

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Desarrollo de estrategias de control del
fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*
(Foc) a partir de la diversidad microbiana**

Sebastian Zapata Henao

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Ciencias Agrarias
Medellín, Colombia
2019

**Desarrollo de estrategias de control del
fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*
(Foc) a partir de la diversidad microbiana**

Sebastian Zapata Henao

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Ph.D. Lilliana María Hoyos Carvajal

Codirectora:

Ph.D. Valeska Villegas Escobar

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Medellín, Colombia

2019

A mis padres, incansables luchadores. A ustedes les debo todo y cuanto soy. Me dieron educación, amor y respeto, las raíces para ser fuerte y las alas para volar en la vida.

Agradecimientos

Gracias a mis directoras de tesis Lilliana y Valeska quienes día a día, a través de su experiencia y conocimiento, orientaron mi formación profesional, brindando herramientas fundamentales para recorrer el camino de la ciencia y la investigación.

Al Centro de Investigaciones del Banano (CENIBANANO) y la Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA), instituciones que han apoyado en todo momento mi desarrollo académico y profesional, depositando su confianza en el trabajo que he realizado durante estos 4 años. Gracias especiales mis jefes Gabriel Elejalde y Marcela Ordoñez, a los investigadores Luz Edith Argel, Vicente Rey y Jorge Vargas, quienes aportaron sus conocimientos en este proceso. Al igual, a los auxiliares de investigación Mónica David y Alba Martínez, por su colaboración en los diferentes ensayos.

A la Universidad EAFIT, en especial al grupo de estudiantes, investigadores y técnicos del laboratorio de Bioprocesos, quienes me abrieron las puertas y compartieron todo su conocimiento en pro del desarrollo de múltiples ensayos de esta tesis. En año y medio conocí seres excepcionales como Sigifredo Cárdenas, Luisa Posada y Gisell García, que se convirtieron en grandes amigos. A ustedes millones de gracias.

Al departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS), entidad que financió el proyecto de investigación con el cual se pudo desarrollar la presente tesis de maestría.

A los amigos de la vida en especial a Marcela Osorio, Jackson Osorio y Luis Fernando Patiño, quienes fueron un apoyo fundamental.

Resumen

El banano es de gran importancia a nivel económico y social alrededor del mundo. Sin embargo, múltiples patógenos afectan el desarrollo de la planta, siendo la marchitez por *Fusarium* la principal amenaza fitosanitaria para el cultivo. Dicha enfermedad es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) que permanece infectivo en el suelo hasta por 30 años, dejando las áreas afectadas inhabilitadas para el cultivo de banano puesto que no existen métodos de control diferentes al mejoramiento genético. La raza 1 del patógeno devastó el banano Gros Michael y Manzano en los años 1950 y en la actualidad la raza 4 tropical (R4T), presente en Asia, África y Oceanía, genera importantes pérdidas económicas en la producción de banano Cavendish teniendo en alerta a centro y sur América. Bajo este contexto, se buscan nuevas estrategias de control basadas en el uso de microorganismos y compuestos biológicos que ayuden a reducir la población del fitopatógeno en el suelo. Por ello, este estudio se centró en desarrollar una estrategia de control del fitopatógeno Foc a partir de la diversidad microbiana. Se determinó que múltiples géneros bacterianos provenientes de diferentes tejidos de *Musa* spp., tenían la capacidad de inhibir el patógeno en pruebas *in vitro*, siendo *Bacillus amyloliquefaciens* (EA-CB0959) el microorganismo más destacado debido a su alta capacidad antifúngica generada a partir de sobrenadantes libres de células (SLC) producidos bajo la fermentación bacteriana en medio de cultivo MOLP (Medio optimizado para la producción de lipopéptidos), compuestos que resultaron ser altamente resistentes a cambios de pH, temperatura y acción de enzimas como la proteinasa K, manteniendo su actividad antifúngica. Los estudios *in vivo* demostraron la capacidad de reducción de la población de Foc R1 en suelos estériles por parte del cultivo bacteriano de EA-CB0959, mientras en pruebas de biocontrol *in vivo* se determinó que EA-CB0959 puede reducir la incidencia y severidad de la marchitez por *Fusarium* en plantas de banano Gros Michael en suelos con altas concentraciones del patógeno; sin embargo, los mayores efectos de biocontrol se observaron después de tratar suelos poscuarentena con cuatro y/o cinco aplicaciones

semanales del extracto bacteriano al 50% antes de la siembra, por lo cual puede ser considerado como un factor clave en un plan de manejo integrado de la enfermedad.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, banano, control biológico, poscuarentena.

Abstract

Bananas are of great economic and social importance around the world. However, multiple pathogens affect the development of the plant, with *Fusarium* wilt being the main phytosanitary threat for the crop. This disease is caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) that remains infective in the soil for up to 30 years, leaving the affected areas disabled for banana cultivation since there are no control methods other than genetic improvement. Race 1 of the pathogen devastated the Gros Michael and Manzano bananas in the 1950s and currently the tropical race 4 (TR4) present in Asia, Africa and Oceania, generates significant economic losses in the production of Cavendish bananas taking alert to central and south America. In this context, new control strategies are sought based on the use of microorganisms and biological compounds that help reduce the population of the phytopathogen in the soil. Therefore, this study focused on developing a strategy to control the Foc phytopathogen from microbial diversity. It was determined that multiple bacterial genera from different tissues of *Musa* spp., have the ability to inhibit the pathogen in *in vitro* tests, being *Bacillus amyloliquefaciens* (EA-CB0959) the most prominent microorganism due to its high antifungal capacity generated from cell-free supernatants (CFS) produced under bacterial fermentation in MOLP culture medium (Medium optimal for lipopeptide production), compounds that were found to be highly resistant to changes in pH, temperature and action of enzymes such as proteinase K, maintaining its activity antifungal. The *in vivo* tests demonstrated the ability to reduce the population of Foc R1 in sterile soils by the bacterial culture of EA-CB0959, while in biocontrol tests *in plant* it was determined

that EA-CB0959 can reduce the incidence and severity of *Fusarium* wilt in Gros Michael banana plants in soils with high concentrations of the pathogen; however, the greatest effects of biocontrol were observed after treating post-quaternary soils with four and/or five applications per week of the bacterial extract at 50% before planting, which can be considered as a key factor in an integrated disease management.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, banana, biological control, post-quarantine.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de anexos	XV
Abreviaturas	XVI
Introducción.....	1
Objetivos.....	7
CAPÍTULO 1. SELECCIÓN DE BACTERIAS PROVENIENTES DE <i>Musa</i> spp., CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA SOBRE Foc R1 <i>in vitro</i>.....	8
1.1 Introducción.....	8
1.2 Materiales y métodos.....	12
1.2.1 Microorganismos empleados	12
1.2.3 Pruebas de inhibición cualitativas	12
1.2.4 Caracterización de los microorganismos seleccionados	13
1.2.5 Prueba de inhibición cuantitativa individual.....	14
1.2.6 Prueba de inhibición cuantitativa con combinación de cepas.....	15
1.2.7 Análisis estadístico	15
1.3 Resultados y discusión.....	16
1.3.1 Pruebas de inhibición cualitativas	16

1.3.2 Caracterización de los microorganismos seleccionados	19
1.3.3 Prueba de inhibición cuantitativa individual	20
1.3.4 Prueba de inhibición cuantitativa con combinación de cepas	24
1.4 Conclusiones	27
Bibliografía	28

CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD DE SOBRENDANTES LIBRES DE CÉLULAS Y COMPUESTOS VOLÁTILES DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS SOBRE Foc R1 ...41

2.1 Introducción	42
2.2 Materiales y métodos.....	46
2.2.1 Microorganismos empleados	46
2.2.2 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de cultivo)	46
2.2.3 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de concentración)	48
2.2.4 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de tiempo de cultivo).....	48
2.2.5 Pruebas de inhibición de VOCs	49
2.2.6 Pruebas de estabilidad del SLC de la bacteria <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959)	49
2.2.7 Análisis estadístico	50
2.3 Resultados y discusión	51
2.3.1 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de cultivo)	51
2.3.2 Efecto de la concentración de SLC sobre la inhibición del crecimiento de Foc R1	55
2.3.3 Efecto del tiempo de fermentación de las bacterias sobre la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes	57
2.3.4 Pruebas de inhibición de VOCs	58
2.3.5 Pruebas de estabilidad del SLC de la bacteria <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959)	60
2.4 Conclusiones	63

Bibliografía	64
CAPÍTULO 3. DINÁMICA Y BIOCONTROL DE <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959)	
SOBRE Foc R1.....	75
3.1 Introducción.....	76
3.2 Materiales y métodos.....	79
3.2.1 Microorganismos empleados	79
3.2.2 Prueba de microcosmos	80
3.2.3 Pruebas de virulencia de Foc R1	80
3.2.4 Bioensayo en suelo inoculado con Foc R1	83
3.2.5 Bioensayo en suelo poscuarentena infectado con Foc R1	84
3.2.6 Análisis estadístico	85
3.3 Resultados y discusión.....	85
3.3.1 Prueba en microcosmos	85
3.3.2 Pruebas de virulencia de Foc R1	85
3.3.3 Bioensayo en suelo contaminado con Foc R1	92
3.3.4 Bioensayo en suelo poscuarentena infectado con Foc R1	94
3.4 Conclusiones.....	98
Bibliografía	99
CAPÍTULO 4. Conclusiones y recomendaciones.....	108
4.1 Conclusiones.....	108
4.2 Recomendaciones.....	110
Anexos.....	111

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Porcentaje de bacterias con capacidad de inhibición sobre Foc R1 aisladas en estudios previos en diferentes tejidos de <i>Musa</i> spp.....	18
Figura 1-2. Análisis filogenético basado en secuencias parciales del gen ribosomal 16S rDNA de bacterias evaluadas por su capacidad de inhibición sobre Foc R1.	19
Figura 1-3. Prueba de inhibición cuantitativa individual.....	21
Figura 1-4. Filos bacterianos con actividad inhibitoria sobre Foc R1.....	22
Figura 2-1. Actividad antifúngica de bacterias sobre Foc R1 mediada por VOCs.	59
Figura 2-2. Halo de inhibición del sobrenadante libre de células de la bacteria <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959) sometido a diferentes rangos de pH, temperatura y proteinasa K.	600
Figura 3-1. Dinámica y control del sobrenadante y células de <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959) en microcosmos inoculados con Foc R1 (1×10^3 UFC/mL).	86
Figura 3-2. Dinámica y control del sobrenadante y células de <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959) en microcosmos inoculados con Foc R1 (1×10^6 CFU/mL).	88
Figura 3-3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad marchitez por <i>Fusarium</i> en plantas de banano Gros Michael sembradas en suelo poscuarentena tratado con aplicaciones consecutiva de <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959) en cinco diferentes experimentos.....	95

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Cepas bacterianas que provocaron halos de inhibición del crecimiento de Foc R1 en medio PDA.....	16
Tabla 1-2. Porcentaje de inhibición de bacterias individuales (controles) y sus respectivas combinaciones (por 2 bacterias).....	25
Tabla 2-1. Efecto del medio de cultivo sobre la eficacia del sobrenadante del cultivo líquido de bacterias para inhibir el crecimiento de Foc R1.	55
Tabla 2-2. Comparación del porcentaje de inhibición de SLC puros (1X) y concentrados (10X) sobre Foc R1.	56
Tabla 3-1. Evaluación de virulencia de diferentes aislados de Foc R1 en plantas de banano Gros Michael.	91
Tabla 3-2. Efecto de la aplicación del cultivo bacteriano de <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959) sobre el desarrollo de la marchitez por <i>Fusarium</i> en banano Gros Michael.	92
Tabla 3-3. Efecto de aplicaciones del cultivo bacteriano de <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA-CB0959) sobre el desarrollo de la marchitez por <i>Fusarium</i> en banano Gros Michael en suelos poscuarentena.	955

Lista de anexos

	Pág.
Anexo I. Análisis estadístico de pruebas de inhibición cuantitativa individual.....	111
Anexo II. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de combinaciones bacterianas	112
Anexo III. Efecto de bacterias antagonistas a Foc sobre la estructura de hifas.....	114
Anexo IV. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de SLC (dependiente de cultivo)	115
Anexo V. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de SLC (dependiente de concentración).....	116
Anexo VI. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de SLC (dependiente de tiempo de cultivo).....	117
Anexo VII. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de VOCs	118
Anexo VIII. Pruebas de estabilidad del SLC de la bacteria <i>B. amyloliquefaciens</i> (EA- CB0959).....	119
Anexo IX. Análisis de suelos de sustrato utilizado en pruebas de patogenicidad de Foc R1, microcosmos, biocontrol de suelo infectado y poscurentena.....	120
Anexo X. Análisis estadístico prueba de patogenicidad de Foc R1	121
Anexo XI. Análisis estadístico de pruebas en microcosmos.....	122
Anexo XII. Análisis estadístico bioensayo en suelo contaminado con Foc R1	127
Anexo XIII. Análisis estadístico bioensayo en suelo poscurentena infectado con Foc1	1299

Abreviaturas

Abreviatura	Término
16S rDNA	Sección 16S del ADN ribosomal (subunidad pequeña)
ABCPE	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad
ACB	Agente de control biológico
ADE	Agua destilada estéril
AIA	"Actinomycete isolation Agar" - Agar para Actinomicetos
ANOVA	"Analysis of Variance" - Análisis de varianza
ASBAMA	Asociación de bananeros del Magdalena y la Guajira
ATCC	American Type Culture Collection
AUGURA	Asociación de Bananeros de Colombia
BAFE	Bacteria aeróbica formadora de endósporas
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
C(+)	Control positivo
C(-)	Control negativo
CVSR	Critical Value of Studentized Range
DAPG	2,4-diacetilfloroglucinol
ddi	Días después de la inoculación
dNTPs	Deoxinucleotides triphosphates - Trifosfatos de desoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Culture
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
Foc R1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> raza 1
Foc R4T	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> raza 4 tropical

f. sp	Forma especial
ISR	Resistencia sistémica inducida
LB	Luria Bertani
LPs	Lipopéptidos
MCRH	Máxima capacidad de retención de humedad
MOLP	Medium Optimal for Lipopeptide Production
MSD	Minimum Significant Difference
MSE	Mean Square Error
Ni	No identificada (Bacteria)
NRPS's	Non-Ribosomal Peptide Synthesis - Sintetasas de péptidos no ribosomales
qPCR	"Real Time Polymerase Chain Reaction" - Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
PCR	"Polymerase Chain Reaction" - Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	"Potato Dextrose Agar" - Agar papa dextrosa
PDB	"Potato Dextrose Broth" - Caldo papa dextrosa
PIA	" <i>Pseudomonas</i> isolation Agar" - Agar para <i>Pseudomonas</i>
RNC	Registro único nacional de colecciones biológicas (Instituto Humboldt)
rpm	Revoluciones por minuto
SFA	"Selective <i>Fusarium</i> Agar"- Agar selectivo para <i>Fusarium</i>
SLC	Sobrenadante libre de células
SNP	"Single nucleotide polymorphisms" - Polimorfismos de nucleótido único
TSA	"Tryptic Soy Agar" - Agar Tripticasa de soya
TSB	"Tryptic Soy Broth" - Caldo Tripticasa de soya
UFC	Unidades formadoras de colonia
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
YMA	"Yeast Malt Agar" - Agar para levaduras

Introducción

La agricultura a nivel mundial afronta grandes retos ante el paulatino desbalance entre la demanda de alimentos y la baja productividad, generada entre otros factores por el crecimiento poblacional, reducción de áreas agrícolas, degradación de suelos y presencia de patógenos (Alexandratos & Bruinsma, 2012; Savary *et al.*, 2012; Cazalis, Loreau & Henderson, 2018). Dentro de los productos agrícolas más consumidos a nivel mundial se encuentran el banano y el plátano, nombrados científicamente en conjunto como (*Musa* spp). Estas musáceas se cultivan en regiones tropicales y subtropicales, teniendo una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo. Como alimento básico, los bananos y plátanos contribuyen a la seguridad alimentaria de millones de personas y dada su comercialización en mercados locales, éstos proporcionan ingresos y empleo a las poblaciones rurales (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007; De la Torre-Gutiérrez, Chel-Guerrero & Betancur-Ancona, 2008; FAO, 2013). En términos de valor bruto de producción, el banano y el plátano se constituyen como el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo después del arroz, el trigo y el maíz (Arias *et al.*, 2004; Frison *et al.*, 2004; FAO, 2013). En 2016, la producción mundial de banano y plátano fue alrededor de 113 y 35 millones de toneladas en aproximadamente 5,5 y 4,6 millones de hectáreas, respectivamente (FAO, 2017). Aunque el subgrupo Cavendish constituye un 47% de la producción mundial de banano, otros genotipos como el banano Gros Michel y Manzano representan un 12% de la producción mundial, frutos apetecidos en el mercado por su particular sabor y fácil manejo poscosecha. Por su parte, los plátanos de cocción con genoma AAB representan un 17%, mientras bananos agridulces como Prata (genotipo de mayor producción y consumo para Brasil) y bananos de cocción de los grupos AAB, ABB y BBB tienen un 24 % de la producción mundial (Soto, 2011).

Aproximadamente el 87% de la producción mundial de banano y plátano es consumida por los productores o vendida en los mercados locales y regionales, catalogados como un alimento de primera necesidad en África, Asia y América tropical (Arias *et al.*, 2004; FAO,

2013). El restante 13% (avaluado en USD 8,9 mil millones), es destinado a mercados internacionales (Dusunceli, 2014; FAO, 2017), donde solamente el banano Cavendish, representó cerca de 18 millones de toneladas exportadas en el año 2017 (FAO, 2018). América Latina y el Caribe es la zona de mayor producción para exportación, con 15,5 millones de toneladas para este mismo año, siendo Ecuador, Costa Rica, Guatemala y Colombia, los países de mayor producción (FAO, 2017; FAO, 2018).

Bajo este contexto, el banano es un producto de importancia económica para Colombia. Se cataloga como el tercer producto agrícola de exportación, antecedido por las flores y el café; y la principal fruta de exportación, siendo eje clave del tejido social en las zonas de producción (Proexport, 2012). La producción de esta fruta genera 35.000 empleos directos y cerca de 100.000 indirectos (AUGURA, 2014), además aporta el 11,8% de las exportaciones agropecuarias del país (AUGURA, 2019). Actualmente Colombia cuenta con 50.685 hectáreas cultivadas de banano Cavendish para exportación en las zonas de Urabá, Magdalena y la Guajira, las cuales tienen una productividad promedio de 1.996 cajas por hectárea, lo que se traduce en una producción de 101 millones de cajas de banano de 18,14 kg por un valor de USD 868 millones para el año 2018 (AUGURA, 2019).

No obstante, los cultivos de musáceas se ven amenazados por diferentes patógenos entre los cuales se destacan *Pseudocercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) agentes causales de la sigatoka negra y la marchitez por *Fusarium*, respectivamente. En el primer caso, es bien conocido los altos volúmenes de fungicidas aplicados para contrarrestar el desarrollo de la enfermedad y la rápida pérdida de sensibilidad del patógeno a dichas moléculas (Arango *et al.*, 2016), mientras que, para el segundo caso, resalta la dificultad en su manejo, constituyéndose en la enfermedad más destructiva de las musáceas (Ploetz, Kema & Ma, 2015).

La marchitez por *Fusarium* antes conocida como mal de Panamá fue descrita por primera vez en Australia en 1874 en banano Manzano (Bancroft, 1876), y posteriormente, fue reportada en Panamá (1890), Suriname (1906), Cuba, Puerto Rico, Jamaica y América Central (1910), India (1911) y Colombia (1954) en banano Gros Michel, lo cual produjo su eliminación como cultivo de exportación en grandes extensiones (O'Donnell *et al.*, 1998). En este periodo de tiempo se calcula que aproximadamente 80.000 ha de banano Gros

Michael fueron destruidas (Viera & Pérez-Vicente, 2009). Para la época se describieron dos razas del patógeno, acordes a su patogenicidad sobre las variedades de banano, siendo Foc raza 1 (R1), patogénica sobre los cultivares Gros Michael (AAA), Silk - Manzano (AAB), Pome - Prata (AAB), Pisang awak (ABB), entre otros; y Foc raza 2 (R2) en bananos de cocción tipo Bluggoe entre otros de genoma (ABB) (De Ascensao & Dubery, 2000).

El problema de Foc R1 se solucionó con la siembra a gran escala de cultivares del subgrupo Cavendish, ya existentes para la época, los cuales mostraron alta resistencia al patógeno. Sin embargo, para la década de los 90`s, cuando la industria bananera estaba en pleno crecimiento, surgió una nueva raza del patógeno catalogada como raza 4 tropical (R4T) en Malasia e Indonesia, la cual puede atacar la totalidad de bananos y plátanos de importancia económica, incluyendo Cavendish (Ploetz, 1994). La enfermedad se extendió en el sudeste asiático en menos de una década. Los brotes iniciales hicieron que las exportaciones de banano en Indonesia pasaran de 100 mil toneladas anuales, a un punto muerto, con pérdidas estimadas en USD 134 millones/año, y de USD 400 millones para la industria filipina (Dusunceli, 2014; Pérez-Vicente, Dita & Martínez, 2014). Los recientes reportes de Foc R4T en Omán (2012), Jordania, Mozambique (2013), Pakistán, Líbano (2015) (Ordoñez *et al.*, 2016), Australia (2016) (O`Neill *et al.*, 2016), Vietnam (Hung *et al.*, 2018), Laos (Chittarath *et al.*, 2018) e Israel (Maymon *et al.*, 2018) han demostrado su amenaza como una enfermedad transfronteriza, provocando serias preocupaciones en la industria bananera de América Latina y el Caribe, donde se encuentran la mayoría de los bananos para la exportación, continente que hasta ahora se mantienen libre del patógeno.

Este patógeno tiene la capacidad de generar diversas estructuras infectivas como macroconidias, microconidas y clamidosporas (Pérez-Vicente, Dita & Martínez, 2014), que permiten su dispersión por vías como el agua (ríos, canales de drenaje y riego), material de propagación, herramientas contaminadas, hospederos alternos, puyones o colinos asintomáticos, y suelo infestado adherido al calzado, animales, vehículos, etc. (Buddenhagen, 2009; Dita, Echevoyén, & Pérez-Vicente, 2013, Ploetz, 2015, Dita *et al.*, 2018). Las clamidosporas de Foc son estructuras de resistencia que pueden permanecer en el suelo por más de 40 años, aun en ausencia del cultivo de banano, lo que hace que el control de este patógeno sea difícil (Buddenhagen, 2009). Las especies

de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección, las clamidosporas germinan estimuladas por los exudados radicales de las plantas hospedantes y no hospedantes, o por el contacto con tejido sano de un cultivar susceptible. Posteriormente se producen micelio y conidias, iniciando la penetración en la planta, a través de las raíces secundarias y terciarias (Pérez-Vicente, Dita & Martínez, 2014). Luego, ingresa al sistema vascular del rizoma y pseudotallo e invade los vasos del xilema. Una vez allí, el hongo produce microconidias las cuales son llevadas a lo largo de los haces vasculares donde inician nuevas zonas de infección ocasionando su obstrucción y como consecuencia el movimiento del agua y nutrientes se reduce (Guo *et al.*, 2014). Los primeros síntomas de la enfermedad son la aparición de estrías verdes pálidas en la base del pecíolo de las hojas más viejas; seguidamente, se presenta un amarillamiento uniforme de las mismas, hasta que la planta se marchita por completo (Knogge, 1996; Guo *et al.*, 2014). A medida que avanza la marchitez, también se observa una rajadura del pseudotallo a nivel del suelo (Pérez-Vicente, Dita & Martínez, 2014, Ploetz, 2015). Los síntomas internos se caracterizan por una decoloración marrón de haces vasculares, necrosis y pudrición de raíces, cormo y pseudotallo. (Pérez-Vicente, Dita & Martínez, 2014, Ploetz, 2015). Cabe resaltar que desbalances nutricionales, limitantes condiciones físico-químicas del suelo y la presencia de nematodos fitopatógenos como *Radopholus similis*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchus*, y *Pratylenchus* (Dinesh *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2018) entre otras plagas, promueven la infección de Foc, al ser factores de estrés que afectan el normal desarrollo de la planta (Dita *et al.*, 2018)

Esta enfermedad no cuenta con controles efectivos por lo cual, las medidas para evitar la introducción de Foc R4T a áreas libres se basan en cuarentena y exclusión del patógeno (Dita, Echegoyén, & Pérez-Vicente, 2013). Diversos estudios han evaluado el uso de productos químicos como benzimidazol, estrobilurinas, carbendazim, benomil, bromuro de metilo e inhibidores de metilación, muchos de ellos con efecto *in vitro*, pero nulo o bajo efecto en pruebas de invernadero y campo, además de ser altamente tóxicos (Herbert & Marx, 1990; Nel *et al.*, 2007), dejando como única alternativa, el uso de amonios cuaternarios, como SporeKill® (i.a. cloruro de didecil dimetil amonio), para desinfección de herramientas y calzado, para evitar la dispersión de Foc R1 y R4T (Nel *et al.*, 2007; Meldrum *et al.*, 2013). Algunas medidas físicas como la quema de cascarilla de arroz sobre suelo infectado y solarización solo reducen el inóculo de los centímetros más superficiales

del suelo (Herbert & Marx, 1990, Ploetz, 2015). El empleo de inductores de resistencia, bioreguladores y productos de origen botánico (Sun *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013), se ha estudiado para tratar de ofrecer estrategias de manejo efectivas, pero han tenido bajo éxito, mientras que el uso de variedades resistentes sigue siendo el método más deseable (Dita *et al.*, 2018). Sin embargo, los programas de fitomejoramiento toman un tiempo prolongado, y las variedades que resultan resistentes en la mayoría de casos no tienen las cualidades organolépticas requeridas por el mercado, por lo cual se hace difícil su establecimiento en el mercado (Ploetz, 2015).

