares a las observadas en presencia de los filtrados de las cepas CCIBP-C5 y *B. subtilis* CCIBP-M27 fueron descritas por Makovitzki *et al.* (2007) en hifas de *Cochliobolus heterostrophus* (Drechsler) y esporas de *Botrytis cinerea* (Kühn) cuando se les aplicó un lipopéptido. Estos autores observaron la salida del contenido intracelular en forma de burbujas en los extremos de los conidios. También, autores como Ruangwong *et al.* (2012) encontraron estructuras globulares o hinchamientos en los extremos de los conidios por la acción de lipopéptidos (iturinas) presente en el filtrado de cultivo de *B. subtilis* en *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig).

Los filtrados de cultivo de las cepas estudiadas afectaron las estructuras de reproducción de *M. fijiensis* e inhibieron significativamente la germinación de los conidios *in vitro*. Estos últimos junto a las ascosporas constituyen la fuente de inóculo y dispersión de este patógeno. Teniendo en cuenta los daños provocado por los FC a estas estructuras, se pudiera presuponer que, en condiciones naturales, podrían reducir la concentración del patógeno capaz de producir infección, por lo que estos hallazgos realzan el efecto antifúngico de los FC y justifican su estudio como agentes de biocontrol.

#### 4.2.1.2 Efecto sobre el micelio

Los filtrados de cultivo de las dos cepas evaluadas inhibieron significativamente el crecimiento de *M. fijiensis* (Figura 12).

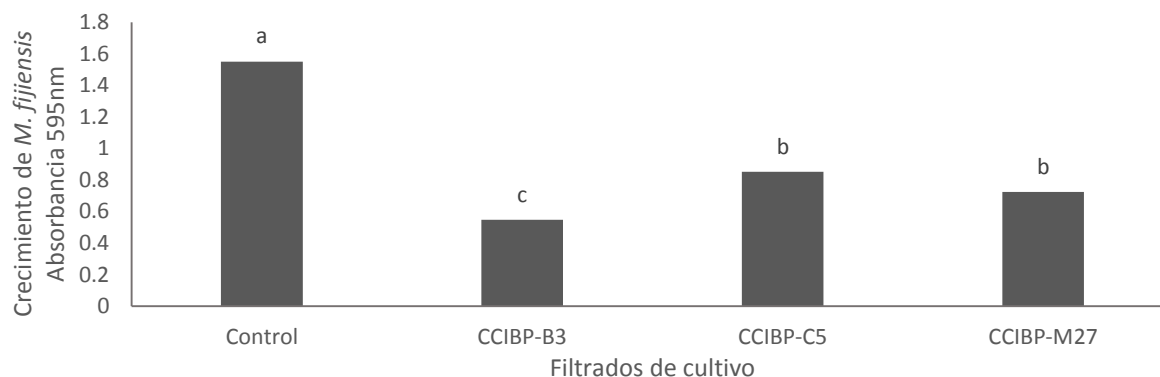


Figura 12. Crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 en medio de cultivo líquido en presencia de filtrados de cultivo bacterianos (1:10 v/v) después de 48 h de incubación. Letras

diferentes sobre barras indican diferencias significativas por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$  ( $n=9$ ). Cepa control *Bacillus subtilis* CCIBP-M27.

Además, mediante el análisis microscópico se pudo constatar que los filtrados de cultivo de las cepas evaluadas provocaron daño sobre el micelio de *M. fijiensis* al ser expuestos a estos durante 48 h.

Se observaron deformaciones en el micelio de *M. fijiensis* en presencia de los filtrados de cultivo como vacuolización e hinchamientos (Figura 13 A). Además, se observó un aumento de la coloración en los extremos apicales de las hifas cuando estas fueron teñidas con una solución de rojo congo (Figura 13 B).

El rojo congo, es un colorante que tiene afinidad por la quitina, la cual no se encuentra en la zona de crecimiento activo de las hifas de los hongos (Nielsen *et al.*, 2001). Según Moreno *et al.* (2006), cuando se inhibe el crecimiento de la célula, la coloración con el rojo congo se incrementa en los extremos apicales de las hifas. Por tanto, los resultados evidenciaron que los filtrados de cultivo actúan sobre las hifas de *M. fijiensis* e inhiben su crecimiento. Estos resultados concuerdan con los observados en los acápites anteriores sobre el efecto antifúngico de los metabolitos difundidos de las cepas bacterianas.

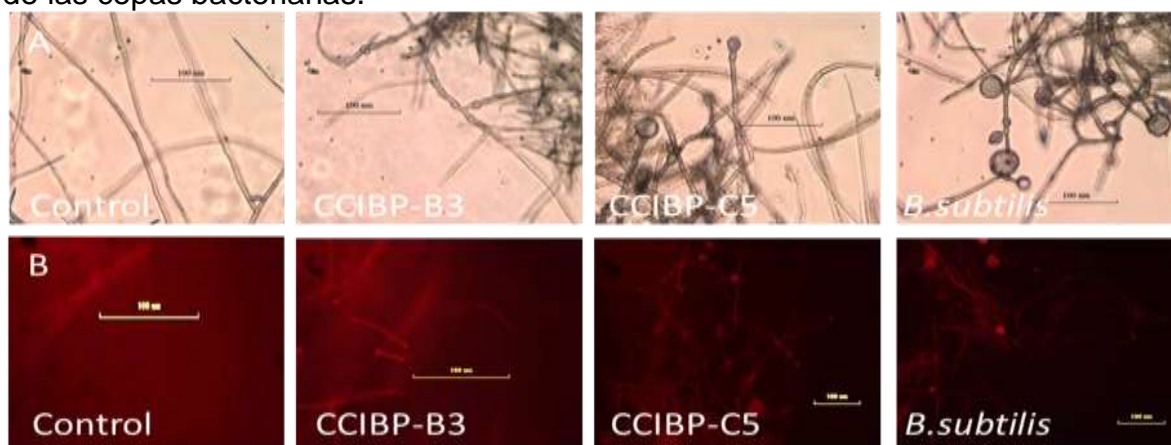


Figura 13. Deformaciones de las hifas de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 observadas a las 48 h de incubación en presencia de filtrados de cultivo bacterianos A) luz blanca 400x B) Tinción con rojo congo (microscopio fluorescente, filtros G-2E/C Trit C (Ex 526-553 nm). Cepa control *Bacillus subtilis* CCIBP-M27.

Los filtrados de cultivo de las cepas CCIBP-C5 y de la cepa control *B. subtilis* CCIBP-M27 provocaron cambios morfológicos en el micelio de *M. fijiensis*. Se observaron abultamientos fundamentalmente en los extremos de las hifas. Deformaciones similares se han descrito en hifas de *R. solani* debido a la acción de una bacisubina (un tipo de lipopéptido), previamente purificada a partir de *B. subtilis* (Liu *et al.*, 2007). Por su parte Zhou *et al.* (2008), observaron deformaciones en la morfología del micelio de *Penicillium expansum* (Link.) por la presencia de filtrados de cultivo de *Paenibacillus polymixa* (Prazmowski) y lo atribuyeron a que probablemente metabolitos de naturaleza peptídica actuaron sobre la membrana celular del hongo y alteraron su permeabilidad.

Igualmente, autores como Moreno *et al.* (2006) observaron el daño y la degradación de la membrana celular plasmática de *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr al ser tratado con proteínas antifúngicas purificadas de *Aspergillus giganteus* (Mattlet) y determinaron que estas proteínas inducían permeabilización y formación de un poro en la membrana plasmática, penetraban, se adherían al núcleo y provocaban cambios en la estructura del ADN. También Senthilkumar *et al.* (2007), encontraron similar respuesta al exponer el micelio de *Rhizoctonia bataticola* (Butler) a filtrados de cultivo de *Paenibacillus* sp. Cepa HKA-15. Además, Alvindia y Natsuaki (2009) observaron la formación y ruptura así como, abultamientos en el extremo apical de las hifas de *Lasioidiplodia theobromae* (Griffon y Maubl), cuando fueron inoculadas conjuntamente con *B. amyloliquefaciens* DGA14 en medio de cultivo líquido.

### Daño oxidativo

Se constató el estrés oxidativo provocado en el micelio cuando se aplicaron los FC que provocó daños a nivel de lípidos y/o proteínas en dependencia de la cepa (Figura 14).

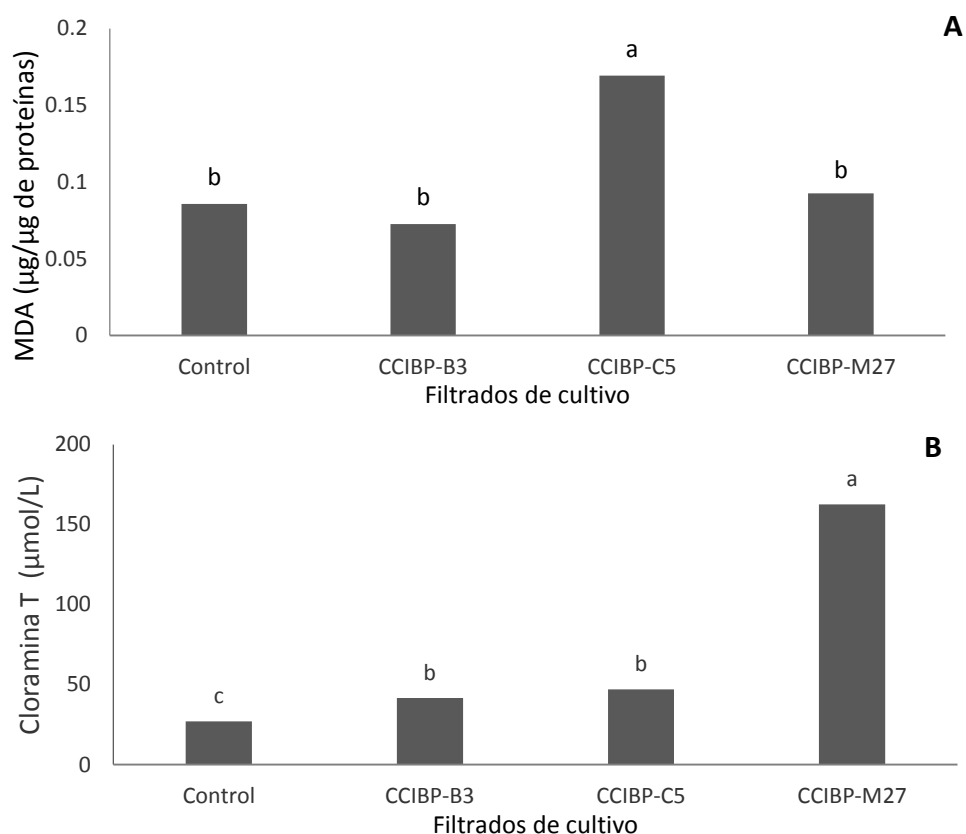


Figura 14. Cuantificación de estrés oxidativo del micelio de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 en presencia de filtrados de cultivo bacterianos a las 48 h de incubación. A) Medida de la producción de malondialdehído (MDA) como resultado de la lipoperoxidación de membrana en micelio y medio de cultivo). B) Medida de la producción de compuestos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP). Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . Cepa control *Bacillus subtilis* CCIBP-M27.

Se observó un incremento significativo en las concentraciones de MDA cuando fue aplicado el FC de la cepa CCIBP-C5 (Figura 14 A). El resto de los filtrados a las concentraciones evaluadas, no registraron cambios en los niveles de lipoperoxidación.

Los lípidos representan el grupo de moléculas más susceptible al daño por las especies reactivas de oxígeno (ROS), específicamente los insaturados que son fácilmente oxidables (Yin *et al.*, 2011). El estrés oxidativo estimula los procesos de peroxidación lipídica y en este sentido, las membranas fúngicas son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, de ahí que este proceso dañe directamente la estructura de la membrana celular e indirectamente a otros componentes celulares. Uno de los productos finales de la peroxidación de los ácidos insaturados es el malondialdehído (MDA) y se ha utilizado como marcador de daño oxidativo en tejidos animales y vegetales (Ayala *et al.*, 2014).

Según Beltrán-García *et al.* (2006), una amplia gama de fungicidas químicos de una forma directa o indirecta forman especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que modifican el patrón de crecimiento de muchos patógenos fúngicos al inducir peroxidación de lípidos. Teniendo en cuenta este criterio y los resultados alcanzados se puede sugerir que la actividad antifúngica del FC de la cepa CCIBP-C5 puede estar relacionada con daño oxidativo sobre las membranas de *M. fijiensis* y está en correspondencia con las deformaciones observadas en el micelio fúngico y sobre los conidios y ascosporas.

Las proteínas son otros de los componentes biológicos que sufren el daño oxidativo por el ataque de radicales libres y al comprobar el daño a nivel de proteínas se observó un incremento en la concentración de PAOP en el micelio incubado durante 48 h con los FC de las dos cepas analizadas con respecto al control, aunque inferior al FC de la cepa de *B. subtilis* CCIBP-M27 (Figura 14B).

La interacción de los radicales libres de oxígeno con las proteínas da lugar a una oxidación de los restos laterales de aminoácidos, lo cual puede traducirse en una pérdida o modificación de la función biológica que desempeñan. Mediante reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación, las proteínas atacadas por radicales dan lugar a los productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP). Aunque no tan utilizado en los estudios relacionados con el estrés oxidativo como la lipoperoxidación, varios investigadores aseguran que constituye un marcador de daño oxidativo (Riverón-Forment *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos relacionados con el daño oxidativo a lípidos y proteínas, constituyentes principales de las membranas celulares, permiten en parte explicar las deformaciones observadas en el micelio y las estructuras de reproducción de *M. fijiensis* al ser expuesto los FC de la cepa CCIBP-C5 y la cepa empleada como control. Autores como Wang *et al.* (2002) destacan que cambios en la membrana plasmática representan el primer paso de una cascada de eventos que promueven un desbalance osmótico interno y una desorganización citoplasmática. Es característico de estos procesos la formación de abundantes vacuolas, el incremento de la agregación del citoplasma y la pérdida de organelos.

#### *Efecto sobre la integridad de la membrana citoplasmática*



En cuanto a la pérdida de electrolitos se confirmó el efecto de los FC evaluados sobre la membrana citoplasmática de *M. fijiensis* ya que se observó un aumento significativo del contenido de los iones potasio en el medio de cultivo, con respecto al control para las dos cepas y sin diferencias con la cepa de *B. subtilis* CCIBP-M27 empleada como control, lo cual sugiere un cambio en la permeabilidad de las membranas plasmáticas o aperturas de poros en estas, inducidas por la presencia de los filtrados de cultivo (Figura 15).

Según Cotoras *et al.* (2004) una medida indirecta del efecto de compuestos antifúngicos en la integridad de la membrana citoplasmática de hongos, es la determinación de la salida de iones intracelulares al medio de incubación, lo cual se demostró en este ensayo.

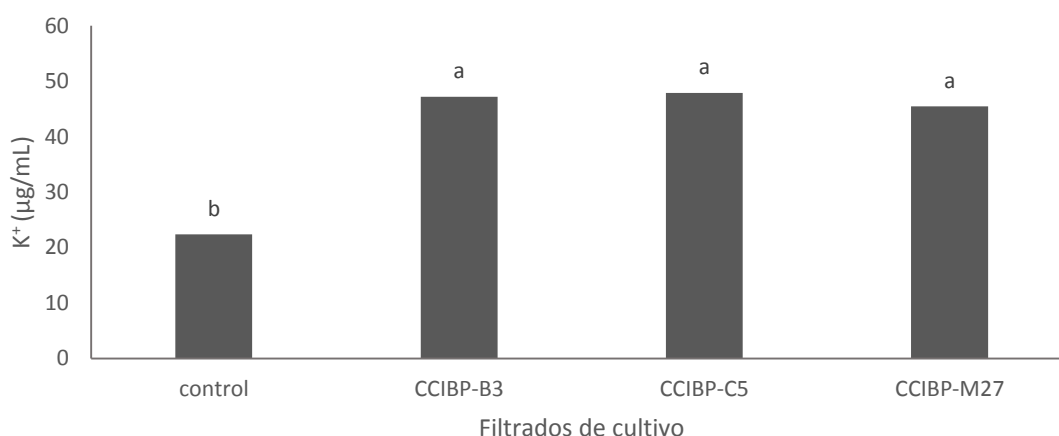


Figura 15. Contenido de iones Potasio en el medio de cultivo, eliminados por el micelio de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 en presencia de filtrados de cultivo bacterianos a las 48 h de incubación. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . Cepa control *Bacillus subtilis* CCIBP-M27.

En este sentido, se ha descrito que el daño provocado por la acción lítica de las enzimas glucanasas y quitinasas sobre el micelio fúngico puede ocasionar la pérdida de electrolitos. También, se ha demostrado que algunos metabolitos secundarios con efecto antifúngico, como lipopéptidos, tienen como modo de acción, afectar la integridad de la membrana citoplasmática. Por ejemplo, Aranda *et al.* (2005) informaron que la toxicidad de las iturinas frente a hongos, está basada en la perturbación osmótica y la consecuente formación de poros conductores de iones. Este hecho fue confirmado por Hsieh *et al.* (2008) y López *et al.* (2009), quienes relacionaron alteraciones a nivel de membrana provocadas por iturinas y surfactinas respectivamente, con la salida de iones potasio.

Varios son los hallazgos que justifican cómo los metabolitos excretados por los antagonistas tienen efecto sobre la estructura del micelio de los hongos fitopatógenos. En este sentido, Liu *et al.* (2010) observaron deformaciones en hifas de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Walker) al ser incubadas con una proteína E2 purificada a partir de filtrados de cultivo de *B. subtilis*. Esta proteína tuvo actividad inhibitoria del crecimiento micelial en varios patógenos, sin embargo, no se detectó



actividad lítica alguna (quitinasa, glucanasa y proteasa). Estos autores, con las deformaciones observadas no lograron dilucidar el mecanismo de acción de esta proteína. Estos criterios sugieren la presencia de además de enzimas líticas, de otros compuestos producidos por las bacterias con efecto sobre el micelio fúngico. Por su parte, Alvarez *et al.* (2011) identificaron metabolitos de tipo lipopéptido en el filtrado de cultivo de cepas de *B. amyloliquefaciens* capaces de producir similares deformaciones en el micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (de Bary).

Las proteínas son, al igual que los lípidos, componentes principales de las membranas celulares. Alteraciones en estos dos compuestos producto de un daño oxidativo, como los provocados por los FC de la cepa CCIBP-C5, pueden afectar de forma severa la funcionabilidad celular. Según Wasternack (2007) entre las principales consecuencias de la peroxidación de las membranas se encuentran la descompartimentación de iones, la pérdida del potencial de membrana y la inhibición del transporte de metabolitos, lo que conlleva a la muerte celular. Los resultados encontrados en cuanto al daño oxidativo sobre estos dos compuestos pudieran ser la causa de la pérdida de electrolitos (potasio) observados anteriormente. Ya sea por cambios conformacionales que conllevaron a un aumento de la permeabilidad o por la apertura de poros en las membranas. Además, estos daños pudieran ser consistentes con las deformaciones observadas a nivel de ascosporas, conidios y micelio así como la inhibición de su crecimiento, al ser expuesto a los FC.

Los resultados obtenidos en este acápite indicaron que los FC de las cepas en estudio, actuaron a nivel de pared y/o membrana plasmática, y provocaron daños al micelio fúngico, que inhibieron su crecimiento. Estos daños pudieran estar provocados por enzimas líticas o lipopéptidos. Además, se comprobó la diferencia entre las cepas en cuanto a los mecanismos involucrados en la actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*.

#### **4.2.2 Efecto de los filtrados de cultivo bacterianos sobre la expresión de la enfermedad**

##### **4.2.2.1 Determinación del efecto de filtrados de cultivo bacterianos sobre la expresión de la enfermedad en plantas de ‘Grande naine’**

El efecto de los filtrados de cultivo sobre el desarrollo de la enfermedad en casa de cultivo dependió de las cepas evaluadas así como del momento de su aplicación. En presencia de los filtrados bacterianos tres días antes (A) o tres días después (D) de la inoculación con *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 se observaron síntomas típicos de la enfermedad en casa de cultivo según lo descrito previamente por Alvarado-Capó *et al.* (2003). El período de incubación para todos los tratamientos fue de 14 días. Las demás variables epifitológicas propuestas por Leiva-Mora *et al.* (2010), variaron respecto al control en los diferentes tratamientos (Tabla 3).

En todos los tratamientos el patógeno completó el ciclo de la enfermedad, ya que se observaron lesiones necróticas con centro seco en el período evaluado. Sin embargo, las plantas que fueron inoculadas con el filtrado de cultivo de la cepa de CCIBP-C5 D así como la de *B. subtilis* CCIBP-M27 A no alcanzaron el estado de síntomas 5 (Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo), según escala cualitativa propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003) y se retardó en 28 días la aparición de

lesiones necróticas con centro seco respecto al control. Para el resto de los tratamientos el TES se retrasó por 21 días.

Tabla 3. Variables epifitológicas evaluadas en casa de cultivo en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) inoculadas con *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 y filtrados de cultivo bacterianos.

Tratamientos	Tiempo de evolución de los síntomas (TES) (días)	Tiempo de desarrollo de la enfermedad (TDE) (días)
Control Inoculado	27	42
CCIBP-B3 A	48	63
CCIBP-B3 D	48	63
CCIBP-C5 A	48	63
CCIBP-C5 D	55	70
CCIBP-M27 A	55	70
CCIBP-M27 D	48	63

En las plantas del tratamiento control a los 70 dpi las hojas se observaron completamente necrosadas (Figura 16). Sin embargo, las plantas en presencia de los FC en ambos momentos de aplicación mantenían abundante tejido verde, las lesiones se aparecieron de forma aislada y nunca coalescieron.

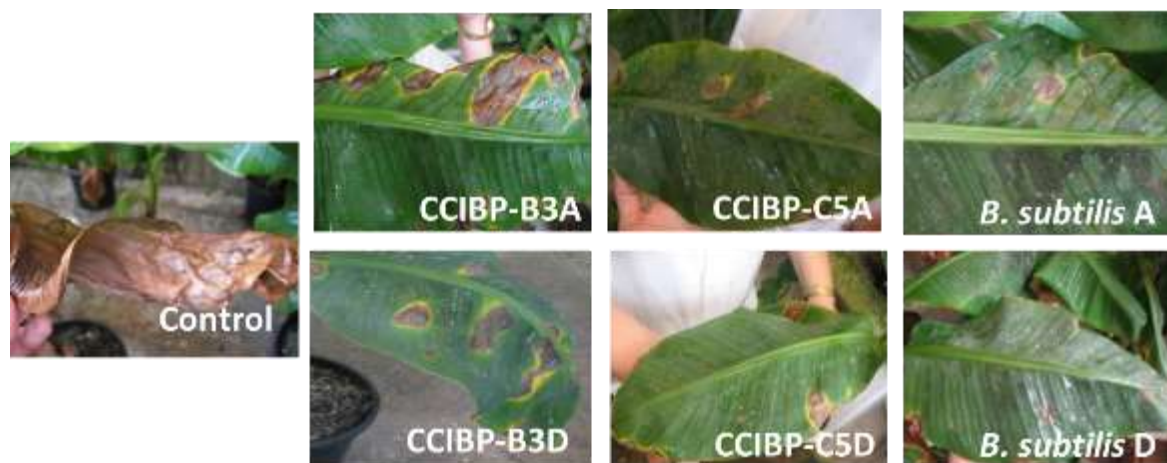


Figura 16. Síntomas de Sigatoka negra en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) inoculadas artificialmente en casa de cultivo a los 70 dpi con la aplicación de filtrados de cultivo bacterianos. Cepa *Bacillus subtilis* CCIBP-M27 utilizada como control.

Los resultados de este estudio se corresponden con los obtenidos por otros autores con filtrados de cultivo bacterianos para el control de enfermedades fúngicas. Por ejemplo, Yoshida *et al.* (2001) lograron el control de antracnosis en mora (*Morus alba* L.) causada por *Colletotrichum dematium* (Pers.), con la aplicación de filtrados de cultivo de la cepa RC-2 de *B. amyloliquefaciens*. Estos autores encontraron que el cultivo libre de células, controló la enfermedad cuando fueron aplicados antes o junto

con la inoculación del patógeno, no siendo así cuando se aplicó posterior a su inoculación. Es probable, para estos casos, que los compuestos que se liberan al medio de cultivo tengan acción inhibitoria directamente sobre el patógeno, como se observó en los experimentos *in vitro* de este trabajo de tesis, pero además, sean inductores de la resistencia al ser inoculados sobre plantas.

El análisis del ABCPE indicó que el FC de la cepa CCIBP-C5 aplicado después de la inoculación de *M. fijiensis*, mostró diferencias significativas con respecto al control (Figura 17) al igual que el de la cepa *Bacillus subtilis* CCIBP-M27 pero aplicado antes de la inoculación. Esta variable permite cuantificar la cantidad de enfermedad en un periodo determinado y su valor inferior al control es indicativo de la reducción de la acción del patógeno sobre la planta o una reducción del inóculo inicial.

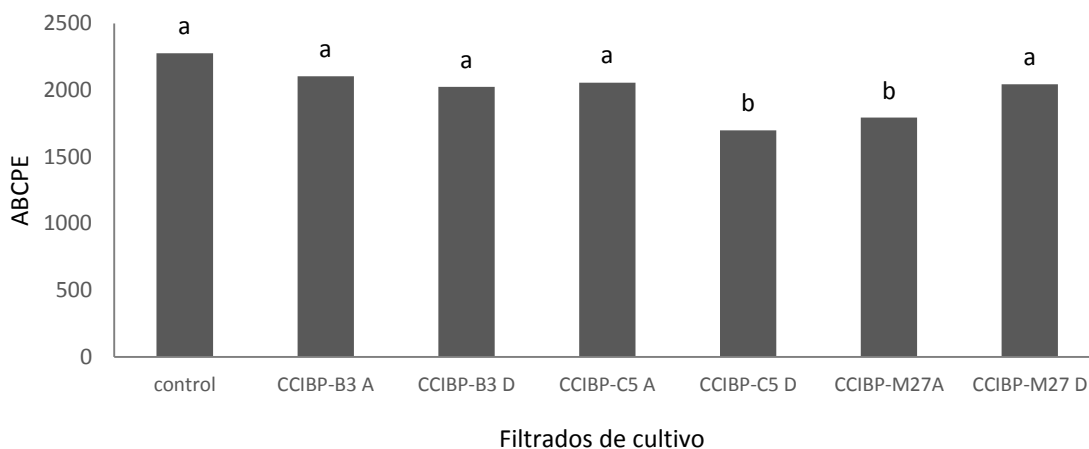


Figura 17. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) en plantas de 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) inoculadas con *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 en casa de cultivo y en presencia de filtrados de cultivo bacterianos de cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (A. antes de inocular el patógeno, D. después). Letras desiguales sobre barras indican diferencias significativas según prueba de Kruskal Wallis /Mann Whitney para  $p < 0,05$ . Cepa *Bacillus subtilis* CCIBP-M27 utilizada como control.

El resultado obtenido con la cepa CCIBP-C5 después de la inoculación evidencia una acción sobre *M. fijiensis*. Esto podría estar en correspondencia con los resultados de los estudios anteriores en condiciones *in vitro* de acción sobre el micelio y de inhibición del crecimiento (acápite 4.2.1.2). Por otra parte, se pone de manifiesto la diversidad de respuestas asociadas al tipo de cepa en condiciones de cultivo similares e indica el potencial de las bacterias aisladas de la filosfera de *Musa* para elaborar bioproductos con diferentes mecanismos de acción.

La variable ABCPE, para los tratamientos con el FC de la cepa CCIBP-B3 no mostró diferencias significativas respecto al control a pesar de presentar un mayor halo de inhibición *in vitro* respecto a la cepa CCIBP-C5. Según Chan *et al.* (2003) el ensayo de difusión en agar es un método de selección para microorganismos antagonistas, ya que es práctico para probar un amplio número de aislados respecto a los ensayos en plantas. También, Vorholt (2012) refiere que numerosas bacterias pueden producir antibióticos en condiciones de laboratorio, sin embargo, la significación de esta producción en las plantas no ha sido bien establecida, excepto pocas

excepciones. Por ello, los ensayos en planta son esenciales para verificar la efectividad del potencial candidato, ya que la actividad *in vitro* puede no estar correspondida con el biocontrol *in vivo*. Esto puede estar relacionado con la degradación de los metabolitos antifúngicos por exposición a factores como la temperatura, el agua, la luz, entre otros.

El ABCPE se ha utilizado para determinar la efectividad de fungicidas en el control de enfermedades foliares en condiciones de campo, causadas por especies del género *Mycosphaerella* (Burke y Dunne, 2008), en la evaluación de la resistencia a enfermedades fúngicas (Eshraghi *et al.*, 2007) y Leiva-Mora *et al.* (2010) la empleó para diferenciar genotipos en cuanto a la resistencia a *M. fijiensis* en casa de cultivo. Sin embargo, en este estudio se implementó por vez primera el ABCPE para evaluar cuantitativamente la respuesta de plantas de *Musa* inoculadas artificialmente en casa de cultivo con *M. fijiensis* y sometidas a diferentes tratamientos con filtrados de cultivo bacterianos, con actividad antifúngica *in vitro*.

En cuanto a la evaluación de los componentes de la resistencia, se observaron diferencias significativas respecto al número de lesiones necróticas en plantas de 'Grande naine' (*Musa* spp. AAA) inoculadas con *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 al ser tratadas con FC bacterianos. En este caso, también el efecto de los filtrados de cultivo se vio influenciado por el momento de su aplicación. Fue encontrada una reducción significativa del número de lesiones necróticas a los 49 dpi para todos los tratamientos en relación con el control (Figura 18). El menor número de lesiones necróticas se observó en el tratamiento con filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 después de inoculado el patógeno (86% menor con respecto al control), sin diferencias con *Bacillus subtilis* CCIBP-M27.

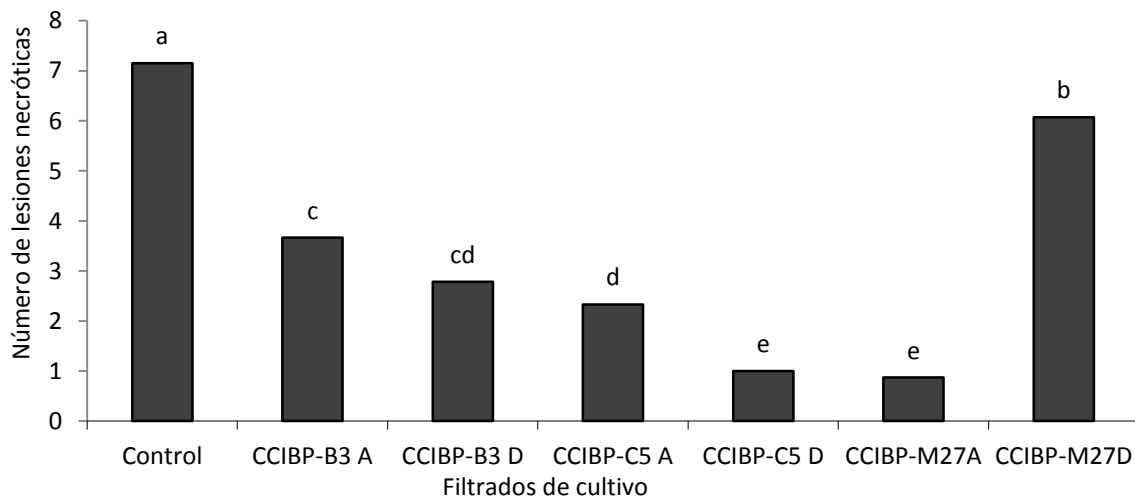


Figura 18. Número de lesiones necróticas por hoja en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) a los 49 días de inoculadas con *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 en casa de cultivo y en presencia de filtrados de cultivos bacterianos de cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (A. antes de inocular el patógeno, D. después). Letras desiguales sobre barras indican diferencias según prueba de Kruskal Wallis /Mann Whitney para  $p < 0,05$ . Cepa *Bacillus subtilis* CCIBP-M27 utilizada como control.

Atendiendo a los resultados en la evaluación de los componentes de la resistencia, el menor número de lesiones necróticas a los 49 dpi observado en las plantas inoculadas con el filtrado de cultivo CCIBP-C5 (aplicado después) estuvo en correspondencia con los resultados en las variables epifitológicas. Este tratamiento retrasó la aparición de lesiones necróticas en 28 días respecto al tratamiento control así como disminuyeron su aparición. También, cuando este FC fue aplicado antes de la inoculación de *M. fijiensis* logró reducir el número de lesiones necróticas en un 67% respecto al control así como retrasó el desarrollo de los síntomas en 21 días. Estos resultados sugieren que el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 pudo actuar sobre la expresión de la enfermedad mediante dos mecanismos: inducción de resistencia y efecto antifúngico directo. Ambos mecanismos pueden estar actuando cuando se aplicó el FC posterior a la inoculación de patógeno y de ahí el resultado en la disminución del ABCPE observado.