Las musáceas, son un micro-ecosistema complejo en el cual diferentes nichos están ocupados por una amplia variedad de microorganismos (Mia, Shamsuddin & Mahmood, 2010), motivo por el cual, se buscan agentes de control biológico (ACB) para limitar el desarrollo de diferentes enfermedades del cultivo, donde se destacan las bacterias por su gran diversidad genética y variedad de producción de compuestos antimicrobianos (Villegas-Escobar, 2012). Para el caso específico de la marchitez por *Fusarium*, el uso del control biológico ha demostrado resultados positivos, donde géneros como *Trichoderma*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, cepas no patogénicas de *Fusarium* spp., entre otros, son promisorios para el control del patógeno; sin embargo, son pocos los estudios que se realizan en invernadero y campo (Akila *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2016). Dichos microorganismos pueden actuar de forma directa a través de la antibiosis (metabolitos secundarios, enzimas líticas, compuestos orgánicos volátiles), parasitismo o competencia; y de forma indirecta induciendo resistencia local o sistémica, promoción del crecimiento vegetal, o cambios favorables en la microbiota del suelo (Cubica *et al.*, 2018). Los agentes de control biológico (ACB) han sido aplicados de diversas formas (suspensión de esporas, enmiendas orgánicas, bioformulaciones, etc.) en diferentes estados de desarrollo de la planta (*in vitro*, endurecimiento, al trasplante, pos-trasplante); sin embargo, no se tiene claridad sobre un protocolo mejor que el otro (Guo *et al.*, 2013; Dita *et al.*, 2018; Cubica *et al.*, 2018). No obstante, para el caso de Colombia, no hay estudios de impacto sobre la bioregulación de microorganismos propios sobre las poblaciones de Foc R1. Además, de forma general, se debe profundizar mucho más en los mecanismos de acción de los microorganismos agentes de control biológico y su interacción con la microbiota del suelo y la planta, para optimizar la actividad antifúngica en campo (Dita *et al.*, 2018), además de

generar estrategias biológicas que permitan reducir las altas cantidades de inóculo del patógeno que queda presente en suelos después de un ataque por Foc (Ordoñez *et al.*, 2015).

Tales evidencias, demuestran el alto impacto que puede llegar a generar Foc RT4 en caso de llegar a Colombia, por ende, la industria bananera del país, a través de la Asociación de bananeros de Colombia (AUGURA) y la Asociación de bananeros del Magdalena y La Guajira (ASBAMA), trabajan de la mano del Instituto Colombiano de Agropecuario (ICA) para prevenir la entrada de Foc R4T. Cabe resaltar que Foc R1 continúa siendo un problema, específicamente para pequeños productores que cultivan variedades susceptibles como Gros Michael y Manzano bajo sistemas de producción en asociación con otros cultivos, recurriendo a medidas de manejo como la agricultura migratoria, las siembras anuales escalonadas y la búsqueda de suelos sin presencia del patógeno (Dita *et al.*, 2018). Aunque no se tienen datos precisos del impacto de Foc R1 en Colombia, se debe destacar que solamente para la región de Urabá, en 2014 se contaba con 1373,6 ha de banano Manzano para exportación, con una productividad de 30528,3 toneladas; sin embargo, la diseminación de Foc R1 generó una reducción significativa, pasando a solo 428.6 ha con una productividad de 7006,2 toneladas en 2016 (AGRONET, 2016).

En este sentido se hace urgente diseñar, adaptar, estudiar, y comprender medidas integradas de control de este fitopatógeno, principalmente las basadas en la diversidad microbiana, para reducir el impacto de Foc R1 en Colombia. Partiendo de lo anterior, la presente investigación pretende responder la pregunta: ¿pueden los métodos de control alternativos basados en la biotecnología, propiamente en la explotación de compuestos metabólicos activos producidos por microorganismos, reducir o eliminar la población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en el suelo?

Objetivos

General:

Desarrollar una estrategia de control del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) a partir de la diversidad microbiana.

Específicos

- Seleccionar bacterias provenientes de *Musa* spp. con actividad antagónica sobre Foc R1 *in vitro*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de sobrenadantes libres de células (SLC) y compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de bacterias con potencial de inhibición sobre Foc R1 *in vitro*.
- Comprobar el potencial de los microorganismos seleccionados o sus metabolitos para reducir la población de Foc a nivel de microcosmos.
- Determinar el efecto de la aplicación del microorganismo con mayor potencial o sus metabolitos sobre el desarrollo de la marchitez por *Fusarium* en plantas de banano Gros Michael.

CAPÍTULO 1. SELECCIÓN DE BACTERIAS PROVENIENTES DE *Musa* spp., CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA SOBRE Foc R1 *in vitro*

Resumen

El uso de agentes de control biológico es una estrategia potencial de manejo de enfermedades vasculares, tales como la marchitez por *Fusarium* en banano. Bajo esta premisa, el objetivo del estudio presentado en este capítulo fue seleccionar microorganismos bacterianos provenientes de *Musa* spp. con actividad antagonica sobre Foc R1 *in vitro*. Para tal fin, se evaluó la capacidad de 315 bacterias aisladas de diferentes tejidos de *Musa* sp., para inhibir el crecimiento de Foc R1 a nivel *in vitro* en medio sólido. El 9,2% (28 cepas) de las bacterias evaluadas, afectaron el crecimiento de Foc con porcentajes de inhibición del 24,2 a 66%, siendo en su mayoría aquellas provenientes de tejidos foliares (57%). Se determinó que el 60,87% de las bacterias antagonistas pertenecen al Filo Firmicutes. Las especies *Burkholderia* sp. (EA-ED0047), *Corynebacterium propinquum* (EA-ED0145), *Bacillus amyloliquefaciens* (EA-CB0959) y *Pseudomonas koreensis* (EA-ED0055) fueron las más promisorias por su alta capacidad antagonica. En la búsqueda de potenciar el efecto antifúngico, se realizaron combinaciones entre pares de bacterias encontrando una respuesta negativa sobre el efecto deseado, la inhibición de Foc R1. Las bacterias con capacidad antifúngica causaron hinchazón y lisis celular en hifas de Foc R1, por lo cual se puede inferir que dicho efecto es causado por metabolitos, enzimas o compuestos volátiles.

Palabras clave: Antagonismo, inhibición, pruebas *in vitro*, combinaciones bacterianas.

1.1 Introducción

La marchitez por *Fusarium* es una de las enfermedades más nocivas que atacan a las musáceas, puesto que hasta el momento tan sólo se tienen medidas de contención, pero

ninguna medida de manejo que prometa la erradicación del patógeno. La enfermedad se desarrolla favorablemente en las regiones tropicales y más del 80% de los bananos y plátanos cultivados en el mundo son susceptibles a algunas de las razas de Foc (Ploetz, 2006; Qi *et al.*, 2008). Debido a la gran variabilidad genética de Foc y a su amplia distribución (Ordoñez *et al.*, 2015), el manejo de esta enfermedad resulta altamente difícil (Ploetz, 2015). El empleo de inductores de resistencia (ácido indolacético y el bisulfito sódico de menadiona), y productos de origen botánico (fungicidas botánicos Wanis 20 EC y Damet 50 EC, talcos a base de *P. fluorescens* strains (Pf1) y *Bacillus subtilis* (TRC 54)), han sido objeto de investigaciones para desarrollar estrategias de manejo de la enfermedad, pero han mostrado baja efectividad (Borges *et al.*, 2004; Akila *et al.*, 2011), por lo que el uso de variedades resistentes sigue siendo el método más promisorio (Dita *et al.*, 2018). Ploetz (2015) afirma que hay pocas opciones para el manejo de la fusariosis del banano. La naturaleza perenne de este patosistema y la naturaleza policíclica del patógeno han complicado el desarrollo de medidas a largo plazo, indicando que es necesario buscar nuevas áreas de cultivo, donde el patógeno no se haya establecido. Una medida de control que sea efectiva y económicamente viable para el control de la enfermedad se hace necesaria.

Las medidas químicas son limitadas para el manejo de este hongo, además de que cuentan con una eficacia cuestionada (Nel *et al.*, 2007). Las medidas culturales tan sólo mitigarían el problema, reduciendo la presión del inóculo en el área sembrada por medio de policultivos (Buddenhagen, 2009). En cuanto a las medidas físicas, en Filipinas se trabaja con quema de cascarilla de arroz sobre los focos de la enfermedad; este proceso genera calor suficiente para eliminar el patógeno sólo en las capas más superficiales del suelo y las zonas no influenciadas por las altas temperaturas continúan con poblaciones de inóculo infectivo (Molina *et al.*, 2010). Un enfoque complementario para el manejo de la marchitez por *Fusarium* lo constituye la búsqueda de microorganismos con alto potencial antagonista al patógeno (Cao *et al.*, 2005). Diferentes microorganismos han sido evaluados y reportados como posibles biocontroladores de Foc, siendo cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* spp., los géneros de hongos más utilizados; mientras que en los géneros bacterianos se destacan *Bacillus* spp., y *Pseudomonas* spp. (Raza *et al.*, 2016).

Thangavelu y Jayanthi (2009) fueron los primeros en reportar la aplicación exitosa en campo de una cepa de *F. oxysporum* no patógeno para reducir el marchitamiento por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* R1 en India. En su estudio, el agente de control biológico (ACB) redujo la severidad de la enfermedad en un 80%. En un estudio similar, (Belgrove, Steinberg & Viljoen, 2011) reportaron hasta 69% de reducción de síntomas de la enfermedad en plantas tratadas con cepas no patogénicas de Foc; no obstante, en pruebas de campo, no encontraron reducciones significativas de la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, usar cepas no patogénicas del género *Fusarium* para biocontrol es riesgoso, debido a las características evolutivas del hongo que le permiten recibir cromosomas con material genético de cepas patogénicas y desarrollar enfermedad (Ma *et al.*, 2010). De otro modo, cepas endofíticas de *Trichoderma* spp., pueden reducir los síntomas externos de la enfermedad hasta un 92%, retardar en más de tres semanas la aparición de los síntomas externos, e incrementar el peso de la raíz y el peso del follaje, en un 109% y 148%, respectivamente, en pruebas de invernadero con Foc R1 (Caballero, 2011, Haddad *et al.*, 2018). Hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Chaetomium* también han sido evaluados con Foc R4T (Núñez-Trujillo *et al.*, 2013).

Del mismo modo, diferentes grupos de bacterias poseen características de interés para ser consideradas como agentes de control biológico contra Foc. En estudios realizados por Silva *et al.* (2014), se aislaron 122 bacterias a partir de cinco cultivares de banano, pero solo una bacteria endófito proveniente del cultivar Pinsangue Seilão y tres aisladas de Maçã (Manzano) categorizadas dentro del género *Bacillus*, mostraron potencial para pruebas de antagonismo *in vitro* contra Foc R1. En un estudio similar, tras aislar comunidades de bacterias endófitas de plantas de banano, sanas y enfermas, se encontraron 30 cepas de las cuales sólo tres mostraron capacidad antagónica significativa contra Foc R4T. Una de ellas fue identificada como *Pseudomonas aureofaciens*, mientras que las dos restantes se catalogaron como *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Los rangos de inhibición del crecimiento de Foc en condiciones *in vitro* fueron 60,32%, 56,25% y 58,34%, respectivamente (Lian, Wang & Zhou, 2008). En estudios recientes, se reportó que *Bacillus amyloliquefaciens* cepa W19, puede producir metabolitos secundarios como la iturina y bacilomicina D, las cuales son altamente efectivas para el control de Foc R4T (Wang *et al.*, 2013). Además, este microorganismo tiene la capacidad de promover el crecimiento de plantas gracias a su producción de ácido indolacético (Wang *et al.*, 2016).

Sekhar y Thomas (2015) aislaron bacterias endófitas a partir de plántulas de banano cv. Gran Enano proveniente de cultivo de tejidos, obteniendo 47 cepas; en su investigación solo uno de estos microorganismos, identificado como *Pseudomonas aeruginosa*, mostró actividad antagónica significativa ante Foc R1. De otro lado, la bacteria endofítica *Pseudomonas fluorescens* WCS 417 redujo en 87,4% la incidencia de la marchitez por *Fusarium*, en estudios de inoculación bajo invernadero (Belgrove *et al.*, 2011). Cao *et al.* (2004) encontraron que el 50% de las cepas de *Streptomyces* aisladas de plantas de banano sanas tenían actividad antagonista contra Foc R4T y el 44,8% de las cepas aisladas de tejidos de raíz mostró actividad antagonista, sugiriendo que los estreptomicetos endófitos que colonizan las raíces del banano podrían proteger a las plantas de la invasión por Foc R4T. En pruebas *in vivo* (plántulas) la cepa S96 de *Streptomyces* sp., redujo en 46% la severidad de la enfermedad. Además, se encontró que la bacteria retrasó en dos semanas la aparición de los primeros síntomas en las plantas (Cao *et al.*, 2005). Por su parte, Lian *et al.* (2009) aplicaron una mezcla de endófitos no cultivables, provenientes de plantas nativas de banano, sanas, en plantas Cavendish, encontrando una reducción del 54% en el desarrollo de síntomas de la enfermedad.

A pesar de los resultados promisorios a nivel *in vitro* y en pruebas de invernadero, pocas investigaciones con aplicación de microorganismos son llevadas a campo y siguen faltando herramientas de control sobre este fitopatógeno (Ploetz, 2015). Además, en Colombia no se han realizado estudios de biocontrol de Foc R1 con microorganismos nativos de plantas del género *Musa* spp. En este sentido, la búsqueda de compuestos bioactivos, microorganismos o consorcios microbianos podrían generar estrategias de mitigación y reducción de inóculo del patógeno en el suelo, teniendo como hipótesis central que la diversidad microbiana aislada a partir de *Musa* spp., tiene la capacidad de bioregulación de Foc R1 y que la combinación de cepas puede generar efectos sinérgicos y/o aditivos. Por ende, el objetivo de la investigación mostrada en este capítulo fue seleccionar bacterias provenientes de *Musa* spp., con capacidad de control *in vitro* sobre Foc R1.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Microorganismos empleados

Para el desarrollo de la investigación se emplearon dos colecciones de microorganismos aislados previamente de plantas de banano y plátano localizadas en cultivos comerciales (Ramírez, 2012, Ceballos *et al.*, 2012). A partir de la colección RNC 191 (Instituto Humboldt), codificada como EA-CB, la cual cuenta con 1496 cepas de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (principalmente del género *Bacillus* spp.), aisladas de la filósfera y rizósfera de plantas de banano y plátano del Urabá antioqueño, se seleccionaron 7 cepas con morfotipos diferentes que habían mostrado actividad antagonista sobre *Fusarium oxysporum* en un estudio previo (Villegas-Escobar, 2012); y de la colección RNC 226 (Instituto Humboldt), codificada como EA-ED, la cual cuenta con 450 microorganismos endófitos aislados de plantas de banano cultivadas en Urabá antioqueño, se seleccionaron 308 aislamientos bacterianos. Las cepas seleccionadas para este trabajo fueron almacenadas en TSB (Caldo Tripticasa de Soya, Merck®) suplementado con glicerol (20% v/v) a -80 °C y para cada experimento fueron activadas en medio TSA (Agar Tripticasa de Soya, Merck®) al 50%, o en otros medios en los que fueron aisladas originalmente, por 24 h a 30 °C.

En cuanto a Foc R1, se seleccionó la cepa codificada como IB, la cual fue aislada previamente de pseudotallo sintomático de banano Manzano (AAB) en la finca comercial “La Isla Bonita” (lat. 7°48'08" N, long. 76°41'25" W) con un historial de presencia de Foc R1 de 12 años. El hongo se conservó mediante cultivo de micelio en papel filtro a 4 °C. Para cada experimento, el hongo se activó colocando un fragmento de papel filtro en medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa, Difco®) por 7 días a 25 °C.

1.2.3 Pruebas de inhibición cualitativas

Con el fin de determinar cualitativamente cuales aislamientos bacterianos podrían tener actividad antimicrobiana contra Foc R1 a nivel *in vitro*, se evaluaron las cepas correspondientes a la colección RNC 191 por el método de “palillos” (Kiyohara, 1982) para el caso de microorganismos cercanos al género *Bacillus* spp., y en otros tipos de bacterias

(colección RNC 226) por el método de “difusión en agar” (Balouiri, Sadiki & Ibensouda, 2016).

Brevemente para el primer método, las cepas bacterianas fueron inoculadas mediante punciones con palillos de madera en medio de cultivo PDA, previamente inoculado con 200 μL de Foc R1 (1×10^3 conidias/mL) y dispersado uniformemente en la superficie del medio. En total se dispusieron 7 cepas bacterianas por caja Petri, con 4 repeticiones (cajas Petri) por caja. Las cajas fueron incubadas a 25 °C por 5 días. Posteriormente, se determinó la presencia (+) o ausencia (-) de halos de inhibición alrededor de cada cepa bacteriana sobre Foc R1. Para el segundo método, las bacterias se sembraron en los medios donde habían sido aisladas originalmente, los cuales fueron YMA (Agar para levaduras), AIA (Agar para actinomicetos) y PIA (Agar para *Pseudomonas*) e incubadas por 24 h a 30 °C. Posteriormente, se tomaron discos de agar de 5 mm de cada cultivo y se inocularon en medio PDA en puntos distribuidos equidistantemente con respecto al centro de la caja Petri. Finalmente se transfirió un disco de agar (5 mm) con micelio de Foc R1 al centro de la caja y se incubó a 25 °C por 5 días, para determinar la presencia o ausencia de halos de inhibición. En total se ubicaron 6 cepas bacterianas por caja de Petri y se usaron 4 repeticiones por tratamiento. Finalizado el proceso de incubación se determinó el diámetro promedio de inhibición para determinar de forma cuantitativa preliminar cuales cepas presentaban actividad antagonista contra Foc R1.

1.2.4 Caracterización de los microorganismos seleccionados

La identificación de las cepas bacterianas se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rDNA. Para esto, se utilizaron los primers para eubacterias 27F/1492R (27 F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 1492R: 5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3'). La extracción de ADN se realizó con el kit Ultra Clean Microbial DNA Isolation (Qiagen) o por extracción en choque térmico. Para la amplificación del gen por PCR se usó GoTaq® Flexi DNA polimerase (GoTaq, Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de PCR se preparó en un volumen total de 25 μL , conteniendo 0,25 μM de cada primer, 0,625 U de ADN polimerasa GoTaq® Flexi, 0,2 mM de dNTPs, 1X de buffer de enzima y 1,5 mM MgCl_2 por cada reacción. Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguida por 31 ciclos

de 94°C por 1 min, 57°C por 45 s, 70°C por 2 min y un período final de extensión a 70°C por 8 min (Villegas-Escobar, 2012). La secuencia consenso se analizó comparando con las secuencias almacenadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando el algoritmo Blast y considerando el porcentaje de similitud más alto. Posteriormente, con las bacterias identificadas y seleccionadas para pruebas cuantitativas, se realizó un árbol filogenético por el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) a partir de las secuencias generadas del gen 16S rDNA. Se incluyó como grupo externo la cepa *Escherichia coli* EAFIT. Además, se tomaron secuencias almacenadas en el GenBank del gen 16S rDNA cepas de referencia de cada género bacteriano de diferentes fuentes como:

- a. American Type Culture Collection (ATCC): Cepas *Bacillus amyloliquefaciens* (23350), *B. subtilis* (6051), *B. megaterium* (14581), *Pseudomonas aeruginosa* (10145), *E. coli* (25922), *Burkholderia cepacia* (25416) y *Streptotrophomonas maltophilia* (13637).
- b. Bulgari et al. (2012): Cepa *Paenibacillus pasadenensis* (R16).
- c. Leibniz Institute (DSMZ)-German Collection of Microorganisms and Cell Culture: Cepa *Corynebacterium coyleae* (DSM 44184).

Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016).

1.2.5 Prueba de inhibición cuantitativa individual

Los aislados seleccionados en las pruebas cualitativas (presencia de halos de inhibición del crecimiento de Foc R1) fueron seleccionados para cuantificar el porcentaje de inhibición ahora por el “método del anillo bacteriano” (Dhingra & Sinclair, 1995). Para ello, se impregnó el borde de una caja Petri pequeña con cada cepa bacteriana (previamente sembrada en su medio de aislamiento) y se imprimió de forma circular y centrada en la superficie de medio PDA en una caja de Petri de 90 mm de diámetro, formando un anillo en el centro. Posteriormente, en el centro de la caja se colocó un disco de agar de (5 mm de diámetro) con micelio de Foc R1 de 7 días de edad crecido en PDA en todo el centro del anillo. Los platos se encubieron a 25 °C por 5 días. Como control se utilizaron cajas de

Petri inoculadas solamente con discos del hongo y cuando este alcanzó un crecimiento igual al diámetro del círculo formado por la bacteria, se midió el crecimiento radial de la colonia de Foc R1. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio con 4 réplicas (cajas de Petri) por tratamiento. La variable respuesta fue el porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio el cual se calculó considerando el diámetro de Foc R1 en las cajas control como 100%.

1.2.6 Prueba de inhibición cuantitativa con combinación de cepas

Con el fin de determinar el efecto de la interacción de cepas bacterianas sobre el crecimiento de Foc, se realizaron 45 combinaciones duales con 10 bacterias, 7 con un porcentaje de inhibición superior al 40% en la prueba cuantitativa individual y 3 sin actividad antifúngica. Además, las 10 bacterias fueron seleccionadas por diferencias morfológicas. Dicha prueba se realizó de forma similar a la prueba anterior, pero colocando primero una cepa y posteriormente su pareja (combinación) en la caja Petri con PDA y Foc R1. Los platos se encubaron a 25 °C por 5 días. Como control absoluto se tenían cajas Petri inoculadas solamente con discos del hongo y cuando este alcanzó un crecimiento igual al diámetro del círculo bacteriano, se midió el diámetro del micelio para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de Foc R1 con respecto al control. Se incluyó la inoculación de las cepas de bacterias de forma individual como control adicional, con el fin de validar los resultados preliminares y para determinar posibles efectos sinérgicos entre los aislamientos. Se realizaron 4 repeticiones (cajas de Petri) por cada combinación y/o aislamiento evaluado.

1.2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el software estadístico y de programación R-project® versión 3.4.4 (2018-03-15). Para cada experimento se verificó el supuesto de normalidad, igualdad de varianzas e independencia mediante la prueba de Shapiro-Wilks, Levene y Durbin Watson, respectivamente.

Debido a que los datos para la prueba de inhibición cuantitativa individual no presentaron una distribución normal, la comparación entre los tratamientos fue realizada usando la

prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Wilcoxon, con un nivel de confianza del 95% (Anexo I).

Por su parte, para analizar las diferencias entre los tratamientos en la prueba de inhibición cuantitativa con combinación de cepas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre las medias de los tratamientos fue evaluada con un análisis de rangos múltiples por medio de la prueba de Dunnett con un nivel de confianza del 95% (Anexo II), donde se comparó el control (bacteria individual con más alto porcentaje de inhibición) contra el efecto de la segunda bacteria y su respectiva combinación, para aquellos casos (combinaciones) donde el porcentaje de inhibición resultara ser mayor al efecto individual de la bacteria con más alto porcentaje de inhibición.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Pruebas de inhibición cualitativas

Un total de 315 cepas de bacterias provenientes de diferentes tejidos de *Musa spp.*, fueron evaluadas cualitativamente para determinar su capacidad de inhibición sobre Foc R1. Se determinó que el 9,2% de las cepas evaluadas (4 bacterias de la colección RNC 191 y 24 de la RNC 226) presentaron halos de inhibición del crecimiento de Foc R1 (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Cepas de bacterias que provocaron halos de inhibición del crecimiento de Foc R1 en medio PDA.

Código	Cultivo	Municipio-Finca	Tejido	Inhibición (mm)
EA-CB0015	Banano-Gran Enano	Campo experimental AUGURA	Filósfera	2,49
EA-CB0575	Banano-Valery	La Navarra	Rizósfera	4,71
EA-CB0959	Plátano-Dominico	El Aserrío	Filósfera	8,03
EA-CB1420	Plátano-Dominico	El Aserrío	Rizósfera	7,93
EA-ED0047	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	20,18
EA-ED0055	Banano-Valery	Mi Capi	Cormo	23,20

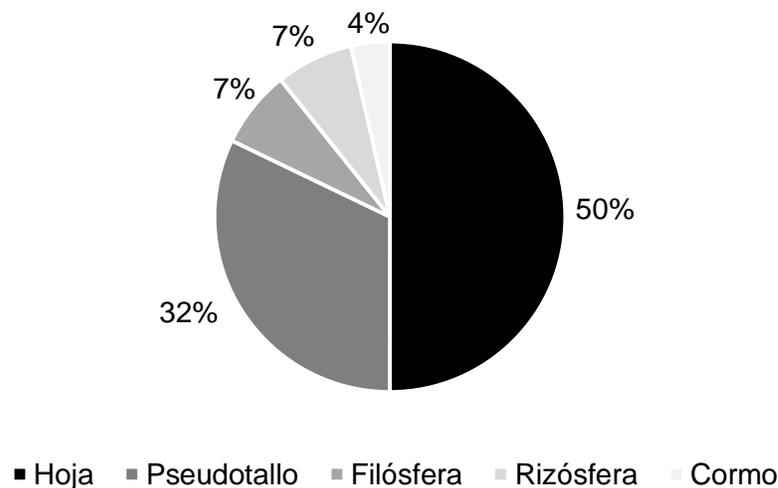
EA-ED0145	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	18,60
EA-ED0161	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	23,20
EA-ED0177	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	22,76
EA-ED0179	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	17,19
EA-ED0184	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	20,98
EA-ED0242	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	27,68
EA-ED0244	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	21,77
EA-ED0245	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	24,16
EA-ED0247	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	22,19
EA-ED0248	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	21,46
EAED0265	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	16,67
EAED0266	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	18,07
EAED-0268	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	16,48
EA-ED0273	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	24,3
EA-ED0274	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	22,55
EA-ED0317	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	25,40
EA-ED0318	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	19,32
EA-ED0321	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	18,82
EA-ED0322	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	21,77
EA-ED0325	Banano-Valery	Mi Capi	Pseudotallo	25,49
EA-ED0361	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	24,64
EA-ED0367	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	25,54
EA-CB0070	Banano-Gran Enano	Campo experimental AUGURA	Rizósfera	0,00
EA-CB1315	Banano-Valery	La Navarra	Filósfera	0,00
EA-CB1057	Banano-Valery	La Navarra	Filósfera	0,00
EA-ED0316	Banano-Valery	Mi Capi	Hoja	0,00

El estudio del microbioma de las plantas y de las funciones ecológicas que cumple está en constante aumento (Berg *et al.*, 2014) En el cultivo de banano se ha determinado que el microbioma está dominado por géneros como *Pseudomonas* y *Strenotrophomonas*, microorganismos conocidos como ACB. Bajo este contexto, la búsqueda de agentes de control biológico para el control de enfermedades vasculares en las plantas, se presenta como una alternativa de manejo sostenible, debido a la baja eficiencia del control químico y los daños ambientales (Hardoim *et al.*, 2015; Eljounaidi, Lee & Bae, 2016). Sin embargo,

el porcentaje de microorganismos que se seleccionan como antagonistas en estudios con diferentes fitopatógenos en banano, es relativamente bajo, con rangos de selección entre 3 y 10% del total de cepas probadas (Villegas-Escobar, 2012; Wang *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014), tal como se determinó en la presente investigación, lo que indica que los microorganismos involucrados en el biocontrol de Foc son pocos y/o desconocemos la función que desempeñan las demás cepas en dicha actividad.

En total, el 50% de las cepas que inhibieron a Foc R1 fueron aisladas originalmente de tejido foliar, 32% de pseudotallo, 7% de filósfera, 7% de rizósfera, y un 4% de corno, de diferentes cultivos de *Musa* spp. (Figura 1-1). En la búsqueda de diferentes grupos bacterianos con potencial de biocontrol sobre Foc R1 y R4T, se estudian tejidos individuales como hoja (Souza *et al.*, 2014) Rizósfera (Ayyadurai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013) pseudotallo (Widono, 2012), raíz (Cao *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2015) meristemo apical (Sekhar & Thomas, 2015), mientras solo algunos comparan la actividad antimicrobiana de microorganismos provenientes de diferentes tejidos, como raíz y hoja, donde Cao *et al.* (2004) a diferencia de los resultados presentados en este estudio, hallaron un mayor número de actinomicetos antagonistas a Foc en tejidos de raíz. Estos trabajos y los resultados observados en este estudio sugieren que agentes de control biológico hacia Foc pueden estar presentes en diferentes tejidos de *Musa* spp.

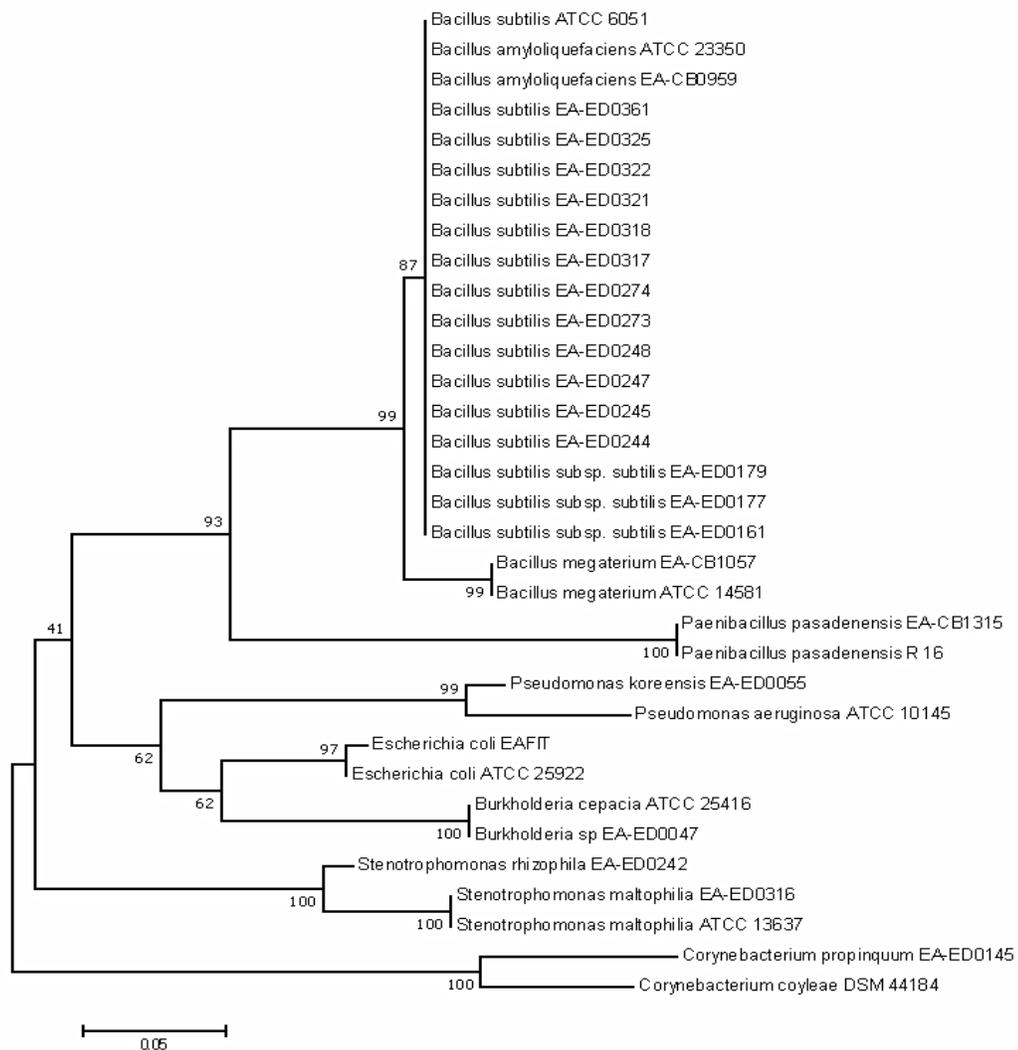
Figura 1-1. Porcentaje de bacterias con capacidad de inhibición sobre Foc R1 aisladas en estudios previos en diferentes tejidos de *Musa* spp.



1.3.2 Caracterización de los microorganismos seleccionados

Las cepas EA-ED0184, EA-ED0265, EA-ED0266, EA-ED0268 y EA-ED0367 no pudieron identificarse, debido a que las lecturas obtenidas por secuenciación no tuvieron la calidad deseada. El árbol filogenético realizado permitió observar la alta afinidad entre los géneros y/o especies identificadas con respecto a las secuencias de referencia, con excepción del caso de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) y la cepa de referencia ATCC 23350 para esta misma especie, las cuales se establecieron en la rama correspondiente a las cepas identificadas como *B. subtilis* (Figura 1-2).

Figura 1-2. Análisis filogenético basado en secuencias parciales del gen ribosomal 16S rDNA de bacterias evaluadas por su capacidad de inhibición sobre Foc R1.



La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados agrupados en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Tamura 3-parameter (Tamura, 1992) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 33 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes.

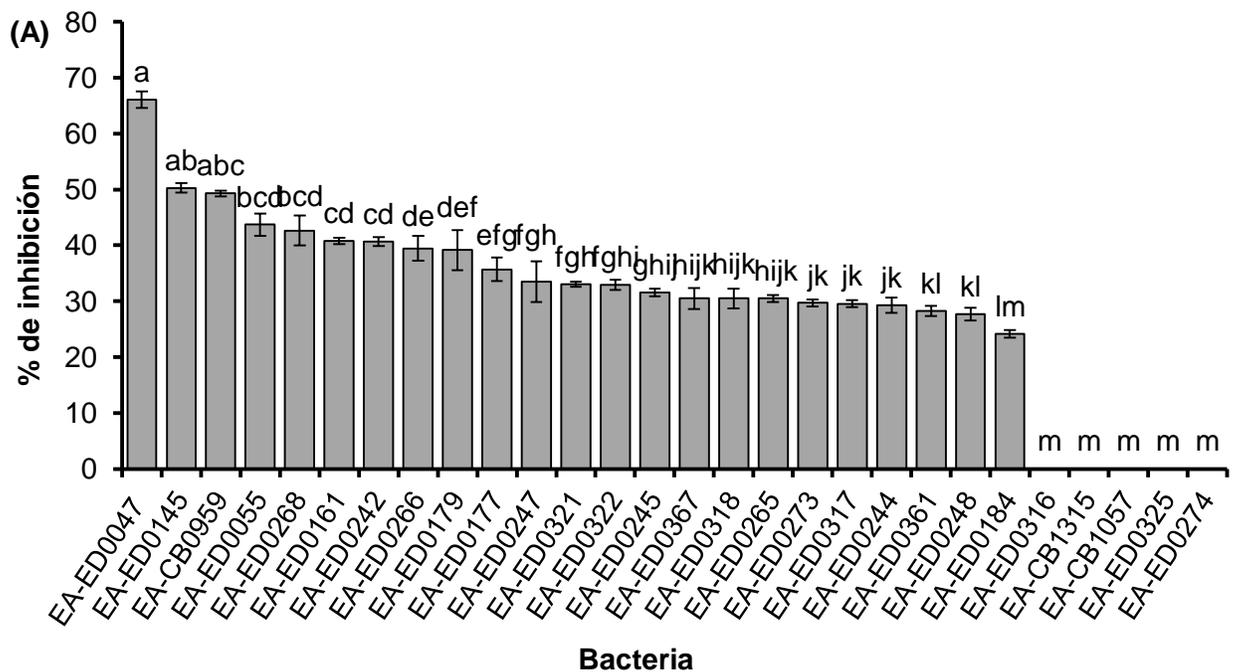
Sin embargo, ambas especies se encuentran altamente relacionadas (Fritze, 2004) y hoy en día se continúa discutiendo su taxonomía, donde autores como Fan et al. (2017) propusieron considerar a *B. amyloliquefaciens* como una unidad taxonómica por encima del nivel de especie, designándolo como “Grupo Operativo *B. amyloliquefaciens*” que consiste en cepas de *B. amyloliquefaciens* provenientes de suelo y cepas de *B. siamensis* y *B. velezensis* asociadas a plantas, cuyos miembros están estrechamente relacionados y permiten identificar cambios en el nivel genómico debido al desarrollo del estilo de vida asociado a la planta; por lo cual, se deben incluir más genes para tener mayor precisión en la identificación de especies de este grupo.

1.3.3 Prueba de inhibición cuantitativa individual

A partir de las pruebas cualitativas, se seleccionaron 28 cepas las para pruebas de inhibición cuantitativa. De la colección RNC 191 se utilizaron las cepas *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) la cual presentó halos de inhibición sobre Foc R1; y las cepas *P. pasadenensis* (EA-CB1315) y *B. megaterium* (EA-CB1057) las cuales no mostraron halos de inhibición; mientras que en el caso de la colección RNC 226 se seleccionaron las 24 cepas que presentaron halos de inhibición y la cepa (EA-ED0316) que no presentó inhibición (Tabla 1-1). Se observó que 23 de estas cepas evaluadas inhibieron el crecimiento de Foc R1 (Figura 1-3A). El aislamiento que presentó mayor porcentaje de inhibición ($66,03\% \pm 1,46\%$) fue *Burkholderia* sp. (EA-ED0047) (Figura 1-3A y 1-3B). Otros microorganismos con alto porcentaje de inhibición (entre 40% y 50%) fueron *Corynebacterium propinquum* (EA-ED0145), *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959), *Pseudomonas koreensis* (EA-ED0055), Ni (EA-ED0268), *B. subtilis* (EA-ED0161) y *Stenotrophomonas rhizophila* (EA-ED0242), los cuales fueron seleccionados para pruebas

de actividad por combinación de cepas, junto con 3 cepas que no mostraron actividad antagonista contra Foc R1, *P. pasadenensis* (EA-CB1315), *B. megaterium* (EA-CB1057) y *S. maltophilia* (EA-ED0316). Solamente las bacterias *B. subtilis* (EA-ED0325) y (EA-ED0274) no presentaron inhibición bajo la prueba del anillo en comparación con la prueba cualitativa (Figura 1-3A).

Figura 1-3. Prueba de inhibición cuantitativa individual.



(B)

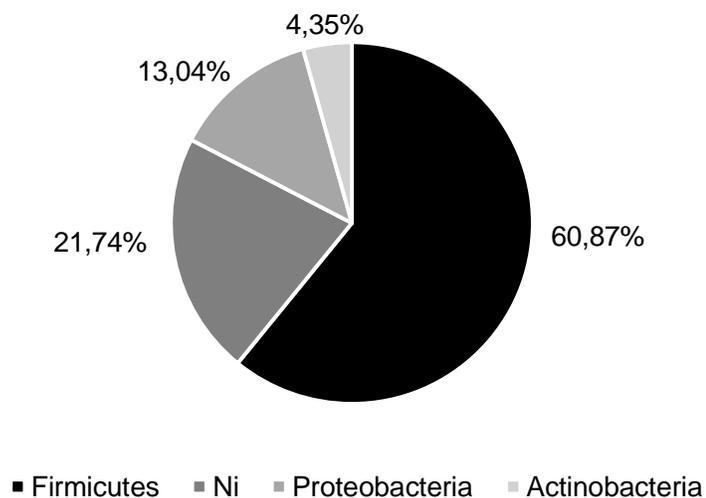


(A) Porcentaje de inhibición *in vitro* de diferentes bacterias sobre el crecimiento de Foc R1. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$; prueba de Wilcoxon). Las barras en las columnas representan la desviación estándar de los datos ($n = 4$). **(B)** Prueba del anillo bacteriano.

El 60,87% de los microorganismos que mostraron actividad antagónica contra Foc R1 pertenecen al Filo Firmicutes (Figura 1-4), donde todas las cepas pertenecen al género *Bacillus*. Los demás microorganismos antagonistas pertenecen a los filos Proteobacteria y Actinobacteria (13,04% y 4,35%), además de microorganismos no identificados (21,74%) (Figura 1-4).

La mayoría de grupos bacterianos que mostraron actividad antagónica sobre Foc R1 en el presente estudio han sido analizados en investigaciones previas contra este patógeno. El género *Bacillus* es ampliamente conocido como agente de control biológico y promotor de crecimiento en plantas, debido a que son microorganismos con capacidad de formar endosporas con tolerancia a cambios de pH, temperatura y condiciones de estrés osmótico (Nicholson *et al.*, 2000), formar biopelículas en el rizoplasma (Xu *et al.*, 2012), solubilizar nutrientes, producir fitohormonas, sintetizar compuestos antimicrobianos e inducir resistencia en plantas (Kan, Maymon & Hirsch, 2017). Adicionalmente, este grupo de microorganismos no presenta actividad patogénica en plantas (Kan, Maymon & Hirsch, 2017). En el presente estudio, las cepas *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) y *B. subtilis* (EA-ED161) presentaron porcentajes de inhibición de $49,27 \pm 0,52\%$ y $40,77 \pm 0,58$, respectivamente. En un estudio previo, se determinó que la bacteria (EA-CB0959) tiene la capacidad e inhibir a *F. oxysporum* (EAP004) y *Ralstonia solanacearum* (EAP009), en pruebas duales en medio sólido (Villegas-Escobar, 2012).

Figura 1-4. Filos bacterianos con actividad inhibitoria sobre Foc R1.



Diferentes publicaciones indican el potencial de biocontrol *in vitro* de diferentes cepas de *Bacillus* spp. sobre Foc. Por ejemplo, Lian, Wang y Zhou. (2008) hallaron que las bacterias endófitas *B. subtilis* (M13) y *B. amyloliquefaciens* (M16) redujeron el crecimiento de Foc R4T en 56,25% y 58,34%, respectivamente. Por su parte, Akila et al. (2011) determinaron que la bacteria *B. subtilis* (TRC 54) aislada de la rizósfera de banano, redujo el diámetro del crecimiento de Foc R1 en 36,6%. Wang et al. (2013) describieron que la bacteria *B. amyloliquefaciens* (W19) aislada de la rizósfera de plantas de banano sanas, inhibió el crecimiento *in vitro* de Foc R4T. A diferencia de estas publicaciones, en las cuales *Bacillus* spp. fue aislado del interior del tejido vegetal o de la rizósfera, las bacterias *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) y *B. subtilis* (EA-ED161) utilizadas en el presente estudio, fueron aisladas del filoplano de *Musa* spp. Sin embargo, otros autores también han encontrado en este tejido microorganismos antagonistas de Foc. Por ejemplo, Souza et al. (2014) reportaron las bacterias *B. amyloliquefaciens* (PS6), *B. thuringiensis* (M05), *B. subtilis* (M28) y *B. amyloliquefaciens* (M10) con porcentajes de inhibición del crecimiento de Foc R1 de 30%, 28, 24% y 19%, respectivamente.

Diferentes autores han descrito la capacidad antagonista de *Pseudomonas* spp., sobre Foc. Por ejemplo, la bacteria endófito *P. aureofaciens* (M1) redujo el crecimiento de Foc R4T en 60,32% (Lian, Wang & Zhou, 2008). Por su parte, Ayyadurai et al. (2006) aislaron la bacteria *P. aeruginosa* (FP10) de la rizósfera de banano Nendran (*Musa* spp. Grupo AAA), y esta mostró actividad antagónica significativa frente a Foc R1 en pruebas *in vitro*. Además, estos autores determinaron que la bacteria produce el compuesto 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), el cual generó hinchazón y lisis del micelio; efecto similar al observado en el presente estudio con la bacteria *P. koreensis* (EA-ED0055) (Anexo III). Del mismo modo, Sekhar y Thomas. (2015) describieron que *P. aeruginosa* (GNS.13.2a) aislada de meristemo apical de banano Gran Enano (*Musa* spp. Grupo AAA), inhibió el crecimiento *in vitro* de Foc R1. También, Akila et al. (2011) hallaron que la bacteria *P. fluorescens* (Pf1) redujo en 44,4% el crecimiento *in vitro* de Foc R1, generando una zona de inhibición en pruebas duales. A pesar de que diferentes especies de *Corynebacterium* spp., y *Stenotrophomonas* spp., han sido encontradas en tejidos de banano, no se tienen reportes de inhibición frente a Foc (Sekhar & Thomas, 2015; Thomas & Sekhar, 2016), por lo que la actividad antifúngica presentada en el presente estudio por parte de las bacterias

C. propinquum (EA-ED0145) y *S. rhizophila* (EA-ED0242) son el primer reporte contra Foc R1 por parte de estos géneros bacterianos. Para el caso de *Corynebacterium* spp., se han desarrollado estudios de biocontrol de nematodos en el cultivo de banano (Fernández *et al.*, 2005), y para el caso de *S. rhizophila* se ha descrito su efecto como promotor de crecimiento vegetal y de protección frente a agentes de estrés en diferentes cultivos (Alavi *et al.*, 2013). Sin embargo, ambos géneros bacterianos son ampliamente conocidos como patógenos oportunistas en humanos (Bernard, 2012; Chung *et al.*, 2017) por lo cual no se recomienda su uso para el desarrollo de bioproductos.

Varios estudios demuestran el potencial de *Burkholderia* spp. como agente de control biológico, pero su uso es discutido, debido al gran número de especies que componen este género conocidas como patógenos en diferentes tipos de plantas y animales, incluidos los humanos (Parke & Gurian-Sherman, 2001; Depoorter *et al.*, 2016), por lo que se recomienda evitar su uso como agentes de biocontrol. Casos exitosos, como lo reportado en *B. cenocepacia* (869T2), bacteria endófito aislada de raíz de *Chrysopogon zizanioides*, la cual presentó un 44,4% de inhibición del crecimiento radial de Foc R4T en pruebas *in vitro* (Ho *et al.*, 2015) resaltan el potencial de este género. En el presente estudio, la bacteria *Burkholderia* sp. (EA-ED0047) generó el mayor porcentaje de inhibición sobre Foc R1, además, en observaciones microscópicas, se determinó que puede causar hinchazón intercalar y terminal, pérdida de contenido citoplasmático y deformación de hifas (Anexo III), lo cual coincide con los efectos descritos por Pan *et al.* (1997) en ensayos de inhibición *in vitro* de Foc R4T por *B. cepacia*. Efectos similares de daño a hifas de Foc R1 fueron hallados en las pruebas de inhibición con *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959), *P. koreensis* (EA-ED0055), *B. subtilis* (EA-ED0161) y *C. propinquum* (EA-ED0145) (Anexo III). Estos resultados en conjunto sugieren que las bacterias con potencial de biocontrol sobre Foc R1 halladas en el presente estudio, están produciendo compuestos antimicrobianos, como metabolitos secundarios, compuestos volátiles o enzimas líticas, que se difunden en el medio, y afectan el micelio de Foc R1.

1.3.4 Prueba de inhibición cuantitativa con combinación de cepas

A partir de las 10 bacterias evaluadas en las pruebas de inhibición cuantitativa, se realizaron 45 combinaciones (2 bacterias por tratamiento). Solamente 11 combinaciones

(24,4%) generaron un mayor porcentaje de inhibición con respecto al control (cepa individual con mayor efecto) (Tabla 1-2; Anexo II). Sin embargo, solamente en cinco casos, dicho efecto fue significativamente mayor al control, donde en cuatro de ellos, las bacterias *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) y *B. subtilis* (EA-ED161) se vieron potenciadas por las cepas *P. pasadenensis* (EA-CB1315) y *B. megaterium* (EA-CB1057) (Tabla 1-2). El caso restante que resultó significativo fue la combinación entre las bacterias *ni* (EA-ED0268) y *S. maltophilia* (EA-ED0316), donde la primera cepa en pruebas individuales presentó alta inhibición, pero perdió su efecto en las pruebas en combinación; mientras la segunda no presentó actividad antagónica de forma individual, sin embargo, su combinación generó un porcentaje de inhibición del 31,9% (Tabla 1-2). Esto sugiere que el efecto observado en las combinaciones se le puede atribuir solo a la cepa bacteriana de había mostrado actividad antagónica.

Tabla 1-2. Porcentaje de inhibición de bacterias individuales (controles) y sus respectivas combinaciones (de 2 bacterias).

Combinación	% de inhibición	Efecto	Control	% de inhibición
(EA-ED0047) + (EA-CB1315)	66,7 ± 1,3	ns	EA-ED0047	66,0 ± 1,4
(EA-CB0959) + (EA-ED0055)	49,4 ± 1,1	ns	EA-ED0145	50,3 ± 0
(EA-CB0959) + (EA-CB1315)	51,1 ± 0,5	*	EA-CB0959	48,5 ± 0,4
(EA-CB0959) + (EA-CB1057)	50,5 ± 0,3	*	EA-ED0161	46,5 ± 0,5
(EA-ED0161) + (EA-CB1315)	50,5 ± 0,4	*	EA-ED0055	45,7 ± 0,2
(EA-ED0161) + (EA-ED0055)	49,1 ± 1,5	ns	EA-ED0242	34,5 ± 0,7
(EA-ED0161) + (EA-CB1057)	50,8 ± 0,9	*	EA-ED0268	0,0 ± 0,0
(EA-ED0055) + (EA-CB1057)	48,3 ± 1,3	ns	EA-CB1315	0,0 ± 0,0
(EA-ED0055) + (EA-ED0316)	45,9 ± 0,5	ns	EA-CB1057	0,0 ± 0,0
(EA-ED0242) + (EA-ED0268)	37,1 ± 2,0	ns	EA-ED0316	0,0 ± 0,0
(EA-ED0268) + (EA-ED0316)	31,9 ± 1,1	*		

(*) (ns) Porcentaje de inhibición significativamente superior o no, respectivamente, comparados con el control (cepa individual con mayor efecto) de acuerdo con la prueba de Dunnett ($\alpha=0.05$). Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar (n=4).