Los resultados de este acápite indicaron que los FC influyeron en la expresión de la enfermedad en plantas inoculadas con *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83. El efecto dependió de la cepa y del momento de la aplicación, posiblemente por la acción directa sobre el patógeno (inhibición del crecimiento) y/o sobre la planta (inducción de resistencia). De esta manera se constató que las cepas con actividad antifúngica *in vitro* también mostraron actividad *in vivo* lo que sugiere la posible implicación de la antibiosis como uno de los mecanismos involucrados en la acción biocontroladora.

Es de destacar que con una única aplicación del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 (después de inoculado el patógeno), se logró una eficiencia en el control de la enfermedad de un 33,6 % a los 70 dpi (Figura 19). Con la cepa control *B. subtilis* CCIBP-M27 (antes) se alcanzó 30,21%.

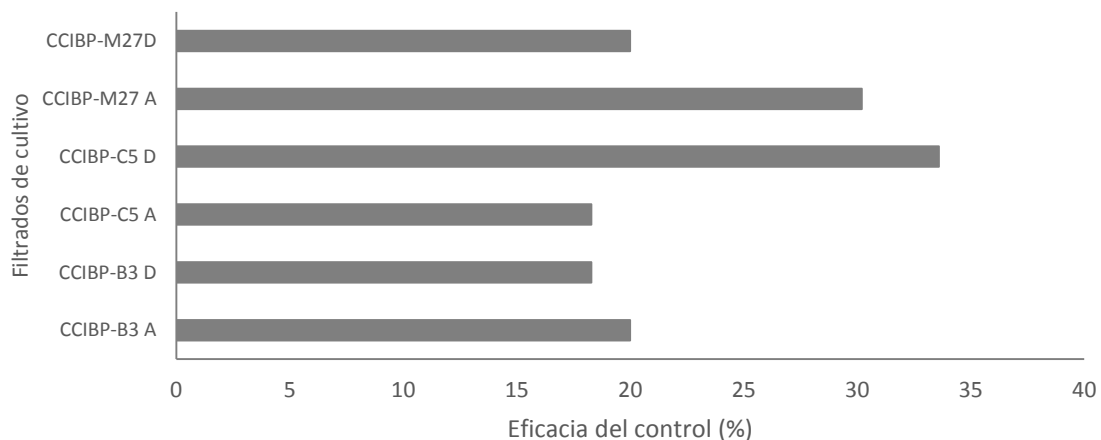


Figura 19. Eficacia de la aplicación de los filtrados de cultivo bacterianos en el control de la enfermedad en casa de cultivo, a los 70 días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83.

El filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5, aislada de la filosfera de *Musa*, mostró una eficacia del control superior a la alcanzada por *B. subtilis* CCIBP-M27, que pertenece a la especie que se ha utilizado para la producción del bioproducto Serenade, empleado en el manejo de la Sigatoka negra. Además, se destaca que este resultado se alcanzó con solo una aplicación y que no contenía preservantes,

conservantes ni estabilizantes que lo protegieran de la acción de la luz del Sol, el agua de riego, entre otros factores ambientales a los que estuvo expuesto, lo cual denota su potencial. Por otra parte, se pudo comprobar que la acción de este FC estuvo restringida a los primeros días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis* ya sea por efecto antifúngico directo o por la inducción de respuesta de defensa en las plantas donde fue aplicado. Estos resultados sugieren la importancia del estudio de los primeros días posteriores a la inoculación en la eficacia del control de este patógeno y para ellos se seleccionó la cepa CCIBP-C5 para continuar los estudios y profundizar en los mecanismos de acción de su FC.

#### 4.2.2.2 Cuantificación de la biomasa de *M. fijiensis* en plantas de *Musa* inoculadas artificialmente

Se logró cuantificar, en los primeros días posteriores a la inoculación, la biomasa de *M. fijiensis* en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) inoculadas artificialmente con suspensiones miceliales mediante PCR en tiempo real. La curva estándar de ADN genómico de *M. fijiensis* se obtuvo con una eficiencia de 100,86 con una  $R^2$  igual a 0,997.

En las plantas a las que se aplicó el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 tres días posteriores a la inoculación, la biomasa fúngica disminuyó significativamente respecto al control inoculado. Estas diferencias se mantuvieron durante el período evaluado (Figura 20).

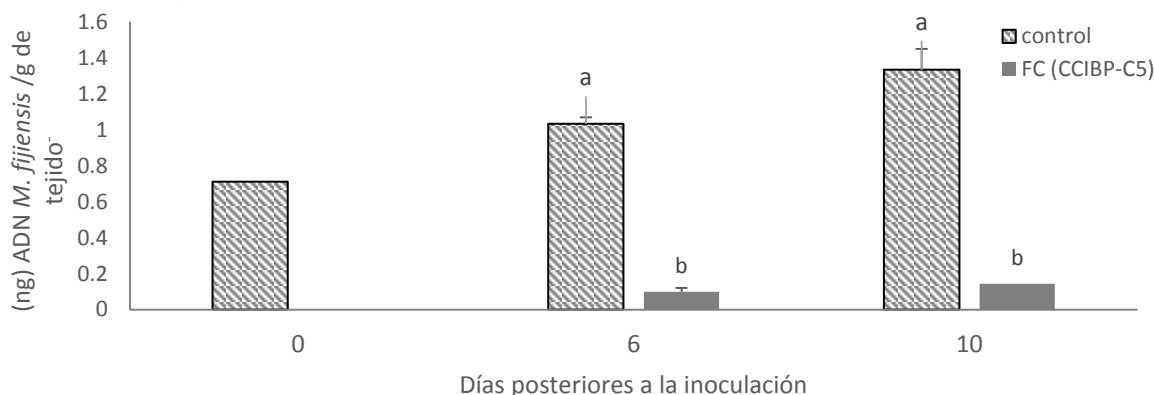


Figura 20. Biomasa de *M. fijiensis* cuantificada en un gramo de hojas de plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) inoculadas artificialmente y con la aplicación de filtrado de cultivo de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 tres días posteriores a la inoculación. Letras sobre barras en un mismo tiempo indican diferencias por prueba de Mann-Whitney para  $p < 0,01$ . Control (plantas inoculadas con *M. fijiensis*), FC (CCIBP-C5) (plantas inoculadas con *M. fijiensis* y la aplicación del FC tres días posteriores a la inoculación).

El filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 redujo la infección en más de un 90% a los 6 dpi respecto al tratamiento control. Resultados similares fueron obtenidos, por Desoignies *et al.* (2013) con la aplicación de lipopéptidos de *B. amyloliquefaciens* previo a la inoculación de *Polymyxa betae* (Keskin) en plantas de remolacha (*Beta vulgaris* L.).

Los resultados obtenidos en la reducción de la biomasa fúngica en los primeros días posteriores a la inoculación corroboran el efecto del FC sobre el inoculo inicial (acción

antifúngica directa sobre el micelio de *M. fijiensis* demostrado en acápite anteriores) y se correspondió con la disminución observada en cuanto al número de lesiones necróticas y del ABCPE.

Además en este ensayo se observó que el incremento de la biomasa fúngica de los 6 a los 10 dpi en presencia del FC fue la sexta parte del incremento en las plantas control lo que sugiere un lento desarrollo del patógeno en planta. Estos resultados coincidieron con lo observado en el acápite 4.2.2.1 respecto al aumento del tiempo de evolución de los síntomas en 28 días respecto al control inoculado, pudiendo presumir la existencia de otros mecanismos involucrados como la elicitación de respuestas de defensa de la planta por parte del FC. La inducción de respuesta de defensa en plantas por los microorganismos no patogénicos o sus metabolitos ha sido referida como un método interesante de control biológico (van Loon, 2008). Estos resultados demostraron la potencialidad que tiene la cepa CCIBP-C5, como agente de biocontrol, así como la importancia de profundizar en el estudio del efecto del FC en la respuesta de plantas.

Se identificó la cepa CCIBP-C5 como *Bacillus pumilus*, con un 99,9 % de similitud según el análisis de su perfil bioquímico en galerías de API 20CH y API 50 (Figura 21). Sus características culturales, morfológicas y bioquímicas coincidieron con las referidas en la literatura para esta especie.

Cepas de *Bacillus pumilus* han sido referidas como inductoras de respuesta de defensa en plantas frente a varios fitopatógenos (Kloepper *et al.*, 2004). También *B. pumilus* es una especie que ha sido estudiada por sus actividad antimicrobiana frente a varios fitopatógenos (Pereira de Melo *et al.*, 2009; Yazici *et al.*, 2011). Entre los metabolitos esta especie que han sido identificados se encuentra el lipopéptido Pumilacidin, con efecto antiviral, antiúlcero (Naruse *et al.*, 1990) y antimicrobiano (From *et al.*, 2007).



Figura 21. Análisis por el programa apiweb™ del perfil bioquímico de la cepa CCIBP-C5.

Más recientemente Serrano *et al.* (2013), demostraron la eficacia del biofungicida protectante Sonata elaborado con la cepa QST 2808 de *B. pumilus*, en el control de la Sigatoka negra en Ecuador. Según estos autores el principal modo de acción de esta cepa, es la producción de amino-azúcares que interfieren en la formación *de novo* de la pared celular de *M. fijiensis*.

#### **4.2.3 Efecto del filtrado de cultivo bacteriano sobre la respuesta de plantas de *Musa***

Se comprobó que el filtrado de cultivo de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 fue capaz de inducir una respuesta de defensa en plantas de *Musa* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) en condiciones de casa de cultivo.

##### **4.2.3.1 Detección histoquímica de compuestos relacionados con la respuesta de defensa en plantas**

Se observó una respuesta de la planta, a nivel histológico, frente a la aplicación del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 y esta fue independiente a la presencia de *M. fijiensis* (Figura 22).

Ya a los seis días posteriores a la inoculación se observaron deposiciones de color rosa en la cavidad subestomática en las plantas donde se aplicaron los filtrados de cultivo tanto cuando las plantas estaban sin inocular como cuando fueron inoculadas con *M. fijiensis* (Figura 22 B y D). Sin la presencia del filtrado de cultivo, no se observaron estas deposiciones durante el periodo evaluado. Igualmente, se observó en las plantas donde se aplicó FC, la aparición de un complejo azul oscuro alrededor de los estomas por la reacción del NBT con el anión superóxido (Figura 22 H).

En cuanto a la detección de lignina y fenoles no fue posible encontrar diferencias entre los tratamientos mediante el método ensayado. Autores como Smith *et al.* (2007) y Sánchez-García *et al.* (2010) refieren que la deposición de lignina se produce en las paredes de las células dañadas en correspondencia con la evolución de los síntomas o la aparición de lesiones. La no detección de estos compuestos puede ser debido al corto tiempo entre la inoculación y la evaluación y a la baja sensibilidad de estos métodos utilizados. Sin embargo, se observaron cambios en la morfología de las células cuando se aplicó el FC.

Una defensa física profundamente estudiada es la síntesis de calosa, cuyas deposiciones locales en planta están asociadas a heridas, infección por microorganismos y a estrés fisiológico (Voigt *et al.*, 2006). Según Asselbergh y Höfte (2007), la calosa es depositada en la pared celular debajo del sitio de penetración, durante la infección fúngica, formando las llamadas papilas que bloquean la entrada del patógeno, éstas se forman entre la membrana plasmática y la pared y pueden ser formadas antes de la penetración de la pared celular. También han sido referidas deposiciones de calosa en las células epidérmicas y del mesófilo de plantas de melón a las 72 h de inoculación con *B. subtilis* UMAF6639 y *P. fusca* (García-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Por otra parte la acumulación de ROS observada, fue indicativo de una respuesta de defensa ya que en microorganismos fitopatógenos biotróficos un incremento de ROS puede causar la muerte del patógeno o estar involucrado como segundo mensajero en la respuesta sistémica de defensa en la planta. En este sentido, Patykowski y Urbanek (2003) plantearon que la acumulación de peróxido de hidrógeno en los espacios apoplásticos puede acelerar el fortalecimiento de la pared celular.

Estudios similares han sido desarrollados en otros patosistemas. Por ejemplo García-Gutiérrez *et al.* (2013) describieron un aumento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno ( $H_2O_2$ ) a las 72 h posteriores a la inoculación de *P. fusca* en hojas de melón a las que se les aplicó previamente *B. subtilis*. También observaron



abundantes depósitos de lignina y calosa fundamentalmente en células del mesófilo y epidérmicas, relacionadas con los puntos de penetración. Sin embargo, estos autores no encontraron esta respuesta en hojas en ausencia de *P. fusca*.

Varias son las moléculas derivadas de microorganismos que han sido estudiadas como inductoras de respuesta de defensa en plantas. Los MAMP, como se les refiere en la literatura científica, pueden incluir múltiples componentes de la superficie celular de bacterias como lipopolisacáridos, flagelinas, peptidoglicano (Zipfel y Felix, 2005) así como, otros compuestos derivados de su metabolismo como los lipopéptidos (Ongena *et al.*, 2007) y los ramnolípidos (RLs) (Sanchez *et al.*, 2012). Estos compuestos son capaces de inducir respuestas de defensa que son muy efectivas en el control de fitopatógenos. Como resultado de la inducción se ha observado deposición de calosa (Boller y Felix, 2009) así como la síntesis y la señalización de fitohormonas (ácido salicílico (SA), etileno (ET) y jasmonato (JA)). Según Boudsocq *et al.* (2010), esta defensa está relacionada con el flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y estos activan las proteínas quinasa dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPKs). A su vez, estas CDPKs regulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), detectable como daño oxidativo.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que existió, además de la acción antifúngica directa del filtrado sobre *M. fijiensis*, una inducción de mecanismos de respuesta de defensa en la planta por el filtrado bacteriano. No siendo necesario para ello la presencia del patógeno.

La inducción de resistencia sistémica en plantas ha sido objeto de estudio de varias investigaciones. Su aplicación es importante para combatir enfermedades difíciles de controlar. Autores como Ferreira *et al.* (2007) hicieron un estudio del papel de las proteínas de defensa en las plantas en la patogénesis fúngica, donde se analizan cada una de las proteínas antifúngicas involucradas; entre las que se encuentran las glucanasas y quitinasas. Por otra parte, Pavlo *et al.* (2011) utilizaron bacterias endofíticas aisladas de la filosfera de *Solanum tuberosum* L. en la inducción de resistencia en este cultivo, a partir de la inoculación del esqueje de la planta con la suspensión bacteriana. En este caso el patógeno fue inoculado en la planta tres semanas después y se redujo su crecimiento en un 50%.

Los resultados alcanzados concuerdan con los referidos en la literatura científica donde se plantea que algunas moléculas bacterianas han sido estudiadas como responsables de inducir respuesta de defensa en plantas, entre las que se encuentran metabolitos volátiles (Ryu *et al.*, 2004), componentes de la superficie celular (Meziane *et al.*, 2005), metabolitos reguladores de hierro (Ran *et al.*, 2005), señales de *quorum-sensing* (Hernández-Reyes *et al.*, 2014) y antibióticos (Raaijmakers *et al.*, 2006). Dentro del último grupo algunos lipopéptidos (CLP) fueron recientemente identificados como elicitores de respuesta de defensa (Ongena *et al.*, 2007; Jourdan *et al.*, 2009; García-Gutiérrez *et al.*, 2013; Waewthongrak *et al.*, 2014).

#### **4.2.3.2 Cuantificación de compuestos enzimáticos y no enzimáticos en hojas de plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* en presencia del filtrado de cultivo bacteriano**

Se pudo determinar la actividad de las enzimas analizadas, así como los compuestos no enzimáticos relacionados con la respuesta defensiva en las plantas mediante la

metodología descrita. Los resultados reflejaron que durante el periodo analizado, tanto las enzimas como los compuestos no enzimáticos variaron su actividad en el tiempo en todos los tratamientos.

La enzima PAL,  $\beta$  1,3 glucanasas, quitinasa, peroxidasas y SOD fueron inducidas en las plantas de banano cv. 'Grande naine' inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83. Además, un incremento adicional en la actividad de estas enzimas fue observado en las plantas donde se aplicó el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 en presencia del patógeno.

### **Actividad enzimática**

Se observó un aumento significativo de la actividad PAL,  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa, así como de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidantes inmediato a la aplicación del FC de CCIBP-C5 (3 dpi) en plantas inoculadas con *M. fijiensis* respecto a las plantas control (Figura 23 y 24).

La respuesta de las plantas frente a la inoculación de *M. fijiensis* fue similar a la descrita por Torres *et al.* (2012) para el cultivar susceptible 'Williams' (*Musa* AAA). Esos resultados demuestran que la planta respondió frente al ataque del patógeno aunque por su magnitud o desarrollo en el tiempo, no fue suficiente para detener el progreso del patógeno. Sin embargo, la respuesta de las plantas inoculadas frente a la aplicación del FC fue similar a la observada por estos autores en plantas del cultivar resistente 'Calcuta 4' (*Musa* AA) luego de la inoculación del patógeno lo cual ha sido relacionado con la respuesta de incompatibilidad. Estos hallazgos sugieren que el FC de *B. pumilus* CCIBP-C5 indujo cambios en la respuesta de la planta frente a *M. fijiensis* lo que permitió una disminución del progreso de la enfermedad, observada en la reducción del número de lesiones necróticas, del ABCPE y la reducción de la biomasa fúngica (acápites 4.2.2.1 y 4.2.2.2).

En plantas inoculadas con *M. fijiensis* se observó aumento de la actividad PAL con respecto a las plantas sin inocular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Portal *et al.* (2011), quienes identificaron varios genes de la ruta de los fenilpropanoides inducidos diferencialmente en la interacción 'Grande naine'-*M. fijiensis*.

A los 3 dpi, las plantas donde se aplicó el FC en presencia del patógeno, los valores de la actividad de la enzima PAL fue tres veces superior a los registrados en las plantas control y el doble de las plantas inoculadas. Así mismo, en plantas con el FC sin la presencia del patógeno los valores de actividad PAL fueron superiores al control sin inocular y similares a los observados en plantas inoculadas (Figura 23 A). Estos resultados sugieren un reconocimiento por parte de la planta del filtrado bacteriano como una condición estresante. Según Ferrer *et al.* (2008), esta enzima cataliza la conversión de la fenilalanina a ácido cinámico, el cual constituye el primer paso en la ruta general de los fenilpropanoides. Como ha sido señalado, esta ruta de síntesis provee a las plantas de compuestos como antocianinas, flavonoides así como flavonas con acción fotoprotectiva ante los daños causados por varios tipos de estrés entre los que se encuentra el ataque de patógenos. Al respecto, varios estudios han demostrado la actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* de metabolitos secundarios en cultivares de *Musa*, procedentes de la vía de los fenilpropanoides

tales como fitoanticipinas y fitoalexinas (Otálvaro *et al.*, 2007; Hidalgo *et al.*, 2009; Cruz-Cruz *et al.*, 2009).

Dentro de la compleja red de procesos bioquímicos que se desarrollan en las plantas luego del ataque del patógeno, está la ruta fenilpropanoide, la cual aporta los compuestos más importantes con funcionalidad de defensa. Entre ellos se encuentran las cumarinas, ligninas, flavonoides, compuestos fenólicos y fitoalexinas. Estos compuestos tienen una variedad de funciones de tipo estructural en las plantas: en la membrana celular, la formación de pigmentos en frutas y flores, y el desarrollo de actividad directa contra la infección de hongos y bacterias, razón por la cual han sido involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas (Sgarbi *et al.*, 2003). Por tanto, es posible que la activación temprana de la enzima PAL por la acción del FC promueva la síntesis de metabolitos secundarios en la planta relacionados con el reforzamientos de las membranas y/o actividad antifúngica directa frente a *M. fijiensis* lo que contribuye a la disminución del progreso de la enfermedad.

El valor alcanzado en la actividad enzimática  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa a los 3 dpi en plantas inoculadas donde se aplicó el filtrado de cultivo fue superior a aquellos donde no fue aplicado, con una tendencia a disminuir respecto a los valores iniciales (Figura 23 B y C). Las quitinasas y las endo- $\beta$ -1,3-glucanasas degradan polisacáridos en la pared celular del patógeno invasor, y en la mayoría de los casos pueden ser categorizadas como proteínas PR, ya que su expresión a menudo está inducida por una infección (Rose *et al.*, 2002). Según van Loon *et al.* (2006) la actividad de ambas enzimas producen un efecto sinérgico que aumenta la resistencia de las plantas frente a los patógenos. Estas han sido estudiadas extensivamente y existen evidencias indirectas que apoyan la hipótesis de que éstas tienen un papel de protección (Ferreira *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2014).

La respuesta de estas enzimas frente a la aplicación del FC a la planta, concuerda con los encontrados por otros investigadores en diferentes patosistemas. Por ejemplo, Karthikeyan *et al.* (2005) determinaron la influencia de la aplicación de *P. fluorescens* sobre la enfermedad causada por *Alternaria palandui* (Ayyangar) y la actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa en dos cultivares (susceptible y resistente) de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). En este estudio, se evidenció una reducción significativa de la enfermedad en las hojas de cebolla tratadas con la bacteria que correspondió con un incremento en la actividad enzimática.

La actividad de estas enzimas fluctuó en el tiempo, en todos los tratamientos. De acuerdo con varios investigadores, estas proteínas intervienen en otros procesos fisiológicos de la planta. La actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa, al igual que la enzima peroxidasa, está relacionada con el proceso de ensamblaje de los componentes de la pared celular en las plantas, así como la polimerización de monómeros de lignina y suberina con la subsecuente resistencia a los patógenos (Ferreira *et al.*, 2007). También ha sido relacionada con la degradación de la calosa (Levy *et al.*, 2007).

Según Lepoivre *et al.* (2003), el conocimiento del papel exacto de estas proteínas en el patosistema *Musa-M. fijiensis* es limitado y aún no se han encontrado publicaciones al respecto. Sin embargo, varios autores plantean en otros patosistemas, que estas enzimas tienen un papel de protección a través de dos mecanismos distintos. Primero, pueden detener el crecimiento y proliferación *M. fijiensis* directamente por hidrólisis de quitina y  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos, volviendo las

células susceptibles a lisis, y segundo, pueden jugar un papel defensivo indirecto según lo sugerido por Ferreira *et al.* (2007). Estos autores plantean que oligosacáridos específicos de quitina y  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos, liberados por la pared celular del hongo, que actúan como elicitores que pueden inducir otro rango amplio de respuestas de defensa en las plantas.

Atendiendo a lo anterior, los resultados observados sugieren que determinados compuestos presentes en el FC son reconocidos inmediatamente por la planta y se suceden cambios que involucran el aumento de la actividad de enzimas como la PAL, glucanasas y quitinasas que pueden comenzar a degradar y afectan el crecimiento y desarrollo de *M. fijiensis*. Entre estos compuestos pueden encontrarse los lipopéptidos. En este sentido, Jourdan *et al.* (2009) encontraron una fuerte inducción de la actividad PAL entre las seis y nueve horas posteriores a la adicción de lipopéptidos bacterianos del tipo surfactina en células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Más recientemente, Yamamoto *et al.* (2014) demostraron la relación directa de un aumento de la actividad enzimática, así como de la expresión de los genes que codifican para la  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) con la resistencia a *C. gloeosporioides*, cuando se les aplicó filtrados de cultivo de la cepa de *B. amyloliquefaciens* S13-3 (productora de lipopéptidos). Estos autores encontraron similar respuesta cuando se aplicaron lipopéptidos purificados del tipo iturinas y surfactinas.

La respuesta antioxidante de las plantas también se vio influenciada por la aplicación de los filtrados de cultivo y la presencia del patógeno (Figura 24). La actividad de las enzimas en estudio (guayacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa) se constató en todos los tratamientos empleados, sin embargo el incremento o disminución de la actividad, varió en el tiempo durante el cual se desarrolló el experimento y estuvo relacionada con el tipo de enzima. Para las tres enzimas la actividad fue máxima inmediatamente después de aplicado el filtrado en presencia del patógeno. El aumento de la actividad de estas enzimas con capacidad antioxidantes, en plantas bajo estrés han sido referidos como parámetro de tolerancia al mismo (Jiménez *et al.*, 2012).

En cuanto a la actividad guayacol peroxidasa (EC 1.11.1.7) (POX) (Figura 24 A), se observó que en las plantas en que fueron aplicados los filtrados de cultivo (en presencia y ausencia de *M. fijiensis*), su actividad aumentó significativamente luego de la aplicación del FC respecto al control sin inocular. Similar respuesta en plantas ha sido descrita por varios autores, luego de la aplicación de inductores de defensa microbianos. Por ejemplo, Chowdappa *et al.* (2013), quienes obtuvieron un incremento en la expresión de enzimas peroxidasa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculadas con *A. solani* o *Phytophthora infestans* (Mont.) donde se aplicó *B. subtilis* OTPB1. También, en plantas de melón inoculadas con *B. subtilis* UMAF6639 y con *P. fusca* se observó un incremento de la actividad peroxidasa a las 48 h como manifestación de los mecanismos de defensa (García-Gutiérrez *et al.*, 2013).

La presencia de *M. fijiensis* también provocó un aumento significativo de la actividad de esta enzima inmediatamente después de su inoculación. La actividad POX en la respuesta de plantas de *Musa* inoculadas con *M. fijiensis* ha sido analizada por otros autores (Sánchez-García *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2012), en donde las plantas

inoculadas mostraron mayor actividad con respecto a las plantas sin inocular. Al respecto, se ha señalado que la POX son un grupo de enzimas oxido-reductoras clase III, presentes en pared y vacuolas que participan en la respuesta de defensa de la planta en procesos como la formación de la pared celular a través de la oxidación de fenoles, la suberización y la lignificación de las paredes de las células vegetales durante la respuesta de defensa ante agentes patógenos y en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la respuesta de defensa (Almagro *et al.*, 2008).

El aumento de la actividad POX, inmediato a la inoculación y a la aplicación del FC, sugiere la detección por parte de la planta de un estrés y el consecuente desencadenamiento de respuestas de defensas tales como el reforzamiento de las paredes celulares.

La APX (clase I) también registró un aumento de su actividad, la cual fue inmediata a la aplicación del filtrado de cultivo y fue independiente a la presencia del patógeno (Figura 24 B).

Según Caverzan *et al.* (2012) las peroxidasas se utilizan frecuentemente como indicador del estrés oxidativo y están ampliamente distribuidas tanto en el ambiente intra como extra celular. Por otro lado, Shigeoka *et al.* (2002), refieren que la APX es el principal sistema antioxidante presente en varios organelos celulares y forma parte del ciclo Ascorbato-Glutatión o ruta Asada-Halliwell-Foyer. Esta ejerce una regulación muy estricta sobre la producción de ROS, estas especies reactivas de oxígeno bajo condiciones de estrés en la célula puede inactivar enzimas y dañar componentes celulares importantes (Sharma *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos relacionados con el aumento de la actividad de estas enzimas sugieren una percepción inmediata del FC por la planta y la generación de un estrés oxidativo.

Posteriormente, los valores de actividad de APX decrecieron bruscamente a los 6 dpi. La disminución de la actividad peroxidasa observada en los tratamientos con el FC, bajo condiciones de estrés, también podría contribuir con el desencadenamiento de una defensa efectiva en la planta. Estas enzimas son las encargadas de reducir los niveles de  $H_2O_2$  en las células, por lo que la disminución de su actividad provoca un aumento en las concentraciones de  $H_2O_2$  el cual puede resultar tóxico para *M. fijiensis* y contribuir a la disminución de la biomasa fúngica que se observó en el acápite 4.2.2.2.

Los resultados relacionados con la actividad de la enzima SOD (Figura 24 C) mostraron que la aplicación del FC influyó considerablemente en la actividad de esta enzima en plantas previamente inoculadas. La actividad SOD a los 3 dpi en las plantas inoculadas y en presencia del FC fue el doble de la registrada para el resto de los tratamientos y se mantuvo superior a tratamiento control durante el periodo evaluado.

El aumento de la actividad SOD sugiere un aumento en la concentración de  $H_2O_2$  en las plantas en presencia del FC, lo cual puede ser la causa de la disminución de la actividad de las peroxidasas observada anteriormente, pues según Cruz de Carvalho (2008) un exceso en la producción de  $H_2O_2$  inhibe la actividad de APX en plantas.

El incremento en la expresión de la enzima SOD por la acción de metabolitos bacterianos ha sido descrito por varios investigadores. Por ejemplo, Chowdappa *et*

al. (2013) encontraron en plantas de tomate inoculadas con *A. solani* o *P. infestans* donde se aplicó *B. subtilis* OTPB1. Dicha actividad aumenta el estrés oxidativo en la planta por la acumulación de  $H_2O_2$  que es tóxico, y puede contribuir al control de microorganismos biotróficos y hemibiotróficos. En este sentido, las ROS pueden actuar directamente sobre el microorganismo y limitar su crecimiento debido a la generación de radicales hidroxilo altamente reactivos (De Gara *et al.*, 2003).

El incremento/decrecimiento de la actividad en el sistema SOD/APX sugiere que la activación moderada del sistema antioxidante puede ocurrir durante la inducción de resistencia a enfermedades en la planta. Según Pavlo *et al.* (2011), la modulación del sistema antioxidante sobre la infección puede ser una reacción específica de la planta ante la colonización con endófitos que inducen resistencia a enfermedades.

En el caso específico de *M. fijiensis*, la acumulación temprana de ROS por el efecto del filtrado de cultivo durante la fase biotrófica, podría disminuir su crecimiento y diseminación confinándolo a lugares específicos y provocando su muerte. El efecto tóxico de las ROS pudiera traducirse en una disminución de la biomasa fúngica en los primeros días posteriores a su inoculación, así como estar relacionado con la reducción del número de lesiones necróticas.

### Compuestos no enzimáticos

La producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) varió, durante el periodo evaluado, tanto por la aplicación del FC de CCIBP-C5 así como por la presencia de *M. fijiensis* (Figura 25). En este sentido, en las plantas en presencia del patógeno, aumentaron los niveles de  $O_2^-$  y estos fueron decreciendo, producto quizás de la acción de los sistemas antioxidantes (SOD).

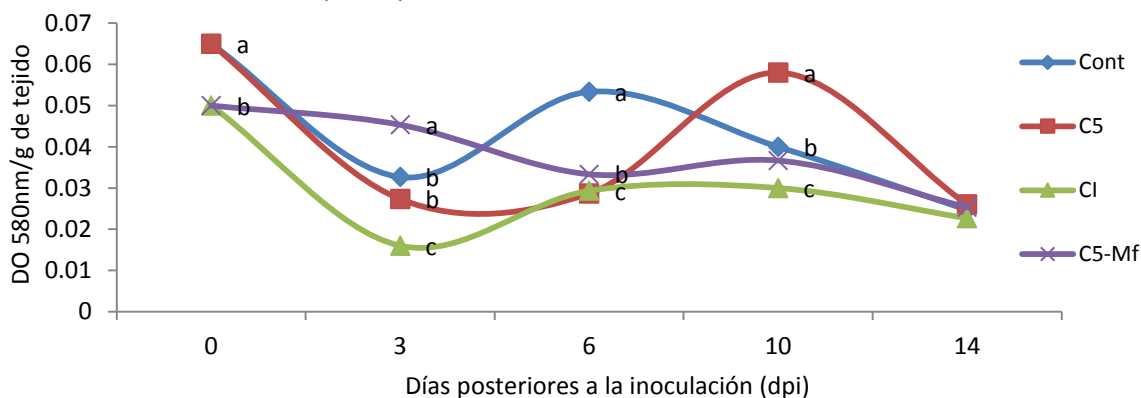


Figura 25. Efecto de la aplicación de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-C5 (C5) en la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) en condiciones de casa de cultivo. Valores medios con letras desiguales en cada tiempo difieren por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$ .

Por otra parte, en las plantas que fue aplicado el filtrado de cultivo una vez inoculadas con *M. fijiensis*, la cantidad de Nitroblue tetrazolium reducido (equivalente a la producción del anión superóxido) fue significativamente superior al resto de los tratamientos, inmediatamente después de su aplicación (3 dpi). A partir de ese momento los valores registrados fueron significativamente superiores a los

observados en las plantas inoculadas sin el filtrado. Esto demuestra el aumento del estrés oxidativo en plantas producto de la aplicación del FC.

Según Torres (2010) la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) constituye la primera respuesta detectable en el sitio de la infección en un lapso de minutos y se sugiere que estimula la cascada de defensa en varias especies de plantas.

El aumento de las concentraciones del anión superóxido, pudo ser debido al reconocimiento a nivel de membrana plasmática del FC. La acumulación de las especies reactivas de oxígeno ha sido descrita como uno de los mecanismos de la respuesta exitosa de las plantas frente a patógenos biotróficos (Delledonne, 2005). Según Agrios (2005), el aumento de ROS en las plantas induce un estado fisiológico que impide el crecimiento e invasión del patógeno, ya sea este, inducidos por el reconocimiento del microorganismo patógeno por parte de la planta como por la sensibilización (*priming*) por parte de microorganismos.

También, la aplicación del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 en plantas de *Musa* sp. influyó en el contenido de fenoles totales tanto en plantas inoculadas como sin inocular (Figura 26). En presencia del patógeno la aplicación del FC favoreció la acumulación de fenoles (6 dpi) y fue significativamente superior al resto de los tratamientos.

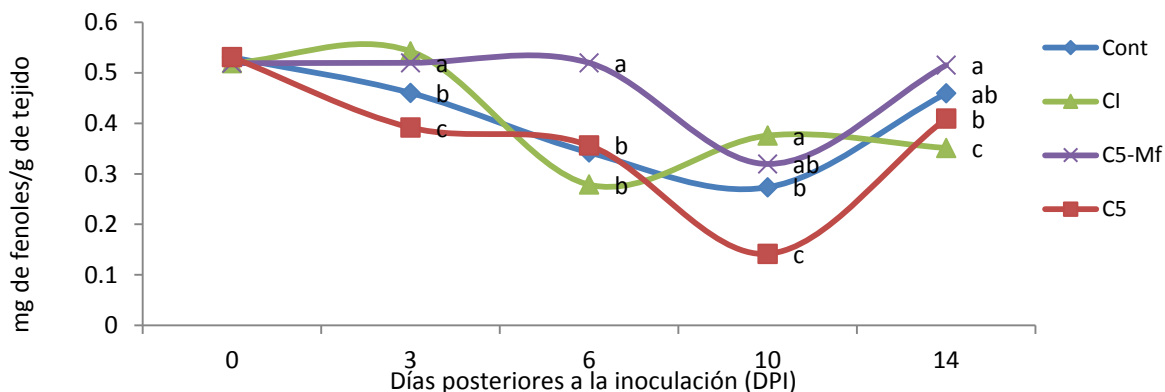


Figura 26. Efecto de la aplicación de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-C5 (C5) en el contenido de fenoles totales en plantas de *Musa* cv. 'Grande naine' en condiciones de casa de cultivo. Valores medios con letras desiguales en cada tiempo difieren por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$ .

Estos resultados están relacionados con el aumento de la actividad PAL (3 dpi) en plantas inoculadas en presencia del FC. Esta respuesta pudiera influir en la generación de compuestos fenólicos con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y contribuir a la disminución de las lesiones necróticas y de la biomasa fúngica observada anteriormente (acápites 4.2.2.1 y 4.2.2.2).

También se pudo comprobar que en las plantas inoculadas con *M. fijiensis* aumentaron en el contenido de compuestos fenólicos respecto al control a los 6 dpi. En este sentido, el incremento en la producción de compuestos fenólicos y su papel en el proceso de defensa de las plantas ha sido abordado por varios autores en diferentes patosistemas (Cruz-Cruz *et al.*, 2009; Hemissi *et al.*, 2013). En general, se

ha observado un aumento significativo en los compuestos fenólicos en las plantas infectadas respecto a las no infectadas.

En el género *Musa*, se ha correlacionado la concentración de fitoalexinas del tipo de las fenilfenalenonas (Quiñones *et al.*, 2000), con la resistencia a *M. fijiensis* (Otálvaro *et al.*, 2002). Además, dos nuevos compuestos del tipo fenalenonas (Otálvaro *et al.*, 2007) y dos perinaftenonas naturales aisladas del cv. resistente 'Yangambi km 5' (*Musa* AAA) (Hidalgo *et al.*, 2009), mostraron actividad antifúngica *in vitro* contra *M. fijiensis*. Recientemente, Echeverri *et al.* (2012) propusieron la utilización de las fenilfenalenonas como un posible tipo de fungicida para el control de la Sigatoka negra.

En general, en el acápite se pudo comprobar que el FC de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 tuvo un efecto en las planta inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* en los primeros días posteriores a la inoculación e incluso sin la presencia del patógeno. Se observó un aumento de la actividad de enzimas tales como la PAL, quitinasas y glucanasas así como cambios en los niveles de ROS y de compuestos fenólicos y estos cambios fueron detectados a nivel histológico, lo que sugiere una inducción de resistencia por parte del FC. Estos hallazgos son consistentes con la reducción de las lesiones necróticas y el alargamiento en la evolución de los síntomas de las plantas inoculadas artificialmente encontrados en ensayos anteriores (acápite 4.2.2.1) cuando el FC fue aplicado tres días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis*. Además, este estudio extiende el rango de especies de plantas en las cuales los *Bacillus* spp. y sus metabolitos actúan induciendo respuesta de defensa, observada previamente en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Ongena *et al.*, 2005), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Ongena *et al.*, 2007), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Jourdan *et al.*, 2009), melón (*Cucumis melo* L.) (García-Gutiérrez *et al.*, 2013) y remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Desoignies *et al.*, 2013).

El FC de CCIBP-C5, logró incidir en la expresión de la enfermedad y que alargó el desarrollo de los síntomas, redujo la biomasa fúngica e indujo cambios en la respuesta de plantas del cv. susceptible 'Grande naine' (*Musa* AAA) en los primeros días posteriores a la inoculación.

Los resultados alcanzados refuerzan el potencial biotecnológico del FC de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. Profundizar en su caracterización podría contribuir al conocimiento de sus mecanismos de acción y a desarrollar formulaciones para el control de la enfermedad.

#### **4.3 Caracterización del filtrado de cultivo de la cepa bacteriana con actividad antifúngica *in vitro* frente *M. fijiensis***

Se logró caracterizar el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5, sugiriendo la presencia de compuestos proteicos con efecto antifúngico sobre el micelio de *M. fijiensis*.

##### **4.3.1 Semipurificación de proteínas**

La concentración de proteína obtenida según el método de Bradford (1976) luego de la precipitación con sales y posterior liofilización fue de 626 µg mL<sup>-1</sup>. La fracción dializada obtenida mostró similar efecto antifúngico que el filtrado de cultivo (Figura 27).



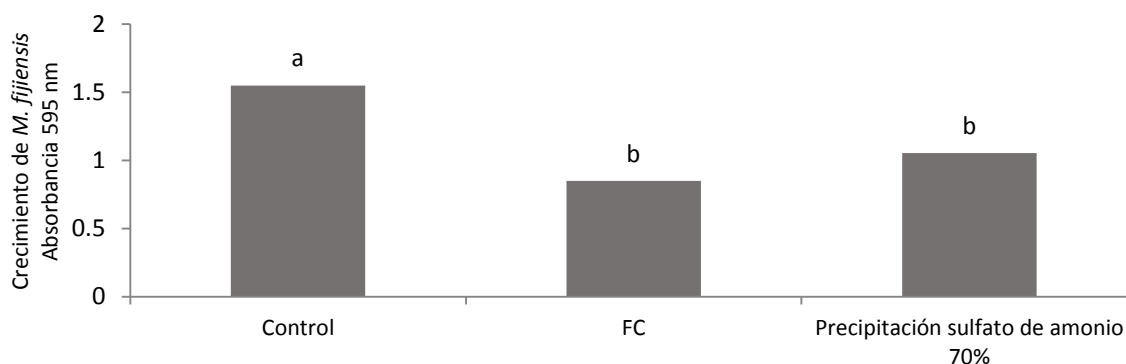


Figura 27. Actividad antifúngica del filtrado de cultivo (FC) y de metabolitos de naturaleza proteica (semipurificados con sulfato de amonio al 70%) frente a *M. fijiensis*, en placas de 96 pocillos incubadas a 28°C y oscuridad. Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$ .

La precipitación con sales o *salting out* es un método tradicionalmente usado en las primeras fases de la purificación de proteínas y el Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) es la sal más usada por su elevada solubilidad en agua. Este método se basa en la baja solubilidad que presentan las proteínas en altas concentraciones de sales (Lehninger, 2005) que permite recuperar las proteínas en forma de precipitado. Este método ha sido empleado para semipurificar proteínas de sobrenadantes de cultivos de *Bacillus* (Moyné *et al.*; 2001; Kim y Chung, 2004).

Microscópicamente se observó la presencia de daños en el micelio respecto al control (Figura 28). Las deformaciones observadas en las hifas de *M. fijiensis*, en presencia de las fracciones semipurificadas pudieran relacionarse con afectaciones de la pared celular del micelio, producto de la acción de los metabolitos de naturaleza proteica secretados al medio de cultivo. Estos metabolitos podrían ser enzimas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas), que degradan la quitina y el  $\beta$ -1,3-glucano constituyente de la pared de los ascomicetos. También ha sido referido la producción de lipopéptidos bacterianos con efecto antimicrobiano con acción a nivel de membrana plasmática (Cristie, 2014).

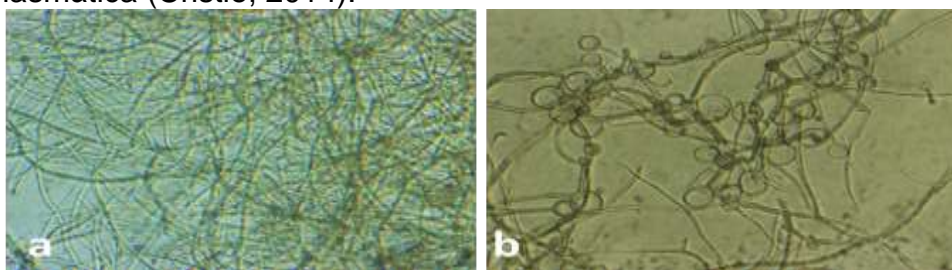


Figura 28. Micelio de *Mycosphaerella fijiensis* CCIBP-Pf-83 a las 48 h de incubación en presencia de la fracción obtenida por la precipitación con Sulfato de amonio al 70% a) control, b) Filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5.

La corrida electroforética realizada (Figura 29) evidenció la presencia de proteínas en la fracción de metabolitos semipurificados. Se observaron varias bandas de diferente intensidad, sin embargo, se destacó una banda de peso molecular entre 33 y 40 kDa. También se observó un aumento en la intensidad de la tinción al nivel del

frente de corrida coincidiendo con la banda de 11 kDa del marcador de peso molecular. Esto puede ser indicativo de la presencia de proteínas o péptidos de bajo peso molecular que no lograron separarse bajo las condiciones utilizadas en la electroforesis.

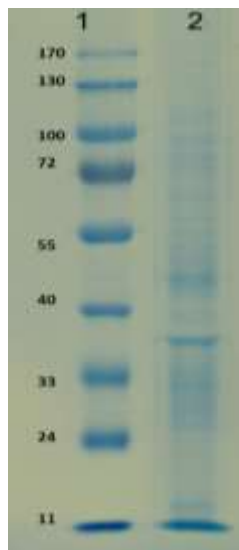


Figura 29. Gel resultante de la corrida electroforética bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 12% de acrilamida y teñido con azul de coomassie. 1 Marcador de peso molecular 2 Fracción obtenida de la precipitación con sales de amonio al 70% del filtrado de cultivo de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5.

Varios son los trabajos que refieren la presencia de compuestos de naturaleza peptídica en filtrados de cultivo de bacterias. En este sentido, Moyne *et al.* (2001) encontraron diferentes bandas en el filtrado de cultivo de *B. subtilis*. Estos autores, purificaron una bacilomicina D de menos de 6 kDa de peso molecular. Kim y Chung (2004) obtuvieron bandas desde 11 hasta 110 kDa del filtrado de cultivo de *B. amyloliquefaciens* y purificaron una proteína de aproximadamente 40 kDa, que mostró actividad inhibitoria frente a *Colletotrichum lagenaria* (Ellis y Halst) y poseía actividad glucanasa., así como Zhou *et al.* (2008) lograron aislar un péptido antifúngico de 4517 Da del filtrado de cultivo de *P. polymyxa*.

Los resultados alcanzados en este acápite sugieren la excreción por parte de la cepa CCIBP-C5 de proteínas o sustancias peptídicas al medio de cultivo, producto de su metabolismo y reafirman la naturaleza proteica de metabolitos responsables de la actividad antifúngica *in vitro* con un peso molecular superior a 12 kDa. Estos pudieran ser enzimas líticas y/o péptidos antibióticos.

#### 4.3.2 Actividad de enzimas líticas

Se comprobó la actividad quitinolítica del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5. La actividad enzimática fue de 4,5 U  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteínas. Sin embargo mediante el método utilizado no se observó actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa en el FC.

Rao-Podile y Neeraja (2010) afirmaron que las bacterias secretan quitinasas para procesar y digerir macromoléculas de N-acetil-glucosamina de forma natural como fuente de nutrientes en su fase saprofita, siendo *Bacillus* un género particularmente eficiente en degradar la quitina.

La quitina es un polímero natural de restos de  $\beta$ -1,4- N-acetil-D-glucosamina y es el componente mayoritario de la pared celular de los hongos filamentosos (BeMiller, 1965) que sirve como elemento de rigidez de las paredes fúngicas. La presencia de estos compuestos hace de estas estructuras un blanco potencial tanto para la acción de quitinasas de plantas como las producidas por los microorganismos.

Los enlaces glicosídicos son los responsables de la integridad de la pared fúngica y cualquier distorsión en estos enlaces, puede destruir la morfología de la hifa y provocar la salida del contenido celular (Rao-Podile y Neeraja, 2010). La acción de las quitinasas presentes en el FC pudiera ser la causa de las malformaciones observadas en el micelio de *M. fijiensis* al ser expuesto al filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5. Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios autores como Osorio *et al.* (2004) quienes atribuyen el efecto antifúngico de bacterias frente a *M. fijiensis*, a la producción de enzimas del tipo quitinasas.

También Ferreira *et al.* (2007) refieren la participación de los restos de las paredes fúngicas (oligosacáridos) producto de la acción de quitinasas y/o glucanasas, como inductores de respuesta de defensa en plantas. Estos criterios pueden ser útiles para explicar los resultados alcanzados en el acápite 4.2.3 sobre el efecto de inducción de respuestas de defensa en plantas de *Musa* sp. cuando fue aplicado el FC.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede inferir que entre los metabolitos responsables de la actividad antifúngica del FC de *B. pumilus* CCIBP-C5 están involucradas enzimas líticas del tipo quitinasa y su acción sobre el micelio fúngico en la interacción con la planta, pudiera contribuir en la respuesta de esta frente a *M. fijiensis*. Por tanto, se requiere continuar los estudios de purificación y caracterización de estas proteínas y la evaluación de su actividad antifúngica.

#### 4.3.3 Presencia de lipopéptidos

Se obtuvieron dos fracciones a partir del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 mediante la extracción con acetato de etilo.

Los metabolitos presentes en ambas fracciones inhibieron el crecimiento del micelio. Además, se observaron similares deformaciones en el micelio al ser tratados con las fracciones acuosa y orgánica del filtrado de cultivo (Figura 30).



Figura 30. Micelio de *Mycosphaerella fijiensis* CCIBP-Pf-83 incubado 48 h a 28°C y oscuridad con fracciones resultantes de la extracción con acetato de etilo del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 a) control b) Fracción acuosa c) Fracción orgánica.

La presencia de actividad antifúngica en ambas fracciones sugiere que los metabolitos con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* no lograron ser extraídos totalmente con el acetato de etilo. Esto puede evidenciar la naturaleza

anfílica de los mismos o la presencia de varios metabolitos antifúngicos de diferente polaridad.

Con el empleo de la cromatografía de capa delgada se pudieron separar los componentes presentes en ambas fracciones del FC. Al ser usado el revelado con ninhidrina al 0,2% se observaron, a partir de los puntos de aplicación, varias manchas de color morado, indicativo de la presencia grupos aminos libres en el extracto acuoso y orgánico. También fueron observadas manchas de color amarillo que son indicativas de aminas terciarias (Figura 31). Estos resultados corroboran la presencia de compuestos de naturaleza peptídica en el filtrado de cultivo.

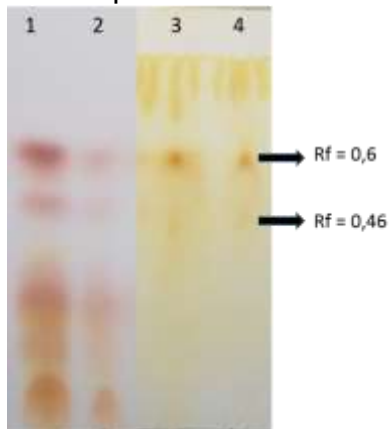


Figura 31. Cromatogramas obtenidos de las fracciones acuosas (1,3) y orgánicas (2,4) del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 luego de una extracción con acetato de etilo 1,2) Ninhidrina 0,2 %, 3,4) Vapores de iodo.

En las placas teñidas con vapores de iodo, se detectaron dos manchas de color amarillo en ambas fracciones con Rf de 0,6 (mayor intensidad) y 0,46; lo que evidenció la presencia de grupos lipídicos. Los valores de Rf de estos puntos coincidieron con puntos teñidos con ninhidrina en ambas fracciones. Según Das *et al.* (2008) la coincidencia de los Rf en las diferentes tinciones (ninhidrina y vapores de iodo) indica la presencia de restos aminos libres y cadenas lipídicas en un mismo compuesto y sugiere la naturaleza lipopeptídica de los mismos.

Los lipopéptidos son estructuras cíclicas fundamentalmente producidas por especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*. Generalmente están constituídos por péptidos hidrofílicos, usualmente de 7 a 10 aminoácidos, unidos a una cadena hidrofóbica de ácidos grasos lo que les confiere un carácter anfipático (Smyth *et al.*, 2010). Esta característica de los lipopéptidos justifica la presencia de estos compuestos en ambas fracciones de la extracción con acetato de etilo.

Se purificaron a partir de la TLC las manchas que apreciaron a un Rf 0,6 en ambas fracciones. En el análisis de espectroscopía infrarroja se observaron señales similares en ambos compuestos purificados a partir de la TLC (Figura 32), que estuvieron en correspondencia con enlaces químicos específicos.

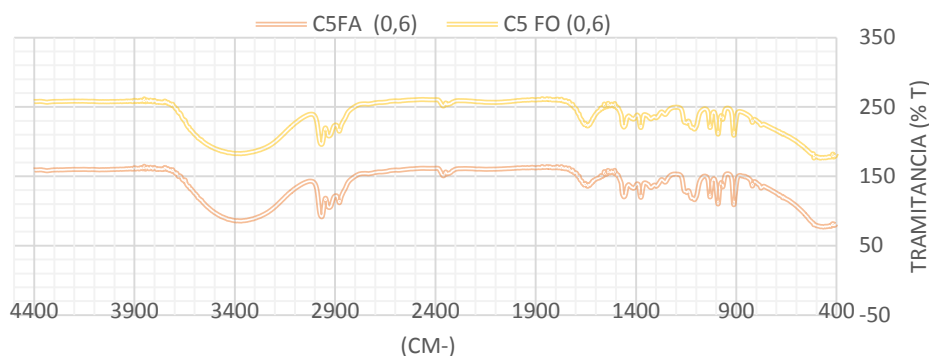


Figura 32.

Espectro infrarrojo de metabolitos purificados a partir del filtrado de cultivo de CCIBP-C5. FA (Fracción acuosa), FO (Fracción orgánica) (valor de Rf).

En este sentido, se encontraron bandas de vibración de valencia del grupo OH ( $\nu_{OH}$ ) en  $3400\text{ cm}^{-1}$  donde pudiera estar sumergida la vibración de valencia del NH, bandas de vibración de los carbonos saturados ( $\nu_{Sp^3-H}$ ) entre  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ . Se observó una banda ancha de vibración de valencia del grupo carbonilo ( $\nu_{C=O}$ ) entre  $1600$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$  donde pudiera estar la vibración de deformación NH de la parte de aminoácidos ( $1560\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ ) (Maldonado *et al.*, 2009). También fueron registradas bandas en  $1460$  y  $1380\text{ cm}^{-1}$  asignables a las vibraciones de deformación de los carbonos  $Sp^3-H$  ( $\sigma_{C-H}$ ), además de bandas anchas entre  $1000$  y  $1300\text{ cm}^{-1}$  asignables a las vibraciones de valencia ( $\nu_{C-O-C}$ ) de ésteres o éteres.

La ausencia de señal a  $1730\text{ cm}^{-1}$ , que ha sido asignada al anillo de lactona (típico de la surfactina y fengicina) (Romero *et al.*, 2007b) pudiera ser indicativo de la presencia de lipopéptidos de tipo iturinas como lipopéptido mayoritario en el FC.

Este grupo de lipopéptidos presentan una fuerte actividad antifúngica *in vitro* frente a una gran variedad de hongos y levaduras pero una limitada actividad antibacteriana y nula actividad antiviral (Arrebola *et al.*, 2010). Según Aranda *et al.* (2005) el mecanismo por el cual actúan está basado en las perturbaciones osmóticas que favorecen la formación de poros conductores de iones lo cual coincide con los daños observados en la integridad de la membrana plasmática de *M. fijiensis* en presencia del filtrado de cultivo. Se requiere realizar otros análisis con el empleo de métodos de purificación y caracterización más sensibles que permitan identificar los lipopéptidos presentes en el FC.

La mayor parte de antibióticos producidos por *Bacillus* sp., que controlan microorganismos fitopatógenos, son compuestos peptídicos no sintetizados en los ribosomas, principalmente lipopéptidos. Estos metabolitos presentan una estructura cíclica, constituidos por péptidos hidrofílicos unidos a una cadena hidrofóbica de ácidos grasos, lo que le confieren la propiedad de ser anfipáticos (Smyth *et al.*, 2010). Los lipopéptidos de *Bacillus* han sido estudiados por su actividad antagonista frente a una amplia gama de microorganismos fitopatógenos que incluyen virus, bacterias, hongos y oomycetes (Ongena *et al.*, 2005; Leclère *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2015). También, se ha demostrado que estos compuestos no sólo son antagonistas sino que facilitan la colonización de las raíces (Hofemeister *et al.*, 2004; Stein, 2005) así como refuerzan el potencial de resistencia del hospedero (Ongena *et al.*, 2007; Henry *et al.*, 2011; García-Gutiérrez *et al.*, 2013; Yakamoto *et al.*, 2014).

Los resultados alcanzados permiten demostrar la presencia de lipopéptidos frente a *M. fijiensis* en el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 y estos pueden ser responsables también de la actividad antifúngica *in vitro* y la inducción de resistencia en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). Sin embargo para demostrar la implicación de cada uno de ellos en la interacción se requieren otros estudios donde se evalúen la actividad antifúngica y el efecto en plantas de los metabolitos purificados.

Los resultados de este trabajo de tesis evidenciaron el potencial como antagonistas de *M. fijiensis* de bacterias presentes en la filosfera de cultivares de *Musa* en las condiciones de Cuba. Se demostró que una cepa que inhibe el crecimiento del patógeno *in vitro* puede emplear varios mecanismos para ello.

Específicamente, la cepa nativa de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 aislada de la filosfera de 'FHIA-18' (AAAB) con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* en medio de cultivo Caldo nutriente produce metabolitos con acción sobre el patógeno, la respuesta de defensa de la planta y la expresión de la enfermedad. En el FC se detectó la presencia de metabolitos de naturaleza proteica con actividad quitinasa así como lipopéptidos, ambos compuestos han sido referidos en la literatura científica con actividad antifúngica.

A partir de los resultados se pudiera considerar la presencia de varios mecanismos que se interrelaciona entre sí. El efecto del FC sobre la interacción *Musa* sp. - *M. fijiensis* se esquematiza en la figura 33 y conducen a:

Efecto antifúngico directo sobre el patógeno del filtrado de cultivo

- daños en las estructuras de reproducción (con deformaciones en los extremos apicales de las hifas y disminución de la germinación de conidios),
- inhibición del crecimiento micelial con daño oxidativo y pérdida en la integridad de la membrana,

Esto puede estar debido a la acción de lipopéptidos presentes en el filtrado de cultivo que desestabilizan la membrana fúngica y puede provocar la pérdida de electrolitos, daño oxidativo y las deformaciones observadas tanto en el micelio como en los conidios y ascosporas. También la acción lítica de las quitinasas presentes en el FC puede influir en la inhibición del crecimiento del micelio fúngico así como provocar daños a nivel estructural.

El FC tuvo efecto sobre la planta mediante la inducción de respuesta de defensa que se demostró con:

- aumento del contenido de fenoles totales y anión superóxido ( $O_2^-$ ) en plantas y deposición de calosa en las células.
- aumento de la actividad de enzimas involucradas en la respuesta defensiva de plantas, tales como: PAL, quitinasas, glucanasas, guayacol peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD),

La presencia de oligosacáridos por la acción de las quitinasas sobre el micelio de *M. fijiensis* puede inducir respuesta de defensa en plantas. Así mismo, los lipopéptidos han sido estudiados por su capacidad de interactuar con las membranas plasmáticas de las células vegetales e inducir respuesta de defensa en plantas. Ambos compuestos pueden ser los responsables del aumento de la actividad de enzimas relacionadas con la producción de compuestos antimicrobianos y el reforzamiento de las paredes celulares. Asimismo aumentó la



actividad antioxidante de la planta lo cual ha sido relacionada con niveles de tolerancia al estrés. También provocó un aumento de la generación de ROS, los cuales pueden afectar directamente el crecimiento del micelio fúngico así como actuar como mensajeros en la cascada de señalización para la respuesta de defensa.

La acción antifúngica directa sobre el patógeno y la elicitación de respuestas de defensa en las plantas inoculadas repercutió en expresión de la enfermedad y permitió:

- disminución del ABCPE y alargamiento en el tiempo de evolución de los síntomas plantas inoculadas en casa de cultivo,
- disminución del número de lesiones necróticas,
- disminución de la biomasa fúngica.

La aplicación del filtrado de cultivo de la cepa *B. pumilus* CCIBP-C5, en plantas con presencia del patógeno, logró alargar el tiempo de evolución de los síntomas así como redujo la biomasa fúngica inicial lo que permitió mantener mayor cantidad de tejido fotosintéticamente activo durante el periodo evaluado (70 días) en condiciones de casa de cultivo.

El desarrollo de un bioproducto a partir de la cepa CCIBP-C5 podría contribuir al control de la enfermedad en programas de manejo integrado. Atendiendo a los resultados podría considerarse su uso sólo o combinado con otros productos, siempre que se demuestre su eficacia en condiciones de campo así como su compatibilidad en las formulaciones que se elaboren para permitir a las plantas llegar a la floración con un mayor número de hojas activas, lograr un mejor llenado del fruto y por tanto disminuir los efectos deletéreos de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

1. En la filosfera de los cultivares de *Musa* spp. evaluados existe diversidad de bacterias con predominio de bacilos esporulados y se pueden seleccionar cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.
2. La actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* de las cepas de *Bacillus* spp. seleccionadas, fue ocasionada por más de un mecanismo de acción.
3. El efecto de los filtrados de cultivo de las cepas de *Bacillus* spp., sobre el patógeno, la expresión de la enfermedad y las plantas inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo, depende de la cepa bacteriana empleada y del momento de la aplicación.
4. Con el filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5, se redujo la biomasa de *M. fijiensis* e inducir cambios bioquímicos y morfológicos relacionados con la respuesta de defensa en plantas en casa de cultivo.
5. El filtrado de cultivo de la cepa *B. pumilus* CCIBP-C5 tiene efecto biocontrolador frente a *M. fijiensis* mediante dos mecanismos: acción antifúngica e inducción de resistencia en plantas de *Musa* sp.
6. La actividad antifúngica *in vitro* del filtrado de cultivo de *B. pumilus* CCIBP-C5 frente a *M. fijiensis* se relaciona con la presencia de metabolitos de naturaleza proteica, entre estos, se detectaron compuestos con actividad quitinasa, así como lipopéptidos.

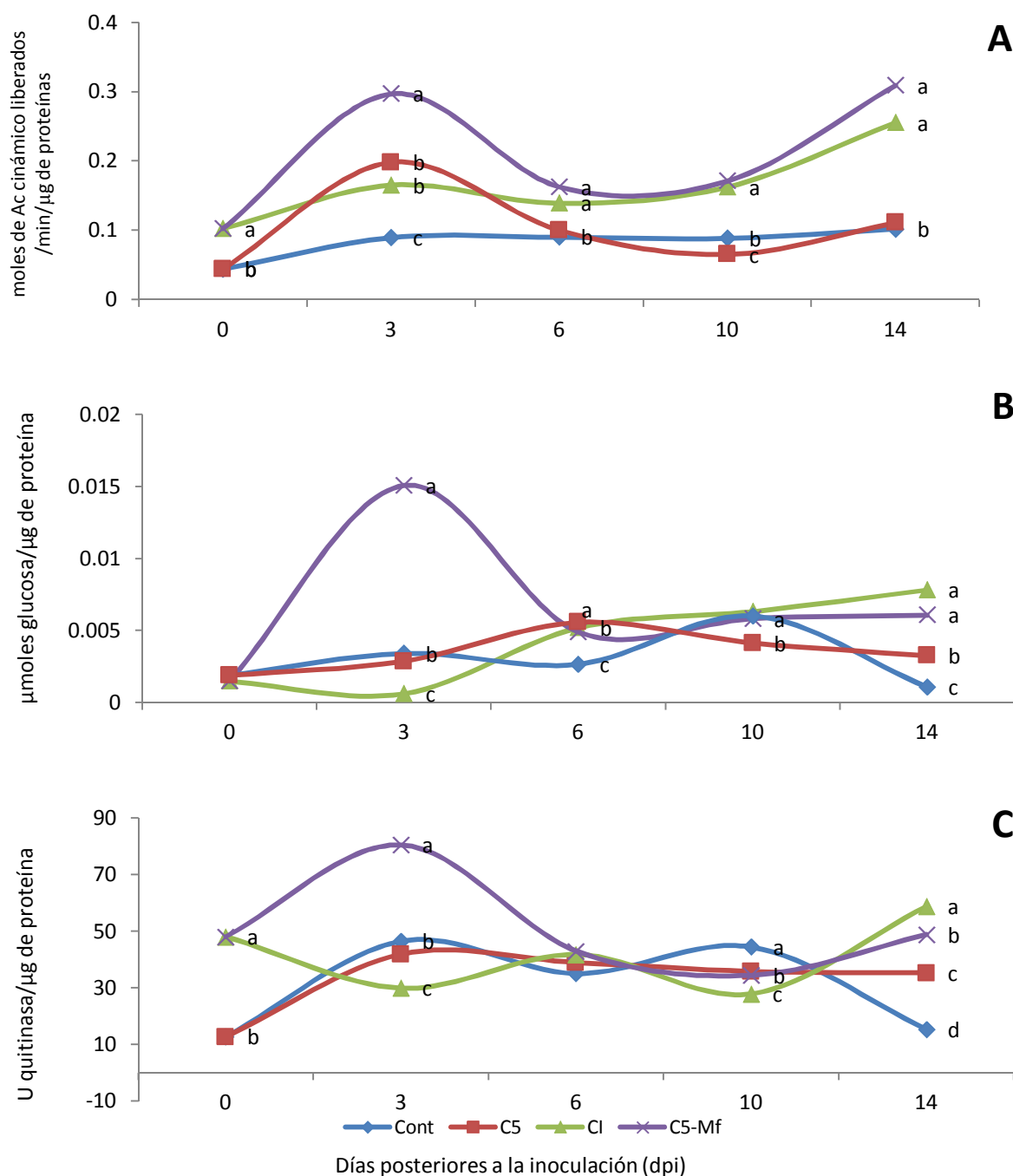


Figura 23. Efecto de los filtrados de cultivos bacterianos de la cepa CCIBP-C5 aplicados tres días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis* en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) en condiciones de casa de cultivo. A) Actividad fenilalanina amonio-liasas B) Actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa, C) Actividad quitinasa. Valores medios con letras desiguales en cada tiempo difieren por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . Cont (Control), C5 (aplicación del FC de la cepa CCIBP-C5), CI (Control inoculado), C5-Mf (plantas inoculadas con *M. fijiensis* y la aplicación del FC de CCIBP-C5).