Los microorganismos producen una amplia gama de compuestos como enzimas, metabolitos y moléculas de señalización que pueden promover el crecimiento y estimular diferentes funciones en otros microorganismos circundantes en ciertas matrices (Little *et al.*, 2008; Strassmann, Gilbert, & Queller, 2011). Bajo esta premisa, en la presente investigación se realizaron combinaciones de 2 bacterias en búsqueda de incrementos y/o cooperación entre las cepas para inhibir el crecimiento de Foc R1. Sin embargo, muy pocas combinaciones, generaron una inhibición significativamente mayor a la generada por las cepas de forma individual (control). Además, su efecto fue relativamente bajo, por lo que no fueron tenidas en cuenta para futuros ensayos. En la literatura no es muy frecuente encontrar investigaciones que realicen este tipo de combinaciones *in vitro*, al contrario de un alto número de investigaciones publicadas para el caso de pruebas de combinaciones de agentes de control biológico *in vivo* (Kavino & Manoranjitham, 2018; Akila *et al.*, 2011).

Un caso exitoso de combinaciones bacterianas *in vitro* fue descrito por Sundaramoorthy *et al.* (2012) quienes hallaron que la combinación entre las cepas *P. fluorescens* (Pf1), *B. subtilis* (EPCO16) y *B. subtilis* (EPC5), redujeron el crecimiento de *Fusarium solani* en un 45,55%, siendo estadísticamente más alta con respecto a la reducción conseguida por las combinaciones entre 2 cepas, o de forma individual. De otro modo, Berendsen *et al.* (2018) determinaron que la combinación de las rizobacterias *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* y *Microbacterium* spp., mostraron un efecto sinérgico en la formación de biopelículas *in vitro*, en comparación con cada cepa individual, lo que permitió una mejor colonización en hojas de *Arabidopsis thaliana* en pruebas *in vivo* y una reducción de la colonización del patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis*. A pesar de que en el presente estudio no se evaluó la capacidad de formación de biopelículas, estudios futuros sobre esta característica podría ayudar a dilucidar la colonización de las bacterias antagonistas a Foc R1 en raíces de banano en pruebas *in vivo*.

1.4 Conclusiones

- Las bacterias *Burkholderia* sp. (EA-ED0047), *Corynebacterium propinquum* (EA-ED0145), *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959), *Pseudomonas koreensis* (EA-ED0055), Ni (EA-ED0268), *B. subtilis* (EA-ED0161) y *Stenotrophomonas rhizophila* (EA-ED0242) mostraron el mayor potencial antagonista sobre Foc R1 al reducir su crecimiento entre 40 y 66% en condiciones *in vitro*.
- Las bacterias antagonistas *Burkholderia* sp. (EA-ED0047), *Corynebacterium propinquum* (EA-ED0145), *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959), *Pseudomonas koreensis* (EA-ED0055) y *B. subtilis* (EA-ED0161) causan daños (hinchazón y pérdida de contenido citoplasmático) en hifas de Foc R1, por lo cual se seleccionaron para pruebas de antagonismo contra Foc por combinación de cepas.
- El efecto antagónico de las bacterias *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) y *B. subtilis* (EA-ED0161) contra Foc R1 fue potenciado cuando se combinaron con las cepas *P. pasadenensis* (EA-CB1315) y *B. megaterium* (EA-CB1057). Además de la combinación entre las bacterias Ni (EA-ED0268) y *S. maltophilia* (EA-ED0316) también mostró un efecto sinérgico contra el crecimiento de Foc R1, a pesar de que ninguna mostró efecto antagónico de forma individual.

Bibliografía

- AGRONET (2016). Estadísticas. Área, producción, y rendimiento nacional por cultivo. [en línea]. Recuperado de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>.
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. *Biological control*, 57(3), 175-183.
- Alavi, P., Starcher, M. R., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2013). Root microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405(T.). *Frontiers in plant science*, 4, 141.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision* (Vol. 12, No. 3). FAO, Rome: ESA Working paper.
- Almeida, N. O., Teixeira, R. A., Carneiro, F. A., de Oliveira, C. M., Ribeiro, V. A., Lobo Júnior, M., & Rocha, M. R. D. (2018). Occurrence and correlations of nematodes, *Fusarium oxysporum* and edaphic factors on banana plantations. *Journal of Phytopathology*, 166(4), 265-272.
- Arango, R. E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., ... & Kema, G. (2016). Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PLoS genetics*, 12(8), e1005876.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., & Pilkauskas, P. (2004). *La economía mundial del banano 1985-2002*. Roma: FAO.

- Asociación de Bananeros de Colombia, AUGURA. (2014). Coyuntura Bananera Colombiana 2013. Recuperado de <http://www.augura.com.co/servicios-gremiales/informacion-economica/>.
- Asociación de Bananeros de Colombia, AUGURA. (2019). Coyuntura Bananera Colombiana 2018. Recuperado de <http://www.augura.com.co/servicios-gremiales/informacion-economica/>.
- Ayyadurai, N., Ravindra-Naik, P., Sreehari-Rao, M., Sunish-Kumar, R., Samrat, S. K., Manohar, M., & Sakthivel, N. (2006). Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 926-937.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Bancroft, J. (1876). Report of the board appointed to enquire into the cause of disease affecting livestock and plants. In *Votes and proceedings*, 3, 1011-1038.
- Belgrove, A., Steinberg, C., & Viljoen, A. (2011). Evaluation of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and *Pseudomonas fluorescens* for panama disease control. *Plant disease*, 95(8), 951-959.
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., Jonge, R., Burgman, W.P., ... & Pieterse, C.M. (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME journal*, 12(6), 1496.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 5, 148.
- Bernard, K. (2012). The genus *Corynebacterium* and other medically-relevant coryneform like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3152-3158.

- Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Fernández-Falcón, M. (2004). Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. *Crop Protection*, 23(12), 1245-1247.
- Buddenhagen, I. W. (2009). Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* and history of introduction of “Tropical Race 4” to better manage banana production. *Acta Horticulturae*, 828, 193-204.
- Bulgari, D., Casati, P., Crepaldi, P., Daffonchio, D., Quaglino, F., Brusetti, L., & Bianco, P. A. (2011). Endophytic bacterial community is restructured in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-00051.
- Caballero, A. J. (2011). *Uso de hongos endofíticos de Trichoderma spp., para el biocontrol del mal de Panamá (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) raza 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA)*. (Tesis de Maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba. Costa Rica. Recuperado de <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr:8080/handle/11554/4239>.
- Cao, L., Qiu, Z., Dai, X., Tan, H., Lin, Y., & Zhou, S. (2004). Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 501-504.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., & Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters*, 247(2), 147–152.
- Cazalis, V., Loreau, M., & Henderson, K. (2018). Do we have to choose between feeding the human population and conserving nature? Modelling the global dependence of people on ecosystem services. *Science of the Total Environment*, 634, 1463-1474.

- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J. J., Argel, L. E., Uribe-Vélez, D., ... & Villegas, V. (2012). Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial ecology*, 64(3), 641-653.
- Chittarath, K., Mostert, D., Crew, K. S., Viljoen, A., Kong, G., Molina, A. B., & Thomas, J. E. (2018). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 (VCG 01213/16) associated with Cavendish bananas in Laos. *Plant Disease*, 102(2), 449.
- Chung, H., Lieberman, T. D., Vargas, S. O., Flett, K. B., McAdam, A. J., Priebe, G. P., & Kishony, R. (2017). Global and local selection acting on the pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* in the human lung. *Nature communications*, 8, 14078.
- De Ascensao A. R., & Dubery I. A. (2000). Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race four. *Phytopathology*, 90(10), 1173–1180.
- De la Torre-Gutiérrez, L., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. (2008). Functional properties of square banana (*Musa balbisiana*) starch. *Food Chem*, 106(3), 1138-1144.
- Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., & Mahenthiralingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5215-5229.
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1995). Basic plant pathology methods CRC Press. Boca raton, FL.
- Dita, M. A., Echegoyén, P. E., & Pérez-Vicente, L. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* en un país de la

región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria – OIRSA. 155pp. San Salvador, El Salvador.

Dita, M. A., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S., & Staver, C. P. (2018). *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in plant science*, 9.

Dinesh, B. M., Ravichandra, N. G., Somasekhara, Y. M., Reddy, B. M. R., & Kumar, K. H. (2014). Interaction between *Radopholus similis* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* causing Wilt Complex on Banana. *Editorial Committee*, 48(4), 506-513.

Dusunceli, F. (Octubre, 2014). Global Programme on *Fusarium* Wilt Disease of Banana. “We have no bananas today?”. Ponencia presentada en FAO Emergency and Rehabilitation – Informal Donor Meeting. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs_Resources_2015/Fazil.Banana.CCP.Panel.4.pdf.

Eljounaidi, K., Lee, S. K., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68.

Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in microbiology*, 8, 22.

FAO. (2013). FAOSTAT 2013. Food and agriculture organization of the United Nations: Banana and plantain processing technologies. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

FAO. (2017). FAOSTAT 2016. Food and agriculture organization of the United Nations: Banana and plantain processing technologies. Recuperado de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.

- FAO. (2018). Food and agriculture organization of the United Nations: Banana statistical compendium 2017. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/web_Banana_statistical_review_2017.pdf.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fernández, E., Mena, J., González, J., & Elena, M. (2005). Biological control of nematodes in banana. In *Banana Root System: towards a better understanding for its productive management: Proceedings of an international symposium*. (p. 193).
- Frison, E. A., Escalant, J. V., Sharrock, S., Jain, S. M., & Swennen, R. (2004). The global *Musa* genomic consortium: A boost for banana improvement. *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, 341-349.
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11), 1245-1248.
- Fu, L., Ruan, Y., Tao, C., Li, R., & Shen, Q. (2016). Continuous application of bioorganic fertilizer induced resilient culturable bacteria community associated with banana *Fusarium* wilt suppression. *Scientific Reports*, 6, 27731.
- Guo, G., Wang, B., Ma, W., Li, X., Yang, X., Zhu, C., Ming, J & Zeng, H. (2013). Biocontrol of *Fusarium* wilt of banana: Key influence factors and strategies. *African Journal of Microbiology Research*, 7(41), 4835-4843.
- Guo, L., Han, L., Yang, L., Zeng, H., Fan, D., Zhu, Y., ... & Zhou, D. (2014). Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* causing banana vascular wilt disease. *PLoS One*, 9(4), e95543.

- Haddad, F., Rocha, L. S., Soares, A. C. F., Martins, I. P. S., Teixeira, L. A. J., Staver, C., & Dita, M. (2016, October). Management of *Fusarium* wilt of bananas in Minas Gerais, Brazil. In *X International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Agroecological Approaches to Promote Innovative Banana 1196* (pp. 137-146).
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- Herbert, J. A., & Marx, D. (1990). Short-term control of Panama disease of bananas in South Africa. *Phytophylactica*, 22(3), 339-340.
- Heslop-Harrison, J. S., & Schwarzacher, T. (2007). Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of botany*, 100(5), 1073-1084.
- Ho, Y. N., Chiang, H. M., Chao, C. P., Su, C. C., Hsu, H. F., Guo, C. T., ... & Huang, C. C. (2015). In planta biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant and soil*, 387(1-2), 295-306.
- Hung, T. N., Hung, N. Q., Mostert, D., Viljoen, A., Chao, C. P., & Molina, A. B. (2018). First Report of *Fusarium* Wilt on Cavendish Bananas, Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (VCG 01213/16), in Vietnam. *Plant Disease*, 102(2), 448-448.
- Kan, N., Maymon, M., & Hirsch, A. M. (2017). Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. *Microorganisms*, 75 (5), 1-13.
- Kavino, M., & Manoranjitham, S. K. (2018). *In vitro* bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: Novel ways to combat *Fusarium* wilt. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 371-387.

- Kiyohara, H., Nagao, K., & Yana, K. (1982). Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2), 454-457.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lian, J. Wang, Z., & Zhou, S. (2008). Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilts pathogen infection. *The Journal of general and applied microbiology*, 54(2), 83-92.
- Lian, J., Wang, Z., Cao, L., Tan, H., Inderbitzin, P., Jiang, Z., & Zhou, S. (2009). Artificial inoculation of banana tissue culture plantlets with indigenous endophytes originally derived from native banana plants. *Biological control*, 51(3), 427-434.
- Little, A. E. F., Robinson, C. J., Peterson, S. B., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2008). Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu. Rev. Microbiol*, 62, 375–401.
- Ma, L. J., Van Der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., ... & Houterman, P. M. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367.
- Maymon, M., Shpatz, U., Harel, Y. M., Levy, E., Elkind, G., Teverovsky, E., ... & Levi, Y. (2018). First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 Causing *Fusarium* Wilt of Cavendish Bananas in Israel. *Plant Disease*, 102(12), 2655.
- Meldrum, R. A., Daly, A. M., Tran-Nguyen, L. T. T., & Aitken, E. A. B. (2013). The effect of surface sterilants on spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4. *Crop protection*, 54, 194-198.

- Molina, A. B., Williams, R. C., Hermanto, C., Suwanda, Komolong, B., & Kokoa, P. (2010). Final Report: Mitigating the Threat of Banana *Fusarium* Wilt: Understanding the Agroecological Distribution of Pathogenic Forms and Developing Disease Management Strategies. ABN 34 864 955 427. ACIAR Publ., Canberra, Australia.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3), 548–572.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection*, 26(4), 697-705.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., & Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044-2049.
- O'Neill, W. T., Henderson, J., Pattermore, J. A., O'Dwyer, C., Perry, S., Beasley, D. R., ... & Hobbs, R. L. (2016). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 strain in northern Queensland. *Australasian Plant Disease Notes*, 11(1), 33.
- Ordoñez, N., García-Bastidas, F., Laghari, H. B., Akkary, M. Y., Harfouche, E. N., Al Awar, B. N., & Kema, G. H. J. (2016). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 causing Panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon. *Plant Disease*, 100(1), 209.
- Ordoñez, N., Seidl, M. F., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B. P., ... & Kema, G. H. (2015). Worse comes to worst: bananas and Panama disease—when plant and pathogen clones meet. *PLoS pathogens*, 11(11), e1005197.
- Pan, M. J., Rademan, S., Kunert, K., & Hastings, J. W. (1997). Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 by

- the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. *Journal of phytopathology*, 145(11-12), 479-486.
- Parke, J. L., & Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risks assessment of biological control strains. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 225-258.
- Pérez-Vicente, L., Dita, M., & Martínez, E. (2014). Technical Manual: Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 (R4T). FAO.
- Ploetz, R. C. (1994). Panama disease: return of the first banana menace. *International journal of pest's management*, 40(4), 326-336.
- Ploetz, R. (2006). *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653–656.
- Ploetz, R. (2015). Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73, 7-15.
- Ploetz, R. C., Kema, G. H., & Ma, L. J. (2015). Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annual review of phytopathology*, 53, 269-288.
- Proexport, 2012. Sector agroindustrial Colombiano. Recuperado de <https://www.inviertaencolombia.com.co/Adjuntos/Perfil%20Sector%20Agroindustrial%20Colombiano%20-%202012.pdf>.
- Qi, Y. X., Zhang, X., Pu, J. J., Zhang, H. Q., & Huang, S. L. (2008). Race 4 identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* from Cavendish cultivars in Hainan province, China. *Australasian Plant Disease Notes*, 3, 48–47.

- Ramírez C. M. (2012). *Bacterias rizosféricas formadoras de endospora en Musa spp. bajo diferentes manejos agronómicos y su potencial para promover crecimiento vegetal*. (Tesis de Maestría). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Raza, W., Ling, N., Zhang, R., Huang, Q., Xu, Y., & Shen, Q. (2016). Success evaluation of the biological control of *Fusarium* wilts of cucumber, banana, and tomato since 2000 and future research strategies. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 202-212.
- Rocha, L. D. S., De Santana, R. F., Soares, A. C. F., & Haddad, F. (2018). REACTION OF BANANA CULTIVARS TO THE *Meloidogyne javanica* X *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* COMPLEX. *Revista Caatinga*, 31(3), 572-583.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. N., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security.
- Sekhar, A. C., & Thomas, P. (2015). Isolation and identification of shoot-tip associated endophytic bacteria from banana cv. Grand Naine and testing for antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *American Journal of Plant Sciences*, 6(07), 943.
- Shen, Z., Zhong, S., Wang, Y., Wang, B., Mei, X., Li, R., ... & Shen, Q. (2013). Induced soil microbial suppression of banana *Fusarium* wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality. *European Journal of Soil Biology*, 57, 1-8.
- Silva, G. F., Souza, S. A., Cruz, J. C., Sousa, N. R., & Procópio, A. R. L. (2014). Endophytic bacteria from banana cultivars and their antifungal activity. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 8661-8670.

- Soto, M. (2011). Situación y avances tecnológicos en la producción bananera mundial. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 13-28.
- Souza, A., Cruz, J. C., Sousa, N. R., Procópio, A. R. L., & Silva, G. F. (2014). Endophytic bacteria from banana cultivars and their antifungal activity. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 8661-8670.
- Strassmann, J. E., Gilbert, O. M., & Queller, D. C. (2011). Kin discrimination and cooperation in microbes. *Annu. Rev. Microbiol*, 65, 349–367.
- Sun, D., Lu, X., Hu, Y., Li, W., Hong, K., Mo, Y., ... & Xie, J. (2013). Methyl jasmonate induced defense responses increase resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in banana. *Scientia horticultrae*, 164, 484-491.
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., & Samiyappan, R. (2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological control*, 60(1), 59-67.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular biology and evolution*, 9(4), 678-687.
- Thangavelu, R., & Jayanthi, A. (2009). RFLP analysis of rDNA-ITS regions of native non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates and their field evaluation for the suppression of *Fusarium* wilt disease of banana. *Australasian Plant Pathology*, 38(1), 13-21.
- Thomas, P., & Sekhar, A. C. (2016). Cultivation Versus Molecular Analysis of Banana (*Musa* sp.) Shoot-Tip Tissue Reveals Enormous Diversity of Normally Uncultivable Endophytic Bacteria. *Microbialecolgy*, 73(4), 885-899.

- Viera, A., & Pérez-Vicente, L. (2009). Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* en bananos y plátanos de Cuba. *Fitosanidad*, 13(3), 169-186.
- Villegas-Escobar, V. (2012). *Identificación y caracterización de extractos bacterianos biológicamente activos contra patógenos de Musa sp.* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, R., ... & Shen, Q. (2013). Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 435-446.
- Wang, B., Shen, Z., Zhang, F., Raza, W., Yuan, J., Huang, R., ... & Shen, Q. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* strain W19 can promote growth and yield and suppress *Fusarium* wilt in banana under greenhouse and field conditions. *Pedosphere*, 26(5), 733-744.
- Widono, S. (2012). Endophytic *Bacillus*: The Potentiality of Antagonism to Wilt Pathogen and Promoting Growth to Micro-Plantlet of Banana *in vitro*. *BIOMIRROR*, 3(6), 1-4.
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., & Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(3), 808-815.

CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD DE SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS Y COMPUESTOS VOLÁTILES DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS SOBRE Foc R1

Resumen

Las bacterias son fuente de innumerables compuestos de importancia en el control de fitopatógenos en diversos patosistemas. Los mecanismos de acción ligados al biocontrol de los agentes de control biológico son la antibiosis (metabolitos secundarios, enzimas líticas, compuestos orgánicos volátiles), parasitismo, inducción resistencia local o sistémica, promoción del crecimiento vegetal, o cambios favorables en la microbiota del suelo. Por tal motivo, en el presente estudio se pretende evaluar la actividad antimicrobiana de sobrenadantes libres de células (SLC) y compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de bacterias con potencial de inhibición sobre Foc R1, bajo condiciones *in vitro*. Se determinó que la producción de compuestos antifúngicos presentes en SLC es dependiente del tipo de medio líquido en que se realice la fermentación, siendo los sobrenadantes de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) y *Burkholderia* sp. (EA-ED0047) los que generaron mayor inhibición del crecimiento de Foc R1 (100 y 56%) cuando estas crecieron en los medios MOLP y LB, respectivamente. Se observó que aumentar la concentración de los compuestos antimicrobianos presentes en SLC, aumentó el efecto antifúngico de *B. subtilis* (EA-ED0161) y *Burkholderia* sp. (EA-ED0047) pasando de 18 y 56% a 63 y 66% de inhibición respectivamente. De forma contraria, la fermentación bacteriana por 12, 24 y 48 h no generaron SLC activos. Por su parte, los compuestos volátiles producidos por *Bacillus megaterium* (EA-CB1057) y *Burkholderia* sp. (EA-ED0047) inhibieron el crecimiento radial de Foc hasta en 30% en cultivo sólido, actividad que se redujo con el tiempo de incubación. Finalmente, se determinó que el SLC de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) es estable a cambios de pH, temperatura y enzimas como proteinasa K, lo que indica que los

compuestos antifúngicos no son de origen proteico, y podrían tener actividad en pruebas *in vivo*.

Palabras clave: Metabolitos, compuestos volátiles, lipopéptidos, estabilidad de compuestos.

2.1 Introducción

El constante crecimiento poblacional a nivel mundial ha hecho que la agricultura tenga el reto de producir una mayor cantidad de alimentos en una menor área (Tilman *et al.*, 2011; Alexandratos & Bruinsma, 2012; Cazalis, Loreau & Henderson, 2018). Para alcanzar los rendimientos requeridos, el mejoramiento genético vegetal ha permitido el desarrollo de plantas con resistencia a patógenos, tolerancia al estrés abiótico y altas cualidades nutricionales (Ceccarelli, 2015). Sin embargo, el componente microbiológico y las interacciones planta-microorganismo han tenido una modesta participación en la selección de plantas mejoradas (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015; Wei & Jousset, 2017). De tal forma que se desconoce en términos de microbiomas, lo que la selección vegetal implica, sumado a prácticas agronómicas como el desarrollo de monocultivos y la aplicación de fertilizantes y pesticidas de síntesis química, en última instancia, causan impactos significativos en el ecosistema (Milla *et al.*, 2015) y han estimulado la presencia de patógenos con alta virulencia (Brown *et al.*, 2015), generando pérdidas y bajos rendimientos en diversos cultivos.

Los cultivos de banano y plátano no son ajenos a las situaciones anteriormente mencionadas. Se catalogan como el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo después del arroz, el trigo y el maíz (FAO, 2013; Frison *et al.*, 2004) y alcanzaron una producción de 113 y 35 millones de toneladas, respectivamente, para el año 2016 (FAO, 2017). En estos cultivos se aplican altas cantidades de fungicidas, nematicidas, insecticidas y herbicidas (Comte *et al.*, 2016); sin embargo, los problemas fitopatológicos asociados con la pérdida de sensibilidad a fungicidas por *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra (Arango *et al.*, 2016) y la falta de medidas de control de la marchitez por *Fusarium*, enfermedades comunes entre los dos cultivos, hacen

necesario la búsqueda y utilización de agentes de control biológico (ACB) en el cultivo de estas musáceas.

El uso de enemigos naturales de los fitopatógenos ha estimulado el desarrollo de alternativas de control biológico basadas en microorganismos antagonistas. Desde el año 2007 cuando Rosemberg y Rosemberg, lanzan la teoría del hologenoma (Rosemberg & Zilber-Rosemberg, 2012), la comprensión sobre los microorganismos endofíticos y su relevancia se ha hecho evidente en las áreas de medicina humana, medio ambiente y agricultura. Esta comunidad de microorganismos o microbioma puede desempeñar un papel importante en la mejora del crecimiento, la sanidad y la adaptabilidad de las plantas a las fluctuaciones climáticas (Agler *et al.*, 2016). Los componentes específicos del microbioma vegetal pueden diferir dependiendo de los factores climáticos, el genotipo y las especies de plantas y por ello, y ante la necesidad de producir alimentos más limpios, la agricultura moderna tiene el reto de conocer el microbioma asociado a las plantas, determinar sus funciones e implementar el uso de microorganismos y sus productos derivados (Berg & Raaijmakers, 2018). El microbioma de las plantas incluye bacterias, hongos filamentosos, levaduras, protistas y virus (Agler *et al.*, 2016; Gopal & Gupta, 2016). Dichos microorganismos tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal y brindar protección contra diversos fitopatógenos (Berg, 2009; Suman, Yadav & Verma, 2016). En términos generales, las bacterias son el grupo de microorganismos más estudiado debido a su amplia diversidad genética que se relaciona con la alta cantidad de productos bioquímicos derivados y funciones en las plantas (Villegas-Escobar, 2012; Gopal & Gupta, 2016). Estas a su vez, poseen diferentes mecanismos de acción ligados al biocontrol sobre hongos como la competencia por nutrientes, la inducción de resistencia en las plantas, y la producción de compuestos antimicrobianos (Hardoim *et al.*, 2015).

Bajo este complejo de mecanismos, las bacterias como ACB pueden colonizar tejidos como la filósfera y rizósfera (microorganismos epifitos y rizosféricos), mientras otros colonizan tejidos internos de la planta y se consideran endofitos. En ambos casos, las bacterias compiten por nutrientes (minerales y compuestos orgánicos producidos por la planta) y por un nicho, factores importantes en el establecimiento de diversos patógenos (Kamilova *et al.*, 2005; Hacquard *et al.*, 2015). Algunas bacterias como *Pseudomonas* spp.,

y *Streptomyces* spp., pueden tomar iones férricos a través de quelantes de hierro (sideróforos) que se liberan en condiciones limitantes de Fe^{3+} , reduciendo la capacidad de patógenos fúngicos como Foc de propagarse en el suelo (Cao *et al.*, 2005; Thangavelu & Mustaffa, 2012). Además, las bacterias ayudan a la fijación de otros nutrientes requeridos por la planta en formas asimilables, como el nitrógeno, fósforo y pueden producir fitohormonas, que favorecen el crecimiento y desarrollo vegetal (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2005).

De otro modo, estos microorganismos pueden activar específicamente la resistencia sistémica inducida (ISR) debido a que en fases iniciales de la interacción planta-microorganismo, se activa el sistema de defensa de las plantas de forma similar a como ocurre con un patógeno. Sin embargo, posteriormente el reconocimiento entre la planta y el microorganismo le permite al ACB escapar del sistema de defensa y puede colonizar los tejidos, brindando una mayor tolerancia a la planta contra patógenos (Zamioudis & Pieterse, 2012; Thomashow, 2016). *Pseudomonas*, *Serratia*, y *Bacillus* son los géneros bacterianos más reportados como inductores de ISR en plantas (Pieterse *et al.*, 2014). Autores como Fishal, Meon y Yun (2010) hallaron un incremento en la acumulación de enzimas relacionadas con la defensa como peroxidasa (PO), fenilalanina amonio liasa (PAL), ácido ligninotiolglicólico (LTGA), y proteínas de genes relacionados con defensas (PR) como quitinasa y β 1,3-glucanasa, en plántulas de banano tratadas con las bacterias endófitas UPMP3 (*Pseudomonas* sp.) y UPMB3 (*Burkholderia* sp.), lo que redujo la incidencia de Foc R4T bajo condiciones de invernadero. Las bacterias a su vez pueden producir algunos tipos específicos de enzimas líticas, compuestos volátiles y metabolitos secundarios, que producen un efecto en microorganismos blanco llamado generalmente como antagonismo (Lugtenberg & Kamilova, 2009). La producción de enzimas líticas como amilasa, catalasa, celulosa, quitinasa, lipasas, proteasas, etc., permite a los ACB acceder a una amplia gama de sustratos, entre los cuales se encuentran componentes estructurales de las plantas (celulosa, hemicelulosa, pectina, etc.) y hongos fitopatógenos (principalmente quitina) (Bach *et al.*, 2016). En cuanto a los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), estas se consideran como moléculas de bajo peso molecular (<300 Da) (Schulz & Dickschat, 2007; Peñuelas *et al.*, 2014) que se difunden fácilmente en los poros del suelo y tienen entre sus diversas funciones, servir de elementos de comunicación, estimulantes e inhibidores del crecimiento (dependiendo de la interacción) e inhibidores de la detección

del quorum, en su competencia con otros microorganismos (Kanchiswamy, Malnoy & Maffei, 2015), por lo que su investigación es importante para el control de fitopatógenos del suelo, además de que pueden promover el crecimiento vegetal e inducir respuestas sistémicas de defensa (ISR) (Kai *et al.*, 2009; Avalos *et al.*, 2018), sin embargo, el conocimiento sobre estos compuestos (identificación, tiempos de producción, etc.) apenas se está empezando a estudiar.

De otro lado, los metabolitos secundarios conocidos por su actividad antimicrobiana son compuestos con una alta polaridad por lo que son solubles en agua y, se caracterizan por ser toxinas o antibióticos (Tyc *et al.*, 2017). Diferentes compuestos son producidos por cada género bacteriano. Por ejemplo, *Bacillus* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios de síntesis no ribosomal, como lo son los lipopéptidos cíclicos (CLPs) de las familias surfactinas, iturinas y fengicinas, péptidos de síntesis ribosomal como las bacteriocinas y policétidos (Stein, 2005; Abriouel *et al.*, 2011). Por su parte, algunas especies de *Pseudomonas* producen antibióticos de diferentes clases, como lo son floroglucinoles, fenazinas, perolnitrina, pioluteorina y cianuro de hidrógeno (Meena, 2014). En cuanto a *Burkholderia* sp., se tienen reportes de producción de pirrolnitrina, xilocandinas, cepafunginas, altericidinas, fenazinas, entre otros (Depoorter *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2018). Los compuestos anteriormente mencionados tienen actividad antimicrobiana contra una amplia gama de fitopatógenos, incluidos hongos como *Foc*. Sin embargo, factores como el tipo de medio donde se realiza la fermentación y el tiempo, pueden afectar la producción de compuestos activos (Villegas-Escobar, 2012) y su estabilidad a cambios de pH, temperatura y actividad de enzimas determinaran su éxito para posterior uso en campo (Ongena & Jacques, 2008).

La comprensión de los mecanismos de acción ligados a la actividad biocontroladora de las bacterias y el conocimiento de los compuestos producidos por estas y su probable rol en los efectos de biocontrol sobre los fitopatógenos facilita los procedimientos de selección de cepas activas y el aprovechamiento de compuestos como nuevas herramientas de control mediante la aplicación en suelos infestados con fitopatógenos. Teniendo en cuenta que en el estudio anterior se seleccionaron las bacterias *Burkholderia* sp. (EA-ED0047), *Corynebacterium propinquum* (EA-ED0145), *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959),

Pseudomonas koreensis (EA-ED0055), Ni (EA-ED0268), *B. subtilis* (EA-ED0161) y *Stenotrophomonas rhizophila* (EA-ED0242) con actividad antifúngica contra Foc R1, en el presente capítulo se pretende evaluar la actividad antimicrobiana de sobrenadantes libres de células (SLC) y VOCs de bacterias con potencial de inhibición sobre Foc R1, bajo condiciones *in vitro*.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Microorganismos empleados

Se seleccionaron siete aislados bacterianos que, en un estudio previo, presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra Foc en pruebas cuantitativas individuales *in vitro*, *Burkholderia* sp., (EA-ED0047), *Corynebacterium propinquum* (EA-ED0145), *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959), *B. subtilis* (EA-ED0161), *P. koreensis* (EA-ED0055), *S. rhizophila* (EA-ED0242), Ni (EA-ED0268) y tres bacterias que no mostraron actividad antifúngica previamente, *P. pasadenensis* (EA-CB1315) *B. megaterium* (EA-CB1057) y *S. maltophilia* (EA-ED0316). En cuanto al patógeno, se utilizó la cepa IB de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc). El estado de conservación de las bacterias y del hongo, se realizó como se indicó en el capítulo anterior (sección 1.2.1).

2.2.2 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de cultivo)

Se evaluó el efecto de diferentes sobrenadantes libres de células (SLC), obtenidos del cultivo de las cepas bacterianas crecidas en diferentes medios líquidos, sobre el crecimiento en medio líquido de Foc R1. Todas las bacterias fueron cultivadas en los medios Caldo Tripticasa de Soya (TSB) (Merck®) y Caldo Papa Dextrosa (PDB) (Neogen®). Adicionalmente, las bacterias Gram-positivas (EA-CB0959, EA-ED0161, EA-ED0145, EA-ED0268, EA-CB1315 y EA-CB1057) fueron crecidas en medio MOLP (Medium Optimal for Lipopeptide Production) (Jacques *et al.*, 1999) y las Gram-negativas (EA-ED0047, EA-ED0055, EA-ED0242 y EA-ED0316) en medio LB (Luria Bertani). El medio MOLP contenía KH_2PO_4 (1,9 g/L), sacarosa (20 g/L), peptona especial (30 g/L), extracto de levadura (7 g/L), solución de elementos traza (1mL/L) y solución de Mn-Mg (9 mL/L). La solución de elementos traza estaba compuesta por: CuSO_4 (1 mg/L), FeCl_3

6H₂O (5 mg/L), Na₂MoO₄·2H₂O (4 mg/L) KI (2 mg/L) ZnSO₄·7H₂O (0,14 mg/L), H₃BO₄ (10 mg/L), C₆H₆O₇ (10 g/L). La solución de Mn-Mg por: MnSO₄·H₂O (0,4 g/L), MgSO₄ (50 g/L). El pH fue ajustado a 7 con una solución de NaOH 1 M (Jacques et al., 1999). El medio LB estaba compuesto por NaCl (10 g/L), triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y glucosa (8 g/L).

Brevemente, cada bacteria fue activada en medio de cultivo sólido TSA al 50% por 24 h a 30 °C. Posteriormente, se tomó una colonia de cada aislado microbiano y se adicionó a un Erlenmeyer de 100 mL el cual contenía 20 mL de cada medio líquido por evaluar, y se incubó por 12 h a 30 °C, en un agitador orbital a 150 rpm. Posteriormente, se ajustó la concentración bacteriana en 1×10^8 UFC/mL en todos los casos, con ayuda de un espectrofotómetro a una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀). Luego se tomaron 2 mL del preinoculo y se adicionó a un Erlenmeyer de 100 mL el cual contenía 20 mL de cada medio líquido por evaluar, y se incubó por 12 h a 30°C, en un agitador orbital a 150 rpm. Posteriormente, el cultivo microbiano se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min, y el sobrenadante se filtró por una membrana de 0,2 µm para eliminar remanentes de células y obtener el SLC.

Para evaluar la capacidad inhibitoria de los SLC sobre Foc R1, inicialmente se activó el hongo en medio de sólido PDA por 7 días a 25 °C. Posteriormente, se realizó un raspado con medio de cultivo líquido extracto de malta, y se ajustó la concentración de la suspensión en 1×10^3 microconidias/mL. El bioensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos de fondo plano (Falcon®) estériles. Cada pozo contenía 50 µL de medio de cultivo estéril extracto de malta (Merck®), 25 µL de suspensión de microconidias de Foc y 25 µL del SLC de cada bacteria obtenidos de los diferentes medios de cultivo evaluados. Como control negativo (C-) se utilizaron pozos que contenían 50 µL de medio estéril extracto de malta, 25 µL de suspensión de microconidias de Foc y 25 µL de cada medio de cultivo líquido evaluado al 10%. Como control positivo se incluyó la adición de 25 µL de SporeKill® (i.a. Cloruro de didecil dimetil amonio) a 1.200 ppm, dosis comercial recomendada para desinfección de superficies (Nel *et al.*, 2007; Meldrum *et al.*, 2013) a los 50 µL de medio extracto de malta con 25 µL de suspensión de microconidias de Foc y como control absoluto o blanco se adicionó 25 µL de medio de cultivo extracto de malta y 25 µL de cada

medio evaluado al 10%. Cada tratamiento constó de 6 pozos, y el ensayo se repitió una vez (microplato) para obtener un total de 12 repeticiones por tratamiento. Los microplatos se encubaron durante 72 h a 25 °C y posteriormente se midió la absorbancia a una densidad óptica de 595 nm (DO_{595}) en un lector (espectrofotómetro) de microplatos BIO-RAD, iMark™. A partir de estos datos, se determinó el porcentaje de inhibición de los tratamientos con sobrenadante y control positivo SporeKill®, en comparación con el control negativo Foc.

2.2.3 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de la concentración)

Con el fin de determinar si la concentración de los SLC evaluada en las pruebas anteriores tiene un efecto sobre su capacidad de inhibición de Foc R1, cada una de las bacterias se cultivó en el medio en el cual se obtuvo mayor inhibición del crecimiento de Foc R1 en microplatos EA-CB0959 en MOLP, EA-ED0047 en LB, EA-ED0161, EA-ED0145, EA-CB1315, EA-CB1057 en TSB y, EA-ED0055, EA-ED0268 y EA-ED0316 en PDB. Una vez obtenido el SLC, se tomaron 10 mL de este y se llevaron a liofilizar durante 48 h, en un equipo Virtis Benchtop tipo K (Virtis SP Scientific, USA). Posteriormente, se desprendió el pellet obtenido y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril, para obtener una concentración diez veces (10X) mayor a la original. Con estos SLC concentrados se continuó con la metodología de microplatos descrita anteriormente para la evaluación de actividad antifúngica sobre Foc R1, teniendo como control el SLC sin diluir.

2.2.4 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de tiempo de cultivo)

Con el fin de determinar si el tiempo de cultivo en el medio líquido seleccionado para la fermentación de cada bacteria afecta la actividad de los SLC, las cepas EA-ED0145, EA-ED0055, EA-ED0161 y EA-ED0047 se cultivaron por 12, 24 y 48 h, tiempo en el que se cosechó el sobrenadante. Posteriormente, se realizó la prueba de microplatos descrita anteriormente para la evaluación de actividad antifúngica sobre Foc R1.

2.2.5 Pruebas de inhibición de VOCs

Con el fin de determinar el efecto inhibitorio de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por diferentes cepas bacterianas sobre el crecimiento de Foc R1, cada aislado microbiano se cultivó en medio TSA al 50% por 24 h a 30°C. Luego, se realizó un raspado de la caja Petri con agua destilada estéril (ADE) para cosechar la biomasa de cada aislamiento y se ajustó la concentración bacteriana en 1×10^8 UFC/mL en todos los casos, con ayuda de un espectrofotómetro a una DO_{600} . Luego, se tomó una caja de Petri con medio de cultivo TSA al 50% y se sembraron 100 μ L de cada bacteria, rastrillando uniformemente. Un disco de 5 mm tomado del crecimiento de Foc R1 por 7 días a 25 °C en medio PDA, fue colocado en el centro de una caja de Petri diferente, también con medio PDA. Posteriormente, se tomaron los fondos de las cajas Petri de los cultivos bacterianos y de Foc R1 y se acoplaron, sellando los bordes con vinipel para evitar el escape de VOCs. Las cajas se encubieron a 25 °C por 7 días, y se realizaron lecturas de inhibición del crecimiento radial del hongo a los 4, 5, 6 y 7 días de incubación. Como control negativo se cultivó Foc sin presencia de bacteria, y se incluyó un control negativo con la bacteria *E. coli* EAFIT. Cada tratamiento contó con 4 repeticiones (caja de Petri).

2.2.6 Pruebas de estabilidad del SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959)

Con el fin de determinar la estabilidad de la actividad antifúngica del SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) ante factores como el pH, la temperatura y el efecto de proteinasa, se realizó un cultivo de la bacteria en medio MOLP, como se describió anteriormente (sección 2.2.2). Una vez obtenido el SLC, se sometió a las siguientes pruebas:

- a. **pH.** Se tomaron dos muestras de 5 mL del SLC y se registró el pH inicial. Posteriormente, una muestra se ajustó a un pH de 2 y otra a 12, utilizando HCl 5M y NaOH 5M, según fuera el caso. Luego, los tratamientos fueron incubados a 20°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se restituyó el pH original, utilizando el ácido y base anteriormente mencionados. Como control positivo se evaluó SLC sin someter a cambio de pH.

- b. Temperatura.** Se tomaron tres muestras de 2 mL del SLC y se sometieron a 50, 70 y 100 °C durante 30 minutos. Posteriormente se retomó a la temperatura ambiente. Como control positivo se evaluó SLC sin someter a cambios de temperatura.
- c. Proteinasa K.** Se tomaron 2 mL del SLC y se trataron con proteinasa K (Promega®) a una concentración de 1 mg/mL. Se incubó a 37 °C durante 4 horas y posteriormente se detuvo la reacción de la enzima sometiendo el SLC a 100°C por 2 minutos. Como control, se tuvo SLC sin adición de la enzima y sometido a las temperaturas de reacción y de inactivación de la proteinasa K (100°C) y SLC sin someter a proteinasa K.

Posteriormente, se cultivó Foc R1 en medio PDA por 7 días a 25 °C y se preparó una suspensión de conidias que se adicionó en medio PDA (aún líquido) para ajustar la concentración a 1×10^3 microconidias/mL de medio. Una vez gelificado el medio en las cajas Petri, se realizaron 4 orificios superficiales de 6 mm de diámetro, distribuidos en puntos equidistantes del centro de la caja. Luego, en cada orificio se aplicaron 80 µL de cada sobrenadante recuperado después de haberlos sometido a los tratamientos anteriormente descritos. Las cajas se incubaron por 72 h a 25 °C y posteriormente se midió el halo de inhibición generado por el tratamiento en cada pozo. Para cada tratamiento se incluyeron 3 cajas de Petri (12 repeticiones).

2.2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el software estadístico y de programación R-project® versión 3.4.4 (2018-03-15). Para cada experimento se verificó el supuesto de normalidad, igualdad de varianzas e independencia mediante la prueba de Shapiro-Wilks, Levene y Durbin Watson, respectivamente.

Debido a que los datos para las pruebas de inhibición de los SLC dependiente de cultivo, concentración y tiempo de cultivo no cumplieron con los supuestos anteriormente mencionados, la comparación entre los tratamientos fue realizada usando la prueba de

Kruskal-Wallis y la prueba de Wilcoxon, con un nivel de confianza del 95% (Anexo IV, V y VI).

Por su parte, para analizar las diferencias entre los tratamientos en las pruebas de inhibición de VOCs y de estabilidad del SLC de la bacteria EA-CB0959 (*B. amyloliquefaciens*), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre las medias de los tratamientos fue determinada mediante de la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% (Anexo VII y VIII).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Pruebas de inhibición de SLC (dependiente de cultivo)

El primer medio evaluado fue TSB, el cual es rico en nutrientes y utilizado ampliamente para el crecimiento de múltiples bacterias (Villegas-Escobar, 2012). Se observó que los sobrenadantes (SLC) producidos por las bacterias evaluadas *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959), *B. subtilis* (EA-ED0161) y *B. megaterium* (EA-CB1057) en el medio TSB, redujeron el crecimiento de Foc R1 en 18, 19 y 9%, respectivamente. Sin embargo, estos porcentajes son significativamente más bajos que el control positivo (SporeKill®), el cual inhibió el crecimiento de Foc R1 en 86% (Tabla 2-1). Los SLC producidos por las demás cepas en el medio TSB no presentaron actividad de antibiosis contra Foc R1.

Las bacterias son fuente de diversos bioproductos útiles en la agricultura. En condiciones naturales, los microorganismos interactúan a través de metabolitos secundarios de forma antagonista o sinérgica (Braga, Dourado, & Araújo, 2016) interacciones que benefician a la planta en sitios de importancia como la rizósfera (Rout, 2014). Las secreciones microbianas están compuestas de un amplio rango de compuestos químicos con actividades antimicrobianas previniendo el ataque de patógenos, ayudan a la toma de nutrientes y promueven el crecimiento vegetal (Hardoin *et al.*, 2015). Por tal motivo, en diferentes cultivos se está evaluando el uso de metabolitos microbianos en el control de fitopatógenos (Wu *et al.*, 2009; García, Rueda & Peláez, 2014).

Un ejemplo de ello, lo constituyen los metabolitos con actividad antimicrobiana, utilizados para el control de numerosos fitopatógenos (Hardoim *et al.*, 2015), entre los cuales se encuentra Foc, agente causal de la marchitez por *Fusarium* en banano, enfermedad que hasta el momento no ha podido ser controlada eficientemente. Sin embargo, dada su importancia, a nivel mundial se realizan investigaciones para generar variadas alternativas de control que puedan implementarse en planes de manejo integrado, incluyendo tratamientos con ACB (Xue *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2016). Comparativamente, el uso de metabolitos microbianos en diferentes patosistemas tiene ventajas sobre el uso de los microorganismos, en la estabilidad y viabilidad del producto, seguridad para la salud y eficiencia en planta (Cubica *et al.*, 2019). Sin embargo, para hacer eficiente su producción en condiciones controladas se requiere conocer las preferencias ambientales de los microorganismos para su crecimiento y biosíntesis de metabolitos de interés (Jayaprakashvel & Mathivanan, 2011; Han *et al.*, 2015), razón por la cual en la presente investigación se evaluaron diferentes medios de cultivo sobre la actividad de antibiosis del SLC de bacterias cuya capacidad de inhibición *in vitro* sobre Foc R1 había sido demostrada previamente.

El efecto antimicrobiano del género *Bacillus* ha sido ampliamente reportado cuando se utiliza como medio de crecimiento TSB (Lee & Kimm, 2012; Siahmoshteh *et al.*, 2018). Resultados similares a los anteriormente expuestos, fueron reportados por Essghaier *et al.* (2009), quienes encontraron que solo los SLC de las bacterias *B. licheniformis* (J24) y *B. pumilus* (M3-16), producidos en TSB inhibieron el crecimiento de *Botrytis cinerea*, en fresas, en 42%. Sin embargo, especies como *Planococcus rifietoensis*, *Halomonas elongata* y *Staphylococcus* sp., no exhibieron un efecto inhibitorio, por lo que se podría pensar que este medio le ofrece un nivel nutricional para la biosíntesis de compuestos con alta actividad antibiótica no solamente a *Bacillus* spp. sino a otras bacterias, como fue observado en el caso de *Pseudomonas brassicacearum* (YC5480) cuyo sobrenadante también mostró actividad antimicrobiana contra *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phytophthora capsici* (Chung *et al.*, 2008).

Por su parte, el medio de cultivo MOLP es un medio rico en nutrientes, diseñado para optimizar la producción de metabolitos secundarios como los CLPs de las familias de las surfactinas, iturinas y fengicinas en *Bacillus* spp. (Jacques *et al.*, 1999). Teniendo en

cuenta dicha información, las bacterias Gram-positivas evaluadas en el presente estudio fueron crecidas en este medio de cultivo. Se observó que el SLC de *B. subtilis* (EA-ED0161) presentó una eficacia de 10% sobre Foc R1, la cual fue más baja que la actividad del SLC obtenido en el medio TSB (Tabla 2-1). De modo contrario, el SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) crecida en MOLP inhibió en 100% el crecimiento de Foc R1, el cual fue significativamente mayor que el control positivo (90%) (Tabla 2-1). Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones del cultivo, el SLC de EA-CB0959 contiene metabolitos con alta capacidad antifúngica. El género *Bacillus*, es ampliamente conocido como ACB y se calcula que especies como *B. amyloliquefaciens* pueden destinar hasta un 8,5% de su genoma para la producción de compuestos antimicrobianos (Chen *et al.*, 2009; Chowdhury *et al.*, 2015). En estudios previos, el SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) presentó alta actividad antimicrobiana sobre los fitopatógenos *Pseudocercospora fijiensis*, *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum* (no patógeno en banano) (Villegas-Escobar, 2012; Villegas-Escobar *et al.*, 2018), atribuida principalmente a las fengicinas y las iturinas, como también ha sido publicado por otros autores (Argüelles-Arias *et al.*, 2009; Raaijmakers *et al.*, 2010). Por lo anterior, podría suponerse que la cepa EA-CB0959 sintetiza este tipo de compuestos y que estos hayan sido los encargados de generar el efecto antifúngico sobre Foc R1 en el presente estudio.

El medio LB es ampliamente utilizado para el crecimiento de bacterias, en especial Gram-negativas. Entre los sobrenadantes producidos por las bacterias probadas en este medio, el SLC de *Burkholderia* sp. (EA-ED0047), inhibió el crecimiento de Foc R1 en 56%. Efecto bajo considerando que el control positivo presentó una eficacia de 90% (Tabla 2-1). En el medio LB, Mao *et al.* (2006) determinaron que el SLC *Burkholderia* sp., inhibió el crecimiento de varios hongos fitopatógenos, entre los cuales se encontraba *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, agente causal de la Fusariosis en pepino. Del mismo modo, Schmidt *et al.* (2009) encontraron una alta producción de pirrolnitrina, un metabolito secundario con actividad antimicrobiana de amplio espectro, producido por *B. cepacia* en medio LB, cuya producción, así como la de otros compuestos antifúngico, están controlados por el quorum sensing (QS) (Depoorte *et al.*, 2016). De otro modo, a pesar de las publicaciones que describen la producción de compuestos antifúngicos en LB por parte del género *Pseudomonas* spp., (Pastor *et al.*, 2016; Durairai *et al.*, 2018), en el presente

estudio, la bacteria *P. koreensis* (EA-ED0055) no exhibió capacidad antifúngica, al igual que *S. rhizophila* (EA-ED0242).