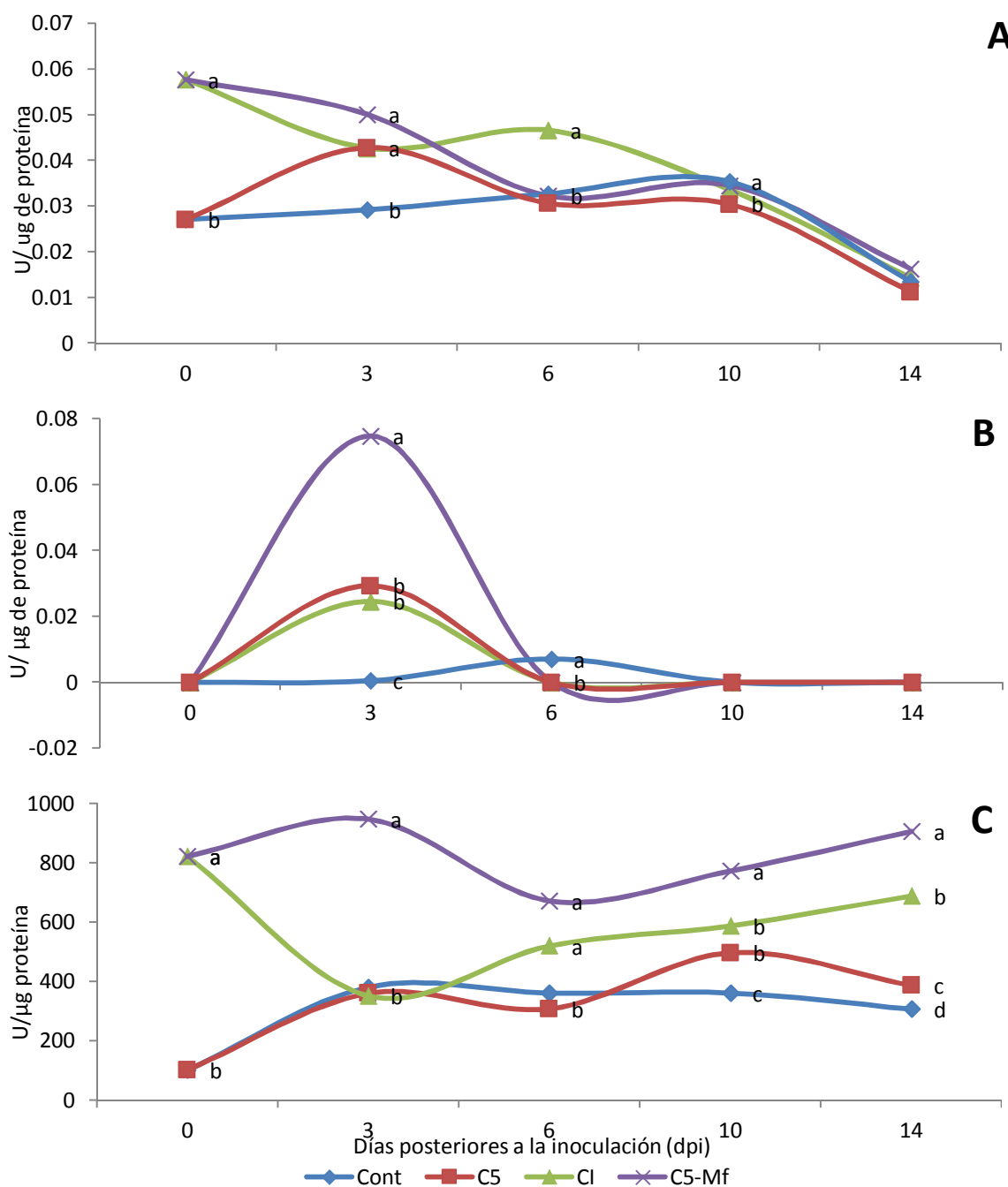


Figura 24. Efecto de los filtrados de cultivos bacterianos de la cepa CCIBP-C5 aplicados tres días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis* en plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) en condiciones de casa de cultivo. A) Actividad guayacol peroxidasa, B) Actividad ascorbato peroxidasa, C) Actividad superóxido dismutasa. Valores medios con letras desiguales en cada tiempo difieren por prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$ . Cont (Control), C5 (aplicación del FC de la cepa CCIBP-C5), CI (Control inoculado), C5-Mf (plantas inoculadas con *M. fijiensis* y la aplicación del FC de CCIBP-C5)

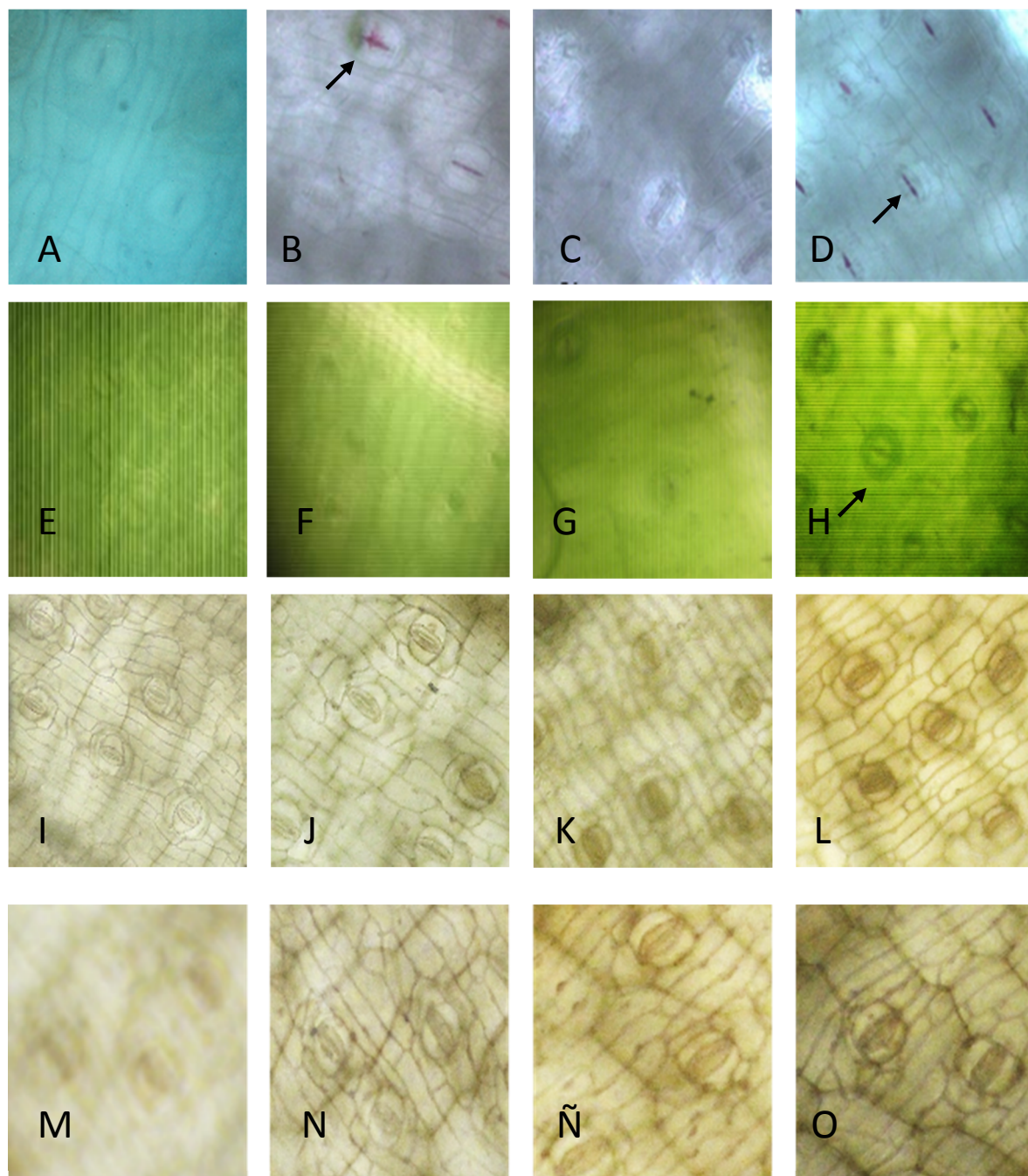


Figura 22. Micrografías de fragmentos de hojas de plantas de banana cv. 'Grande Naine' (*Musa AAA*) a los seis días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis* con: tinción de calosa (A-D), anión superóxido (E-H), fenoles (I-L) y lignina (M-O) en: (A,E,I,M) plantas sin inocular, (B,F,J, N) con la aplicación de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-C5, (C,G,K,Ñ) Control Inoculado y (D,H, L,O) inoculados artificialmente con *M. fijiensis* y la aplicación de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-C5 tres días posteriores a la inoculación. Las flechas representan la detección de calosa y anión superóxido

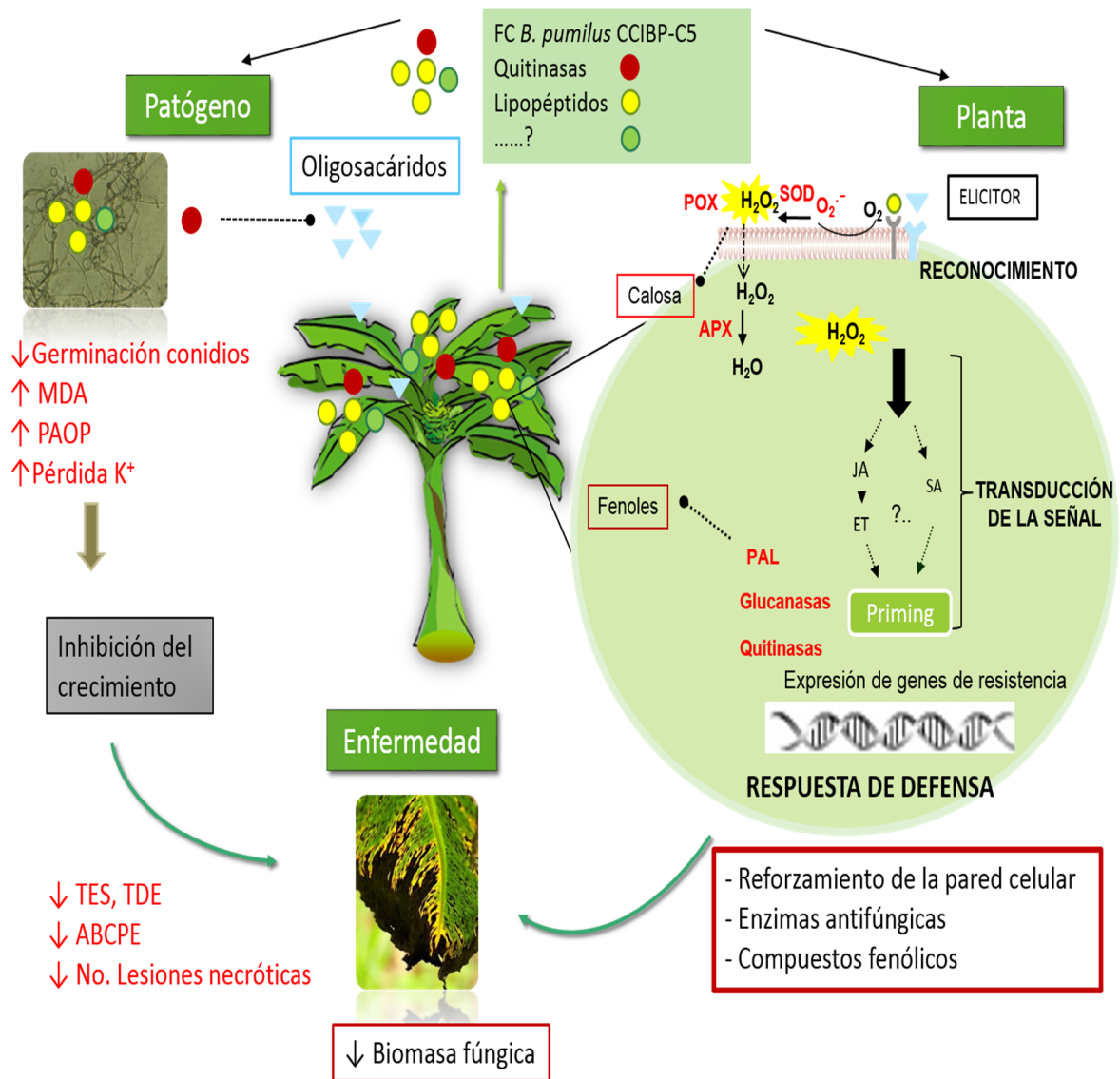


Figura 33. Integración de los mecanismos asociados al efecto del filtrado de cultivo de la cepa de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 sobre la interacción *Musa* sp.- *Mycosphaerella fijiensis*. Para ilustrar el efecto sobre la inducción de respuesta de defensa en plantas se utilizó como base el esquema propuesto por Ongena y Jacques (2008) (texto resaltado en rojo relaciona las determinaciones realizadas durante la investigación). (malondialdehído (MDA), productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP), iones potasio ( $K^+$ ), tiempo de evolución de los síntomas (TES), tiempo de desarrollo de la enfermedad (TDE), área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), anión superóxido ( $O_2^-$ ), guayacol peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasas (SOD), fenilalanina aminio-liasas (PAL), ácido jasmónico (JA), Etileno (ET), ácido salicílico (SA)).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, GN (2005) Plant Pathology 5th Edition Academia Press New York, EUA. pp. 922.
2. Almagro, L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA (2008) Class III peroxidases in plant defence reactions. Journal of Experimental Botany, 60:377-390.
3. Alvarado-Capó, Y, Leiva-Mora M, Rodríguez MA, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Portal O, Kosky RG, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance by using mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalante, JV (eds.) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. pp. 169-175. INIBAP, Montpellier.
4. Álvarez, E, Pantoja A, Gañán L, Ceballos G (2013) Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT No. 387. pp 40
5. Alvindia, DG (2012) Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils, and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*. Afr. J. Microbiol. Res., 6(15):3690-3695.
6. Arzanlou, M, Abeln EC, Kema GH, Waalwijk C, Carlier J, de Vries I (2007) Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. Phytopathology, 97(9):1112-1118.
7. Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.
8. Beltrán-García, M, Ogura T, Manzo G, Arias C (2006) Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas? Revista Mexicana de Fitopatología, 24(1): 50-58.
9. Carr, C. (2013) Aislamiento y selección de bacterias epífitas antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, del filopiano de musáceas con diferente nivel de resistencia a la enfermedad y en diferentes condiciones de cultivo. Tesis Mag. Sci. ITCR, Cartago, Costa Rica. pp. 87
10. Castellanos, L, Rivero T, Stefanova M, Villa P (2009) Efectividad biológica de Gluticid para el control de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de la Sigatoka negra del banano. Centro Agrícola, 36(3):83-88.
11. Castro, R (2015) Bioproducto a base de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* Rifai para el manejo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en bananeras orgánicas. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Cuba, 99p.

12. Ceballos, I, Mosquera S, Angulo M, Mira J, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V (2012) Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Microb Ecol., 64:641–653.
13. Churchill, ACL (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Mol. Plant Pathol. 12:307-328
14. Cristier, W (2014) Microbial lipopeptides: structure, occurrence and biology. <http://lipidlibrary.aocs.org>: 1-6.
15. Cruz de Carvalho, MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. Plant Signal Behavior, 3: 156-165.
16. Cruz-Cruz, CA, Ramírez-Tec G, García-Sosa K, Escalante-Erosa F, Hill L, Osbourn AE, Peña-Rodríguez LM (2009) Phytoanticipins from banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine) plants, with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka. European Journal of Plant Pathology, 126: 459–463.
17. Cruz-Martín, M, Acosta-Suárez M, Mena E, Roque B, Leiva-Mora M, Pichardo T, del Pilar-Castro R, Alvarado-Capó Y (2013) Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. Biotecnología Vegetal, 13(4):219-224.
18. Das, P, Mukherjee S, Sen R (2008) Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. Journal of Applied Microbiology, 104:1675–1684.
19. Delledonne, M (2005) “NO News Is Good News for Plants,” Current Opinion in Plant Biology, 8(4):390-396.
20. Desoignies, N, Schramme F, Ongena M, Legrève A (2013) Systemic resistance induced by *Bacillus* lipopeptides in *Beta vulgaris* reduces infection by the rhizomania disease vector *Polymyxa betae*. Molecular Plant Pathology, 14:416-421.
21. Ferreira, RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. Molecular Plant Pathology, 8(5):677-700.
22. Fouré, E (1985) Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon. Fruits, 40:393-399.
23. Fu, G, Huang S, Ye Y, Wu Y, Cen Z, Lin S (2010) Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. Biological Control, 55:1-10.

24. García-Gutiérrez, L, Zerrouh H, Romero D, Cubero J, de Vicente A, Pérez-García A (2013) The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid dependent defence responses. *Microbial Biotechnology*, 6:264-274.
25. González, R, Bustamante E, Shannon P (1996) Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Manejo Integrado Plagas*, 40:12–16.
26. Guzmán, M (2012) Control biológico y cultural de la Sigatoka negra. *Tropical Plant Pathology* 37 (Suplemento). 45° Congresso Brasileiro de Fitopatologia -Manaus, AM.
27. Guzmán, M, Orozco-Santos M, Pérez-Vicente L (2013) Sigatoka leaf spot diseases of bananas: dispersion, impact and evolution of management strategies in Latin American-Caribbean region. XX Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (Bananas e Plátanos) 9 a 13 de setembro. Acorbat. Brasil. Fortaleza, CE.
28. Hemissi, I, Mabrouk Y, Mejri S, Saidi M, Sifi B (2013) Enhanced defence responses of chickpea plants against *Rhizoctonia solani* by pre-inoculation with rhizobia. *Journal of Phytopathology*, doi:10.1111/jph.12071.
29. Hernández-Reyes, C, Schenk S, Neumann C, Kogel KH, Schikora A (2014) N-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. *Microbial Biotechnology*, 7: 580–588.
30. Jiménez, J, Moreno LP, Magnitskiy S (2012) Respuesta de las plantas a estrés por inundación. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6 (1): 96-109.
31. Jiménez, JM, Galindo JJ, Ramírez C (1987) Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epifitas. En: *Proceedings of the 7th Acorbat Meeting*, Catie Turrialba, Costa Rica, pp. 105–109.
32. Jourdan, E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthelemy JP, Thonart P, Ongena M (2009) Insights into the defense related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact.*, 22:456-468.
33. Leiva-Mora, M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Roque B (2010) Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotecnología Vegetal*, 10 (2):79-88.
34. Levy, A, Erlanger M, Rosenthal M, Epel BL (2007) A plasmodesmata associated beta-1, 3-glucanase in Arabidopsis. *Plant J.*, 49:669-682.
35. Marín, D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87(3):208-222



36. Meziane, H. Van der Sluis I., Van Loon LC, Höfte M, Bakker P (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.*, 6:177-185.
37. Mogollón-Ortiz, AM, Castaño-Zapata J (2011) Efecto de inductores de resistencia en plántulas de plátano Dominico-Hartón (*Musa balbisiana* AAB) contra *Mycosphaerella* spp. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat.*, 35(137).
38. Mosquera, O, Echeverry L, Osorio J (2009) Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia et Technica*, XV (41): 232-236.
39. Ongena, M, Duby F, Jourdan E, Beaudry T, Jadin V, Dommes J, Thonart P (2005) *Bacillus subtilis* M4 decrease plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 67(5):692-698.
40. Ongena, M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol.*, 9:1084-1090.
41. Pan, SQ, Ye XS, Kuc J (1991) Association of  $\beta$ -1,3 glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mold in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 39:25-39.
42. Patiño, LF, Bustamante E, Salazar EM (2007) Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa x paradisiaca* L.) y plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica (Chile)*, 67(4):437-445.
43. Patykowski, J, Urbanek H (2003) Activity of enzymes related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 151:153-161.
44. Pérez, R, Negrín M, Cuéllar E, Castellanos L (2014) Indicadores del crecimiento, desarrollo y rendimiento de cinco cultivares híbridos de banano. *Centro Agrícola*, 41(4):75-80.
45. Ran, LX Li ZN, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker P (2005) Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Eur. J. Plant Pathol.*, 113: 59-70.
46. Raaijmakers, JM, de Bruijn I, de Kock MJ (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp. diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 19:699-710.
47. Ryu, C, Farag MA, Hu C, Reddy MS, Paré PW, Kloepper JW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 134:1017-1026.

48. Salazar, LM, Patiño LF, Bustamante E (2006) Sustratos foliares para el incremento de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas en la filosfera de banano. Rev. Fac. Nac. Agr., Medellín, 59(2):3449-3465.
49. Sánchez-García, C, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B (2010) Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal, 10 (2):89-97.
50. Serrano, L., Manker D, Brandi F, Cali T (2013) The use of *Bacillus Subtilis* QST 713 and *Bacillus pumilus* QST 2808 as protectant fungicides in conventional application programs for black leaf streak control. Acta Hort., (ISHS) 986:149-155.
51. Smyth, TJ, Perfumo A, McClean S, Marchant R, Banat IM (2010) Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. En: Timmis, KN (ed.) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, 3687-3704. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
52. Tikhonov, VE, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Jansson HB (2002) Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genetics and Biology, 35: 67-78.
53. Torres, J, Calderón H, Rodríguez-Arango E, Morales JG, Arango R (2012) Differential induction of pathogenesis-related proteins in banana in response to *Mycosphaerella fijiensis* infection. European Journal of Plant Pathology, 133:887-898.
54. van Loon, LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol., 44:135–162.
55. Wang, CW, Xing J, Chin CK, Peters JS (2002) Fatty acids with certain structural characteristics are potent inhibitors of germination and inducers of cell death of powdery mildew. Physiol Mol Plant Pathol., 61:151-161.
56. Waewthongrak, W, Leelasuphakul W, McCollum G (2014) Cyclic Lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS–S14 elicit defense-related gene expression in Citrus Fruit. PLOS ONE, 9(10): 1-11.
57. Yamamoto, S; Shiraishi S, Suzuki S (2014) Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*?. Letters in Applied Microbiology, 60:379-386.



## **Artículos publicados**

# *Antifungal activity of Musa phyllosphere Bacillus pumilus strain against Mycosphaerella fijiensis*

**Mileidy Cruz-Martín, Mayra Acosta-Suárez, Eilyn Mena, Berkis Roque, Tatiana Pichardo & Yelenys Alvarado-Capó**

## **Tropical Plant Pathology**

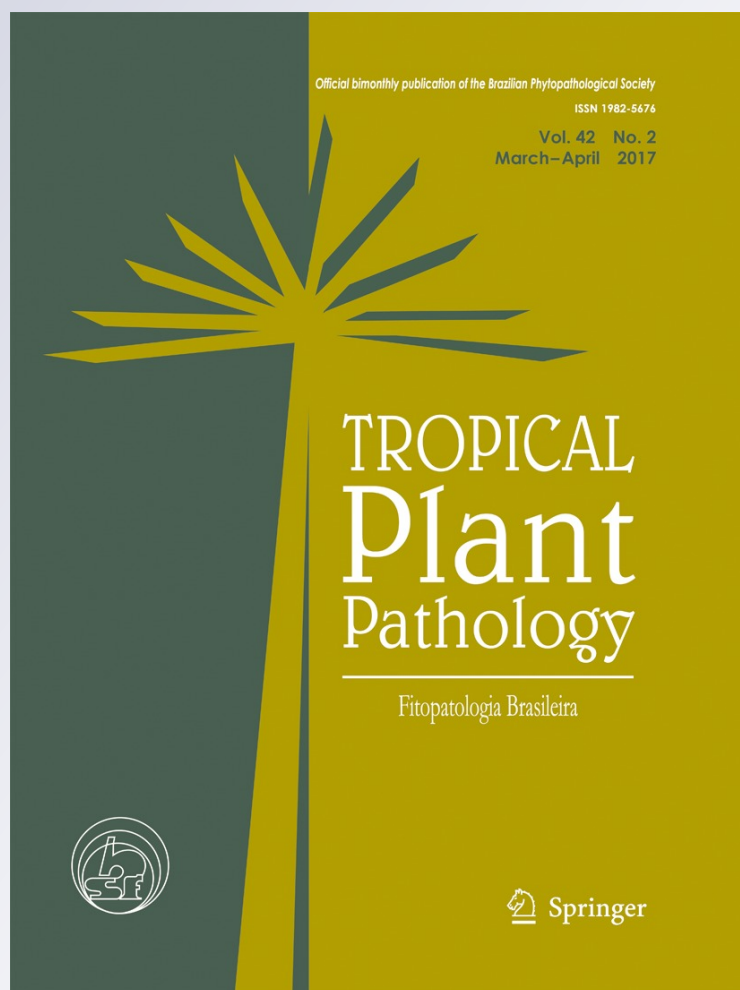
e-ISSN 1983-2052

Volume 42

Number 2

Trop. plant pathol. (2017) 42:121-125

DOI 10.1007/s40858-017-0139-3



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Sociedade Brasileira de Fitopatologia. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

SHORT COMMUNICATION

# Antifungal activity of *Musa* phyllosphere *Bacillus pumilus* strain against *Mycosphaerella fijiensis*

Mileidy Cruz-Martín<sup>1</sup> · Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup> · Eilyn Mena<sup>1</sup> · Berkis Roque<sup>1</sup> · Tatiana Pichardo<sup>1</sup> · Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>

Received: 3 October 2016 / Accepted: 6 February 2017 / Published online: 27 February 2017  
© Sociedade Brasileira de Fitopatologia 2017

**Abstract** Black leaf streak disease (BLSD; also known as black Sigatoka) caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet is one of the main diseases affecting banana trees worldwide. Associated microorganisms in the phylloplane have been previously studied for their control. An exhaustive understanding of biocontrol mechanisms will potentiate the biological control agent. Therefore, strain *Bacillus pumilus* CCIBP-C5, isolated from banana leaves surface was evaluated for *in vitro* antagonism against *M. fijiensis* and the effect of culture filtrate on fungal growth and disease progress was determined. Bacterial cell and its diffused metabolites inhibited *M. fijiensis* growth. The culture filtrate of *B. pumilus* affected the mycelial growth, with antifungal effect on hyphal tip, membrane permeability and integrity. Also, a reduction of number of BLSD necrotic lesions and disease progression were found after application of the *B. pumilus* CCIBP-5 culture filtrate in banana plants. Results indicate that CCIBP-C5 has potential for biological control of BLSD.

**Keywords** Black Sigatoka · Biological control · Culture filtrate · Greenhouse · Mycelial damage

Black leaf streak disease (BLSD) caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet reduces plant photosynthetic area and produces premature ripening of banana fruits (Churchill 2011).

Section Editor: Bernardo A. Halfeld-Vieira

✉ Mileidy Cruz-Martín  
mileidy@ibp.co.cu

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba 54830

Chemical products have been widely used and have been highly successful during many years to control the disease. However, serious concerns on pesticide residues and environmental pollution have emerged recently. In addition, the development of fungicide resistance triggered the search for sustainable alternatives.

Associated microorganisms of the phylloplane and the rhizosphere of multiple crops have been used for the control of various diseases. Ceballos et al. (2012) found that five percent of aerobic endospore forming bacteria from banana phyllosphere showed *in vitro* antifungal activity against *M. fijiensis*. Gutierrez-Monsalve et al. (2015) evaluated the effect of a microbial fungicide (MF) based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 against BLSD. The MF used in different programs with systemic fungicides reduced disease intensity up to 42.9%, and did not differ from the conventional program. The efficacy of MF depends mainly on the metabolites produced by the bacterial cells. However, the mechanism of biocontrol is still not fully understood. The current study is aimed at analyzing the antifungal effect of *B. pumilus* strain against *M. fijiensis*. For this purpose, the *in vitro* antifungal activity of bacterial cells and its culture filtrate was assayed. Finally, the effect of culture filtrate on artificially inoculated plants was determined.

*Bacillus pumilus* CCIBP-C5 was isolated from banana phyllosphere and identified using the API 50 CHB kit (BioMérieux, Inc.). *Mycosphaerella fijiensis* strain CCIBP-Pf-83 was isolated from the leaves of the susceptible genotype ‘Grande naine’ (*Musa* AAA) and its identity was confirmed by PCR amplification of the internal transcribed spacer for ribosomal DNA, according to Johanson and Jeger (1993). The strain was stored in potato dextrose agar (PDA) culture medium at 4 °C until its subsequent use. *M. fijiensis* was grown in potato dextrose broth (PDB) medium for 15 days at 28 °C on a rotatory shaker at 120 rpm to obtain mycelial

suspensions. The suspension was homogenized with Ultra-Turrax T25 for one minute and the concentration was determined using a hemocytometer. Both strains are kept in the Microbiological Culture Collection at Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba.

A dual culture assay was performed to explore the bacteria effect on *M. fijiensis* mycelia on PDA. An overnight grown culture of CCIBP-C5 was centrifuged (10 min at 4 °C and 12 000 × g) and cells were adjusted to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.1 in deionized water. Seven microliters of bacterial suspension were inoculated in the center of plates containing PDA and fungal mycelial fragments (~5 × 10<sup>5</sup> fragments/mL). In the control plates, the bacterial suspension was replaced by sterile distilled water. The plates were kept at 28 °C for 72 h and inhibition zones were measured (mm). The experiment was repeated twice using two replicates.

In order to determine the antifungal activities of diffused compounds, plates containing PDA and fungal mycelial fragments were covered with a cellophane membrane and an aliquot (3 µL) of bacterial suspension (OD<sub>600nm</sub>=0.1) was placed in the middle of the plate. After incubation for 24 h at 28 °C, the membrane with the bacterial strain grown was removed, and the plate was incubated for 48 h at 28 °C. The fungal growth inhibition halo was measured and compared to control, where the bacterial suspension was replaced by sterile distilled water. The experiment was repeated three times. After that, CCIBP-C5 was grown for three days in nutrient broth (NB) medium at 30 °C and 120 rpm on an orbital shaker to obtain the culture filtrate (CF) containing the diffused compounds. *Bacillus pumilus* CF was obtained after centrifugation for 10 min at 4 °C and 12 000 × g followed by filtration through a 0.22 µm filter membrane.

The CF was diluted (1:10) in *M. fijiensis* mycelial suspension and incubated for 48 h at 28 °C. The control treatment contained NB inoculated with mycelial suspension. Fungal growth was determined by absorbance reading according to Cruz-Martín et al. (2013) using 96 wells microtiter plates. In addition, mycelia were observed under the optical microscope (400x) and described. The experiment was repeated twice using eight replicates per treatment.

The Congo red staining was used to allow visualization of chitin deposition at hyphal tip of *M. fijiensis*. After incubation with CF, Congo red was added to the fungal cultures to a final concentration of 1 mM. Ten minutes later the fluorescence was observed by confocal microscopy (excitation wavelength 543 nm; emission wavelength 560 to 635). The red staining of hyphal tip was an indication of growth inhibition.

The effect of CF of CCIBP-C5 strain on fungal membrane integrity was assessed by determining the concentration of potassium in the growth medium. *M. fijiensis* mycelial suspensions grown after 48 h culture were inoculated into 2 mL 5 mM Tris-HCl (pH 7) buffer solution and adjusted to 5 × 10<sup>5</sup> fragments/mL. Next, the CF diluted in the buffer solution

(1:10) was applied and incubated for 48 h at 28 °C in darkness. Fresh NB (1:10) was used as control. The assay was performed in triplicate. The potassium concentration in the growth medium was determined by atomic absorption spectrophotometry (Unicam SP9) and results were expressed in mg/L.

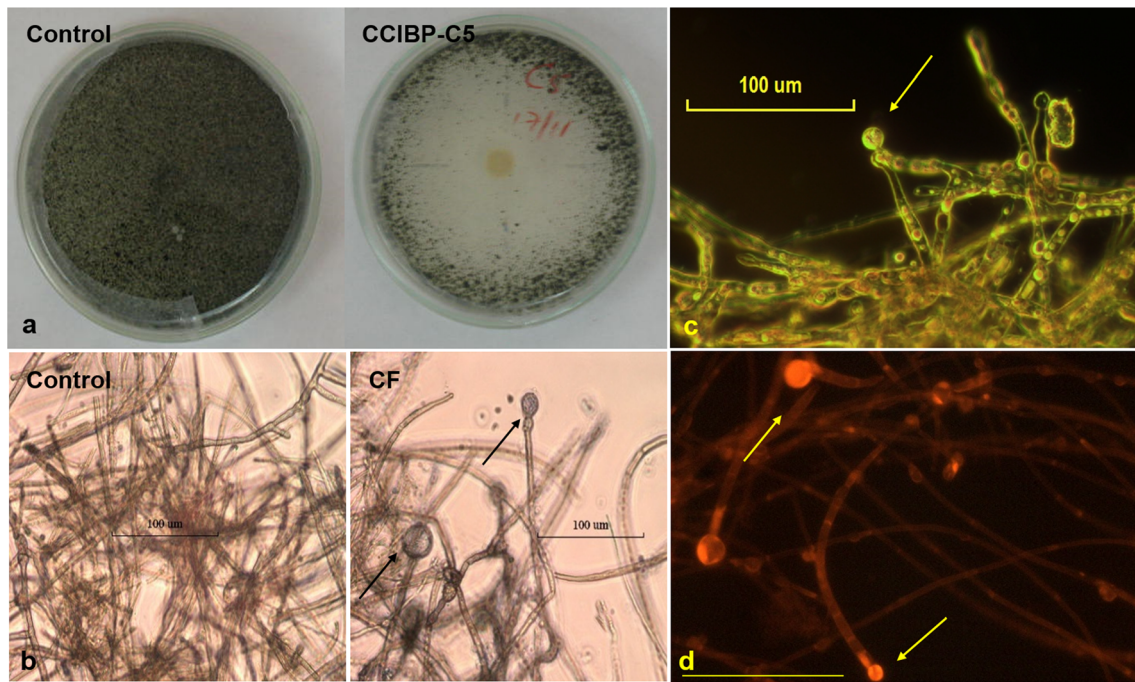
The effect of CF in oxidative stress was assessed by determination of lipid peroxidation and protein oxidation. The samples were obtained by inoculating the *M. fijiensis* suspension (~5 × 10<sup>5</sup> fragments/mL) in a flask with PDB medium and diluted CCIBP-C5 CF (1:10). The flasks were incubated for 48 h at 28 °C in the dark and mycelia were separated by centrifugation for 5 min at 4 °C and 10 000 × g. The extent of lipid peroxidation [malondialdehyde (MDA) as principal product] was estimated using the thiobarbituric acid assay described by Choi et al. (1996). Protein damage was determined by the advanced oxidation protein products (AOPP) assay (Matteucci et al. 2001) using Chloramine T as a standard.