Adicionalmente, los SLC producidos en el medio de cultivo PDB, no mostraron efectos inhibitorios del crecimiento de Foc R1 (Tabla 2-1). Este medio se incluyó dentro del estudio, puesto que tiene los mismos componentes del medio sólido (PDA) a excepción del agar, donde se realizaron las pruebas de inhibición cuantitativas por lo que se puede sugerir que estos compuestos no influyeron en la actividad antifúngica de las bacterias. Las bacterias *P. pasadenensis* (EA-CB1315) y *C. propinquum* (EA-ED0145) no crecieron en los medios MOLP y PDB, por lo que no se tuvieron en cuenta en los análisis respectivos (Tabla 2-1). Estos resultados y los múltiples reportes citados en esta sección permiten sugerir que la capacidad antifúngica de los SLC es dependiente del tipo de medio de cultivo; sin embargo, algunos autores como Palumbo, Baker y Mahoney (2006) están en desacuerdo con esta afirmación y concluyen que el medio de cultivo no afecta la capacidad antifúngica de SLC de diferentes grupos bacterianos, como *Burkholderia pyrrocinia* (INH9-5b), *P. fluorescens* (NF6-5) y algunas especies de *Bacillus* sp., que inhibieron totalmente el crecimiento del hongo *Aspergillus flavus*, en 3 medios (PDB, extracto de almendra (AEM) y extracto de levadura y sacarosa (YES)). Con base en los resultados observados en el presente estudio se puede afirmar que el medio de cultivo sí influye en la actividad de antibiosis, además, se puede plantear la hipótesis de que los compuestos activos presentes en los SLC con poca actividad antifúngica, están en baja concentración, o se producen en un tiempo posterior al tiempo de fermentación utilizado en este estudio, por lo que su eficacia fue baja, esto con base en las publicaciones que han mostrado que la actividad antagonista de diferentes especies bacterianas está relacionada directamente con la concentración de los compuestos bioactivos (Ongena & Jacques, 2008). Finalmente, en este estudio se seleccionó la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) por su alta actividad antifúngica bajo las condiciones evaluadas.

Tabla 2-1. Efecto del medio de cultivo sobre la eficacia del sobrenadante del cultivo líquido de bacterias para inhibir el crecimiento de Foc R1.

Tratamiento		Inhibición (%) / Medio de cultivo			
		TSB	MOLP	LB	PDB
C(+)	SporeKill®	86 ± 1 a	90 ± 1 b	90 ± 1 a	87 ± 1 a
EA-CB0959	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	18 ± 17 b	100 ± 0 a	ND	0 ± 0 b
EA-ED0047	<i>Burkholderia</i> sp.	0 ± 0 b	ND	56 ± 3 b	0 ± 0 b
EA-ED0161	<i>Bacillus subtilis</i>	19 ± 15 b	10 ± 1 c	ND	0 ± 0 b
EA-ED0145	<i>Corynebacterium propinquum</i>	0 ± 0 b	NC	ND	NC
EA-ED0055	<i>Pseudomonas koreensis</i>	0 ± 0 b	ND	0 ± 0 c	0 ± 0 b
EA-ED0268	Ni	0 ± 0 b	0 ± 0 d	ND	0 ± 0 b
EA-ED0242	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0 ± 0 b	ND	0 ± 0 c	0 ± 0 b
EA-CB1315	<i>Paenibacillus pasadenensis</i>	0 ± 0 b	NC	ND	NC
EA-CB1057	<i>Bacillus megaterium</i>	9 ± 11 b	0 ± 0 d	ND	0 ± 0 b
EA-ED0316	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0 ± 0 b	ND	0 ± 0 c	0 ± 0 b

Ni: No identificada; ND: No Determinado; NC: No Creció.

Tratamientos con la misma letra en cada medio de cultivo no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba Wilcoxon ($\alpha = 0.05$). Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar (n = 12).

2.3.2 Efecto de la concentración de SLC sobre la inhibición del crecimiento de Foc R1

En la búsqueda de factores que pudiesen aumentar antibiosis de los SLC de las bacterias evaluadas, estos se liofilizaron y se concentraron. La evaluación de los sobrenadantes mostró un incremento significativo en el efecto inhibitorio del SLC concentrado producido por las bacterias *B. subtilis* (EA-ED0161) y *Burkholderia* sp., (EA-ED0047) en los medios TSB y LB, pasando de 18 y 56% a 63 y 66%, respectivamente. (Tabla 2-2). Por su parte, el uso de sobrenadantes concentrados de las bacterias *C. propinquum* (EA-ED0145), *P. koreensis* (EA-ED0055), Ni (EA-ED0268) y *S. rhizophila* (EA-ED0242) no provocaron adicionales de inhibición en comparación con los sobrenadantes sin diluir (Tabla 2-2). La

actividad antifúngica del sobrenadante de la bacteria EA-CB0959 concentrado se mantuvo alta (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Comparación del porcentaje de inhibición de SLC puros (1X) y concentrados (10X) sobre Foc R1.

Tratamiento	Medio	% Inhibición/Concentración	
		1X	10X
EA-CB0959 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MOLP	100 ± 0 a	100 ± 1 a
EA-ED0047 <i>Burkholderia</i> sp.	LB	56 ± 3 a	66 ± 2 b
EA-ED0161 <i>Bacillus subtilis</i>	TSB	19 ± 15 a	63 ± 4 b
EA-ED0145 <i>Corynebacterium propinquum</i>	TSB	0 ± 0 a	0 ± 0 a
EA-ED0055 <i>Pseudomonas koreensis</i>	PDB	0 ± 0 a	0 ± 0 a
EA-ED0268 Ni	PDB	0 ± 0 a	0 ± 0 a
EA-ED0242 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	PDB	0 ± 0 a	0 ± 0 a
EA-CB1315 <i>Paenibacillus pasadenensis</i>	TSB	0 ± 0 a	0 ± 0 a
EA-CB1057 <i>Bacillus megaterium</i>	TSB	9 ± 11 a	0 ± 0 a
EA-ED0316 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	PDB	0 ± 0 a	0 ± 0 a

Ni: No identificada.

Tratamientos con la misma letra en cada concentración no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba Wilcoxon ($\alpha = 0.05$). Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar ($n = 12$).

Bajo la misma metodología Souto et al. (2004) determinaron que el aumento en la concentración (5X) del SLC de *Bacillus* sp. (BNM 122), provocó la inhibición total de la germinación de ascosporas de *Sclerotinia sclerotiorum*. Del mismo modo, Luz et al. (2017) demostraron la actividad antimicrobiana de SLC liofilizados y concentrados, de *Lactobacillus* sp., sobre *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium expansum*, hongos productores de micotoxinas en diferentes alimentos. Los resultados observados en este experimento sugieren que la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las bacterias evaluadas guarda una relación directa con la concentración de los compuestos activos contenidos allí; sin embargo, la implementación de un proceso para contratarlos,

como la liofilización elevaría los costos de producción de bioproductos, basados en sobrenadantes concentrados, por lo que no serían rentables para la aplicación en pruebas posteriores de invernadero y/o campo. Desde un punto de vista ecológico, se ha encontrado que la producción de compuestos activos contra Foc por parte de *B. amyloliquefaciens* puede verse aumentada en presencia de exudados de la raíz de banano (Wang *et al.*, 2016) por lo cual, en pruebas *in vivo* se podrían tener aumento de compuestos en presencia de la planta.

2.3.3 Efecto del tiempo de fermentación de las bacterias sobre la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes

Tras utilizar sobrenadantes obtenidos en diferentes tiempos de crecimiento (12, 24 y 48 h) de las bacterias en los medios de cultivo seleccionados en cada caso, se observó una pérdida del efecto antimicrobiano contra Foc R1 de los SLC producidos por las bacterias *Burkholderia* sp., (EA-ED0047) y *B. subtilis* (EA-ED0161) en comparación con lo observado previamente, con los sobrenadantes cosechados después de 72 h de fermentación. En estudios anteriores, Ho *et al.* (2015) publicaron que la bacteria *B. cenocepacia* (869T2) crecida en medio LB por 24 h, presentó alta actividad inhibitoria sobre Foc R4T, tiempo en el cual ha producido metabolitos como pirrolnitrina y pirroloquinolina quinona. De igual forma, los SLC de las bacterias *P. koreensis* (EA-ED0055) y *C. propinquum* (EA-ED0145) obtenidos en los diferentes tiempos de fermentación, no mostraron actividad inhibitoria hacia Foc R1, a pesar de que, en pruebas en medio sólido, se caracterizaron por tener actividad antifúngica.

Contrario a lo anteriormente mencionado Souto *et al.* (2004) observó una similar actividad inhibitoria del SLC de *Bacillus* sp., (BNM 122), recuperado después de 12, 24, 48 y 72 h, contra *Sclerotinia sclerotiorum*. En el caso de *Burkholderia* sp., se ha observado efectos antifúngicos después de 120 h de fermentación (Mao *et al.*, 2006), mientras que en el caso de *Bacillus* spp., Essghaier *et al.* (2009) determinaron que los SLC solo fueron activos después de 24 h de cultivo. Estos hechos, confirman la importancia del tiempo de fermentación en la búsqueda de compuestos antimicrobianos, puesto que muchos de ellos pueden estar ligados al crecimiento de la población del microorganismo y por ende se producen en la fase exponencial y/o estacionaria (Villegas-Escobar, 2012).

2.3.4 Pruebas de inhibición de VOCs

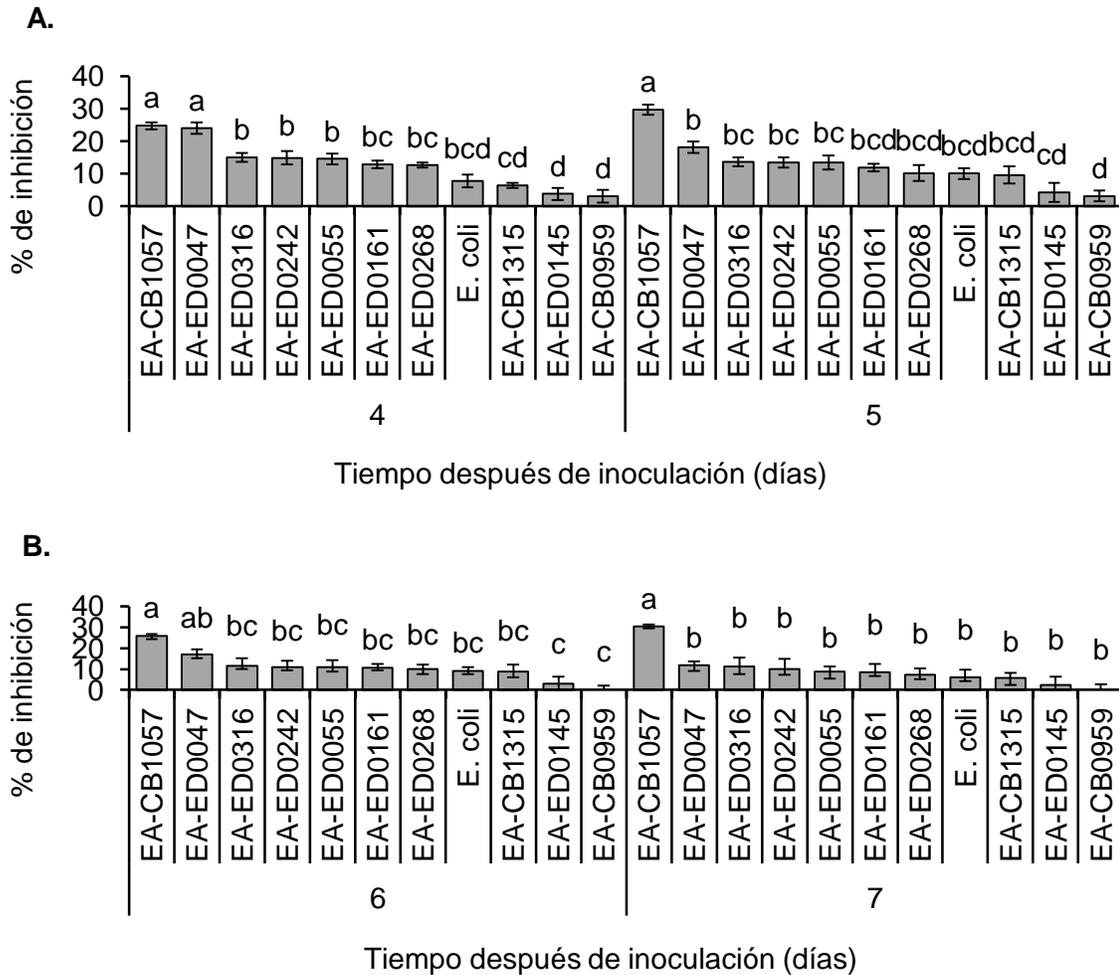
La búsqueda de VOCs con potencial de biocontrol sobre fitopatógenos del suelo está en auge (Tyc *et al.*, 2017). En el presente estudio, se evidenció que la bacteria *B. megaterium* (EA-CB1057) produjo compuestos volátiles con la inhibición más alta contra Foc R1 en comparación con las demás bacterias durante las cuatro evaluaciones, con porcentajes de eficacia entre 25 y 30% (Figura 2-1 A y B). Cabe denotar que esta bacteria no generó inhibición en las pruebas *in vitro* anteriormente realizadas. La producción de VOCs con actividad antifúngica había sido descrita antes para los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, los cuales tienen efecto antifúngico contra diferentes especies de *Fusarium*, reduciendo su crecimiento entre 20 al 70% (Liu *et al.*, 2008; Guevara-Avenidaño *et al.*, 2019). La especie *B. megaterium* ha sido reportada por producir VOCs con capacidad de promover el crecimiento vegetal en *Arabidopsis thaliana* (López-Bucio *et al.*, 2007); sin embargo, hasta el momento no se habían reportado con actividad antifúngica.

Por su parte, la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) no produjo inhibición del crecimiento de Foc mediante esta metodología de evaluación (Figura 2-1 A y B), lo cual sugiere que su actividad antifúngica solo está ligada a la acción directa con producción de metabolitos contenidos en el sobrenadante de su cultivo. Sin embargo, Yuan *et al.* (2012) y Wang *et al.* (2013), si han determinado efectos antifúngicos contra Foc R4T mediados por VOCs producidos por las bacterias *B. amyloliquefaciens* (NJN-6) y (W19), entre un 30 a 40%, respectivamente; por lo cual, este mecanismo de acción es un rasgo que puede variar entre cepas de la misma especie (Tyc *et al.*, 2017).

De forma contraria, se determinó que la bacteria *Burkholderia* sp., (EA-ED0047), inhibió el crecimiento de Foc entre 10 y 25% mediante la producción de VOCs (Figura 2-1 A y B). Estos resultados sugieren que el efecto antifúngico de *Burkholderia* sp., (EA-ED0047) sobre Foc R1, podría estar mediado por la combinación de compuestos difusibles en medio, como se determinó en descritos antes en este estudio y VOCs. Sin embargo, es de resaltar que el efecto inhibitorio de los VOCs producidos por este microorganismo, pierden su efecto con el tiempo (Figura 2-1 A y B). Aunque la gran mayoría de especies de este género bacteriano producen VOCs con actividad antimicrobiana (Carrión *et al.*, 2018; Groenhagen *et al.*, 2013), y a diferencia de los resultados mencionados, autores como

Bach et al. (2016) resaltan que *B. cepacia* (89), solo inhibe el crecimiento de varios hongos fitopatógenos mediante la producción de metabolitos, pero no por la producción de VOCs.

Figura 2-1. Actividad antifúngica de bacterias sobre Foc R1 mediada por VOCs.



(A) Porcentaje de inhibición en los días 4-5 y, **(B)** 6-7 días de pos-inoculación. Las diferencias significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes en cada día de evaluación, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras en las columnas representan la desviación estándar de los datos ($n = 4$).

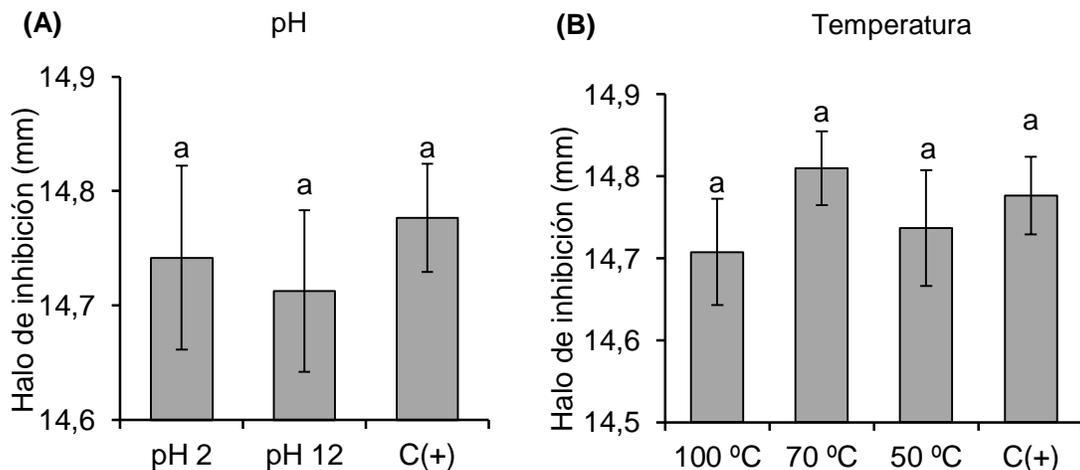
Algunos reportes demuestran la capacidad otros géneros bacterianos para producir VOCs con efecto antifúngico sobre Foc. Por ejemplo, *Enterobacter* sp., (Ho et al., 2015), *Herbaspirillum* spp., y *Pseudomonas* spp., los cuales inhibieron el crecimiento de Foc R4T en 20.3% (Ting et al., 2011). Sin embargo, la ideación para el uso de VOCs como método

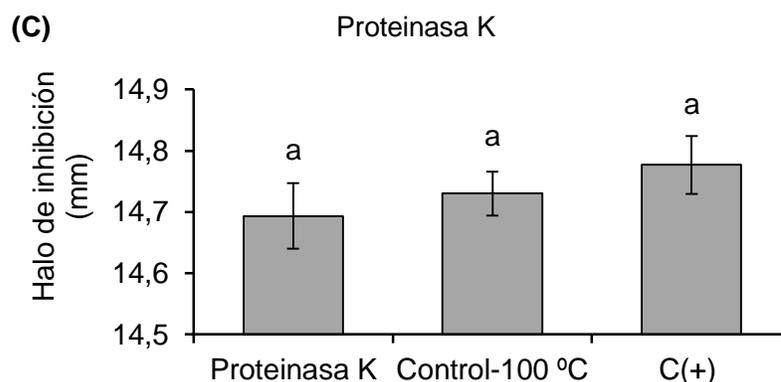
de control de fitopatógenos aún se encuentra en desarrollo, y faltan muchos avances para la identificación de moléculas y el escalamiento de bioproductos a base de VOCs (Avalos *et al.*, 2018).

2.3.5 Pruebas de estabilidad del SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959)

En el presente estudio, se estableció que el SLC producido por la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en el medio de cultivo MOLP, tiene la mayor capacidad antifúngica contra Foc R1, por tal motivo fue seleccionada con el fin de determinar su estabilidad ante diversos factores. El pH inicial de este sobrenadante es 8. Tras someter el SLC a cambios drásticos de pH, tanto ácidos como básicos, se determinó que este no perdió su capacidad inhibitoria frente a Foc R1, una vez el pH del SLC fue restituido (Figura 2-2A). Esto mismo se observó al someter el SLC a altas temperaturas (100, 70 y 50 °C) y al efecto de la enzima proteínasa K (Figura 2-2B y 2-2C), su actividad antifúngica no se vio afectada.

Figura 2-2. Halo de inhibición del sobrenadante libre de células de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) sometido a diferentes rangos de pH, temperatura y proteínasa K.





(A) Efecto del pH, (B) temperatura y (C) proteínasa K, en la actividad de inhibición del SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) sobre Foc R1. C(+) = Control positivo. Tratamientos con la misma letra en cada experimento no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras en las columnas representan la desviación estándar ($n = 12$).

El éxito de los ACB o sus productos derivados, no solamente dependen de su capacidad antimicrobiana, sino también de su proceso de formulación y estabilidad bajo condiciones de campo. Lugtenberg y Kamilova, (2009) especifican que, para actuar de manera eficiente, el ACB debe permanecer activo en un amplio rango de condiciones, como la variación del pH, la temperatura y las concentraciones de diversos iones. Estos requisitos no son fáciles de cumplir. Por lo tanto, es común que la eficacia de varios productos comerciales de biocontrol sea limitada.

Souto et al. (2004) encontraron resultados similares a los observados en el presente estudio, puesto que determinaron que el efecto antifúngico de SLC de *Bacillus* sp., (BNM 122), no perdió su actividad antifúngica tras ser sometido a tratamientos de pH entre 4 a 10, temperatura de 120 °C, proteínasa K, tripsina y lipasa A. Sin embargo, la actividad se perdió tras someter el SLC a un pH 2, lo cual no sucedió en la presente investigación. De igual manera, el efecto de diferentes enzimas, entre las que se encuentra la proteínasa K, ha sido estudiada sobre SLC con actividad antimicrobiana, para caracterizar la naturaleza de los compuestos activos de la fermentación bacteriana. Un ejemplo de ello, lo reportan Siahmoshteh et al. (2018) quienes determinaron que el tratamiento con 0,1 mg/mL de proteínasa K a SLC de *Bacillus* sp., no causa ningún impacto en la actividad antifúngica contra *Aspergillus parasiticus*. En otras especies bacterianas de biocontrol, como *B.*

cepacia (89), también se ha detectado que los SLC son estables a concentraciones de 0,5 mg/mL de proteinasa K, altas y bajas temperaturas y pH entre 4 y 10, lo que indica que los compuestos activos no tienen estructuras proteicas (Bach *et al.*, 2016). Estos resultados en conjunto sugieren que el SLC de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) puede resistir diferentes condiciones adversas una vez se aplique al suelo como alternativa de control de Foc R1. Además, con base en la literatura se sugiere que esta especie puede producir CLPs de síntesis no ribosomal, de las familias de las iturinas, fengicinas y surfactinas, los cuales son altamente resistentes a los tratamientos anteriormente mencionados (Cawoy *et al.*, 2015), compuestos posiblemente presentes en este SLC con actividad antifúngica sobre Foc R1. La bacteria *B. amyloliquefaciens* (W19) tiene la capacidad de producir dos CLPs (iturina y bacillomicina D), los cuales inhibieron el crecimiento de Foc R4T (Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, el escalamiento para la aplicación en invernadero y pruebas de campo se llevó a cabo con células bacterianas y mezclas de compost (Wang *et al.*, 2016), como generalmente ocurre en los estudios de control biológico de este patógeno. Cabe señalar que, aunque existen numerosos estudios de bacterias como ACB contra Foc R1 y R4T, hasta donde se conoce, este es el primer estudio que ha medido el efecto del medio de cultivo y las condiciones de fermentación descritas sobre la actividad antifúngica de sobrenadantes contra Foc R1.

2.4 Conclusiones

- La actividad antifúngica de los SLC de las bacterias evaluadas en el presente estudio sobre Foc R1 es dependiente del tipo de medio líquido usado para la fermentación.
- El SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) mostró el mayor potencial antagonista sobre Foc R1 al reducir su crecimiento en 100% en condiciones *in vitro* por lo cual se seleccionó para pruebas posteriores.
- En general, la actividad antifúngica de los SLC contra Foc R1 mantuvo una relación directa con la concentración evaluada. Sin embargo, este comportamiento varió entre las cepas de las bacterias evaluadas.
- El tiempo de fermentación de las bacterias afecta la actividad antifúngica de los SLC, siendo mayor a las 72 h de cultivo en la mayoría de cepas bacterianas, mientras 12, 24 y 48 h no son efectivos para la colecta de los SLC de las bacterias *Burkholderia* sp. (EA-ED0047), *B. subtilis* (EA-ED0161), *P. koreensis* (EA-ED0055) y *C. propinquum* (EA-ED0145).
- Del grupo de bacterias evaluadas solamente la cepa *Burkholderia* sp. (EA-ED0047) mostró efectos antifúngicos mediados por VOCs y por compuestos sintetizados en medio líquido.
- Los SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) conservaron su actividad antagónica contra Foc R1, después de haber sido sometidos a cambios extremos de pH, temperatura y a la acción de la proteinasa K.

Bibliografía

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Review*, 35(1), 201- 232.
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS biology*, 14(1), e1002352.
- Aktuganov, G., Melentjev, A., Galimzianova, N., Khalikova, E., Korpela, T., & Susi, P., (2008). Wide-range antifungal antagonism of *Paenibacillus ehimensis* IB-X-b and its dependence on chitinase and b-1,3-glucanase production. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(7), 577–587.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision* (Vol. 12, No. 3). FAO, Rome: ESA Working paper.
- Arango, R. E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., ... & Kema, G. (2016). Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PLoS genetics*, 12(8), e1005876.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial cell factories*, 8(1), 63.
- Avalos, M., van Wezel, G. P., Raaijmakers, J. M., & Garbeva, P. (2018). Healthy scents: microbial volatiles as new frontier in antibiotic research?. *Current opinion in microbiology*, 45, 84-91.

- Bach, E., dos Santos Seger, G. D., de Carvalho Fernandes, G., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 99, 141-149.
- Berg, G., & Raaijmakers, J. M. (2018). Saving seed microbiomes. *The ISME journal*, 12(1), 1167-1170.
- Braga, R.M., Dourado, M.N., & Araújo, W.L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 86-98.
- Brown, J. K. (2015). Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. *Annual review of phytopathology*, 53, 513-539.
- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in microbiology*, 10, 616.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., & Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters*, 247(2), 147–152.
- Carrión, V. J., Cordovez, V., Tyc, O., Etalo, D. W., de Bruijn, I., de Jager, V. C., ... & Raaijmakers, J. M. (2018). Involvement of Burkholderiaceae and sulfurous volatiles in disease-suppressive soils. *The ISME journal*, 1.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial biotechnology*, 8(2), 281-295.
- Cazalis, V., Loreau, M., & Henderson, K. (2018). Do we have to choose between feeding the human population and conserving nature? Modelling the global dependence of people on ecosystem services. *Science of the Total Environment*, 634, 1463-1474.

- Ceccarelli, S. (2015). Efficiency of plant breeding. *Crop Science*, 55(1), 87-97.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., ... & Borriss, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of biotechnology*, 140(1-2), 27-37.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 780.
- Chung, B. S., Aslam, Z., Kim, S. W., Kim, G. G., Kang, H. S., Ahn, J. W., & Chung, Y. R. (2008). A bacterial endophyte, *Pseudomonas brassicacearum* YC5480, isolated from the root of *Artemisia* sp. producing antifungal and phytotoxic compounds. *The Plant Pathology Journal*, 24(4), 461-468.
- Comte, I., Cattan, P., Charlier, J. B., Gentil, C., Mottes, C., Lesueur-Jannoyer, M., & Voltz, M. (2016, October). Assessing the environmental impact of pesticide use in banana cropping systems. In *X International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Agroecological Approaches to Promote Innovative Banana* 1196 (pp. 195-202).
- Depoorter, E., Bull, M. J., Peeters, C., Coenye, T., Vandamme, P., & Mahenthiralingam, E. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5215-5229.
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W. S., Park, Y. J., Senthilkumar, P., ... & Oh, B. T. (2018). An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. *Biological Control*, 125, 138-146.

- Essghaier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Hajlaoui, M. R., Boudabous, A., Jijakli, H., & Sadfi-Zouaoui, N. (2009). Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of applied microbiology*, 106(3), 833-846.
- FAO. (2013). FAOSTAT 2013. Food and agriculture organization of the United Nations: Banana and plantain processing technologies. Recuperado de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- FAO. (2017). FAOSTAT 2016. Food and agriculture organization of the United Nations: Banana and plantain processing technologies. Recuperado de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- Fishal, E. M. M., Meon, S., & Yun, W. M. (2010). Induction of tolerance to *Fusarium* wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible berangan banana pre-inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). *Agricultural Sciences in China*, 9(8), 1140-1149.
- Frison, E. A., Escalant, J. V., Sharrock, S., Jain, S. M., & Swennen, R. (2004). The global *Musa* genomic consortium: A boost for banana improvement. *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, 341-349.
- Fu, L., Ruan, Y., Tao, C., Li, R., & Shen, Q. (2016). Continuous application of bioorganic fertilizer induced resilient culturable bacteria community associated with banana *Fusarium* wilt suppression. *Scientific reports*, 6, 27731.
- García, S.D., Rueda, A., & Peláez, C.A. (2014). Antimicrobial activity of extracellular metabolites from antagonistic bacteria isolated from potato (*Solanaum phureja*) crops, *Summa Phytopathologica*, 40(3), 212-220.
- Gopal, M., & Gupta, A. (2016). Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. *Frontiers in microbiology*, 7, 1971.

- Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S., & Weiskopf, L. (2013). Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 892-906.
- Guevara-Avenidaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser, E. A., ... & Reverchon, F. (2019). Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological research*, 219, 74-83.
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., ... & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 603-616.
- Han, J., Chen, D., Huang, J., Li, X., Zhou, W. W., Gao, W., & Jia, Y. (2015). Antifungal activity and biocontrol potential of *Paenibacillus polymyxa* HT16 against white rot pathogen (*Coniella diplodiella* Speq.) in table grapes. *Biocontrol science and technology*, 25(10), 1120-1132.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- Ho, Y. N., Chiang, H. M., Chao, C. P., Su, C. C., Hsu, H. F., Guo, C. T., ... & Huang, C. C. (2015). *In planta* biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant and soil*, 387(1-2), 295-306.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pawn, E., Thonart, P. (1999). Optimization of Biosurfactant Lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79, 223-233.

- Jayaprakashvel, M., & Mathivanan, N. (2011). Management of plant diseases by microbial metabolites. In *Bacteria in agrobiology: plant nutrient management* (pp. 237-265). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jung, B. K., Hong, S. J., Park, G. S., Kim, M. C., & Shin, J. H. (2018). Isolation of *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 173-180.
- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(6), 1001-1012.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., & Lugtenberg, B. (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1809-1817.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science*, 20(4), 206-211.
- Lee, H. A., & Kim, J. H. (2012). Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* strains with antifungal activities from Meju. *Preventive nutrition and food science*, 17(1), 64.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and-ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 207-2017.
- Liu, W. W., Wei, M. U., Zhu, B. Y., Du, Y. C., & Feng, L. I. U. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in China*, 7(9), 1104-1114.

- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Manes, J., & Meca, G. (2017). *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 128-135.
- Mao, S., Lee, S. J., Hwangbo, H., Kim, Y. W., Park, K. H., Cha, G. S., ... & Kim, K. Y. (2006). Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. *Current microbiology*, 53(5), 358-364.
- Meena, B. (2014). Biological control of pest and diseases using fluorescent pseudomonads. In *Basic and applied aspects of biopesticides* (pp. 17-29). Springer, New Delhi.
- Meldrum, R. A., Daly, A. M., Tran-Nguyen, L. T. T., & Aitken, E. A. B. (2013). The effect of surface sterilants on spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4. *Crop protection*, 54, 194-198.
- Milla, R., Osborne, C. P., Turcotte, M. M., & Violle, C. (2015). Plant domestication through an ecological lens. *Trends in ecology & evolution*, 30(8), 463-469.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection*, 26(4), 697-705.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Palumbo, J. D., Baker, J. L., & Mahoney, N. E. (2006). Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial ecology*, 52(1), 45-52.

- Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V., & Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the protection of tomato plants against fungal pathogens. *Current microbiology*, 73(3), 346-353.
- Peñuelas, J., Asensio, D., Tholl, D., Wenke, K., Rosenkranz, M., Piechulla, B., & Schnitzler, J. P. (2014). Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant, cell & environment*, 37(8), 1866-1891.
- Ploetz, R. (2015). Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73, 7-15.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2012). The hologenome concept. In *Beneficial microorganisms in multicellular life forms* (pp. 323-340). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 827-837.
- Rout, M.E. (2014). The plant microbiome. *Advances in Botanical Research*, 69(1), 279-309.
- Schmidt, S., Blom, J. F., Pernthaler, J., Berg, G., Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., & Eberl, L. (2009). Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Environmental microbiology*, 11(6), 1422-1437.

- Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural product reports*, 24(4), 814-842.
- Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 89, 300-307.
- Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M., & Garcia, A. F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1247-1256.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857.
- Suman, A., Yadav, A. N., & Verma, P. (2016). Endophytic microbes in crops: diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity* (pp. 117-143). Springer, New Delhi.
- Ting, A. S. Y., Mah, S. W., & Tee, C. S. (2011). Detection of potential volatile inhibitory compounds produced by endobacteria with biocontrol properties towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 229-235.
- Thangavelu, R., & Mustafa, M. M. (2012). Current advances in the *Fusarium* wilt disease management in banana with emphasis on biological control. In *Plant pathology*. InTech. 273-298.
- Thomashow, L. S. (2016). Induced systemic resistance: a delicate balance. *Environmental microbiology reports*, 8(5), 560-563.

- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20260-20264.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292.
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206.
- Villegas-Escobar, V. (2012). *Identificación y caracterización de extractos bacterianos biológicamente activos contra patógenos de Musa sp.* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Villegas-Escobar, V., González-Jaramillo, L. M., Ramírez, M., Moncada, R. N., Sierra-Zapata, L., Orduz, S., & Romero-Tabarez, M. (2018). Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-CB0959: active metabolites responsible for *in vitro* and *in vivo* control of *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control*.
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, R., ... & Shen, Q. (2013). Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 435-446.
- Wang, B., Shen, Z., Zhang, F., Raza, W., Yuan, J., Huang, R., ... & Shen, Q. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* strain W19 can promote growth and yield and suppress *Fusarium* wilt in banana under greenhouse and field conditions. *Pedosphere*, 26(5), 733-744.
- Wei, Z., & Jousset, A. (2017). Plant breeding goes microbial. *Trends in plant science*, 22(7), 555-558.

- Wu, C. H., Bernard, S. M., Andersen, G. L., & Chen, W. (2009). Developing microbe–plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial biotechnology*, 2(4), 428-440.
- Xue, C., Penton, C. R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., ... & Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific reports*, 5, 11124.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01357.
- Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 139-150.

CAPÍTULO 3. DINÁMICA Y BIOCONTROL DE *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) SOBRE Foc R1

Resumen

A excepción del mejoramiento genético vegetal, la marchitez por *Fusarium* en banano causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) no cuenta con métodos de control que permitan rehabilitar suelos infectados con Foc. Bajo este contexto, los objetivos del presente capítulo fueron cuantificar el potencial de las células y sobrenadantes de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) para reducir la población de Foc a nivel de microcosmos y determinar el efecto de su aplicación sobre el desarrollo de la enfermedad en plantas de banano Gros Michael. En ensayos de microcosmos, se determinó que la aplicación del sobrenadante de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) producido en medio MOLP con presencia de células (1×10^4 UFC/mL) redujo la población de Foc R1 en un 100 y 62%, cuando el patógeno fue inoculado en 1×10^3 y 1×10^6 UFC/g suelo estéril, respectivamente, previo al ACB. La aplicación de solo células del ACB no redujo la población de Foc R1. Por su parte, cuando el agente de biocontrol EA-CB0959 se aplicó en el suelo previamente inoculado con el patógeno (1×10^6 UFC/g suelo) antes de la siembra de plantas de banano Gros Michael, se observó una disminución significativa (30%) del índice de enfermedad hasta el día 28 después de las inoculaciones (ddi); mientras que, en ensayos suelos poscuarentena (posterior a erradicación de plantas enfermas con Foc R1), se observó que la aplicación semanal, por 4 y 5 semanas del cultivo completo de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) diluido al 50% a suelos contaminados con el patógeno, redujeron la severidad de la enfermedad entre 75 y 88%, a los 63 ddi. Los resultados indican que *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) es una herramienta que reduce la incidencia y la severidad de la enfermedad, por lo que puede ser usada en programas de manejo integrado del patógeno en pruebas de campo.

Palabras clave: Poscuarentena, reducción de inóculo, incidencia, severidad.

3.1 Introducción

El suelo es un componente esencial de la vida en la tierra. Este se encuentra compuesto por fracciones de agua, aire, materia orgánica y mineral, que permiten el establecimiento de una amplia gama de macro y microorganismos (Moebius-Clune *et al.*, 2016). Se estima que en un gramo de suelo coexisten alrededor de 90 millones de bacterias, 4 millones de actinomicetos y 200 mil hongos (Glick, 2015). Mientras que, según el Royal Botanic Gardens (2016), se calcula que en el planeta existen 400 mil especies de plantas, de las cuales 31 mil son usadas para alimentación, medicina, etc. Las plantas y microorganismos evolucionaron juntos (Nihorimbere *et al.*, 2011); sin embargo, en las asociaciones planta-microorganismo pueden resultar interacciones simbióticas (beneficio del microorganismo y el vegetal) o parasíticas (detrimento del estado de la planta) (Hardoim *et al.*, 2015), relaciones mediadas por múltiples factores genéticos, ambientales, etc. (Schenk, Carvalhais, & Kazan, 2012).

En promedio, se determina que el 16% de las pérdidas de la producción mundial de cultivos se debe a patógenos (Oerke, 2006), siendo *Fusarium oxysporum* uno de los más agresivos en la agricultura. Este se considera como el quinto patógeno en importancia histórica y económica y el número 1 en esfuerzos de investigaciones en los últimos años (Dean *et al.*, 2012; Royal Botanic Gardens, 2016), debido a que es un hongo habitante del suelo, que causa marchitez vascular en una amplia gama de cultivos, por lo cual se divide en más de 100 formas especiales (f. sp.) de acuerdo con su patogenicidad en cada hospedero (Gordon, 2017). Cabe destacar que este hongo produce macroconidias, microconidias y clamidosporas, siendo estas últimas estructuras de resistencia, con paredes gruesas que pueden permanecer en el suelo en ausencia del hospedero (Nelson, 1981), lo que hace que el control para este patógeno sea altamente difícil. Para tratar de controlar este patógeno, en patosistemas como banano - *F. oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) se han utilizado estrategias como la aplicación de productos de síntesis química y el mejoramiento genético. En el primer caso, su eficacia es muy baja, además, dichos productos pueden representar un riesgo para la salud y el medio ambiente, ya que los residuos tóxicos pueden acumularse en el suelo y entrar en el suministro de alimentos (Nel *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2018). Mientras que el desarrollo de plantas resistentes resulta costoso y con frecuencia poco durable, puesto que el patógeno puede quebrar la resistencia, además,

las cualidades organolépticas del producto cosechado generalmente son inferiores, por lo que no son aceptadas por el consumidor (McHughen & Wager, 2010; Ploetz, 2015; Cubica *et al.*, 2019). Como medida de control básica en el manejo de enfermedades se debe procurar reducir el inóculo inicial del patógeno. La germinación de las esporas de los fitopatógenos en el suelo puede estar limitada por fenómenos como la fungistasis, el cual puede ser generado por la actividad de los microorganismos del suelo, principalmente bacterias, mediada a su vez, por la extracción de nutrientes y la producción de compuestos antifúngicos (Garbeva *et al.*, 2011). Por estos motivos, la búsqueda de ACB es vital para el manejo Foc, donde se destaca el uso de bacterias, en especial del género *Bacillus* (Cao *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019).

Bacillus es un género de bacterias Gram positivas aeróbicas formadoras de endósporas (BAFEs) que se presentan en múltiples ambientes, entre ellos diversos tejidos y la rizósfera de plantas, mamíferos e insectos (Govindasamy *et al.*, 2010), por lo que son ampliamente utilizadas en la agricultura, con excepción de las especies *B. cereus* y *anthracis*, las cuales son patógenos de humanos (Helgason *et al.*, 2000). Este género ha sido reportado como ACB de fitopatógenos del suelo, foliares y de poscosecha (Ongena *et al.*, 2005). Se estima que en un gramo de suelo pueden coexistir entre 10^3 a 10^6 células de *Bacillus* y *Paenibacillus* (género filogenéticamente cercano) (McSpadden Gardener, 2004). *Bacillus* tiene ventajas considerables sobre otros ACB, puesto que tiene la capacidad de colonizar raíces y posee diferentes mecanismos de acción para el control de fitopatógenos como la producción de compuestos antimicrobianos, quorum quenching, enzimas hidrolíticas, la inducción de respuesta de defensa en el hospedero, la competencia por nutrientes en el suelo y la promoción de crecimiento vegetal (Govindasamy *et al.*, 2010, Cawoy *et al.*, 2015), sumado a su capacidad de producir esporas resistentes a ambientes extremos, lo que le brinda ventajas durante el proceso de formulación y almacenamiento como bioproductos comerciales (Fravel, 2005; Ongena & Jacques, 2008). Las especies de este género bacteriano más utilizadas en la agricultura son *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, las cuales conforman el grupo o complejo *B. subtilis* (Fravel, 2005; Borris, 2015).

Dentro del conjunto de compuestos antimicrobianos producidos por las cepas del complejo *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, los lipopéptidos cíclicos (CLPs) de síntesis no ribosomal han sido los más estudiados. Estos metabolitos tienen estructuras anfipáticas, están formados por un oligopéptido cíclico con una cola lipídica (ácido graso hidrófobo) de longitud variable, los cuales son formados por enzimas denominadas sintetetasas de péptidos no ribosomales (NRPS's) (Stein, 2005, Roongsawang et al., 2010). Los CLPs se dividen en familias, donde las más conocidas son por sus efectos antimicrobianos y surfactantes son las surfactinas, iturinas y fengicinas, las cuales presentan diferentes isoformas (Raaijmakers et al., 2010). Las surfactinas son potentes biosurfactantes, conocidas por su actividad hemolítica, antiviral, antimicoplasmática y antibacteriana, más no antifúngica; mientras que las iturinas poseen alta capacidad antifúngica contra levaduras y hongos, más su actividad antibacteriana es limitada; y las fengicinas presentan una alta actividad antifúngica, en especial contra hongos filamentosos (Ongena & Jacques, 2008; Pérez-García, Romero, & De Vicente, 2011). La estructura anfifílica de los lipopéptidos les permite interactuar con las membranas biológicas de hongos fitopatógenos, degradando la membrana plasmática, lo que ocasiona un desequilibrio osmótico y posterior daño citoplasmático; además, los CLPs pueden interactuar en combinaciones para generar una mayor capacidad antimicrobiana (Romero et al., 2007). Cabe señalar, que los CLPs también están involucrados en procesos de motilidad y colonización de la raíz por *Bacillus* spp., así como en la estimulación de respuestas de defensa en la planta (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Govindasamy et al., 2010).

Múltiples reportes indican el potencial de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* para el biocontrol de *F. oxysporum* en cultivos como pepino (Cao et al., 2012), tomate (Vitullo et al., 2012), melón (Zhao et al., 2013) y uchuva (Moreno, 2017), donde se destaca la especie *B. amyloliquefaciens* puesto que se ha determinado que pueden destinar hasta un 8,5% de su genoma para la producción de compuestos antimicrobianos (Chen et al., 2009; Chowdhury et al., 2015). Esta especie se divide en dos subespecies, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (asociadas a plantas) y *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (no asociadas a plantas) (Borris et al., 2011). Cepas modelo de esta especie son el principio activo de bioproductos comerciales reconocidos como Kodiak™ (Bayer Crop Science), Companion (Growth Products Ltd.), BioYield™ (BayerCrop Science), INTEGRAL® (BASF), VAULT® (BASF), SERENADE Max® (Bayer Crop Science),

CEASE(R) (BioWorks, Inc.), RhizoVital® (ABiTEP GmbH), RhizoPlus® (ABiTEP GmbH), Double Nickel 55TM (Certis USA), y Amylo-X® (Certis USA), comercializados en la agricultura mundial (Borris, 2015). Cabe señalar, que *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. velezensis* y sus metabolitos producidos han demostrado efecto biocontrolador sobre Foc en banano (Wang *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2018, Huang *et al.*, 2019). Sin embargo, se requieren métodos de control que permitan reducir las altas cantidades de inóculo del patógeno, en los suelos, después de un ataque por Foc (Ordoñez *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que en el estudio anterior se determinó que el SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) cultivado en medio MOLP inhibió en 100% el crecimiento de Foc R1, además de que los compuestos antifúngicos son estables, por tal razón en el presente estudio se tienen como objetivos i) Comprobar el potencial de los microorganismos seleccionados o sus metabolitos para reducir la población de Foc R1 a nivel de microcosmos. y ii) Determinar el efecto de su aplicación sobre el desarrollo de la enfermedad de la marchitez por *Fusarium* en plantas de banano Gros Michael.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Microorganismos empleados

La bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) fue seleccionada de acuerdo a resultados de un estudio previo basado en criterios como pruebas de inhibición cuantitativas, pruebas con SLC y estabilidad de estos a cambios de temperatura, pH y degradación por proteinasa K.

En cuanto a Foc R1, se seleccionaron tres cepas, la cuales fueron aisladas a partir de pseudotallos sintomáticos de plantas de banano Manzano (AAB) y denominadas como IB, VR y VE, las cuales fueron colectadas en las fincas comerciales “La Isla Bonita” (lat. 7°48'08" N, long. 76°41'25" W), “Varonesa” (lat. 7°63'23" N, long. 76°36'20" W) y “Villa Ester” (lat. 7°56'46" N, long 76°43'43" W), respectivamente, en la zona de Urabá, Colombia. El estado de conservación de la bacteria y del hongo fitopatógeno, se realizó como se indicó en el capítulo anterior (sección 1.2.1).

3.2.2 Pruebas en microcosmos

Para determinar el efecto de sobrenadantes y células de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en microcosmos inoculados con Foc R1 (cepa IB), se tomaron recipientes plásticos de 565 mL de capacidad a los cuales se les adicionó 120 g de sustrato compuesto por dos partes de suelo (Vivero Tierra negra) y una parte de cascarilla de arroz denominado como “microcosmos” (análisis de suelos en Anexo IX) esterilizado en autoclave 120 °C, 15 PSI, 20 min por tres ciclos. Posteriormente, el suelo se inoculó uniformemente con 40 mL suspensión de microconidias de Foc R1 en concentraciones de 2×10^3 y 2×10^6 microconidias/mL con las cuales se obtuvo una concentración final teórica de 1×10^3 y 1×10^6 UFC/g suelo, respectivamente. El suelo se incubó con el patógeno por 30 min en ensayos iniciales y 24 h en los finales, respectivamente para cada concentración de Foc R1. Luego cada microcosmos fue tratado con:

- a. Células: Se adicionaron 40 mL/microcosmos de una suspensión de células de *B. amyloliquefaciens* a una DO_{600nm} de 1, con el fin de obtener una concentración final de 1×10^8 UFC/mL. Dichas células habían sido cultivadas en medio TSB por 24 h a 150 rpm, la fermentación fue centrifugada y la biomasa resuspendidas en ADE.
- b. Sobrenadante: Se adicionaron 40 mL/microcosmos de sobrenadante de *B. amyloliquefaciens*. Este fue producido mediante un cultivo de la bacteria en medio MOLP por 72 h a 150 rpm, y fue centrifugado a 4500 rpm. Debido a la cantidad de volumen y densidad del sobrenadante, este no se pudo filtrar, por lo cual contenía células bacterianas (1×10^4 UFC/mL).

Como controles se incluyeron microcosmos con aplicaciones de células aplicadas al suelo sin Foc R1, sobrenadante con células sin Foc R1 y suelo inoculado con Foc R1 sin adición de tratamiento biológico a los cuales se les adicionó 40 mL de ADE, y un control absoluto de suelo con 80 mL de ADE, para un total de 6 tratamientos. Para cada uno de los tratamientos anteriormente descrito se tenían 3 microcosmos. Durante el tiempo del ensayo, los microcosmos se mantuvieron a una temperatura de 25°C, luminosidad de 12 horas luz-oscuridad, y una humedad relativa del suelo entre el 60-70% de acuerdo a la MCRH (Maxima capacidad de retención de humedad) del sustrato.

Para el ensayo donde se inoculó Foc R1 a 1×10^3 UFC/g de suelo con 30 min de incubación, se tomaron muestras de suelo a los 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14 y 21 días después de la inoculación de los tratamientos para realizar conteos de UFC de Foc y *B. amyloliquefaciens* por gramo de suelo, esto permitió conocer las condiciones de crecimiento y desarrollo de los microorganismos en este ambiente. Ensayos posteriores con Foc a 1×10^6 UFC/g de suelo con 24 h de incubación, se tomaron muestras de suelo a los 0 y 1 día después de la inoculación con el patógeno para realizar conteos de UFC de Foc, y en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14 y 21 días después de la inoculación de los tratamientos para realizar conteos de UFC de Foc y *B. amyloliquefaciens* por gramo de suelo.

Los medios utilizados para el conteo de UFC/g de suelo de Foc R1 y *B. amyloliquefaciens* fueron SFA (Agar selectivo para *Fusarium*) (Leslie & Summerell, 2008) y TSA + Benomyl, respectivamente. El medio SFA está compuesto por KH_2PO_4 (0,5 g/L), NaNO_3 (2 g/L), dextrosa (20 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 1% (1 mL/L), extracto de levadura (1 g/L), agar (20 g/L) y cloranfenicol (200 ppm/L) para inhibir el crecimiento de *B. amyloliquefaciens*. Para el medio TSA, se adicionó Benomyl (200 ppm/L) para inhibir el crecimiento de Foc R1. Para cada microcosmos, se realizaron 3 muestreos (1 g), se realizaron diluciones seriadas en ADE y se platearon 200 uL por placa de cada muestra en los medios mencionados, y se incubaron a 25°C por 3 días para conteos de Foc R1 y 30°C por 24 h para el caso de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959).

3.2.3 Prueba de virulencia de Foc R1

Con el fin de determinar la virulencia de los tres aislamientos de Foc R1 y seleccionar un aislamiento que reprodujera la enfermedad en pruebas de biocontrol posteriores, se utilizaron plantas de banano Gros Michael (variedad altamente susceptible a Foc R1), propagadas *in vitro* y se sembraron en recipientes con 4 kg de sustrato (igual al mencionado en sección 3.2.2) sin esterilizar. Para la infección de las plantas se utilizó la metodología propuesta por Pérez-Vicente, Dita y Martínez (2014), en la cual los aislamientos de Foc R1 fueron multiplicados en medio de cultivo PDA por 7 días. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con agua destilada estéril con el fin de obtener una suspensión de microconidias la cual fue ajustada a una concentración de 1×10^6 microconidias/mL. Cuando las plantas alcanzaron 40 cm de altura (1,5 meses) se

desarraigaron del sustrato, se lavaron las raíces con agua corriente y se realizó un corte con tijeras en 2 raíces a 40 cm del pseudotallo. Posteriormente, el sistema radical fue sumergido en 200 mL de suspensión de conidias por 30 min. Como control se incluyó la inmersión de raíces en agua destilada estéril. Luego de la inoculación, las plantas se sembraron nuevamente en el sustrato. En total se realizaron 4 tratamientos (3 aislamientos de Foc y un control), cada uno de ellos con 20 unidades experimentales (plantas) en un diseño completamente al azar.