Micropropagated 'Grande naine' plants were used to evaluate the effect of CF in the plant. Plants were grown for three months in the greenhouse until they reached 20 cm of height and had more than three developed leaves. Preparation of *M. fijiensis* mycelia suspension, artificial inoculation and evaluation of symptom development and evolution were carried out following the protocol described by Leiva-Mora et al. (2010). The first three leaves of the plants were inoculated with the fungal suspension containing 1% gelatin. The CF (~3 mL per leaf) was applied on the abaxial surface of the leaf at 72 h after (CF A) and 72 h before (CF B) *M. fijiensis* inoculation. An equal number of plants inoculated with *M. fijiensis* and NB were used as controls. A complete randomized design with five plants per treatment was set up in greenhouse conditions (>80% humidity, 28 ± 2 °C) and the experiment was repeated twice.

BLSD development was assayed every week during 70 days post inoculation (dpi) using the rating scale of Alvarado-Capó et al. (2003). The evaluation of inoculated leaves included: incubation time (defined as the time between inoculation and appearance of the first symptoms), disease development time (defined as number of days between inoculation and occurrence of lesions with whitish to gray centers that have a black border and are slightly depressed), area under disease progress curve (AUDPC) by Shanner and Finney (1977) and number of necrotic lesions. Furthermore, the efficacy of biocontrol was evaluated at 70 days according to Fu et al. (2010). In all experiments, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used for data analysis. Treatment means were separated by Mann-Whitney test using SPSS Statistics ver. 21.0 for Windows and the significance was set at P < 0.05.

*Bacillus pumilus* CCIBP-C5 inhibited *M. fijiensis* growth (Fig. 1a). An inhibition zone (35.7 mm of radio) was observed at 72 h in the presence of the bacterial suspension. This corroborated the presence of bacteria of the genus *Bacillus* with





**Fig. 1** Antifungal activity of *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 against *Mycosphaerella fijiensis*. **a)** Inhibition zone on mycelial growth by dual culture assay, **b)** Light micrographs of *M. fijiensis* hyphae after 48 h of incubation with nutrient broth culture medium (control) and after incubation with culture filtrate of CCIBP-C5 (CF) [note the swollen

(black arrow) hyphal tip] **c)** Deformation and vacuolization of *M. fijiensis* mycelium in culture filtrate treatment **d)** Mycelial growth is arrested by diffused metabolite (yellow arrows indicate strong Congo red staining at the protuberances on the tips of hyphae)

antifungal activity against *M. fijiensis* in the phyllosphere of *Musa* spp. that may constitute potential biological control agents. These results agree with those obtained by Ceballos et al. (2012).

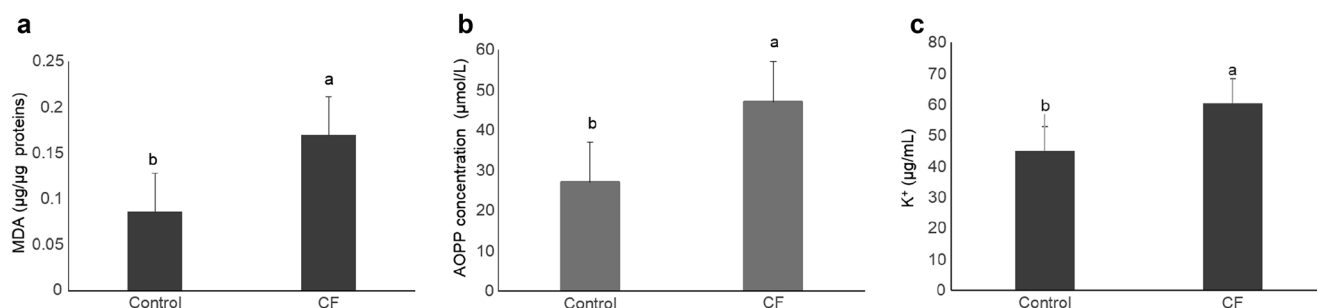
The antifungal activity was related to the production of diffused metabolites by the bacterial strain. This was confirmed by the effect of CF on *M. fijiensis* growth (Fig. 1b–d). The CF caused an inhibition of 45% of *M. fijiensis* growth *in vitro* with respect to control as measured by microtiter assay, suggesting an effect on the cellular structures of the fungus. Microscopical observations indicated that the untreated pathogen was completely filled, having intact fungal walls and defined membranes. However, it was observed that the CF of CCIBP-C5 produced morphological changes as shown by bulges or cracks in the hyphae tip of the mycelium as well as vacuolization (Fig. 1b–c). Zhou et al. (2008) detected similar deformations in mycelial morphology of *Penicillium expansum* (Link.) in the presence of *Paenibacillus polymyxa* culture filtrate and attributed it to peptidic metabolites probably acting on the cell membrane of the fungus and its permeability.

*Mycosphaerella fijiensis* cultures treated with CF exhibited strong Congo red staining at the protuberances in the tips of the hyphae (Fig. 1d). These results suggest that CF arrests hyphal growth in fungal culture. Fungal growth inhibition is

in accordance with the previous test of diffused metabolites of CCIBP-C5 bacterial cells with antifungal activity against *M. fijiensis*.

Also, *B. pumilus* CCIBP-C5 produced metabolites that have an effect on *M. fijiensis* membrane. An oxidative damage at membrane level and an increase in its permeability were found. CF clearly stimulated an oxidative burst on the mycelium of *M. fijiensis* and the damage was observed at lipid and proteins levels. As shown in Fig. 2, a significant increase in MDA and AOPP concentrations was observed when CF-CCIBP-C5 strain was applied. The results related to oxidative damage to lipids and proteins, main constituents of cell membranes, partly explain the deformations observed in *M. fijiensis* mycelium during exposure with the CF of CCIBP-C5 strain. Likewise, a significant increase of potassium ions in growth media was observed in the treated mycelium when compared to the control.

Wang et al. (2002) noted that changes in the plasma membrane represent the first step in a cascade of events that promotes internal osmotic imbalance and cytoplasmic disorganization. This process is characterized by abundant vacuole formation, increased aggregation and loss of cytoplasmic organelles. The deformations observed in *M. fijiensis* hyphae in the presence of CF could be related to damages in the mycelium cell wall. These metabolites could be hydrolytic enzymes (chitinase and glucanase), that degrade chitin and  $\beta$ -1,3-



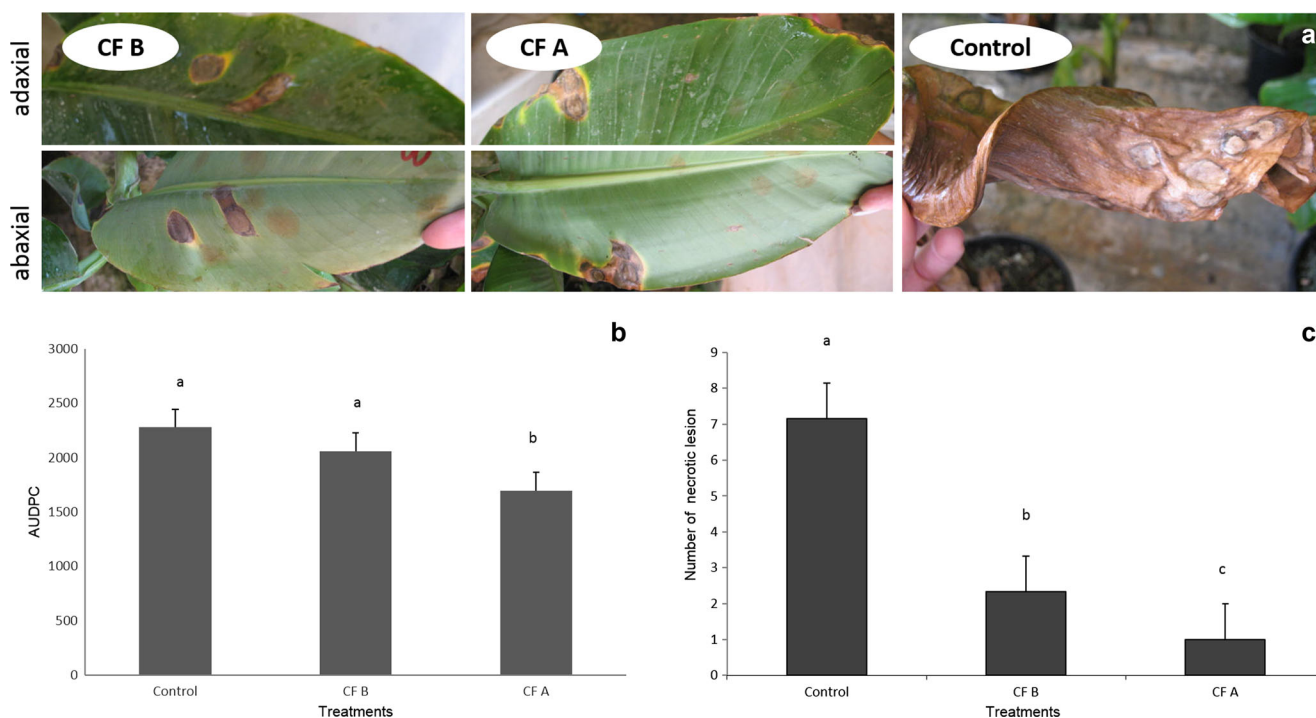
**Fig. 2** Oxidative stress on *Mycosphaerella fijiensis* CCIBP-Pf-83 mycelia in the presence of bacterial culture filtrate at 48 h of incubation. **a**) Measurement of malondialdehyde (MDA) production as result of membrane lipoperoxidation (mycelium plus culture medium). **b**)

Measurement of advanced oxidation protein products (AOPP) production. **c**) Measurement of concentrations of potassium in the growth medium. Different letters above bars indicate significant differences by Kruskal-Wallis/ Mann-Whitney at  $p < 0.05$  ( $n = 3$ )

glucan, constituents of ascomycetes cell wall. Likewise, Gutiérrez-Román et al. (2015) and Moreno et al. (2016) have proposed to reduce or complement chemical disease management programs against BLSD with the use of chitinolytic microorganisms. Also, in CF of *B. pumilus* CCIBP-C5, lipopeptides could be present. Ruangwong et al. (2012) found globular structures or swelling at the conidia ends of *Colletotrichum gloeosporioides* by the action of lipopeptides (iturins) present in the culture filtrate of *B. subtilis*. *Bacillus* lipopeptides have been studied for their antagonistic activity against a wide range of phytopathogenic microorganisms

including viruses, bacteria, fungi and oomycetes. In addition, it has been shown that these compounds also facilitate root colonization (Stein 2005) and reinforce the host's resistance potential (Ongena et al. 2007).

In *Musa* plants inoculated with *M. fijiensis* and in the presence of CF, typical symptoms of disease were observed as previously described by Alvarado-Capó et al. (2003). The incubation time for all treatments was 14 days. In all cases, the pathogen completed the cycle of disease and necrotic lesions with dry center were observed in the evaluation period (Fig. 3a). However, the inoculated plants with the CF applied



**Fig. 3** Effect of culture filtrate of *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 in artificially inoculated banana plants with *Mycosphaerella fijiensis* under greenhouse conditions. **a**) Banana plants artificial inoculated with *M. fijiensis* at 70dpi, **b**) Area under disease progress curve (AUDPC) (from 21 to 70 dpi). Different letters on bars indicate significant differences by Kruskal-Wallis / Mann-Whitney,  $p < 0.05$  ( $n = 10$ ). **c**)

Number of necrotic lesions at 49 dpi. Different letters on bars indicate significant differences by Kruskal-Wallis / Mann-Whitney,  $p < 0.05$  ( $n = 10$ ). (Control) plants inoculated with *M. fijiensis* suspension, (CF B) CF applied in the abaxial surface of the leaf at 72 h before *M. fijiensis* inoculation, (CF A) CF applied at 72 h after *M. fijiensis* inoculation

three days after inoculation did not reach the state 5 of symptoms according to the qualitative scale used.

On the other hand, plants inoculated with *M. fijiensis* (control) completed the disease cycle 42 days after inoculation. In comparison, treatments with CCIBP-C5 CF showed a significant disease reduction. The CF B treatment delayed the disease progress by 21 days, while treatment CF A did it by 28 days with respect to control. Comparisons of AUDPC values indicated that the CF applied after inoculation of *M. fijiensis* showed significant differences with respect to the control (Fig. 3b). This variable quantifies the amount of disease in a given period and its lower value with respect to the control indicates a pathogen reduction on the plant or a reduction of the initial inoculum. Also, fewer necrotic lesions were observed in treatment with CF after pathogen inoculation (86% lower compared to control) (Fig. 3c). Moreover, with a single application of CCIBP-C5 CF (after pathogen inoculation) the efficiency of disease control was of 33.6% at 70 dpi. The CF did not contain preservatives or stabilizers that protect it from the action of sunlight, water irrigation or other environmental factors it was exposed to, which indicates its potential. Until now, similar results related to biological control of bacterial culture filtrate against BLSD have not been reported.

The results of this study expand our understanding of the mechanisms by which *B. pumilus* CCIBP-C5 exerts antifungal activity against *M. fijiensis*. The biocontrol effects of CF-CCIBP-C5 on banana plants artificially inoculated with *M. fijiensis* might be attributed to production of antifungal metabolites with negative effects on hyphal tip structure and membrane damage. The characteristics of this strain and its metabolites, make it a promising agent for the biological control of BLSD on banana.

**Acknowledgements** The authors are grateful to MSc. Miguel Tzec for his help in microscopy techniques. Partial financial support for this work was an output of a scholarship from the Food Security Center from the University of Hohenheim, which is part of the DAAD (German Academic Exchange Service) program “exceed” in cooperation with the host institute Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), México and PhD Blondy Canto Canché.

## References

- Alvarado-Capó Y, Leiva-Mora M, Rodríguez MA, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Portal O, Kosky RG, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. In: Jacome L, Lepoivre P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalante JV (eds) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, pp 169–175
- Ceballos I, Mosquera S, Angulo M, Mira J, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V (2012) Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Microb Ecol 64:641–653
- Choi G, Lee HJ, Cho K (1996) Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pest Biochem Physiol 55:29–39
- Churchill AC (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Mol Plant Pathol 12:307–328
- Cruz-Martín M, Acosta-Suárez M, Mena E, Roque B, Leiva-Mora M, Pichardo T, del Pilar-Castro R, Alvarado-Capó Y (2013) Cuantificación del crecimiento in vitro de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. Biotecnología Vegetal 13:219–224
- Fu G, Huang S, Ye Y, Wu Y, Cen Z, Lin S (2010) Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. Biol Control 55:1–10
- Gutierrez-Monsalve JA, Mosquera S, González-Jaramillo LM, Mira JJ, Villegas-Escobar V (2015) Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture. Biol Control 87:39–46
- Gutiérrez-Román MI, Holguín-Meléndez F, Dunn F, Guillén K, Huerta-Palacios G (2015) Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa* spp.). BioControl 60:565–572
- Johanson LH, Jeger MJ (1993) Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. Mycol Res 97:670–674
- Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Roque B (2010) Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. Biotecnología Vegetal 10:79–88
- Matteuci E, Biasci E, Giampietro O (2001) Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. Acta Diabetol 38:187–189
- Moreno B, Dunn F, Guillén K, Holguín F, Hernández M, Encarnación S, Huerta G (2016) Antifungal performance of extracellular chitinases and culture supernatants of *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. World J Microbiol Biotechnol 32:44
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ Microbiol 9:1084–1090
- Ruangwong O, Chang C, Lamine S, Liang W (2012) Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Afr J Microbiol Res 6:3732–3738
- Shanner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of show-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67:1051–1056
- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol 56:845–857
- Wang C, Xing J, Chin CK, Peters JS (2002) Fatty acids with certain structural characteristics are potent inhibitors of germination and inducers of cell death of powdery mildew. Physiol Mol Plant Pathol 61:151–161
- Zhou W, Huang J, Niu T (2008) Isolation of an antifungal *Paenibacillus* strain HT16 from locusts and purification of its medium dependent antagonistic component. J Appl Microbiol 105:912–919



## Diversidad de cepas bacterianas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Mileidy Cruz-Martín<sup>1</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Tatiana Pichardo<sup>1</sup>, Rosa Castro<sup>2</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: mileidy@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Recursos Naturales, Departamento de Fitopatología, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). Panamericana Sur km 1 ½. Riobamba. Chimborazo. Ecuador. CP 06-01-4703.

### RESUMEN

La búsqueda de alternativas a los plaguicidas agrícolas que se emplean para el manejo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) incluye la selección de cepas de microorganismos con potencial para el control de este patógeno. El objetivo del trabajo fue caracterizar cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. con efecto antifúngico frente a *M. fijiensis*. Se realizó una caracterización morfológica, cultural, fisiológica y molecular de las cepas y se cuantificó la actividad antifúngica de estas mediante cultivo dual. Se comprobó la diversidad de bacterias con propiedades antifúngicas frente a *M. fijiensis* presentes en la filosfera *Musa* spp. Además, se constató que la filosfera de estos cultivos puede utilizarse como fuente de obtención de posibles controles biológicos de *M. fijiensis*.

Palabras clave: bacterias, biocontrol, epifitos, Sigatoka negra

## Bacterial strains diversity in *Musa* spp. phyllosphere with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

### ABSTRACT

The search for alternatives to agricultural pesticides used for the management of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) includes the selection of microorganisms strains with potential for the control of this pathogen. The objective of the work was to characterize bacterial strains isolated from the phyllosphere of *Musa* spp. with antifungal effect against *M. fijiensis*. A morphological, cultural, physiological and molecular characterization of the strains was performed and the antifungal activity of these strains was quantified by dual culture. It was verified the diversity of bacteria with antifungal properties against *M. fijiensis* present in the phyllosphere of *Musa* spp. In addition, it was found that the phyllosphere of these crops can be used as a source of obtaining possible biological controls of *M. fijiensis*.

Keywords: bacteria, biocontrol, Black Sigatoka, epiphytes

### INTRODUCCIÓN

El control biológico para patógenos foliares, puede ser una alternativa complementaria dentro del manejo de enfermedades, la cual frecuentemente involucra la aplicación del microorganismo antagonista sobre la superficie de la hoja (Agrios, 2005). El uso de productos biológicos está encaminado además del propio control, lograr la seguridad alimentaria, al adquirir alimentos libres de sustancias tóxicas (Cawoy *et al.*, 2011).

Sin embargo, el éxito de dicho antagonista depende de su capacidad para establecerse

como miembro de la microbiota epifita, especialmente cuando se requiere disminuir el inóculo del patógeno (Marín *et al.*, 2003). Por tal motivo, el uso de antagonistas microbianos nativos debería preferirse al uso de antagonistas aislados de otros ambientes, pues los primeros se encuentran adaptados a las condiciones que determinan el hábitat en la superficie de la hoja (Ceballos *et al.*, 2012).

Las tendencias actuales en la búsqueda de alternativas a los plaguicidas agrícolas incluyen el aumento del uso de los procesos

de selección para identificar cepas de microorganismos con potencial para el control de patógenos causantes de enfermedades. Esta etapa preliminar, podría proporcionar herramientas adicionales para las alternativas de manejo de enfermedades con productos biológicos que posean diferentes mecanismos de acción que los plaguicidas químicos (Alvindia, 2012).

Entre las enfermedades foliares más devastadoras de los plátanos y bananos (*Musa* spp.) se encuentra la Sigatoka negra, causada por el ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Está considerada la enfermedad más limitante de estos cultivos ya que reduce el rendimiento y la productividad dentro de la plantación (Churchill, 2011).

En la búsqueda de productos biológicos efectivos contra *M. fijiensis* se han estudiado diferentes microorganismos (bacterias y hongos) asociados a estos cultivos (Alvindia y Natsuaki, 2008; Ceballos *et al.*, 2012). Por esta razón el objetivo del trabajo fue caracterizar fisiológica, bioquímica y molecularmente bacterias presentes en la filosfera de *Musa* con efecto antifúngico frente a *M. fijiensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas bacterianas*

Para este estudio se emplearon 19 cepas bacterianas pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Estas fueron aisladas de la filosfera de diferentes cultivares de *Musa* spp. y se seleccionaron por su actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010).

### *Caracterización cepas*

Se realizó una caracterización morfológica, cultural, fisiológica y molecular de las cepas. Para ello se llevaron a cabo observaciones microscópicas, se describieron los caracteres culturales y se determinó la respuesta a pruebas bioquímicas de acuerdo con los protocolos descritos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg y Holt, 1984; Krieg y Holt, 1986).

Para la caracterización molecular se empleó la técnica de amplificación de la región 16S ribosomal. Para la purificación del ADN genómico de los aislados bacterianos se empleó el protocolo propuesto por Pereira de Melo *et al.* (2009). Se utilizaron los cebadores 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 907R (5'CCGTCATTCTMTTTRAGTTT 3') que amplifican regiones específicas de la subunidad 16S del ADN ribosomal.

El producto de la amplificación del gen de 16S fue aplicado en geles de agarosa 1%. Las bandas fueron purificadas con el uso del Kit GENE CLEAN II (Q-BIOgene) y el ADN resultante se cuantificó en espectrofotómetro Nanodrop (Thermo sciences). El amplicón fue secuenciado por Macrogen Inc. (Seul, Korea) y con las secuencias obtenidas se realizó un árbol filogenético que fue elaborado mediante el método del vecino más cercano y las secuencias se agruparon juntas basado en un *bootstrap* de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Probabilidad Máxima Compuesta (Tamura *et al.*, 2004) y utilizando el programa MEGA 7.0.14.

### *Cuantificación de la actividad antifúngica*

Para la cuantificación de la actividad antifúngica de las cepas se empleó el método de cultivo dual y como inóculo fúngico se utilizaron suspensiones miceliares de *M. fijiensis*. Se prepararon placas de Petri (90.0 mm) como se describe a continuación. En un Erlenmeyer con 200.0 ml de Agar Papa Dextrosa (PDA) (Fluka) fundido (~ 40 °C) se añadieron 20.0 ml de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (para una concentración final de  $5.0 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $\text{ml}^{-1}$ ). Se homogenizó la mezcla y se vertió en las placas de Petri. Cuando las placas estuvieron secas, se añadieron en el centro de la placa 7.0  $\mu\text{l}$  de cada suspensión bacteriana (una cepa por placa de Petri) ajustada a  $\text{DO}_{600}=0.1$  (Eppendorf Biophotometer), a partir de cultivos bacterianos de 24 horas de crecidos en Agar nutriente (Biocen). Como control se emplearon 7  $\mu\text{l}$  de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 horas.

La evaluación se realizó mediante la medición del halo de inhibición (mm) del crecimiento

del patógeno a las 72 horas de incubación. Se emplearon tres réplicas por cada cepa bacteriana y el ensayo se repitió tres veces. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la caracterización de las bacterias antagonistas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. se pudo comprobar la diversidad presente entre estas cepas que poseen actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*.

Se identificaron tres familias *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Micrococcaceae*. Predominaron los bacilos esporulados (*Bacillus*) (52.6%) y otro 31.5% de las cepas se agruparon como otros bacilos Gram+ no formadores de esporas. Entre las características distintivas de las cepas analizadas estuvo su diversidad metabólica ya que fueron capaces de degradar *in vitro* varios sustratos tales como caseína (63% de las cepas) gelatina (53%) y almidón (11%). Las características principales de cada una de las cepas se presentan en las tablas 1, 2, 3 y 4.

La preponderancia del género *Bacillus*, en la superficie de hojas de *Musa* spp. bajo las condiciones de cultivo en Cuba coinciden con los resultados referidos por Ceballos *et al.* (2012) en Urabá, Colombia. Estos autores encontraron que el 44% del total de las bacterias cultivables, pertenecían al grupo de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas. La presencia de estas estructuras y la producción de sustancias con actividad antifúngica puede ser la causa del predominio de cepas pertenecientes al género *Bacillus*. Estas características les permiten la subsistencia y competencia en condiciones ambientales desfavorables (Todar, 2003). 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. También su actividad antimicrobiana puede estar dada por la producción de péptidos

antimicrobianos (Arguelles-Arias *et al.*, 2009), enzimas líticas como glucanasas y quitinasas (Rao-Podile y Neeraja, 2011) y lipopéptidos. Los bioproductos basados en *Bacillus* son ampliamente empleados en la agricultura convencional y representan la clase más importante de productos viables para el uso fitosanitario (Pérez-García *et al.*, 2011). Según Cawoy *et al.* (2011) entre los bioproductos disponibles en el mercado formulados a partir de bacterias, la mayoría de ellos contienen especies de *Bacillus*.

Mediante el análisis molecular se logró la amplificación del ADN bacteriano y se corroboró la diversidad bacteriana presente en la filosfera de *Musa* spp. (Figura 1). Autores como Yang *et al.* (2001) demostraron con estudios que no requieren el cultivo del microorganismo, que los habitantes de las hojas son mucho más diversos que lo predicho por los estudios tradicionales. Sumado a esto, Yadav *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2010) en análisis de las comunidades bacterianas de la filosfera de plantas han revelado que estas son diversas tanto cuantitativa como cualitativamente.

El método de cultivo dual empleado permitió cuantificar la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas bacterianas frente *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 (Figura 2).

En cuanto a la actividad antifúngica, propiedad que fue utilizada como criterio de selección, también se observaron diferencias significativas entre las cepas mediante el método de evaluación empleado (Tabla 5).

Se observaron halos de inhibición bien definidos a las 72 horas de incubación y estos oscilaron entre 11.2 y 42.0 mm. Mediante esta técnica se pudieron observar diferencias entre las cepas en cuanto a la actividad antifúngica *in vitro* y corroborar los resultados anteriores sobre la diversidad de las bacterias presentes en la filosfera de bananos (Ceballos *et al.*, 2012). Incluso, dentro de una misma familia se observaron diferencias significativas en cuanto al diámetro del halo de inhibición, de ahí la importancia de realizar este tipo de determinaciones cuantitativas para la selección de cepas.

Tabla 1. Principales características de los aislados de la familia *Bacillaceae* aisladas de la filosfera de *Musa spp.*

Características	CCIBP-A2	CCIBP-A3	CCIBP-A5	CCIBP-B1	CCIBP-B2	CCIBP-B3	CCIBP-B4	CCIBP-B5	CCIBP-B.1	CCIBP-C5
Color colonia (AN)	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B
Agrupación	S	S	S	S	S	S	P	S	S	S
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Espora	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deformación esporangio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hugh y Leifson oxidativo	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
fermentativo	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Indol	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Hidrólisis almidón	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hidrólisis caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Hidrólisis gelatina	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Voges Proskauer	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Leyenda: B- beige, A-amarillo, S-solos, P-parejas

Tabla 2. Principales características de otros bacilos Gram+ no formadores de esporas aislados de la filosfera de *Musa* spp.

Características	CCIBP-A4	CCIBP-A6	CCIBP-C1	CCIBP-C2	CCIBP-C3	CCIBP-C4
Color colonia (AN)	Amarillo claro	Amarillo oscuro	Amarillo claro	Rosado	Amarillo claro	Amarillo claro
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Hugh y Leifson						
oxidativo	-	-	-	-	-	-
fermentativo	+	+	+	+	+	+
Indol	-	+	+	-	+	+
Hidrólisis						
almidón	+	-	-	-	-	-
Hidrólisis						
caseína	+	-	+	-	+	-
Hidrólisis						
gelatina	+	-	+	+	+	-
Voges						
Proskauer	-	-	-	-	+	-

Tabla 3. Principales características de las cepas de la familia *Pseudomonadaceae* aisladas de la filosfera de *Musa* spp.

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

Teniendo en cuenta los resultados de la caracterización de las cepas bacterianas tanto bioquímica, fisiológica, molecularmente así como de su actividad antifúngica se pudo constatar la diversidad existente en las bacterias presentes en la filosfera de *Musa* spp., que poseen actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. Estos resultados coinciden con los

referidos por otros autores como Osorio *et al.* (2004) para las condiciones de cultivo en Colombia.

Los resultados alcanzados en este trabajo reafirman, además, lo planteado por Redford *et al.* (2010) acerca de que las bacterias presentes en la filosfera no son simples

Tabla 4. Principales características de las cepas de la familia *Micrococcaceae* aisladas de la filosfera de *Musa* spp.

Características	CCIBP-C7
Color colonia (AN)	Beige
Agrupación	Tétradas
Catalasa	+
Hugh y Leifson	
oxidativo	-
fermentativo	-
Indol	-
Hidrólisis almidón	-
Hidrólisis caseína	-
Hidrólisis gelatina	-
Voges Proskauer	-

Tabla 5. Actividad antifúngica *in vitro* de diferentes cepas bacterianas frente a *Mycosphaerella fijiensis* (CCIBP-Pf 83) en cultivo dual a las 72h de incubación.

Cepas bacterianas	Diámetro del halo de inhibición (mm)	Rangos medios
CCIBP-B.1	29.5	78.7 ef
CCIBP-A1	29.1	74.2 f
CCIBP-A2	28.7	72.5 fg
CCIBP-A3	33.0	95.1 de
CCIBP-A4	38.2	138.1 bc
CCIBP-A5	32.0	92.4 de
CCIBP-A6	24.0	45.6 g
CCIBP-B1	29.4	88.2 def
CCIBP-B2	29.7	73.3 f
CCIBP-B3	40.6	155.8 ab
CCIBP-B4	34.5	119.7 bcd
CCIBP-B5	33.8	105.9 cd
CCIBP-C1	35.3	116.2 cd
CCIBP-C2	32.0	95.1 de
CCIBP-C3	36.3	116.2 cd
CCIBP-C4	42.0	165.1 a
CCIBP-C5	35.7	109.3 cd
CCIBP-C6	11.2	9.3 h
CCIBP-C7	36.3	115.3 cd

Valores de rangos medios con letras desiguales indican diferencias entre las medias según Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0.05$

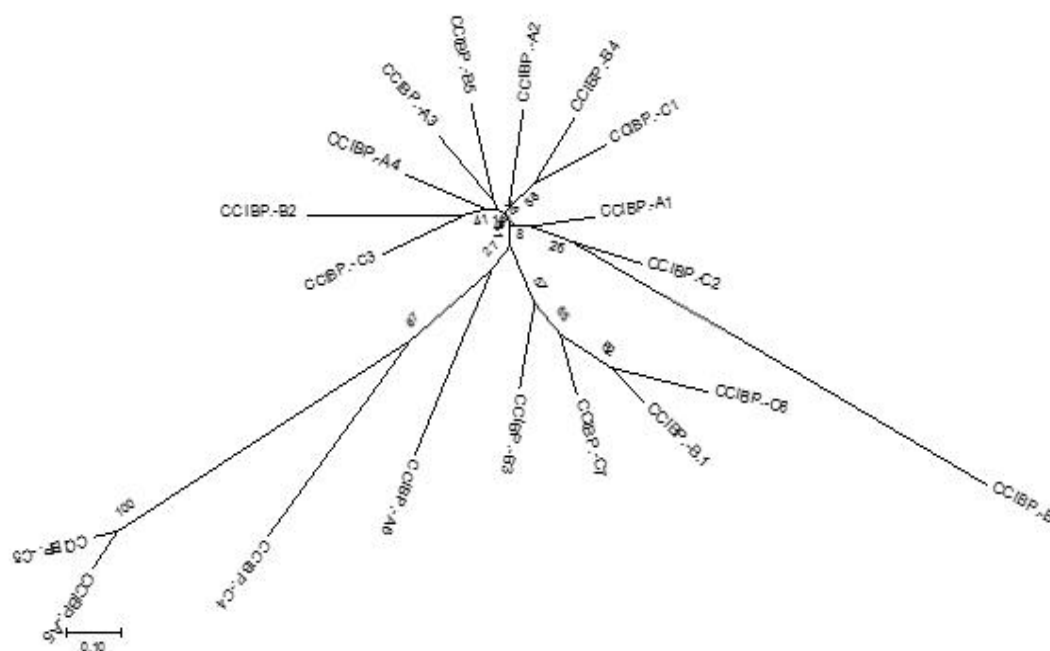


Figura 1. Diversidad genética de bacterias antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis* aisladas de la filosfera de *Musa* spp. basada en las secuencias del 16S rDNA. El árbol filogenético fue elaborado mediante el método del vecino más cercano y las secuencias se agruparon juntas basado en un *bootstrap* de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Probabilidad Máxima Compuesta utilizando MEGA 7.0.14.

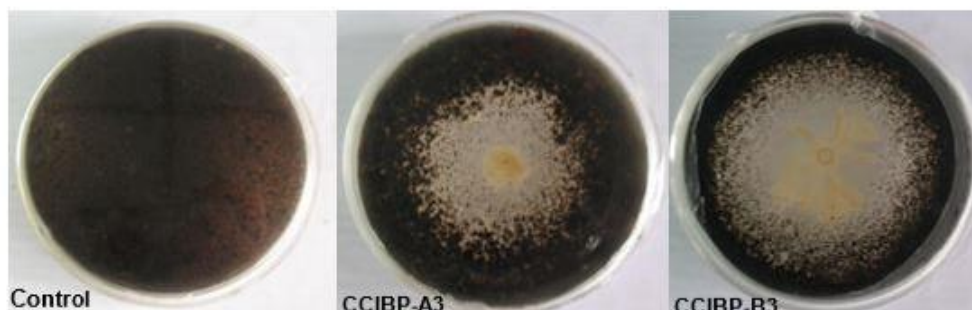


Figura 2. Actividad antifúngica *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. frente a *M. fijiensis* en cultivo dual en medio de cultivo PDA después de 72h de incubación a 28°C y oscuridad.

habitantes de la superficie de las hojas sino que están íntimamente relacionadas con las plantas que colonizan y tienen una influencia directa o indirecta en la composición de microorganismos asociados al cultivo. Es por ello que la filosfera de *Musa* spp. puede constituir una fuente importante de obtención de bacterias con características promisorias para el control biológico de *M. fijiensis*. Un conocimiento exhaustivo de estos microorganismos, sus características y su relación con *M. fijiensis* y la planta permitirá la

elaboración de bioproductos eficientes para el control de esta enfermedad.

## CONCLUSIONES

Las bacterias antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis* aisladas de la filosfera de *Musa* spp. son diversas en caracteres morfológicos, culturales y fisiológicos con presencia de representantes de tres familias y predominio del género *Bacillus*. Pueden constituir una fuente importante de candidatos para la elaboración

de productos biológicos que puedan insertarse en el manejo de la enfermedad.

## REFERENCIAS

Agrios GN (2005) Plant Pathology. Academia Press, New York; ISBN: 0-12-044565-4

Alvindia DG (2012) Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils, and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*. African Journal of Microbiology Research 6(19): 3690-3695; doi: 10.5897/AJMR12.175

Alvindia DG, Natsuaki KT (2008) Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. Crop Protection 27 (8):1200–1207; doi: 10.1016/j.cropro.2008.02.007

Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GAI as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. Microbial Cell Factories 8 (63): 1-12; doi: 10.1186/1475-2859-8-63

Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena M (2011) *Bacillus*-based biological control and plant diseases. En: Stoytcheva M (ed). Pesticides in the modern world, pesticides use and management, pp. 273-303. InTech Europe, Croatia; ISBN: 978-953-307-459-7

Ceballos I, Mosquera S, Angulo M, Mira J, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V (2012) Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Microb Ecol 64: 641–653; doi: 10.1007/s00248-012-0052-8

Churchill A (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology 12 (4):307-328; doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00672.X

Krieg NR, Holt J (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, New York; ISBN: 0683041088

Krieg NR, Holt J (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore; ISBN: 0683078933

Marín DH, Romero RA, Guzman M, Sutton TB (2003) Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Disease 87(3):208-222; doi: 10.1094/PDIS.2003.87.3.208

Osorio I, Patiño LF, Bustamante E, Rodríguez PA (2004) Selección y evaluación de bacterias quitinolíticas provenientes de la zona de Urabá para el control de la Sigatoka negra. Boletín Técnico de Cenibabano (Medellín) 6:8-13

Pereira de Melo F, Fiore M, de Moraes L, Silva-Stenico M, Scramin S, Teixeira M, de Melo I (2009) Antifungal compound produced by the *Cassava* endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. Sci Agric 66(5): 583-592; doi: 10.1590/S0103-90162009000500002

Pérez-García A, Romero D, Vicente A (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. Current Opinion of Biotechnology 22 (2):187-193; doi: 10.1016/j.copbio.2010.12.003

Poveda I, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B, Alvarado-Capó Y (2010) Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal 10 (1): 57 – 61

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; doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x

Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Nat Acad Sci 101 (30):11030-11035; doi:10.1073/pnas.0404206101

Todar K (2003) The genus *Bacillus*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, Madison

Rao-Podile A, Neeraja Ch (2011) Microbial chitinases as potential biopesticides. En: Reddy VD, Rao PN, Rao KV (eds). Pest and Pathogens: Management Strategies, pp. 275-300. CRC Press, Leiden; ISBN: 9780415665766

Redford A, Bowers R, Knight R, Linhart Y, Fierer N (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. Environmental Microbiology 12(11): 2885–2893; doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x

Yadav R, Karamanoli K, Vokou D (2010) Estimating bacterial population on the phyllosphere by serial dilution plating and leaf imprint methods. ECOPRINT 17: 47-52

Yang C-H, Crowley DE, Morneman J, Keen NT (2001) Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. Proc Nat Acad Sci 98 (7): 3889-3894; doi: 10.1073/pnas.051633898



Zhang B , Bai Z, Hoefel D , Wang X , Zhang L, Li Z (2010) Microbial diversity within the phyllosphere of different vegetable species. En: Mendez-Vilas A (ed). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, pp.1067–1077. Formatex Research Center, Badajoz

Recibido: 20-09-2015

Aceptado: 05-12-2015

## Respuesta histoquímica de plantas de banano cv. 'Grande naine' inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* y filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5

Eilyn Mena\*, Mileidy Cruz-Martín, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Tatiana Pichardo, Yelenys Alvarado-Capó. \*Autora para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: eilyn@ibp.co.cu

### RESUMEN

En los últimos años, ha ganado interés el biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* con el empleo de microorganismos o sus productos. Sin embargo, el conocimiento de los eventos bioquímicos involucrados en la interacción *Musa-M. fijiensis*-microorganismo, es aún limitado. El objetivo del trabajo fue determinar la respuesta histoquímica de plantas de 'Grande naine' (*Musa* AAA) inoculadas o no con el patógeno, en presencia de filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. Para esto, se emplearon técnicas que permitieran la visualización de calosa, anión superóxido, lignina y compuestos fenólicos en los primeros días posteriores a la inoculación (dpi). Como resultado, a los 6 dpi se observaron deposiciones de calosa dentro de los estomas en plantas donde se aplicó el filtrado de cultivo, independientemente de la presencia o no del patógeno. Además, se observó un halo azul, alrededor de estomas, indicativo de la presencia de anión superóxido. Con la técnica empleada no fue posible detectar lignina o acumulación de compuestos fenólicos. Se demostró la acumulación de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta de defensa de plantas de 'Grande naine' ante la infección del patógeno. Además, que con el empleo de filtrados de cultivo bacterianos la planta responde en los primeros días de la infección. Estos resultados evidencian el posible mecanismo de inducción de la respuesta de defensa en plantas de *Musa* spp. en presencia de filtrado de cultivo bacteriano.

Palabras clave: anión superóxido, calosa, fenoles, lignina, Sigatoka negra

### Histochemical response of 'Grande naine' plants inoculated with *M. fijiensis* and *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 cell free filtrate

#### ABSTRACT

In recent years, interest has won biocontrol *Mycosphaerella fijiensis* with the use of microorganisms or their products. Nevertheless, the knowledge of the biochemical events involved in *Musa-M. fijiensis*-microorganism interaction, is still limited. The objective was to determine the histochemical response of 'Grande naine' (*Musa* AAA) plants inoculated or not with the pathogen in the presence of culture filtrate of *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. For this, techniques that allow visualization of callose, superoxide anion, lignin and phenolic compounds in the early days post inoculation (dpi) were used. As a result, at 6 dpi callose deposition were observed within the stomata in plants where the culture filtrate was applied regardless of the presence or absence of the pathogen. Furthermore, a blue halo was observed around stomas, indicative of the presence of superoxide anion. It was not possible to detect accumulation of lignin or phenolic compounds with the technique used. It was demonstrated the accumulation of biochemical compounds related to defense response of 'Grande naine' plants to pathogen infection. Furthermore, it was shown that the plant responds in early infection with the use of bacterial culture filtrates. These results demonstrate the possible mechanism of induction of defense response in plants of *Musa* sp. in the presence of bacterial culture filtrate.

Key words: Black Sigatoka, callose, lignin, phenols, superoxide anion

### INTRODUCCIÓN

El control biológico en el manejo de plagas y enfermedades ha ganado aceptación en los últimos años. El uso de microorganismos

beneficiosos es considerado uno de los métodos más promisorios para las prácticas seguras y racionales de manejo de cultivos (Fravel, 2005). En el caso particular de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*

Morelet), enfermedad que afecta a plátanos y bananos, se han venido investigando especies bacterianas productoras de compuestos antifúngicos. Estudios al respecto realizados por varios autores incluyen bacterias del género *Bacillus* y en los últimos años se ha comenzado a analizar la integración entre los compuestos antagonistas y la inducción de resistencia (González *et al.*, 1996; Ceballos *et al.*, 2012).

Aunque se ha avanzado en el estudio de los eventos genómicos y bioquímicos de la interacción *Musa-M. fijiensis* para cultivares susceptibles y resistentes (Sánchez-García *et al.*, 2010; Cavalcante *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012), los resultados son escasos en la inserción de otros factores extrínsecos como es el caso de los microorganismos antagonistas.

Según Ferreira *et al.* (2007) con el empleo de técnicas histoquímicas es posible detectar cambios estructurales y fisiológicos en las células que rodean el sitio de penetración del patógeno. En general, estas técnicas permiten, de forma rápida, identificar procesos químicos celulares, tráfico celular y la clasificación de metabolitos. Además, se pueden estudiar procesos de penetración de microorganismos patógenos y las reacciones de defensa de las plantas (Hassan y El-Awadi, 2013).

En estudios previos se demostró la actividad antifúngica *in vitro* de bacterias provenientes de la filosfera de *Musa* frente a *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010). Atendiendo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta histoquímica de plantas de *Musa* spp. inoculadas con *M. fijiensis* y filtrado de cultivo bacteriano de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 aislado de la filosfera de *Musa* sp. y con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

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

### Suspensión micelial de *Mycosphaerella fijiensis*

Se empleó el aislado de *M. fijiensis* 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 Enlarmeyers de 100 ml de volumen con 50 ml de Caldo Papa Dextrosa (PDB) (BioCen). Estos fueron incubados en agitación a 120 rpm y 28°C, durante 15 días. Para obtener la suspensión de *M. fijiensis* se decantó el medio de cultivo y se homogeneizó en mezcladora (Ultraturrax T25), durante un minuto con medio de cultivo PDB, se filtró por tamiz de 40.0 µm y se ajustó a  $5.0 \times 10^5$  fragmentos de micelio ml<sup>-1</sup> en medio de cultivo PDB.

### Filtrado de cultivo bacteriano

Para el estudio se empleó *Bacillus pumilus* CCIBP-C5, perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP. Dicha cepa fue aislada de la filosfera de *Musa* spp. y posee actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010). Se inoculó 1 ml del cultivo de la cepa bacteriana ajustado a  $DO_{600} = 0.1$  ( $\sim 5.0 \times 10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>) en 100 ml de medio de cultivo Caldo Nutriente (CN) (BioCen). Se incubaron durante 48 horas (120 rpm y 30°C) y posteriormente se centrifugaron por 15 min a 4°C y 10 000 g (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Para eliminar las células bacterianas, el sobrenadante fue esterilizado por filtración (0.22 µm) y se conservó a 4°C. El sobrenadante libre de células bacterianas se denominó filtrado de cultivo bacteriano (fc).

### Inoculación artificial con *M. fijiensis* y aplicación del filtrado de cultivo bacteriano

Las plantas se plantaron en bolsas de polietileno con sustrato compuesto por 50% de humus de lombriz, 30% de compost y 20% de zeolita a una razón de 5:3:2 (v/v), en casa de cultivo durante 45 días. Transcurrido ese tiempo, las plantas se transfirieron a macetas plásticas (20 cm de diámetro con un litro de capacidad) con igual sustrato y permanecieron allí otros 45 días, hasta alcanzar como mínimo 20 cm de altura y tres hojas activas. El riego fue por aspersión tres veces al día, iluminación solar, con una media en la intensidad luminosa de 280-400 µmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (medido con Exttech Light Meter 401025, USA). La temperatura media durante el día fue de 30 ± 2°C y la humedad relativa del 80 ± 5%.

Las plantas *in vitro* de 'Grande naine' se inocularon artificialmente con *M. fijiensis* según

el procedimiento descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010). Tanto al filtrado de cultivo bacteriano como a la suspensión de *M. fijiensis* se les adicionó gelatina al 1% (m/v) para aumentar la adhesión a la superficie de la hoja. La inoculación de ambos se realizó por la parte abaxial de las tres primeras hojas. La suspensión micelial se aplicó con la ayuda de un pincel y el filtrado de cultivo bacteriano por aspersión tres días posteriores a la inoculación (dpi) con el patógeno. Las plantas se ubicaron completamente al azar en la casa de cultivo.

Se conformaron los siguientes tratamientos:

- 1) Control: plantas de 'Grande naine' con tres hojas expandidas completamente y 20 cm de altura, sin inocular.
- 2) Filtrado de cultivo bacteriano *B. pumilus* CCIBP-C5: plantas inoculadas con filtrado de cultivo bacteriano.
- 3) Control inoculado: plantas inoculadas con *M. fijiensis*.
- 4) Filtrado de cultivo bacteriano *B. pumilus* CCIBP-C5 y *M. fijiensis*: plantas inoculadas con el patógeno y tres días después con el filtrado de cultivo bacteriano.

Para determinar la acumulación de compuestos bioquímicos, la toma de muestras se realizó en los primeros 14 días posteriores a la inoculación (dpi) con el patógeno, correspondiente al período de incubación del hongo. En cada uno de los tiempos de evaluación se tomaron como muestra las tres hojas inoculadas por planta, para cada tratamiento.

En cada hoja se tomaron al azar, fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> de la zona media de la tercera hoja inoculada de cada tratamiento a los 6, 10 y 14 dpi. Las muestras fueron tratadas según las técnicas descritas más adelante. Todas las muestras se observaron en microscopio óptico (Novel) con amplificación de 400x y se fotografiaron inmediatamente.

#### *Deposiciones de calosa*

Para observar las deposiciones de calosa, los fragmentos de hojas fueron fijados en solución amortiguadora de fosfato de sodio y

formaldehído al 10% y gradientes de alcohol etílico (30, 50 y 70%). Para el aclaramiento se siguió el protocolo que se describe brevemente: las muestras de hojas se lavaron con agua destilada y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 3%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las hojas se lavaron con agua destilada a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se acidificaron con ácido acético al 20%, durante 10 minutos. Finalmente, se lavaron en agua destilada a temperatura ambiente.

Las deposiciones de calosa se visualizaron con una tinción diferencial, mediante el protocolo del ácido peryódico 0.5% y el reactivo de Schiff (Merck), propuesto por McManus y Mowry (1964). La presencia de calosa se determinó por la aparición de áreas de color rosa.

#### *Acumulación de anión superóxido*

El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) se detectó indirectamente a partir de la reducción de *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), según la metodología propuesta por Fryer *et al.* (2002). Las muestras se sumergieron en una solución de NBT 6 mM, durante 8 horas. Para incrementar el contraste se removió la clorofila del tejido vegetal con etanol al 95% (v/v) a 100°C, durante 5 minutos.

#### *Acumulación de compuestos fenólicos*

Para la detección de compuestos fenólicos se empleó el método colorimétrico descrito por Reeve (1951). Se agregó una gota de nitrato de sodio acuoso al 10% (v/v), una gota de ácido acético acuoso al 10% (v/v) y luego una gota de urea acuosa al 20% (m/v). Después de 3 minutos, se adicionaron dos gotas de NaOH 2N. En presencia de los compuestos fenólicos se observa una coloración roja intensa.

#### *Acumulación de lignina*

Las deposiciones de lignina en las paredes celulares se visualizaron utilizando una tinción con fluoroglucina al 1% (m/v) en etanol al 70% (v/v), durante 5 minutos (Southerton y Deverall, 1990). Se adicionaron dos gotas de ácido clorhídrico (HCl) concentrado y se enjuagó con agua. Ante la presencia de lignina se observan áreas de color rojo/rosado (Gahan, 1984).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó una respuesta de la planta, a nivel histoquímico, frente a la aplicación del filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 independientemente de la presencia del patógeno.

### Deposiciones de calosa

A los 6 dpi se observó una tinción rosada en la cavidad subestomática en las plantas donde se aplicaron los filtrados de cultivo; en plantas inoculadas (Figura 1d) o no con *M. fijiensis* (Figura 1b). El ácido peryódico es un oxidante fuerte que reacciona con la calosa dando lugar a aldehídos que toman un color rosa con el reactivo de Schiff (McManus y Mowry, 1964). Sin embargo, en las plantas sin el filtrado de cultivo, no se observaron deposiciones de calosa en el período evaluado (Figura 1a y c).

La calosa es un polímero formado por (1-3)- $\beta$ -D-glucano, cuyas deposiciones locales en la planta están asociadas a heridas, infección por patógenos y a estrés fisiológico (Voigt *et al.*, 2006). En respuesta a la infección con patógenos fúngicos la calosa constituye una barrera estructural inducible (Ferreira *et al.*, 2007). Según Asselbergh *et al.* (2007), este compuesto es depositado en la pared celular debajo del sitio de penetración entre la membrana plasmática y la pared celular, formando las llamadas papilas que bloquean la entrada del hongo. Además, la síntesis de calosa constituye una defensa física por su relación con la clausura estomática (Luna *et al.*, 2011).

En este sentido, García-Gutiérrez *et al.* (2013) observaron deposiciones de calosa en las células epidérmicas y del mesófilo a las 72 horas, en plantas de melón (*Cucumis melo* L.)

inoculadas con *B. subtilis* UMAF6639 y con *Podosphaera fusca* (Fr.) U. Braun & Shishkoff. En este estudio no se observaron diferencias en la respuesta de defensa de las plantas en presencia o no de la bacteria cuando no se inoculó el patógeno. Los resultados fueron indicativos de la activación de mecanismos de defensa previo a la inducción de la bacteria en conjunto con la activación directa por el patógeno.

### Acumulación de anión superóxido

En las plantas donde se aplicó el filtrado de cultivo, se observó la aparición de un complejo azul oscuro alrededor de los estomas debido a la reacción del NBT con el anión superóxido a los 6 dpi (Figura 2b y d). La coloración azul es debido a que el NBT se oxida dando un color azul oscuro en la zona donde se acumula el  $O_2^-$  (Fryer *et al.*, 2002). A los 10 y 14 dpi la coloración fue menos intensa y en toda la superficie de la hoja, no siendo posible determinar una respuesta localizada o relacionada con la penetración del patógeno.

Los resultados están en correspondencia con los encontrados por Patykowski y Urbanek (2003), quienes detectaron un aumento de  $O_2^-$  en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) parcialmente resistente en la fase temprana de la infección por *Botrytis cinerea* Pers. Por otro lado, Kuźniak *et al.* (2014) observaron acumulación de  $O_2^-$  en plantas de calabaza (*Cucurbita maxima* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) a los 5 dpi en respuesta a la inoculación con *Erysiphe cichoracearum* (DC.) y *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith y Brian), respectivamente. Estos autores determinaron que la acumulación de este ion es temporal y está en correspondencia con el estallido oxidativo relacionado con la respuesta hipersensible en la planta.

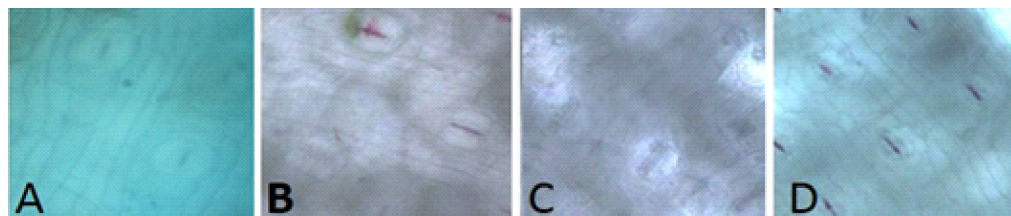


Figura 1. Deposiciones de calosa en hojas de plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis*, a los 6 dpi coloración rosa en centro de los estomas A) Control, B) con fc *B. pumilus* CCIBP-C5, C) Control inoculado y D) con fc *B. pumilus* CCIBP-C5 y *M. fijiensis* (400 x).

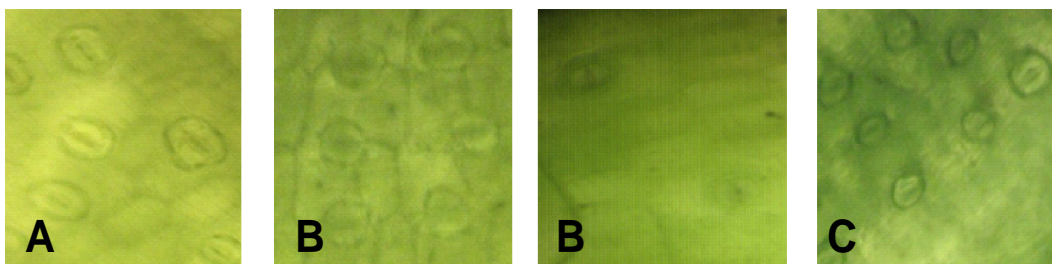


Figura 2. Acumulación de anión superóxido en hojas de plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis*, a los 6 dpi coloración azul en bordes de los estomas A) Control, B) con fc *B. pumilus* CCIBP-C5, C) Control inoculado y D) con fc *B. pumilus* CCIBP-C5 y *M. fijiensis* (400 x).

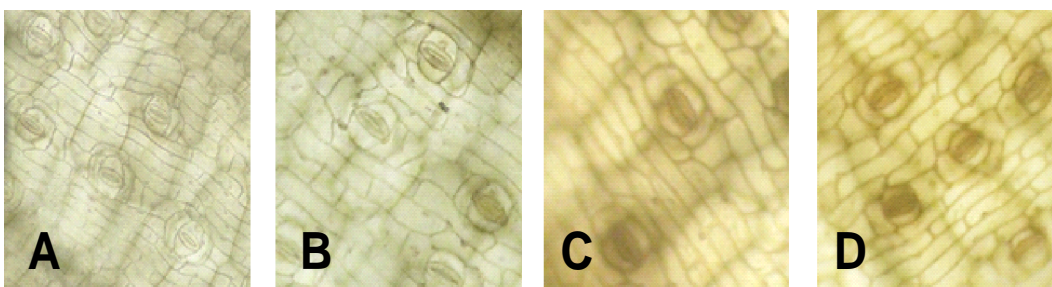


Figura 3. Acumulación de compuestos fenólicos en hojas de plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis*, a los 6 dpi A) Control, B) con fc *B. pumilus* CCIBP-C5, C) Control inoculado y D) con fc *B. pumilus* CCIBP-C5 y *M. fijiensis* (400x).

*M. fijiensis* es un hongo hemibiotrófico, que tiene primero una fase biotrófica y posteriormente pasa a la fase necrotrófica. En patógenos biotróficos un incremento de ROS puede causar la muerte del patógeno o estar involucrado como segundo mensajero en la respuesta sistémica de defensa en la planta (De Gara *et al.*, 2003). Sin embargo, los patógenos necrotróficos estimulan la producción de ROS, lo cual induce a la muerte celular de la planta y favorece la colonización e infección del patógeno (Torres *et al.*, 2012).

Atendiendo a ello, se puede suponer que la inducción de un estallido oxidativo en los primeros días de la infección limite el desarrollo y crecimiento de *M. fijiensis*. En el patosistema *Musa-M. fijiensis*, varios autores han observado en el estallido oxidativo una respuesta temprana en cultivares resistentes inoculados en comparación con cultivares susceptibles (Cavalcante *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012).

#### Acumulación de compuestos fenólicos

En cuanto a la detección de fenoles (Figura 3) no fue posible encontrar diferencias entre los

tratamientos mediante el método ensayado. Sin embargo, en el estudio realizado se observaron cambios en la morfología de las células cuando se aplicó el filtrado de cultivo. En las plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* (Figura 3 c y d) se observó una coloración naranja.

En este mismo patosistema, Sánchez-García *et al.* (2010) observaron acumulación de compuestos fenólicos en las células epidérmicas tanto del cultivar resistente 'Calcutta 4' como del susceptible 'Grande naine' posteriormente a la inoculación con *M. fijiensis*. La acumulación de estos compuestos fue aislada al inicio y aumentó en correspondencia con el estado de síntomas de la enfermedad en la planta.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados a partir de intermediarios del metabolismo primario, a través de rutas como la de los fenilpropanoides. Las sustancias que se producen forman parte del arsenal defensivo de la planta y sus funciones no se restringen a un compuesto en particular (Dixon *et al.*, 2002).



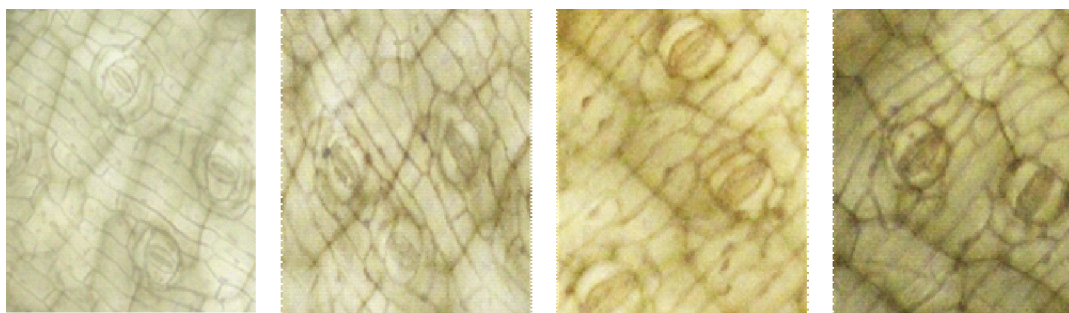


Figura 4. Resultados del ensayo para detección de acumulación de lignina en hojas de plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis*, a los 6 dpi A) Control, B) con *B. pumilus* CCIBP-C5, C) Control inoculado y D) con *B. pumilus* CCIBP-C5 y *M. fijiensis* (400 x).

### Acumulación de lignina

En cuanto a la detección de lignina tampoco fue posible encontrar diferencias entre los tratamientos mediante el método ensayado. Al igual que en el contenido de fenoles se detectaron cambios en las células cuando se aplicó el filtrado de cultivo bacteriano. En este caso se observó un reborde más oscuro en los estomas (Figura 4).

Estos resultados coinciden con los referidos por Cavalcante *et al.* (2011), quienes a los 10 dpi observaron modificaciones en la pared celular de los cultivares parcialmente resistente 'Pisang Madu' y resistente 'Calcutta 4'. La no detección de estos compuestos tanto para los fenoles como para la lignina, puede ser debido al corto tiempo entre la inoculación y la evaluación.

La lignina es un polímero complejo formado por cadenas largas de ácidos fenólicos, constituye un componente estructural de la pared celular de las plantas. Su deposición hace a la pared celular más gruesa y resistente, lo que restringe la penetración y el ataque de patógenos (Ferreira *et al.*, 2007). Autores como Sánchez-García *et al.* (2010) refieren que la deposición de lignina se produce en las paredes celulares de las células dañadas en correspondencia con la evolución de los síntomas o la aparición de lesiones y que es mayor en los cultivares resistentes respecto a los susceptibles.

### CONCLUSIONES

La aplicación de filtrado de cultivo bacteriano de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 indujo la formación de deposiciones de calosa y anión

superóxido en plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis*, no siendo necesario para ello la presencia del patógeno.

### REFERENCIAS

- Asselbergh, B, Curvens K, França SC, Audenaert K, van Vuylsteke BF, Höfte M (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* 144: 1863-4877
- Cavalcante, JB, Escoute J, Madeira JP, Romero RE, Nicole MR, Oliveira LC, Hamelin C, Lartaud M, Verdeil JL (2011) Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. *Tropical Plant Biology* 4: 134-143
- Ceballos, I, Mosquera S, Ángulo M, Mira JJ, Argel IE, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V (2012) Cultivable bacteria population associated with leaves of banana and plantain and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Environmental Microbiology* 64: 641-653
- De Gara, L, de Pino MC, Tommasi F (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-patogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 863-870
- Dixon, RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Srinivasa-Reddy MS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390
- Ferreira, RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR (2007) The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 8(5): 677-700
- Fravel, DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 43: 337-359

- Fryer, MJ, Oxborough K, Mullineaux Ph, Baker NR (2002) Imaging of photo oxidative stress responses in leaves. Journal of Experimental Botany 53(372): 1249-1254
- García-Gutiérrez, L, Zerrouh H, Romero D, Cubero J, de Vicente A, Pérez-García A (2013) The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defense responses. Microbial Biotechnology 6: 264-274
- González, R, Bustamante E, Shannon P, Ruiz C (1996) Avances en el control biológico de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). En: Badilla, W, Rivera G, Mora JR, Navarro W, Badilla W (Eds) Memoria: fitopatología X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, pp. 53-57. CATIE. San José
- Hassan EA, El-Awadi ME (2013) Brief review on the application of histochemical methods in different aspects of plant research. Nature and Science 11(12): 54-67
- Kuźniak E, Świercz U, Chojak J, Sekulska-Nalewajko J, Gocłowski J (2014) Automated image analysis for quantification of histochemical detection of reactive oxygen species and necrotic infection symptoms in plant leaves. Journal of Plant Interactions 9(1): 167-174
- Leiva-Mora, M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Roque B (2010) Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. Bioteecnología Vegetal 10 (2): 79-88
- Luna, E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. Molecular Plant-Microbe Interactions 24 (2): 183-193
- McManus, JF, Mowry R (1964) Straining methods. Histological and histochemical. Special methods for the constituents of cell and tissues, pp. 99-246. Harper & Row. New York
- Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación de clones de *Musa* spp. Tesis para aspirar por el grado científico de doctor en ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba
- Patykowski, J, Urbanek H (2003) Activity of enzymes related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. Journal of Phytopathology 151: 153-161
- Poveda, I, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B, Alvarado-Capó Y (2010) Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Bioteecnología Vegetal 10 (1): 57-61
- Reeve, RM (1951) Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. Stain Tech 26: 91-96
- Sánchez-García, C Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B (2010) Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. Bioteecnología vegetal 10 (2): 89-97
- Southerton, SG, Deverall BJ (1990) Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. Phys Mol Plant Path 36: 483-494
- Torres, JM, Calderón H, Rodríguez-Arango E, Morales JG, Arango R (2012) Differential induction of pathogenesis-related proteins in banana in response to *Mycosphaerella fijiensis* infection. European Journal of Plant Pathology 133: 887-898

Recibido: 11-11-2014  
Aceptado: 18-02-2015



## Efecto de la temperatura, pH y detergentes sobre la actividad antifúngica de filtrados de cultivo bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis*

Eilyn Mena\*, Mileidy Cruz-Martín, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Michel Leiva-Mora, Yelenys Alvarado-Capó. \*Autora para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: eilyn@ibp.co.cu

### RESUMEN

Las bacterias asociadas a cultivos han sido estudiadas como potenciales agentes de biocontrol. Sin embargo, se han desarrollado pocas investigaciones sobre la interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis*-bacterias asociadas a *Musa*. En consecuencia, se desconocen los metabolitos bacterianos involucrados y el efecto sobre ellos de factores físicos y químicos. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la temperatura, el pH y la acción de detergentes sobre filtrados de cultivo con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. La inhibición del crecimiento del patógeno se evaluó mediante lectura de absorbancia a DO 565 nm. Se comprobó que la actividad antifúngica de los filtrados de cultivo bacterianos frente a *M. fijiensis*, varió en presencia de diferentes valores de temperatura, pH y tipos de detergentes y esto se relacionó con la cepa bacteriana. Los resultados sugirieron la posible naturaleza proteica de los metabolitos con actividad antifúngica.

Palabras clave: bacteria, control biológico, metabolitos antifúngicos

## Effect of temperature, pH and detergents on the antifungal activity of bacterial culture filtrates against *Mycosphaerella fijiensis*

### ABSTRACT

The bacteria associated to crops have been studied as potential biocontrol agents. However, few investigations on the interaction *Musa* spp. - *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* associated bacteria have been developed. Consequently, bacterial metabolites involved and the effect on them of physical and chemical factors remain unknown. Therefore, this study aimed to determine the effect of temperature, pH and detergents on bacterial culture filtrates with antifungal activity *in vitro* against *Mycosphaerella fijiensis*. The pathogen growth inhibition was assessed by absorbance reading at OD 565nm. It was found that the antifungal activity of the bacterial culture filtrates against *M. fijiensis*, varied in the presence of different values of temperature, pH, and types of detergents and this was related to the bacterial strain. The results suggested the possible protein nature of the metabolites with antifungal activity.

Keywords: bacteria, biological control, antifungal metabolites

Los plátanos y bananos se encuentran entre los cultivos más importantes a nivel mundial. Constituyen una fuente natural de fibra y minerales como el potasio. Las plantaciones de este cultivo son afectadas por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra. Esta enfermedad es considerada la más perjudicial, ya que provoca una necrosis severa en la hoja y es difícil de combatir (Churchill, 2010). Su control está dado principalmente por el manejo cultural y la aplicación de fungicidas. El empleo de fungicidas químicos no es sustentable, debido a su alto costo para pequeños productores, la

contaminación ambiental y la resistencia que ha generado en el patógeno (Fu *et al.*, 2010). En este contexto, el control biológico surge como una alternativa que podría permitir a los productores combatir la enfermedad y continuar dentro de la actividad agrícola sin afectar la sostenibilidad del medio ambiente en los sistemas de producción de plátanos y bananos. En esta área se incluye el uso de microorganismos antagonistas, la adición de sustratos foliares que permitan incrementar las poblaciones bacterianas y la inducción de resistencia a patógenos (Patiño *et al.*, 2007). En correspondencia con ello se han realizado

investigaciones en géneros bacterianos tales como: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Rao-Podile y Neeraja, 2010). No obstante, pocas son las investigaciones en la interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis*-bacterias asociadas a *Musa*. Ceballos *et al.* (2012) realizaron investigaciones a partir de bacterias de la filosfera de *Musa* sp. contra *Mycosphaerella fijiensis* pero es limitado el conocimiento de las características de los metabolitos producidos por estas y su efecto sobre el patógeno.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la temperatura, el pH y la presencia de detergentes sobre filtrados de cultivo bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*.

Se emplearon cinco cepas bacterianas cuyos cultivos filtrados inhibían el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010), pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas: CCIBP-M27, CCIBP-B3, CCIBP-A4, CCIBP-C5 y CCIBP-B.1. Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo Caldo Nutriente (CN), durante 48 horas en agitación y 28°C. Posteriormente, se centrifugaron por 15 minutos a 4°C y 10 000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Para eliminar las células bacterianas, el sobrenadante fue filtrado (0.22 µm) y se conservó a 4°C.

Para determinar el efecto de la temperatura, el pH y detergentes sobre los filtrados de cultivo bacterianos, estos se sometieron a los diferentes tratamientos que se explican más adelante. Posteriormente, en todos los casos, se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* mediante el método de microdilución en placas de 96 pocillos (Cruz-Martín *et al.*, 2013). Para ello, se utilizó una dilución (1:10); 25 µl de filtrado de cultivo sometido a diferentes tratamientos y 225 µl de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (aprox.  $5.0 \times 10^5$  fragmentos de micelio/ml) en medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). Las placas se incubaron durante 48 horas y 28°C. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a DO 595 nm en espectrofotómetro (Thermo Labsystems Opsys MR). Se utilizaron ocho réplicas por tratamiento. Como control de crecimiento se colocaron en cada placa ocho repeticiones con

250 µl de una suspensión micelial de *M. fijiensis* en PDB.

Para comprobar el efecto de la temperatura se conformaron cinco tratamientos que incluyeron las siguientes: -80, 4, 28, 60 y 121°C. En cada una se incubaron 300 µl del filtrado de cultivo de las cepas bacterianas durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* como se describió anteriormente.

Con el objetivo de determinar el efecto del pH se siguió el protocolo propuesto por Munimbazi y Bullerman (1998). Para cada tratamiento (pH 2, 4, 6, 7 y 8) se tomaron 300 µl de los filtrados de cultivo que se diluyeron en agua destilada estéril (1:1) y se ajustó el pH. Se mantuvieron en estas condiciones durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* como se mencionó más arriba.

El efecto de los detergentes se constató a través de cuatro tratamientos. Los detergentes utilizados fueron: el aniónico SDS (del inglés: *Sodium Dodecyl Sulphate*), el catiónico CTAB (del inglés: *Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*), además de los no iónicos Triton X 100 y Tween-80. Cada detergente se añadió a 100 µl de filtrado de cultivo de cada cepa para una concentración final de 1%, se incubaron a 28°C y oscuridad, durante cuatro horas. Pasado ese tiempo se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*.

Se comprobó que los filtrados de cultivo bacterianos obtenidos eran termoestables, excepto el de CCIBP-M27; que solo inhibió el crecimiento de *M. fijiensis* a 28°C. Por otra parte, CCIBP-A4 mostró una disminución de la actividad antifúngica a 121°C (Tabla 1).

Además, se determinó que la actividad antifúngica de los filtrados de cultivo bacterianos, varió a diferentes valores de pH en dependencia de la cepa. En los filtrados de cultivos de CCIBP-A4 y CCIBP-C5 se evidenció inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* en todos los valores de pH evaluados. Sin embargo, los filtrados de cultivo de las cepas bacterianas CCIBP-M27, CCIBP-B3 solo mostraron actividad antifúngica a pH=2, pH=6 respectivamente; y pH=2 y 4 en el caso de CCIBP-B.1 (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la temperatura, el pH y la presencia de detergentes sobre la actividad antifúngica de filtrados de cultivo (fc) bacterianos.

Factores			Cepas				
			CCIBP-M27	CCIBP-B3	CCIBP-A4	CCIBP-C5	CCIBP-B.1
Temperatura (°C)	-80		-	+	+	+	+
	4		-	+	+	+	+
	28		+	+	+	+	+
	60		-	+	+	+	+
	121		-	+	+/-	+	+
pH	2		+	=	+	+	+
	4		=	=	+	+	+
	6		=	+	+	+	=
	7		=	=	+	+	=
	8		=	=	+	+	=
Detergentes	Aniónico	SDS	+	+	+	+	-
	Catiónico	CTAB	=	=	-	-	-
	No iónico	TritonX-100	-	=	+	-	=
		Tween-80	=	+	=	-	=

Leyenda: (+) indicador de estabilidad de la actividad antifúngica, (-) indicador de disminución de la actividad antifúngica, (=) No efecto. El crecimiento de *M. fijiensis* fue igual al control.

El filtrado de cultivo de CCIBP-B3 mantuvo su actividad inhibitoria del crecimiento fúngico al ser expuesto a la acción de todos los detergentes empleados en el estudio. Sin embargo, en el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-B.1 se limitó ante la presencia de los detergentes iónicos evaluados. Por otra parte, los filtrados de cultivo de las cepas CCIBP-A4 y CCIBP-C5 en presencia del detergente catiónico CTAB afectaron el crecimiento del patógeno.

Analizar el efecto de factores físicos y químicos sobre la actividad antifúngica de bioproductos que puedan ser empleados para el combate de enfermedades en plantas tiene gran importancia. Ello contribuye a su caracterización y a garantizar la estabilidad sin perder la actividad biológica.

En este sentido, Munimbazi y Bullerman (1998) determinaron la estabilidad de metabolitos bacterianos a diferentes valores de pH y comprobaron que los producidos por *Bacillus pumilus* eran estables en el rango de 2 a 10.

La mayor inhibición (99%) del crecimiento del patógeno *Aspergillus parasiticus* se produjo a pH=2 y para pH con valores entre 4 y 6 fue de 92%. De igual forma, la mayor actividad inhibitoria para las cepas CCIBP-M27, CCIBP-B3 y CCIBP-B.1 se produjo entre estos valores de pH.

Por otra parte, el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-B3 mantuvo su actividad antifúngica en presencia de todos los detergentes ensayados. Ello sugiere que si en su composición hay presencia de péptidos el grupo funcional no está expuesto a la desnaturalización por los agentes químicos empleados. Al contrario, según los resultados para el filtrado de cultivo de CCIBP-B.1, su grupo funcional tiene una posible composición no iónica y está expuesto a la acción de compuestos desnaturalizantes. Munimbazi y Bullerman (1998) emplearon también detergentes (TritonX-100, Tween-20, Tween-80, Nonidet P-40, SDS, CTAB y Deoxycholic acid). De ellos, solo Tween-80 redujo la actividad antifúngica de los metabolitos producidos por *B. pumilus* y Nonidet P-40 la

inhibió completamente y concluyeron que la actividad inhibitoria estaba dada por un péptido de estructura cíclica.

Similares resultados han sido encontrados por Lee *et al.* (2008). Estos autores plantearon que la actividad de los metabolitos antifúngicos, purificados de *Paenibacillus lentimorbus* WJ5 no fue afectada por la exposición de estos a diferentes temperaturas (-80, 60 y 121), solo a 121°C por cinco horas se redujo la actividad antifúngica. En base a estos resultados concluyeron que presentaban alta termoestabilidad y la actividad antifúngica estaba dada por la presencia de pequeños péptidos. Además, en su estudio los metabolitos antifúngicos producidos por *P. lentimorbus* WJ5, eran activos en un amplio rango de pH (2 y 13). Estos autores determinaron que la exposición de los compuestos antifúngicos a los detergentes (SDS y Tween-80 al 1%) no afectó su actividad antifúngica. Sin embargo, la inhibió en presencia del detergente catiónico CTAB (1%), al igual que lo obtenido en el presente estudio para el filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-A4 y CCIBP-C5. A partir de estos resultados infirieron que era indicativo de la naturaleza aniónica del grupo funcional involucrado en el mecanismo antifúngico.

De igual forma, Hu *et al.* (2008) plantearon que los compuestos con actividad antifúngica presentes en el sobrenadante del medio de cultivo de la cepa *Bacillus subtilis* QM3, eran termoestables; ya que al ser sometidos a diferentes tratamientos térmicos, a 100°C se redujo la actividad inhibitoria pero se vio disminuida a temperaturas superiores (121°C, durante 20 minutos). Ellos sugirieron que quizás la actividad antifúngica estaba dada por un antibiótico perteneciente a la familia de las iturinas.

Los filtrados de cultivo bacterianos empleados en este trabajo mostraron actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* ante la variación de diferentes factores físicos y químicos. La composición de los filtrados de cultivo parece estar relacionada con compuestos de naturaleza proteica. En este sentido, los metabolitos presentes en el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-M27 pudieran ser pequeñas proteínas no estables, sin embargo en el caso de los presentes en CCIBP-B.1 pudieran ser

péptidos pequeños estables, no iónicos. En el caso de los metabolitos presentes en el filtrado de cultivo de CCIBP-B3 pudieran ser péptidos con estructura cíclica y los péptidos presentes en CCIBP-A4 CCIBP-C5 podrían tener grupos funcionales aniónicos expuestos.

Atendiendo a estos resultados se requieren nuevos estudios que permitan corroborar la naturaleza de los metabolitos responsables de la actividad antifúngica de los filtrados de cultivo de las cepas en estudio.

## CONCLUSIONES

La actividad antifúngica de los filtrados de cultivo bacterianos frente a *M. fijiensis*, varió en presencia de diferentes valores de temperatura, pH y tipos de detergentes y esto se relacionó con la cepa bacteriana.

## REFERENCIAS

- Ceballos, I, Mosquera S, Angulo M, Mira J, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S y Villegas V (2012) Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Microb Ecol.64: 641-653
- Cruz-Martín, M, Acosta-Suárez, M, Mena E, Roque B, Leiva-Mora M, Pichardo T, Alvarado-Capó Y (2013) Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. Biotecnología Vegetal 13 (4): 219-224
- Churchill, ACL (2010) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology 11:22
- Fu, G, Huang S, Ye Y, Wu Y, Cen Z, Lin S (2010) Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. Biological Control 55: 1-10
- Hu, QP, Xu JG, Song P, Song JN, Chen WL (2008) Isolation and identification of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* QM3 from Qinghai yak dung in China. World J Microbiol Biotechnol 24: 2451-2458
- Lee, YK, Senthilkumar M, Kim JH, Swarnalakshmik K, Annapurna K (2008) Purification and partial characterization of antifungal metabolite from *Paenibacillus lentimorbus* WJ5. Microbiol Biotechnol 24: 3057-3062

Munimbazi, C, Bullerman LB (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. Journal of Applied Microbiology 84 (6): 959–968

Patiño, LF, Bustamante E, Salazar LM (2007) Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa x paradisiaca* L) y plátano (*Musa acuminata* Colla). Agricultura Técnica (Chile) 67(4): 437-445

Poveda, I, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B, Alvarado-Capó Y (2010) Caracterización de cepas bacterianas aisladas

de la filosfera de *Musa* spp con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal 10 (1): 57-61

Rao-Podile, A, Neeraja Ch (2010) Microbial chitinases as potential biopesticides. Pest and Pathogens: Management Strategies 275-300

Recibido: 25-9-2013

Aceptado: 31-10-2013

## Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia

Mileidy Cruz-Martín<sup>1\*</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Eilyn Mena<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Michel Leiva-Mora<sup>1</sup>, Tatiana Pichardo<sup>1</sup>, Rosa del Pilar Castro<sup>1,2</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>. \*Autora para correspondencia

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.  
e-mail: mileidy@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Recursos Naturales. Departamento de Fitopatología. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana Sur km 1 ½. Riobamba. Ecuador. CP 06-01-4703

### RESUMEN

El crecimiento lento de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en medios de cultivo sintéticos y semi-sintéticos así como las características de sus colonias hacen que el uso de los métodos tradicionales de evaluación del crecimiento fúngico sean inadecuados y poco factibles. Por ello, se requiere de un método que permita cuantificar su crecimiento en volúmenes reducidos de sustancias y en cortos periodos de tiempo. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el crecimiento de *M. fijiensis* a través lecturas de absorbancia, en el tiempo, de suspensiones miceliales obtenidas de cultivos en medio líquido. Se comparó la masa seca del micelio de este patógeno crecido en medio de cultivo líquido en frascos de 250 ml de capacidad y la absorbancia en placas de 96 pocillos. Similar procedimiento se empleó para evaluar el efecto de filtrados de cultivo bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*. Se encontró una relación lineal entre la absorbancia a 595 nm del crecimiento fúngico en medio de cultivo líquido con respecto a la masa seca. Mediante lecturas de absorbancia en placas de 96 pocillos fue posible cuantificar el crecimiento de suspensiones miceliales *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido. Además, pudo ser aplicado para evaluar la inhibición del crecimiento del patógeno por filtrados de cultivo bacterianos con resultados a las 48 h de incubación.

Palabras clave: actividad antifúngica, biomasa, DO<sub>595</sub>.

## Quantification of *Mycosphaerella fijiensis* *in vitro* growth by absorbance readings

### ABSTRACT

The slow growth of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in synthetic and semi-synthetic media as well as the characteristics of their colonies makes the use of traditional methods for evaluating the fungal growth are inadequate and impractical. Therefore, it requires a method to quantify growth in small volumes of substance and in short periods of time. The aim of this study was to quantify the *M. fijiensis* growth, through absorbance readings on the time, of mycelial suspensions obtained from cultures in liquid medium. Mycelial dry weight of the pathogen grown in liquid culture in flasks of 250 ml capacity and the absorbance in 96 well plates was compared. Similar procedure was used to evaluate the effect of bacterial culture filtrates with *in vitro* antifungal activity against *M. fijiensis*. A linear relationship between absorbance at 595 nm of fungal growth in liquid culture medium with respect to the dry mass was found. Absorbance readings using 96-well plates were possible to quantify the *M. fijiensis* mycelial suspensions growth in liquid culture. Also, there may be applied to assess the growth inhibition of the pathogen for bacterial culture filtrates with results at 48 h incubation.

Key words: antifungal activity assay, biomass, DO<sub>595</sub>.

### INTRODUCCIÓN

Como medida del crecimiento fúngico se han empleado diferentes método entre los que se destacan: medida del crecimiento radial de las colonias (Hernández-Castillo *et al.*, 2008), determinación de la masa seca del micelio y la

lectura de la turbidez mediante absorbancia (Broekaert *et al.*, 1990). Sin embargo, una de las características distintivas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, principal patógeno foliar de plátanos y bananos (*Musa* spp.), es su crecimiento lento en medios de cultivo sintéticos y semi-sintéticos. Además, las



colonias son compactas, elevadas y pequeñas (Meredith y Lawrence, 1969; Manzo *et al.*, 2001) (Figura 1A). Esto implica una desventaja en los estudios de interacción planta patógeno donde se requiere de producción de inóculo del hongo o en ensayos relacionados con la actividad antifúngica ya sea de controles biológicos, nuevos productos químicos o de evaluación de la resistencia del patógeno. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas para el uso de estructuras de reproducción del patógeno y otros métodos para su cultivo.

Por ejemplo, se ha empleado la descarga de ascosporas de hojas con síntomas del patógeno y mediante la inhibición del crecimiento del tubo germinativo se puede monitorear la resistencia a fungicidas químicos (Chin *et al.*, 2001, Pérez *et al.*, 2009). Sin embargo, este método es laborioso, se contamina con otros microorganismos fácilmente, depende de la colecta adecuada de los síntomas y de su disponibilidad. Para este fin se han empleado también conidios (Essis *et al.*, 2010), pero la producción *in vitro* de estos depende de la cepa y de las condiciones de incubación. Igualmente, se ha utilizado la medición del diámetro de las colonias para evaluar la inhibición del crecimiento fúngico (Mosquera *et al.*, 2009) pero esto se dificulta por las características del crecimiento *in vitro* del patógeno descritas anteriormente y se requieren entre 15 y 20 días para mostrar los resultados. Por ello, contar con un método de evaluación del crecimiento de la biomasa de *M. fijiensis* que sea adecuado, ya sea para la caracterización de aislados (producción de biomasa) o la evaluación de nuevos fungicidas químicos o de naturaleza biológica y que permita mostrar resultados en menor tiempo y confiables, contribuiría al desarrollo de los estudios de interacción planta-patógeno y de nuevas estrategias de control.

Peláez *et al.* (2006) propusieron un método para determinar la sensibilidad de aislados de *M. fijiensis* frente a varios fungicidas a partir de la lectura de absorbancia a DO 595 nm. Estos autores utilizaron como inóculo fragmentos de micelio obtenidos de colonias de 12-15 días de crecidas en medio de cultivo Agar papa dextrosa, sin embargo, los resultados se obtenían a partir de los 12 días de cultivo. El utilizar colonias como inóculo y el tiempo que requiere para su evaluación

son aspectos que pudieran mejorarse para que pueda ser utilizado en diferentes aplicaciones.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, este trabajo se propuso cuantificar el crecimiento de *M. fijiensis* a través lecturas de absorbancia en el tiempo de suspensiones miceliales obtenidas de cultivos en medio líquido.

Además, los resultados se compararon con el incremento de la masa seca de suspensiones miceliales crecidas en similar medio de cultivo y se comprobó la factibilidad del empleo de este método para la evacuación de la actividad antifúngica de filtrados de cultivo bacterianos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El aislado de *M. fijiensis* empleado fue el CCIBP-Pf-83 perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP. La suspensión micelial se obtuvo a partir de un cultivo del patógeno en Caldo Papa Dextrosa (PDB) (BioCen) incubado durante 15 días en agitación a 120 rpm y 28°C. Esta se homogeneizó en batidora (Ultraturrax T25), durante 1 min con medio de cultivo PDB y se filtró por tamiz de 40.0  $\mu$ m.

Se inocularon 250  $\mu$ l de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (aprox.  $5.0 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $\text{ml}^{-1}$ ) en placas estériles de 96 pocillos. Posteriormente, se incubaron a 28°C y oscuridad.

Las mediciones del crecimiento de *M. fijiensis* se realizaron a los tres, cinco, siete y diez días de incubación. Los valores de absorbancia a 595 nm del crecimiento de *M. fijiensis* en placas de 96 pocillos, fueron obtenidos mediante un espectrofotómetro.

Simultáneamente se inocularon Erlenmeyer (250 ml de volumen) con 100 ml medio de cultivo PDB, con una suspensión micelial de *M. fijiensis* a igual concentración. Los frascos se colocaron en zaranda orbital a 28°C y 120 rpm. A los tres, cinco, siete y diez días de incubación se determinó el incremento de la biomasa fúngica mediante la masa seca (g). Para ello, se eliminó el medio de cultivo por filtración y el micelio se secó en estufa a 60°C, hasta obtener masa constante.

Se realizaron tres repeticiones para cada método y se graficó el incremento de la biomasa fúngica en función del tiempo. Seguidamente, se determinó la correspondencia entre los resultados del incremento de la biomasa mediante ambos métodos a través de un análisis de regresión lineal según lo propuesto por Broekaert *et al.* (1990).

Finalmente, se aplicaron los resultados para la evaluación de la actividad antifúngica de un filtrado de cultivo bacteriano frente a *M. fijiensis*. El filtrado de cultivo se obtuvo a partir de la cepa CCIBP-C5 perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (aislada de la filosfera de *Musa* y con actividad antifúngica *in vitro*), según lo descrito por Cruz-Martín *et al.* (2010). Se siguió similar procedimiento para ambos métodos de evaluación (lectura de absorbancia y masa seca) y se usó una dilución de 1:10 del filtrado bacteriano con respecto al medio de cultivo. Para el análisis estadístico de los resultados se realizó un análisis de varianza de un factor y se empleó el programa estadístico SPSS para Window versión 19.0 previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó que el crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo PDB tuvo similares características tanto en frascos de cultivo de 250 ml de capacidad como en placas de 96 pocillos. En ambos la turbidez se incrementó en el tiempo (Figura 1 B,C) y esto se corroboró mediante los valores de absorbancia y masa seca (Figura 2).

Se encontró una relación lineal entre la absorbancia a 595 nm de suspensiones miceliales de *M. fijiensis* con respecto a la masa seca (g) (Figura 3) con  $R^2$  de 0.9993. Similares resultados fueron obtenidos por Broekaert *et al.* (1990) en curvas de crecimiento de *Phycomyces blakesleeanus*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma hamatum*, *Septoria nodorum* y *Rhizoctonia solani* obtenidas mediante el registro de la absorbancia a 595nm y la masa seca.

El incremento de la biomasa de *M. fijiensis* registrado mediante ambos métodos sugiere la posibilidad de evaluar el crecimiento *in vitro* de este patógeno en menores periodos de tiempo que los propuestos por Peláez *et al.* (2006).

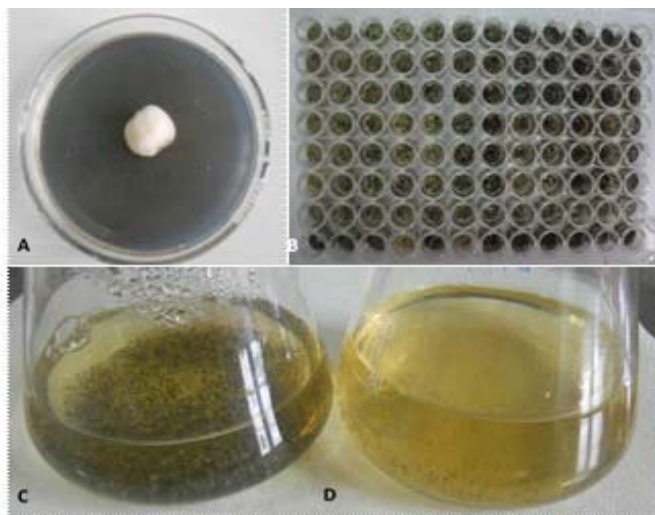


Figura 1. Crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* (A) colonia crecida en medio de cultivo Agar papa dextrosa durante 14 días. (B, C, D) Crecimiento de suspensiones miceliales en medio de cultivo Caldo papa dextrosa a las 48 horas en (B) placas de 96 pocillos (C) frascos de cultivo de 250 ml (D) frascos de cultivo de 250 ml y en presencia de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-C5.



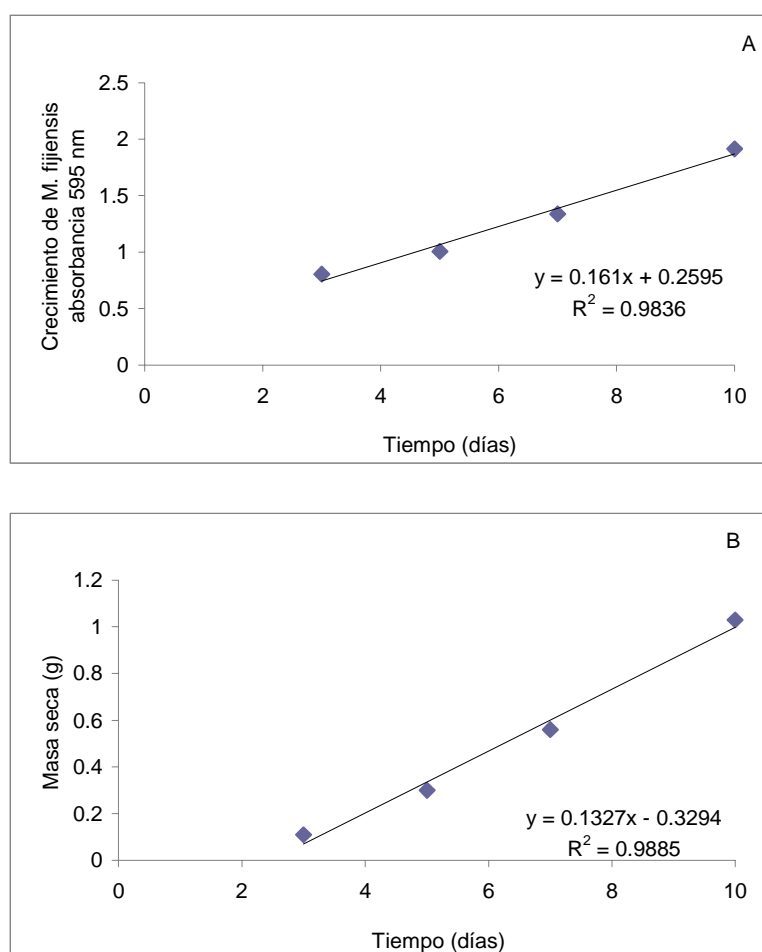


Figura 2. Crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido A) por medida de la absorbancia a 595 nm. B) a partir de valores de masa seca (g). n=8.

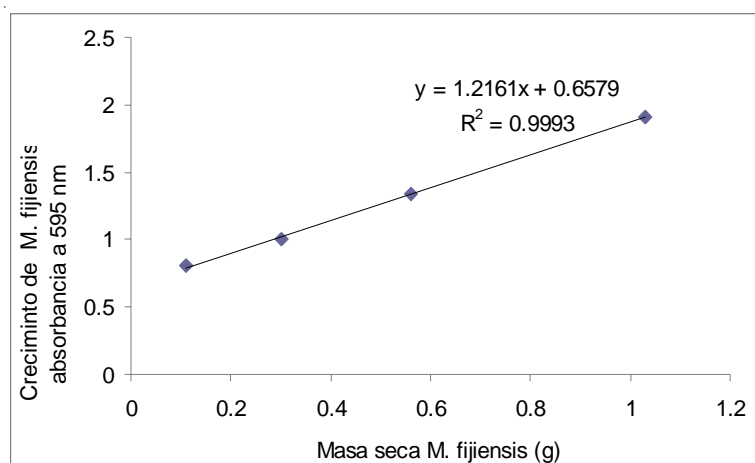


Figura 3. Regresión lineal entre absorbancia 595 nm frente a masa seca (g) de la curva de crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido n=8.

Según Broekaert *et al.* (1990) si la absorbancia es un indicador de la biomasa del hongo en curvas de crecimiento normal, entonces las medidas de absorbancia pueden ser utilizadas como una herramienta para determinar las curvas de inhibición del crecimiento o hacer un monitoreo de la biomasa fúngica. Estos autores, plantearon que el uso de microplacas constituye una ventaja, ya que el ensayo puede montarse de forma fácil y rápida, se requieren pocas cantidades de muestra, la detección se hace por medio de un instrumento exacto y brinda la posibilidad de computarizar el procesamiento de los datos de forma directa.

Cuando se evaluó la actividad antifúngica del filtrado de cultivo bacteriano frente a *M. fijiensis* se observó similar comportamiento en cuanto a la relación entre la inhibición del crecimiento por medida de la masa seca y la absorbancia a 595 nm con un valor de  $R^2=0.9945$ .

Al comparar el crecimiento de la biomasa de *M. fijiensis* en presencia del filtrado con actividad antifúngica con respecto al control (Figura 1 C,D) se observaron diferencias significativas a las 48 horas de incubación, según análisis de varianza de un factor ( $p<0.05$ ), lo que permitió seleccionar este tiempo de cultivo para la evaluación de la actividad antifúngica.

En este estudio se comprobó por primera vez la relación lineal existente entre los valores de absorbancia a 595 nm y la masa seca (g) como medida del crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido, para cuantificar la biomasa del patógeno. Se pueden emplear microplacas de 96 pocillos para la evaluación de la inhibición del crecimiento, lo cual es importante cuando se cuenta con pequeños volúmenes del agente antagonista así como la posibilidad de incorporar un gran número de réplicas al experimento. Este resultado posibilita minimizar los volúmenes finales requeridos en la cuantificación del crecimiento de *M. fijiensis* así como los tiempos de evaluación, variables imprescindibles en estudios de efectividad de compuestos purificados de naturaleza biológica frente a este patógeno.

## CONCLUSIONES

Mediante lecturas de absorbancia en placas de 96 pocillos fue posible cuantificar el crecimiento

de suspensiones miceliales *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido. Además pudo ser aplicado para evaluar la inhibición del crecimiento del patógeno por filtrados de cultivo bacterianos con resultados a las 48 h de incubación. Como ventaja adicional se emplearon suspensiones miceliales del patógeno crecido en medio de cultivo líquido lo cual facilita su manipulación y ajuste de concentración.

## REFERENCIAS

- Broekaert WF, Terras F, Cammue B, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *Microbiology Letters* 69: 55-60
- Chin K, Wirz M, Laird D (2001) Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Dis.* 85: 1264-1270
- Cruz-Martín M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez, Roque B, Leiva-Mora M (2010) Efecto de filtrados cultivo bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* en la interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis* *Biotecnología Vegetal*. 10(2): 99-104
- Essis B, Kobenan K, Traoré S, Koné D, Yatty J (2010) Sensibilité au laboratoire de *Mycosphaerella fijiensis* responsable de la Cercosporiose noire des bananiers vis-à-vis de fongicides couramment utilisés dans les bananeraies ivoiriennes. *Journal of Animal & Plant Sciences* 7(2): 822- 833
- Hernández-Castillo F, Lira-Saldivar RH, Cruz-Chávez L, Gallegos-Morales G, Galindo-Cepeda M, Padrón-Corral E, Hernández-Suárez M (2008) Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *ÖYTON* 77: 241-252
- Manzo G, Orozco M, Guzmán S (2001) Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios de cultivo líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19: 66-71
- Meredith, D, Lawrence J (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52 (3): 459-476
- Mosquera O, Echeverry L, Osorio J (2009) Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia Et Technica* XV(41): 232-236
- Peláez J, Vásquez LE, Díaz TJ, Castañeda DA, Rodríguez E, Arango RE (2006) Use of a micro title

plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. 59(2): 3425-3433

Pérez, L (2009) Fungicidas utilizados en el manejo de las enfermedades de los bananos y plátanos.

Resistencia a Fungicidas. Seminario de manejo de enfermedades de Musáceas. INISAV. Ciego de Ávila, Cuba

Recibido: 10-7-2013

Aceptado: 16-9-2013

## Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediada por metabolitos difundidos y volátiles

Mileidy Cruz-Martín<sup>1\*</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Ivian Poveda<sup>2</sup>, Michel Leiva-Mora<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>. \*Autor por correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mileidy@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

### RESUMEN

Los microorganismos 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. La Sigatoka negra se considera la enfermedad foliar de mayor impacto económico para la industria de banano en el mundo y para su control se requieren de nuevas estrategias que permitan disminuir el uso de fungicidas. Esto ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas como el empleo de bacterias antagonistas. En este trabajo se realizaron ensayos con el objetivo de determinar si la actividad antifúngica *in vitro* de 20 cepas bacterianas contra *Mycosphaerella fijiensis* era ocasionada por metabolitos difundidos al medio de cultivo o volátiles. Como resultado se constató que el 80.0% de las cepas bacterianas evaluadas mostraron actividad antifúngica *in vitro* por metabolitos difundidos al medio de cultivo así como el 60.0% mediante la producción de metabolitos volátiles. El 55.0% de las cepas mostraron ambos mecanismos. Esta característica, hace de estas bacterias, mejores candidatos para su selección como agentes de control biológico.

Palabras clave: antagonistas, biocontrol, compuestos volátiles, metabolitos difundidos.

### *In vitro* antifungal activity of bacteria against *Mycosphaerella fijiensis* mediated by diffused and volatile metabolites

#### ABSTRACT

Antagonistic microorganisms do not have a unique mode of action. Multiplicity of these is an important feature for selection as biological control agents. Black Sigatoka is considered the foliar disease with most economic impact for the banana industry worldwide. New strategies to control it are required to reduce the use of fungicides. That is why an increasing interest to find biological alternatives, such as the use of antagonistic bacteria, has risen. Assays were carried out to determine whether *in vitro* antifungal activity of 20 bacterial strains against *Mycosphaerella fijiensis* was caused by metabolites diffused into the culture medium or volatile. Results demonstrated that 80.0% of bacterial strains tested showed *in vitro* antifungal activity by diffused metabolites in the culture medium and 60.0% by producing volatile metabolites. The 55.0% of strains showed both mechanisms. This feature makes these bacteria the best candidate for its selection as biological control agent.

Keywords: antagonistic, biocontrol, volatile compounds, diffused metabolites.

### INTRODUCCIÓN

El control de hongos fitopatógenos 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.

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 y varios mecanismos pueden operar simultáneamente bajo condiciones ambientales diferentes (Islam *et al.*, 2012).

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. El conocer los mecanismos implicados en la

actividad antifúngica es crucial para el éxito en el uso de un agente de control biológico.

La Sigatoka negra, causada por el hongo ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, se considera la enfermedad foliar de mayor impacto económico para la industria de banano en el mundo. Según Churchill (2011) se requieren grandes avances en el desarrollo de nuevos sistemas de manejo integrado de la enfermedad para favorecer el incremento de la calidad y sanidad del cultivo, así como, disminuir el uso de fungicidas. Además, el incremento a nivel mundial de las demandas por las medidas de seguridad ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas para el control de la enfermedad. Los esfuerzos en este sentido se han encaminado fundamentalmente a la identificación de bacterias capaces de contribuir a las estrategias de control (Marín *et al.*, 2003). No obstante, el conocer los mecanismos involucrados en la actividad antifúngica de las bacterias frente a este patógeno es importante para el establecimiento de estrategias efectivas. Es por ello que en este trabajo se realizaron ensayos con el objetivo de determinar si la actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis* de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. era ocasionada por metabolitos difundidos al medio de cultivo o volátiles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se emplearon 20 cepas bacterianas pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP. Estas fueron aisladas de la filosfera de *Musa* spp. y se seleccionaron previamente por poseer actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010).

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 Enlarmeyers de 100 ml de volumen con 50 ml de medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB) (BioCen) e incubado en agitación a 120 rpm y 28°C, durante 15 días.

Para determinar si la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción

de metabolitos difundidos o volátiles por las cepas bacterianas, se siguieron los protocolos propuestos por Montealegre *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

### *Inhibición por metabolitos difundidos*

Las suspensiones bacterianas fueron crecidas durante 24 h en Caldo Nutriente (CN) (BioCen) y se ajustaron a  $DO_{600}=0.1$  ( $\sim 5.0 \times 10^9$  ufcml<sup>-1</sup>).

En una placa de Petri (150 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<sup>-1</sup>). 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. 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.

### *Inhibición por metabolitos volátiles*

En una tapa de una placa de Petri de 50 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<sup>-1</sup>). Luego se inocularon 50 µl 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®. Como control se emplearon 50 µl 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 realizaron observaciones microscópicas de las hifas del patógeno en los casos que se observó inhibición del crecimiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Inhibición por metabolitos difundidos*

Como resultado de este experimento, 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*.

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 *Rhizoctonia 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. Deformaciones similares se han referido en observaciones microscópicas de antagonismo de cepas de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium graminearum*. Estos cambios se atribuyeron a que probablemente los metabolitos antifúngicos actuaron en la membrana celular del hongo y alteraron su permeabilidad (Chan *et al.*, 2003).

En este mismo patosistema, 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 *Lycopersicon esculentum* (tomate) y banano.

De igual forma, Senthilkumar *et al.* (2007) como resultado del tratamiento de *Rhizoctonia bataticola* con *Paenibacillus* sp. cepa HKA-15, observaron deformaciones del micelio del patógeno y atribuyeron los daños observados a metabolitos de naturaleza peptídica.

### *Inhibición por metabolitos volátiles*

Se comprobó que la inhibición del crecimiento del patógeno fue ocasionada también por la producción de metabolitos volátiles en el 60.0% de las cepas. El método empleado resultó efectivo para evaluar la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* por la producción de metabolitos volátiles (Figura 1).

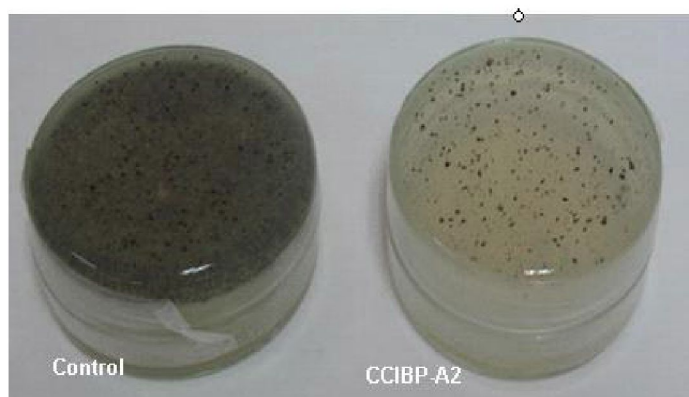


Figura 1. Actividad antifúngica de cepas bacterianas frente a *Mycosphaerella fijiensis* (CCIBP-Pf-83) por producción de metabolitos volátiles a las 48 horas de incubación.

El estudio de metabolitos volátiles para el control de patógenos fúngicos ha sido referido por varios autores (Chen *et al.*, 2008, El-Hasan *et al.*, 2009) aunque su aplicación práctica se ha visto relegada por lo complejo de la caracterización y purificación de este tipo de metabolito. Además, se requieren estudios relacionados con la formulación de productos a partir de cepas que tengan este mecanismo (Ting *et al.*, 2010).

En el estudio microscópico se observaron deformaciones de las hifas y encrespamientos. Similares resultados fueron informados por Fiddaman y Rossal (1993) que observaron deformación y además vacuolización de las hifas en *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* como consecuencia del tratamiento con *B. subtilis*. Esta cepa secretó un metabolito volátil con propiedades fungicidas.

De las 20 cepas evaluadas, 11 presentaron los dos mecanismos de acción (55.0%) y dos ninguno de ellos. Esto coincide con resultados referidos por diferentes autores como Islam *et al.* (2012) quienes 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.

Estos resultados pudieran constituir un criterio importante a tener en cuenta para la selección de estas bacterias como agentes de control biológico, ya que, la multiplicidad de estos mecanismos es importante para el reforzamiento de las propiedades antifúngicas y una mejor eficiencia en el control.

## REFERENCIAS

- Chan, YK, McCormick WA, Seifert KA (2003) Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. Can.J. Microbiol. 49: 253-262
- Chen, H, Xiao X, Wang J, Wu L, Zheng Z, Yu Z (2008) Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnol. Lett. 30: 919-923
- Churchill, A (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology 14(2): 307-328
- El-Hasan, A, Walker F, Schöne J, Buchenauer H (2009) Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. Eur. J. Plant Pathol. 124: 457-470
- Fiddaman, PJ, Rossal S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 74: 119-126
- Islam Md, Jeong Y, Lee Y, Song C (2012) Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. Mycobiology 40(1): 59-66
- Marín, D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. Plant disease 87(3): 208-222
- Montealegre, J, Reyes R, Pérez LM, Herrera R, Silva P, 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
- Poveda, I, M Cruz-Martín, C Sánchez-García, M Acosta-Suárez, M Leiva-Mora, B Roque, Y Alvarado-Capó (2010) Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal 10 (1): 57-61
- Rahman, M, Kadir J, Mahmud T, Rahman R, Begum M (2007) Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. Asian Journal of Plant Science 6(1): 12-20
- Riveros, A, Giraldo, C, Gamboa, A (2003) Microbial control of Black leaf streak disease. En: Jacome, L, Lepoivre, P, Marín, D, Ortiz, R, Romero, R, 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. INIBAP, Montpellier
- Senthilkumar M, Govindasamy V, Annapurna K (2007) Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. Curr Microbiol. 55(1): 25-9
- Ting, A, Mah SW, Tee CS (2010) Identification of volatile metabolites from fungal endophytes with biocontrol potential towards *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Race 4. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 5 (2): 177-182

Recibido: 24-4-2012

Aceptado: 26-6-2012

**Certificados que avalan la  
presentación de los resultados  
en eventos científicos**





Biotechnología y Sociedad,  
diálogos para un desarrollo sostenible.

18 al 22 de Noviembre 2013  
NH Gran Hotel Provincial  
Mar del Plata | ARGENTINA



Se deja constancia que el trabajo

**EFFECTO DE FILTRADO DE CULTIVO BACTERIANO SOBRE ESTRUCTURAS DE  
MYCOSPHAERELLA FIJENSIS MORELET**  
de los autores

Mileidy Cruz-Martin; Eilyn Mena; Mayra Acosta-Suàrez; Berkis Roque; Michel Leiva-Mora;  
Tatiana Pichardo; Yelenys Alvarado-Capo

ha sido presentado como poster

**en el VIII Encuentro de Latinoamericano del Caribe de Biotecnología – REDBIO2013**

PATRICIA BENAVIDES

---

Secretaria REDBIO Argentina

ALEJANDRO ESCANDÓN

---

Presidente  
del VIII Encuentro REDBIO Argentina 2013

del 7 al 10 de Mayo

**Congreso Internacional**  
**de Biotecnología Vegetal**

Se le Otorga el Presente

**Certificación**

**A:** Mileidy Cruz-Martín, Eilyn Mena, Yelenys Alvarado-  
Capó, Mayra Acosta-Suárez, Cynthia Sánchez-García,  
Berkis Roque, Michel Leiva-Mora.

Por su participación como:

**Ponente**

En la Novena Edición del Congreso Internacional Bioveg 2013,  
Realizado del 7 al 10 de mayo, en la Ciudad de Ciego de Ávila. Cuba

<http://www.bioplantas.cu>

<http://bioveg.bioplantas.cu>

PROCESO  
Pablo Neruda



Dr. Oscar V. Concepción Laflitte  
Presidente del Comité Organizador



INIVIT

## II Simposio Internacional

de Raíces, Rizomas, Tubérculos,  
Plátanos, Bananos y Papaya

# Certificado

*A:* Cruz-Martín M, Mena E, Acosta-Suarez M, Roque B, Leiva-Mora M,  
Pichardo T, Alvarado Capó Y.

Por participar como **DELEGADO** en las actividades científicas del Simposio realizadas  
en la cayería norte de Villa Clara, Cuba, del 22 al 25 de octubre de 2013.

Dado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba a los 25 días del mes de octubre de 2013.

  
Dr. C. Sergio Rodríguez Morales  
Presidente del Comité Organizador



  
Dra. C. Lilián Morales Romero  
Secretaria Ejecutiva

  
Dr. C. Luis Ruiz Martínez  
Presidente del Comité Organizador

# 10<sup>ma</sup> Congreso de Biotecnología Vegetal Internacional

Se le Otorga el Presente

## Certificación

A: Mileidy Cruz Martín, Eilyn Mena, Mayra Acosta Suárez,  
Miguel Tzec Simá, Berkis Roque, Tatiana Pichardo, Blondy  
Canto Canche, Yelenys Alvarado Capó

Por su participación como:

Ponente

En la Décima Edición del Congreso Internacional Bioveg 2015,  
Realizado del 11 al 15 de mayo, en la Ciudad de Ciego de Ávila. Cuba

<http://www.bioplantas.cu>

<http://bioveg.bioplantas.cu>



Pablo Neruda



*[Signature]*  
Dr. Oscar W. Concepción Laflitte  
Presidente del Comité Organizador





El Comité Organizador del XII Simposio Internacional de  
Biotecnología Vegetal otorga el presente:


## CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

### Ponente Oral

**Título:** Potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp.  
como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

**A:** Mileidy Cruz-Martín, Eilyn Mena, Mayra Acosta, Berkis  
Roque, Tatiana Pichardo, Yelenys Alvarado-Capó

Dado en Cayo Santa María, Villa Clara, Cuba a los 8 días de abril de 2016

  
Dr. C. Osvaldo Fernández Martínez  
Presidente del Comité Organizador



[simposio.ibp.co.cu](http://simposio.ibp.co.cu)  
[www.ibp.co.cu](http://www.ibp.co.cu)

*...del laboratorio al campo*

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP)

**Tesis presentadas**



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



**Potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la  
filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de  
*Mycosphaerella fijiensis* Morelet**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Agrícolas**

MILEIDY CRUZ MARTÍN

Santa Clara  
2015



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
VERITATE SOLA NOVIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



**Mecanismos de acción del filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus*  
CCIBP-C5 en la interacción *Musa-Mycosphaerella fijiensis***

**Tesis presentada en opción al Título Académico de  
Master en Biotecnología Vegetal**

EILYN MENA MÉNDEZ

Santa Clara, Cuba  
2016



The background of the entire page is a photograph of banana leaves. Some leaves are healthy and green, while others show significant damage with large, irregular brown and black necrotic spots, characteristic of a fungal infection.

**TESIS DE DIPLOMA**

**Actividad antifúngica de metabolitos bacterianos  
frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet**

Autora: Eilyn Mena Méndez

Tutora: Dr.C. Yelenys Alvarado Capó

Consultante: MSc. Mileidy Cruz Martín

**Santa Clara, 2012**



**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  
2010**

**Acreditación de la introducción  
del resultado y de su impacto**

## **Acreditación de la introducción del resultado y de su impacto:**

Los resultados presentados tienen novedad científica y han contribuido a incrementar la visibilidad científica del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Estos han sido publicados en siete artículos científicos, 2 en revistas del grupo 1 en la Web of Science y 5 en revistas del grupo 2, y se presentaron en seis eventos científicos internacionales. Parte de estos resultados se editaron en una tesis de doctorado evaluada por un tribunal nacional de Sanidad Vegetal. Otros resultados de esta propuesta se reflejaron en dos tesis de maestría en Biotecnología Vegetal.

La propuesta recoge varios resultados con alto grado de terminación destacando la colección de cepas procedentes de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis*. En este trabajo se obtuvieron cepas bacterianas que pueden ser empleadas en los programas de Manejo integrado de la enfermedad Sigatoka negra, así como para otros propósitos. Actualmente cepas de esta colección se han incorporado a otros proyectos de investigación como el proyecto nacional: **Estrategias para prevenir futuras afectaciones por Foc RT4 en *Musa* spp.** para su estudio como antagonistas de *Fusarium oxysporum* schlecht. f. *sp. cubense*.

Se demostró el efecto en casa de cultivo de filtrados de cultivo bacterianos con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. Esto contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias para el mejoramiento genético y a la formulación de nuevos productos biológicos. El desarrollo y ajuste de protocolos para la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de bacterias y metabolitos frente a *M. fijiensis* constituyen herramientas importantes para el trabajo con este microorganismo fitopatógeno.

De forma general en esta investigación se desarrolla nueva una metodología de trabajo para las investigaciones relacionadas con metabolitos secundarios obtenidos de bacterias. Estos protocolos y metodologías pueden ser utilizados por todos los centros de investigación de la especialidad del país (Centro de Bioplantitas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria e Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas). En este trabajo se constata el potencial que tienen las bacterias aisladas de la filosfera de *Musa*, bajo las condiciones cubanas de producción, para el control biológico de *M. fijiensis*.

Los resultados de esta investigación constituyen, los primeros estudios sobre la caracterización de los metabolitos bacterianos implicados en la actividad antifúngica de varias cepas bacterianas frente a *M. fijiensis*. El conocimiento de la estabilidad y la naturaleza química de los compuestos involucrados en la actividad antifúngica de estas cepas constituye un aspecto clave para el desarrollo posterior de bioproductos.

En la actualidad en el Instituto de Biotecnología de las Plantas se continúa el estudio de las cepas bacterias seleccionadas y sus metabolitos para dilucidar los mecanismos implicados en el biocontrol. Así mismo, las cepas están siendo aplicadas en varios cultivos de interés, como por ejemplo papa, bananos, frijol y café para estudios relacionados con la promoción del crecimiento vegetal (nutrición y protección).





Instituto de Biotecnología de las Plantas  
Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas  
Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara,  
Villa Clara, Cuba  
Tel: 53 (42) 281257, 281268, 281693  
Fax: 53 (42) 281329  
Web: <http://www.ibp.co.cu>  
e-mail: [info@ibp.co.cu](mailto:info@ibp.co.cu)

Santa Clara, 5 de septiembre del 2018  
"Año 59 de la Revolución"

## AVAL

Entre los principales problemas fitosanitarios del cultivo de plátanos y bananos en Cuba se encuentra la Sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar y está considerada como la más perjudicial a nivel mundial. El control de esta enfermedad representa un gran reto y para su control se requiere del desarrollo de programas de manejo integrado de la enfermedad que incluyan, entre otros, el uso de controles biológicos en combinación con compuestos que promuevan o mejoren los mecanismos de defensa de las plantas.

De forma general en esta investigación se desarrolla nueva una metodología de trabajo para las investigaciones relacionadas con metabolitos secundarios obtenidos de bacterias para el manejo integrado de la Sigatoka negra. Estos protocolos y metodologías pueden ser utilizados por todos los centros de investigación de la especialidad del país (Centro de Bioplasmas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria e Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas). En este trabajo se constata el potencial que tienen las bacterias aisladas de la filosfera de *Musa*, bajo las condiciones cubanas de producción, para el control biológico de *M. fijiensis*.

Los resultados de esta investigación constituyen, los primeros estudios sobre la caracterización de los metabolitos bacterianos implicados en la actividad antifúngica de varias cepas bacterianas frente a *M. fijiensis*. El conocimiento de la estabilidad y la naturaleza química de los compuestos involucrados en la actividad antifúngica de estas cepas constituye un aspecto clave para el desarrollo posterior de bioproductos.

En la actualidad en el Instituto de Biotecnología de las Plantas se continúa el estudio de las cepas bacterias seleccionadas y sus metabolitos para dilucidar los mecanismos implicados en el biocontrol. Así mismo, las cepas están siendo aplicadas en varios cultivos de interés, como por ejemplo papa, bananos, frijol y café para estudios relacionados con la promoción del crecimiento vegetal (nutrición y protección).

Sin otro particular y para que conste se firma el siguiente aval

Dr. C. Osvaldo Fernández Martínez  
Director del Instituto de Biotecnología de las plantas





**Avaless de introducción de  
resultados**



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

Mérida, Yucatán, México, 2 de agosto 2017

H. MIEMBROS DEL COMITÉ EVALUADOR  
PREMIO ANUAL DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA  
PRESENTE

Estimados miembros de la Academia de Ciencias de Cuba ,

A través de la presente extiendo mi apoyo al trabajo “**cepas de *Bacillus* spp. con potencial para el manejo de la Sigatoka negra**” presentado por el grupo de la Dra. Mileidy Cruz Martín para en convocatoria 2017.

Sigatoka negra ha sido y continúa siendo el principal problema en todas las zonas productoras de bananos y plátanos, y el patógeno ha desarrollado tolerancia e incluso resistencia hacia muchas de las moléculas empleadas para su control, lo que hace urgente encontrar alternativas de manejo.

La estrategia que proponen la Dra. Cruz Martín y su grupo, no sólo representa una alternativa, sino es además una alternativa más sostenible que el desarrollo y uso de fungicidas químicos. Adicionalmente, el empleo de extractos biológicos en campo en vez de la liberación de los microorganismos vivos, eliminan los riesgos posteriores que implica el manejo de seres vivos.

Los resultados en las pruebas realizadas en casa sombra muestran un alto potencial para el uso del extracto de *Bacillus pumilus* sobre la Sigatoka negra. La caracterización realizada evidencia la presencia de enzimas líticas y lipopéptidos, los cuales son potencialmente los responsables de la actividad biológica del extracto. Es importante apoyar la continuación de estas investigaciones para evaluar en campo la efectividad sobre Sigatoka negra e inocuidad de este extracto para lograr concretar el desarrollo de un producto biotecnológico.

Sin otro particular quedo de Ustedes atentamente,

Dra. Blondy Canto Canché  
Investigadora Titular C  
Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II  
Miembro Regular de la Academia Mexicana de Ciencias  
Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
(01)9999428330 ext 265  
cantocanche@cicy.mx



## AVAL

La producción de plátanos y bananos está priorizada en Cuba, no solo por el poder nutritivo de los mismos, sino porque son altamente cotizados por la población. Una de las causas que limitan los rendimientos son las enfermedades virales, bacterianas y fúngicas. Entre las últimas, se encuentra la Sigatoka negra, que puede ocasionar pérdidas en el rendimiento entre 50-70%. El manejo de esta enfermedad es difícil, y su base fundamental son los fungicidas químicos sintéticos. El empleo de bioproductos con actividad antifúngica está siendo tratado con mucha frecuencia en diversas regiones del mundo y también en Cuba, por la posibilidad de lograr una alternativa eficaz de manejo de algunos hongos fitopatógenos y el hecho de disminuir la polución ambiental. Su aplicación potencial lo hace de interés mundial, no solamente por la cuestión ambiental, sino también por la baja disponibilidad de estos productos para pequeños productores y por el elevado costo de los tratamientos para un cultivo de tan amplia distribución. Es por ello, que la búsqueda de nuevos agentes amigables con el ambiente es un tema priorizado y actual.

En el instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) se viene realizando desde hace varios años investigaciones relacionadas con el estudio de microorganismos que viven asociados a las plantas con el bacterias objetivo conocer sus efectos en la interacción planta-patógeno que permita mejorar las estrategias de mejoramiento genético de cultivos de interés así como seleccionar candidatos microbianos para la elaboración de bioproductos eficaces para el manejo de enfermedades.

El trabajo **Cepas bacterianas con potencial para el manejo de la Sigatoka negra** aborda el estudio de las potencialidades de aislados bacterianos, provenientes del filoplano de banano, capaces de limitar el desarrollo del agente causal de la Sigatoka negra, así como el esclarecimiento de los principales mecanismos involucrados en ello.

Como novedad, este trabajo aporta nuevos conocimientos a la comunidad científica cubana sobre el potencial de aislados del género *Bacillus*, como agentes de control biológico de *Mycosphaerella fijiensis*. Así mismo se logró conformar un cepario de aislados de *Bacillus* con actividad antagonista frente a *M. fijiensis* y se cuenta con un candidato para la elaboración de un biofungicida para el control de la Sigatoka negra. Finalmente, los

resultados aportan un valor práctico dentro de la agricultura bananera, por el interés para su rápida aplicación e introducción en la práctica social.

"Año 59 de la Revolución"

AVAL

Ing. Antonio Panto Martínez  
Especialista de platano y bananos del  
Órgano Central del Ministerio de la Agricultura



La producción de plátanos y bananos en Cuba se ve afectada por el poder nutritivo de las causas que provocan enfermedades fúngicas. Entre las más importantes se encuentra la Sigatoka negra, que puede ocasionar pérdidas en el rendimiento entre 50-70%. El manejo de esta enfermedad es difícil, y su base fundamental son los fungicidas químicos sintéticos. El empleo de bioproductos con actividad antifúngica está siendo usado con mucha frecuencia en diversas regiones del mundo y también en Cuba, por la posibilidad de lograr una alternativa eficaz de manejo de algunos hongos fitopatógenos y el hecho de disminuir la contaminación ambiental. Su aplicación potencial lo hace de interés mundial, no solamente por la cuestión ambiental, sino también por la baja disponibilidad de estos productos para pequeños productores y por el elevado costo de los tratamientos para un cultivo de tan amplia distribución. Es por ello, que la búsqueda de nuevos agentes amigables con el ambiente es un tema priorizado y actual.

En el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) se viene realizando desde hace varios años investigaciones relacionadas con el estudio de microorganismos que viven asociados a las plantas con el objetivo de conocer sus efectos en la interacción planta-patógeno que permita mejorar las estrategias de mejoramiento genético de cultivos de interés así como seleccionar candidatos microbianos para la elaboración de bioproductos eficaces para el manejo de enfermedades.

El trabajo Cepas bacterianas con potencial para el manejo de la Sigatoka negra aborda el estudio de las potencialidades de aislados bacterianos, provenientes del filopiano de banano, capaces de limitar el desarrollo del agente causal de la Sigatoka negra, así como el esclarecimiento de los principales mecanismos involucrados en ello.

Como novedad, este trabajo aporta nuevos conocimientos a la comunidad científica cubana sobre el potencial de aislados del género *Bacillus*, como agentes de control biológico de *Mycosphaerella fijiensis*. Así mismo, se logró conformar un cepario de aislados de *Bacillus* con actividad antagonista frente a *M. fijiensis* y se cuenta con un candidato para la elaboración de un biofungicida para el control de la Sigatoka negra. Finalmente, los



28 de Septiembre/2017  
"Año 59 de la Revolución"

## AVAL

En el trabajo recibido titulado "Cepas bacterianas con potencial para el manejo de la Sigatoka negra", de investigadores del INIVIT, se pone de manifiesto que la Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada una de las 10 enfermedades que tienen mayor impacto en la agricultura a nivel mundial. Históricamente el control químico ha sido la principal vía de manejo.

La identificación de cepas de *Bacillus* mediante ensayos de laboratorio y en casas de cultivo es un importante avance para el desarrollo de agentes de control biológico con uso potencial en el control de esta enfermedad. Siendo esto las primeras etapas de un largo camino dirigido a la obtención de un bioproducto que logre salvar eficazmente los retos y dificultades que implica en la práctica el biocontrol a nivel de la filósfera.

En las investigaciones realizadas, se caracterizaron cepas de *Bacillus* spp. y se comprobó mediante ensayos de laboratorio y en casa de cultivo su potencial como agentes de biocontrol de *M. fijiensis*. Como aportes del trabajo está la colección de cepas caracterizadas con potencial para su empleo en la formulación de bioproductos para el manejo de la Sigatoka negra, la determinación de los mecanismos implicados en el biocontrol de la cepa CCIBP-C5 frente a *M. fijiensis*, el desarrollo y la estandarización de protocolos para la determinación de la actividad anti fúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*. Estos resultados han permitido la publicación de 5 artículos en revistas nacionales y uno en *Tropical Plant Pathology*, la presentación de 5 trabajos en eventos internacionales y la defensa de una tesis de Doctorado, dos de Maestría y una de Licenciatura en Biología.

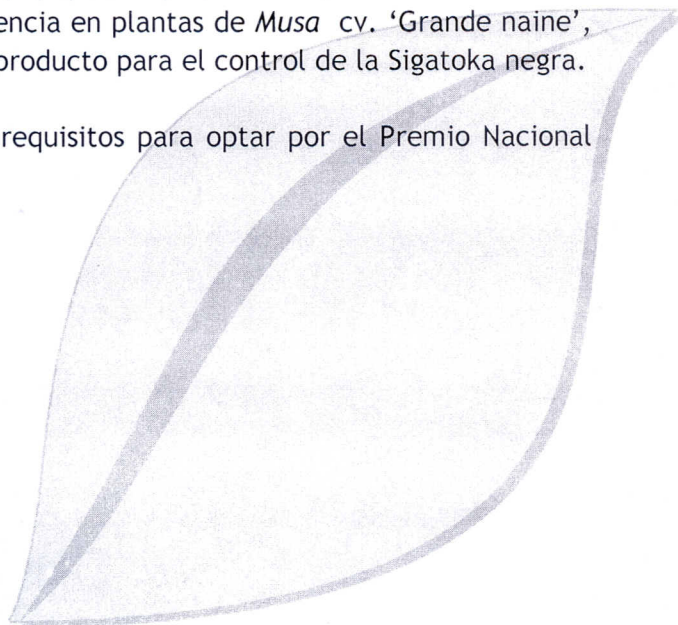
Además este trabajo permite contar con un candidato bacteriano aislado de la filósfera de *Musa* spp. productor de metabolitos de tipo lipopéptidos y quitinasas, con actividad anti fúngica frente a *M. fijiensis* e inductor de resistencia en plantas de *Musa* cv. 'Grande naine', que podría ser usado en la elaboración de un bioproducto para el control de la Sigatoka negra.

Consideramos que este trabajo cumple con los requisitos para optar por el Premio Nacional Anual 2017 de la Academia de Ciencias de Cuba.

Saludos cordiales



Dra. Marlene Veitía Rubio  
Presidenta del Consejo Científico  
Directora General INISAV







**FORUM**  
**CIENCIA Y TÉCNICA**

LA UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
OTORGA:

# Premio Destacado

A: Dra. C. Yileidy Cruz Fortín

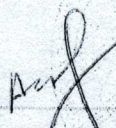
POR EL TRABAJO TITULADO: Polemicidad de cepos de *Boillius* spp.,  
por el control de enfermedades fúngicas en  
Humana

COMISIÓN: Biología e Industria Farmacéutica

"La supervivencia de la Revolución y del Socialismo,  
la preservación de la independencia de este País  
depende hoy, fundamentalmente, de la Ciencia y la Técnica."

*Fidel Castro Ruz*

Dado en Santa Clara, a los 6 días del mes de julio de 2017  
"Año 59 de la Revolución"

  
Presidente de la Comisión



# FORUM

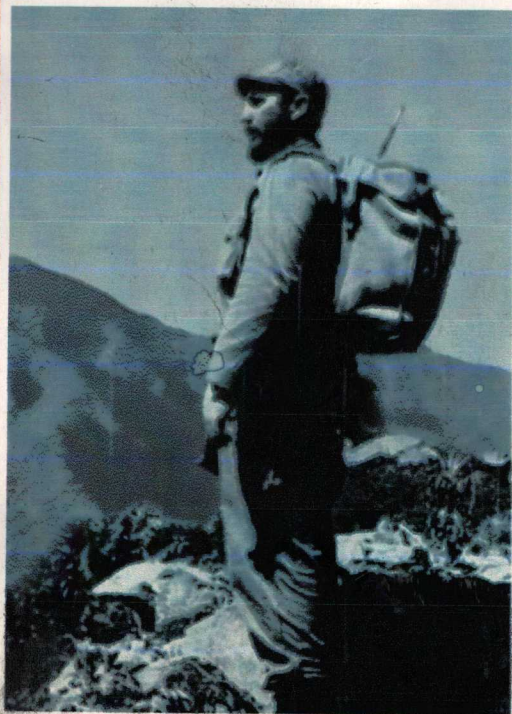
OTORGA

## RECONOCIMIENTO

**A:** Mileidy Cruz Martín y colectivo.

**Por el IMPACTO MEDIOAMBIENTAL logrado con su trabajo:**

Mecanismos de acción del filtrado de cultivo *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 en la interacción *Musa* *Mycosphaerella* *figiensis*.



*"No puede haber socialismo sin ciencia"*

*VJ Forum, 1991*

Dado en Santa Clara a los 5 días  
del mes de abril de 20 17.

  
Comisión  
del Forum de Ciencia y Técnica





Instituto de Biotecnología de las Plantas  
Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas  
Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba  
Tel: 53 (42) 281257, 281268, 281693  
Fax: 53 (42) 281329  
Web: <http://www.ibp.co.cu>  
e-mail: [info@ibp.co.cu](mailto:info@ibp.co.cu)

Santa Clara, 27 de julio del 2017  
"Año 59 de la Revolución"

### AVAL

En el Consejo Científico del Instituto de Biotecnología de las Plantas, celebrado el 27 de Junio del 2017 se aprobó por unanimidad (Acuerdo 27-2017) avalar la propuesta a Premio Academia de Ciencias Nacional titulada:

### **Cepas bacterianas con potencial para el manejo de la Sigatoka negra**

El control de la Sigatoka negra, enfermedad que afecta a plátanos y bananos, representa un gran reto y requiere el desarrollo de programas de manejo integrado que incluyan alternativas biológicas que permitan disminuir el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, el empleo de bioproductos en Cuba para el control de esta enfermedad es limitado. La presente investigación desarrollada en el Instituto de Biotecnología de las Plantas tuvo como objetivo determinar el potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra. Se realizaron aislamientos de la filosfera de *Musa* spp. y se comprobó la presencia de bacterias productoras de metabolitos antifúngicos (volátiles y difundidos) con características promisorias para el control biológico de *M. fijiensis*. A partir de los resultados se demostró la presencia de varios mecanismos involucrados en el biocontrol que se interrelacionan entre sí. El conocimiento de estos permite el desarrollo de bioproductos más eficaces, a partir de estas cepas. Como aporte de este trabajo se cuenta con una colección de cepas caracterizadas con potencial para su empleo en la formulación de bioproductos para el manejo de la Sigatoka negra, protocolos para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *M. fijiensis* y desde el punto de vista social ha contribuido en la formación de profesionales y estudiantes en el campo de la Biología y Agronomía. Se defendió una tesis de doctorado, dos de maestría en Biotecnología Vegetal y una de Licenciatura en Biología. Estos resultados permitieron disponer por vez primera de candidatos bacterianos para el manejo de la Sigatoka negra en Cuba. La presente investigación tiene un gran valor científico y práctico, se lograron publicaciones en revistas científicas de reconocido prestigio y fue presentado en eventos científicos de carácter nacional e internacional.

Atentamente,

Dr. C. Yelenys Alvarado Capó  
Presidenta del Consejo Científico  
Instituto de Biotecnología de las Plantas