La incidencia y la severidad de la enfermedad se registraron cada 7 días, por 35 días después de la inoculación del patógeno. La incidencia expresó el porcentaje de plantas que presentaron síntomas típicos de la enfermedad, mientras que la severidad de la enfermedad expresó la intensidad de los síntomas en las plantas afectadas. La severidad se evaluó con base en la escala de 0 a 5, descrita por Cao et al. (2018) con modificaciones.

Severidad de enfermedad (%) = $[\sum (ni \times vi) \div (V \times N)] \times 100$, donde ni indica el número de plantas en cada grado de severidad; vi es el grado de severidad de 0 a 5; V = valor la escala de enfermedad más alto (5) y N = el número de plantas evaluadas. La escala de enfermedad describe la intensidad de síntomas así: 0 = sin síntomas, 1 = una a dos hojas con amarillamiento y/o rajadura de pseudotallo, 2 = tres hojas con amarillamiento, 3 = cuatro hojas con amarillamiento, 4 = cinco o más hojas con amarillamiento y 5 = planta marchita. Posteriormente, estos datos fueron utilizados para calcular el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) utilizando la fórmula descrita por Madden, Hughes y Van Den Bosch (2007). Al momento de finalizar las evaluaciones, se realizó un corte del cormo de cada planta para validar los síntomas de la enfermedad. Para ello se utilizó la escala de síntomas internos propuesta por Pérez-Vicente, Dita y Martínez, (2014) que toma valores de 0-4, los cuales corresponden a: 0= Sin síntomas; 1: Decoloración inicial del rizoma; 2: Ligera decoloración del rizoma a lo largo de todo el sistema vascular; 3: Rizoma con la mayoría de los tejidos internos necrosados; 4= Rizoma totalmente necrótico.

Durante el experimento las plantas se mantuvieron en un invernadero con temperatura promedio de 27°C y humedad relativa superior al 80%, se regaron con agua corriente cada dos días, manteniendo la MCRH del sustrato entre 60 al 70%. El programa de fertilización edáfica constó de la aplicación de 3 g de fosfato diamónico (DAP Nutrimon® 18-46-0) al

momento de la siembra, y 3 g de Urea G (Nutrimon® 46-0-0), Sulfato de amonio (SAM Nutrimon® 21-0-0-24), Abotek (Yara® 15-4-23-4) y Triple 15 (Yara® 15-15-15) a los 15, 30, 75 y 105 días después de la siembra, respectivamente, cada 7 días. Por su parte, para la fertilización foliar se preparó una mezcla de 1,5 cm³/L de Wuxal tapa negra (Bayer® 16-16-12), 1 g/L de Urea G (Nutrimon® 46-0-0) y 2,5 g/L de melaza de caña (AGRORISARALDA®), la cual se aplicó a partir de los 15 días después de la siembra, cada 7 días.

3.2.4 Bioensayo en suelo inoculado con Foc R1

Para evaluar la actividad biocontroladora de *B. amyloliquefaciens* sobre Foc R1 *in vivo*, se seleccionó la cepa IB, y se tomaron recipientes con 4 kg de sustrato compuesto por una parte de suelo (Campo experimental AUGURA) una parte de cascarilla de arroz, y una parte de arena de río, denominado como “invernadero” (análisis de suelos en Anexo IX), el cual había sido secado a temperatura ambiente durante 20 días, y se inoculó uniformemente con 250 mL de una suspensión de microconidias de Foc a una concentración de 1×10^6 microconidias/mL con el fin de obtener una concentración final de 1×10^6 UFC/g suelo. El suelo se incubó con el patógeno por 24 h de acuerdo al ensayo previo en microcosmos. Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada recipiente, 250 mL del cultivo bacteriano completo (caldo de fermentación) de *B. amyloliquefaciens*, el cual fue producido en medio MOLP por 72 h a 150 rpm, a una concentración de 1×10^9 UFC/mL. Transcurridas 24 h después de la inoculación de la bacteria, se tomaron plantas de banano Gros Michael con 40 cm de altura, las cuales provenían de cultivo *in vitro* y habían sido sembradas en recipientes con la misma cantidad e igual sustrato al anteriormente mencionado, las cuales se extrajeron para realizar un lavado y corte en dos raíces. Posteriormente, dichas plantas fueron sembradas en el sustrato inoculado con Foc R1 y *B. amyloliquefaciens*. Como control negativo se incluyó plantas sembradas en sustrato inoculado solo con Foc R1 más 250 mL de ADE, y como control absoluto plantas sembradas en sustrato al cual se le aplicaron 250 mL de ADE. En total se tuvieron 3 tratamientos, cada uno de ellos con 10 unidades experimentales (plantas) en un diseño completamente al azar. La incidencia y severidad de la enfermedad se evaluó cada 7 días, por 77 días después de la inoculación del patógeno. Para los cálculos de incidencia, severidad, ABCPE y validación de síntomas internos de la enfermedad, al igual que las

condiciones de fertilización y riego de las plantas se siguió la metodología descrita en (sección 3.2.2).

3.2.5 Bioensayo en suelo poscuarentena infectado con Foc R1

Con el fin de determinar si las aplicaciones de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en suelos poscuarentena afectados por Foc R1 reducían la incidencia y severidad de la enfermedad, se tomaron plantas de banano Gros Michael, las cuales se sembraron en recipientes de 4 kg en el sustrato descrito en (sección 3.2.5). Una vez presentaron una altura de 40 cm, se inocularon con una suspensión de microconidias de Foc R1 a una concentración de 1×10^6 microconidias/mL, siguiendo la metodología descrita en (sección 3.2.2). 20 días después de la inoculación, tiempo en que las plantas presentaron los primeros síntomas de la enfermedad (amarillamiento de hojas y rajadura de pseudotallo) cada planta fue tratada con 10 mL de glifosato (Roundup, Monsanto™, i.a. sal isopropilamina de (N-fosfonometil) glicina) al 10%, para causar la muerte de las mismas (esto con el fin de simular las condiciones de suelos similares a las encontradas en campo después de aplicar el método de cuarentena) (Dita, Echevoyén, & Pérez-Vicente, 2013). Posteriormente, el material vegetal en descomposición fue incorporado en el sustrato, y cada recipiente fue regado con agua corriente cada dos días manteniendo la MCRH entre el 60-70%. 30 días después, se realizó la aplicación de los tratamientos, de la siguiente manera:

- a. Tratamiento con *B. amyloliquefaciens*: consistió en recipientes con suelo inoculado con Foc R1, a los cuales se les aplicó 250 mL del cultivo bacteriano de *B. amyloliquefaciens* al 50% a una concentración de 5×10^8 UFC/mL, el cual fue producido en medio MOLP por 72 h a 150 rpm. La aplicación del cultivo bacteriano se realizó cada 8 días, teniendo tratamientos con diferentes números de aplicaciones por (1, 2, 3, 4 y 5) semanas del inóculo bacteriano.
- b. Tratamiento-control negativo Foc: consistió de recipientes con suelo inoculado con Foc R1 y ADE.
- c. Tratamiento-control absoluto: suelo tratado únicamente con ADE, sin presencia de Foc.

24 horas después de la aplicación de cada tratamiento, se realizó la siembra de plantas de banano Gros Michael de 40 cm de altura. Se realizó un diseño completamente al azar, donde para cada tratamiento y tiempo de inoculación bacteriana se tenían 7 plantas (unidad experimental) para un total de 105 unidades experimentales. La incidencia y severidad de la enfermedad se evaluó cada 7 días, por 63 días después de la inoculación del patógeno. Para los cálculos de incidencia, severidad, ABCPE y validación de síntomas internos de la enfermedad, al igual que las condiciones de fertilización y riego de las plantas se siguió la metodología descrita en (sección 3.2.2).

3.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el software estadístico y de programación R-project® versión 3.4.4 (2018-03-15). Para cada experimento se verificó el supuesto de normalidad, igualdad de varianzas e independencia mediante las pruebas de Shapiro-Wilks, Levene y Durbin Watson, respectivamente.

Para analizar las diferencias entre los tratamientos en la prueba en microcosmos (UFC/g suelo), prueba de patogenicidad de Foc R1 (ABCPE), pruebas de bioensayo en suelo inoculado artificialmente y en poscuarentena (ABCPE), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre las medias de los tratamientos fue evaluada mediante de la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% (Anexos X al XIII).

3.3 Resultados y discusión

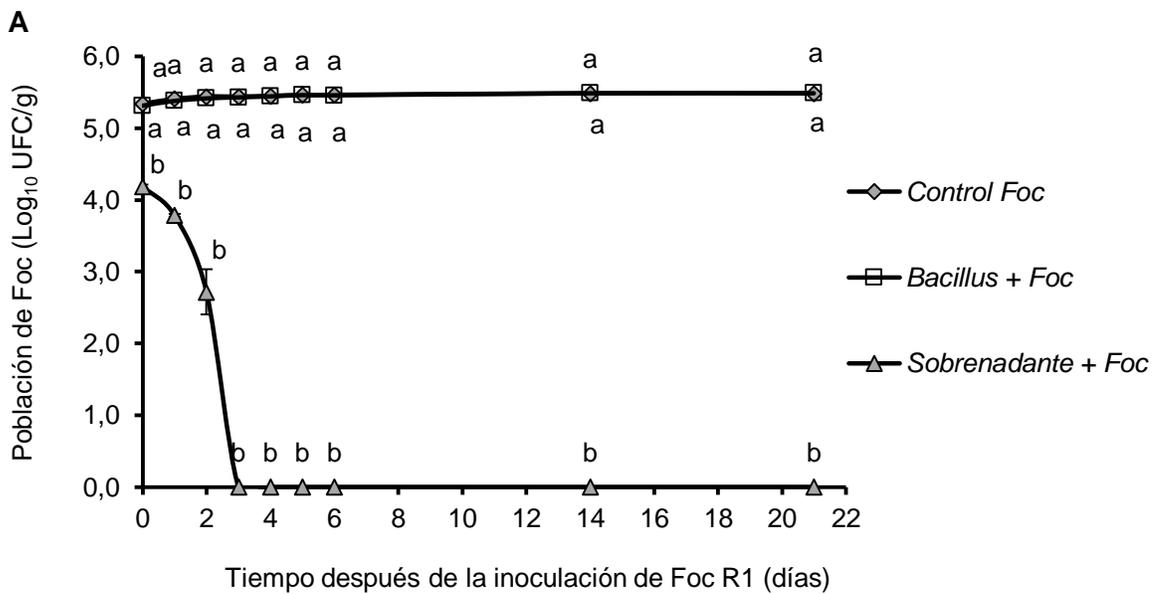
3.3.1 Pruebas en microcosmos

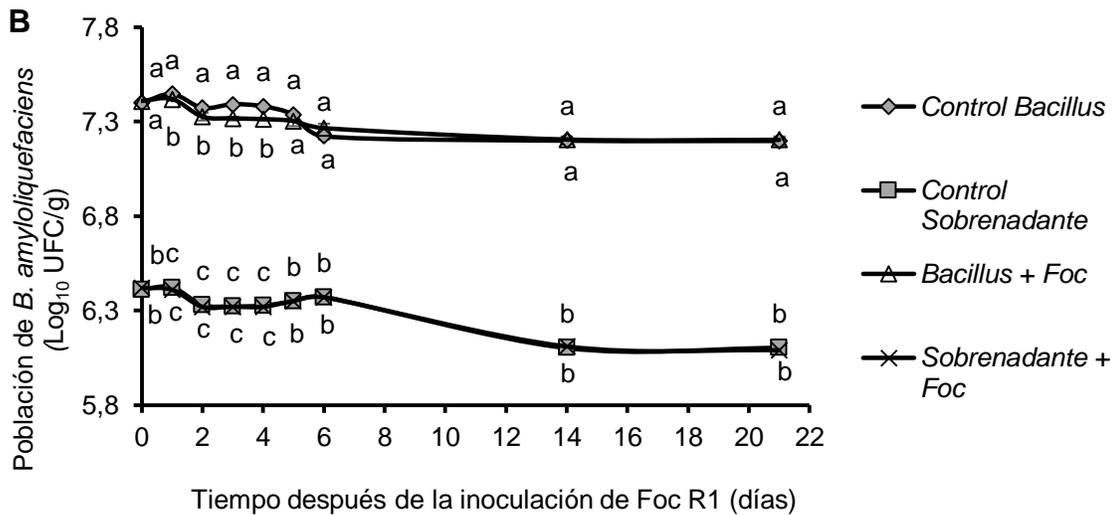
Para el ensayo de microcosmos donde se inoculó Foc R1 a una concentración de 1×10^3 y 30 min después se aplicaron los tratamientos, se determinó que el sobrenadante con células de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) redujo significativamente, la población de Foc R1 de forma progresiva, desde el momento de la aplicación donde la población del patógeno se encontraba en $1,5 \times 10^4$ UFC/g de suelo húmedo, hasta 3 ddi, tiempo en el cual no se obtuvieron colonias del patógeno (Figura 3-1A). De forma contraria, el tratamiento con células de la bacteria no redujo la población del patógeno, la cual fue

similar a la presentada por el control de Foc, oscilando entre 2×10^5 y $3,1 \times 10^5$ UFC/g de suelo húmedo, a los 21 días de evaluación (Figura 3-1A).

De otro modo, se determinó que las poblaciones de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en el tratamiento con células y sobrenadantes, iniciaron con una población de $2,5 \times 10^7$ y $2,5 \times 10^6$ UFC/g de suelo húmedo, respectivamente; presentando un crecimiento entre los 0 y 1 ddi, y reduciéndose hasta conseguir una estabilidad entre los 14 y 21 ddi, con poblaciones finales de $1,2 \times 10^7$ y $1,2 \times 10^6$ UFC/g de suelo húmedo, respectivamente. (Figura 3-1B). Se observó que la presencia de Foc afectó la población de *B. amyloliquefaciens* entre 1 y 4 ddi, solo en el tratamiento con células, mientras en los demás tiempos y en el tratamiento con sobrenadante, no se vio un efecto del patógeno sobre el ACB (Figura 3-1B).

Figura 3-1. Dinámica y control del sobrenadante y células de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en microcosmos inoculados con Foc R1 (1×10^3 UFC/mL).



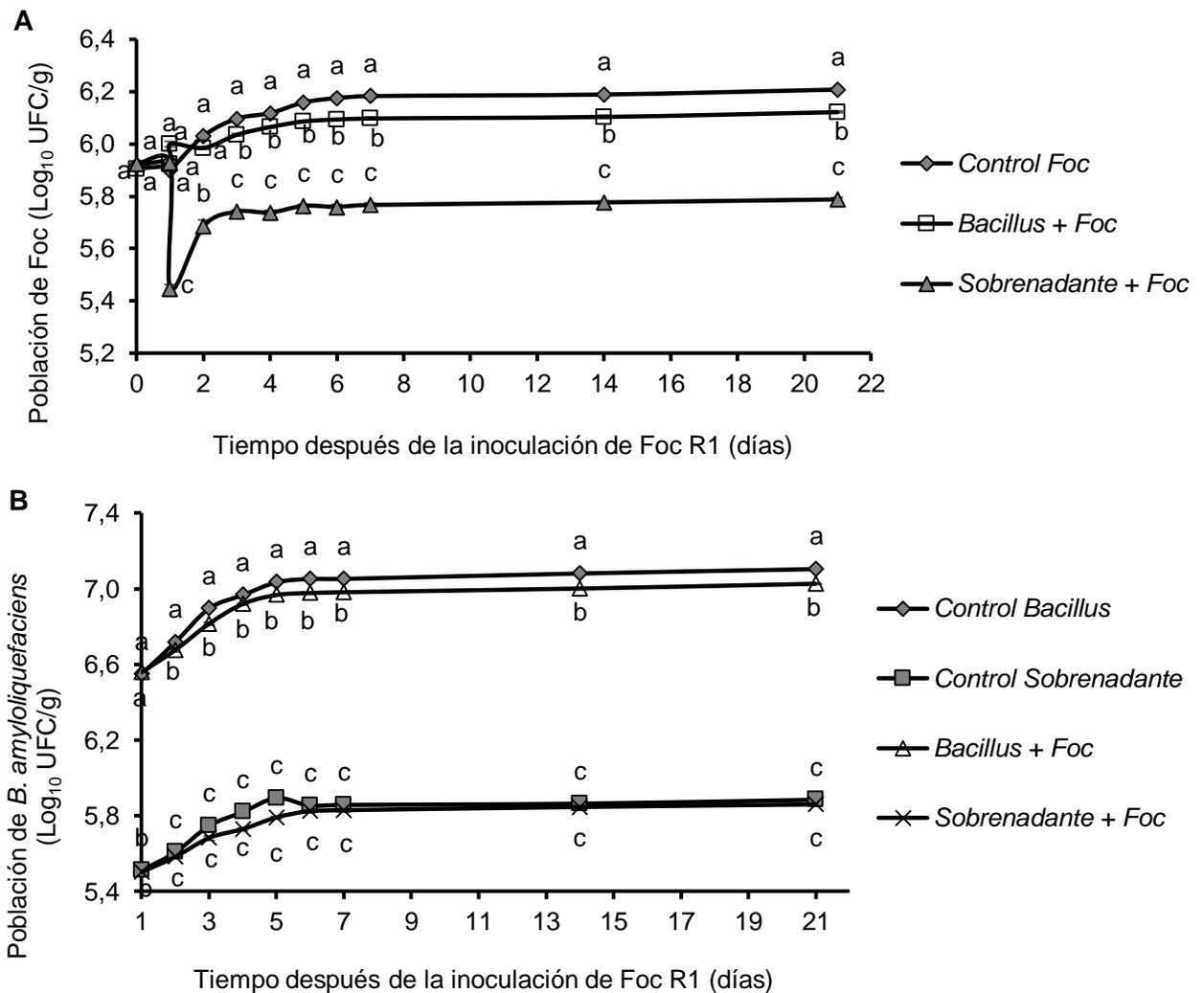


UFC/g de suelo húmedo de (A) Foc R1 y (B) *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en microcosmos. La aplicación de los tratamientos con el ACB se realizó 30 min después de la inoculación del patógeno. Tratamientos con la misma letra en cada tiempo no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras en las columnas representan la desviación estándar de los datos ($n = 9$).

Por su parte, para los microcosmos que fueron inoculados con una mayor concentración de Foc R1 (1×10^6 UFC/mL), se comprobó que la población del patógeno 1 ddi fue de $8,6 \times 10^5$ UFC/g de suelo húmedo (Figura 3-2A). Sin embargo, después de la aplicación de los tratamientos, se determinó que el sobrenadante + células de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) redujo significativamente la población de Foc R1, hasta una concentración de 6×10^5 UFC/g de suelo húmedo, la cual se mantuvo constante entre los 5 a 21 ddi (Figura 3-2A). De forma contraria al ensayo de microcosmos anteriormente mencionado (Figura 3-1), el tratamiento con células bacterianas causó una reducción significativa de la población del patógeno en comparación con el control de Foc, entre los 3 y 21 ddi, obteniendo una población final del patógeno de $1,3 \times 10^6$ UFC/g de suelo húmedo (Figura 3-2A), sin embargo, es una reducción mínima, puesto que la población del patógeno en el tratamiento control fue de $1,6 \times 10^6$ UFC/g de suelo húmedo a los 21 ddi (Figura 3-2A). En total, el porcentaje de reducción de inóculo fue de 18,5 y 61,7% para el tratamiento con células y sobrenadantes, respectivamente. Por su parte, la población de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) se vio levemente reducida en presencia de Foc en

todos los tiempos de evaluación para el tratamiento con células, obteniendo una población final $9,9 \times 10^6$ UFC/g de suelo húmedo, en comparación con el control $1,2 \times 10^7$ UFC/g de suelo húmedo. De forma similar, la población de la bacteria se vio afectada en el tratamiento con sobrenadante + Foc entre los 3 y 5 ddi, sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente diferente a la del tratamiento control con sobrenadante, observándose una estabilización de las poblaciones que se equipararon al final del experimento, con $7,6 \times 10^5$ UFC/g de suelo húmedo para ambos tratamientos (Figura 3-2B).

Figura 3-2. Dinámica y control del sobrenadante y células de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en microcosmos inoculados con Foc R1 (1×10^6 UFC/mL).



UFC/g de suelo húmedo de **(A)** Foc R1 y **(B)** *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en microcosmos. La aplicación de los tratamientos con el ACB de realizaron 1 ddi del patógeno. Tratamientos con la

misma letra en cada tiempo no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras en las columnas representan la desviación estándar de los datos ($n = 9$).

Los resultados obtenidos en los anteriores ensayos difieren a lo reportado por Zacky & Ting (2013) quienes determinaron que las células de *Streptomyces griseus* reducen la población de Foc R4T de $7 \log_{10}$ a $6 \log_{10}$ UFC/g de suelo, con respecto al control de Foc, 20 ddi en microcosmos; mientras que los extractos crudos (sobrenadantes) de esta bacteria no tuvieron un efecto inhibitorio significativo, a pesar de que las enzimas quitinasa y 1,3-glucanasa, compuestos a los cuales se les atribuyó la actividad antifúngica de esta cepa, estaban en mayor concentración en los extractos crudos con respecto a las células en ensayos previos *in vitro*. Estos resultados pueden sugerir que las enzimas no son estables en el suelo, por lo cual la aplicación de estos compuestos no tiene efecto inhibitorio, tal cual lo corrobora Anitha y Rabeeth (2009), quienes determinaron que las células de *S. griseus* pueden reducir la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) puesto que la bacteria puede producir constantemente más cantidad de enzimas, mientras los extractos crudos van a tener una concentración definida y no son estables a factores ambientales.

Contrario a las observaciones anteriormente mencionadas, los CLPs, posibles compuestos de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) que están ejerciendo la actividad antifúngica contra Foc R1 en microcosmos, no son fácilmente detectados en suelos (Debois *et al.*, 2015), debido a que estos se producen en muy bajas cantidades y posiblemente migran rápidamente a la membrana del organismo al cual va a atacar; además, las condiciones físico-químicas de la rizósfera y la gran cantidad compuestos orgánicos presentes en el suelo, limitan dicha identificación (Ongena & Jacques, 2008; Nihorimbere *et al.*, 2012; Debois *et al.*, 2014). Por ende, la producción de CLPs se realiza en medios de cultivo líquidos, donde se estimula la producción en grandes cantidades de estos compuestos (Debois *et al.*, 2015). De esta manera, se puede sugerir que las células de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) no producen la cantidad suficiente de CLPs en suelo para reducir la población de Foc R1, mientras la fermentación en medio MOLP permite obtener un sobrenadante con mayor cantidad de estos compuestos que son estables en el suelo (Shoda, 2000) y poseen alta actividad antifúngica, además de que este fermentado contiene células para colonizar el suelo.

La reducción de inóculo de *Fusarium oxysporum* por parte de células de bacterias biocontroladoras o sus productos derivados, se analiza en la mayoría de estudios con la presencia de la planta, puesto que se ha determinado que los exudados de la raíz juegan un rol determinante en la colonización y producción de compuestos antimicrobianos por parte del ACB (Berendsen, Pieterse & Bakker, 2012; Debois *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2016). Por ejemplo, Cao *et al.* (2011) determinaron que la mezcla de *B. subtilis* SQR 9 con fertilizante bio-orgánico redujo la población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* (FOC) de $1,95 \times 10^6$ a $0,1 \times 10^5$ UFC/g de raíz en plantas de pepino, lo que se reflejó en una disminución de la incidencia de la enfermedad. Además, en dicho estudio se determinó que la población del ACB se incrementa en los dos primeros días, luego decrece y se estabiliza en un rango de 10^6 a 10^7 UFC/g suelo, de forma similar a lo observado en los dos ensayos realizados con *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en la presente investigación. Cabe resaltar, que la colonización de *Bacillus* en raíces de banano se ha vinculado como un posible mecanismo de protección ante el ataque de Foc (Zhang *et al.*, 2011). Por su parte, Grosu *et al.* (2015) determinaron que las cepas de *B. amyloliquefaciens* B3 y B8 redujeron la carga fúngica de *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum* en microcosmos con plantas de trigo, en porcentajes que oscilaron entre 72 y 86%, valores similares a los encontrados en las aplicaciones del sobrenadante de EA-CB0959.

Los anteriores hallazgos permiten sugerir que la aplicación del sobrenadante de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) puede reducir el inóculo de Foc R1 en suelos y, por ende, posiblemente puede reducir la incidencia y severidad de la enfermedad en ensayos *in vivo*, promoviendo además la colonización de la bacteria, puesto que este sobrenadante cuenta con células. Sin embargo, esta hipótesis debe comprobarse en suelo natural puesto que en este estudio se utilizó suelo estéril. Además, se requiere de bioformulaciones que permitan mantener viables tanto los compuestos antimicrobianos como las células bacterianas, punto clave en la eficacia de los ACB.

3.3.2 Prueba de virulencia de Foc R1

Los primeros síntomas de la enfermedad se presentaron a los 14 días después de la inoculación (ddi) (datos no mostrados) para los 3 aislamientos de Foc R1. Pasados 35 ddi,

el 100% de las plantas infectadas con cada hongo presentaban síntomas (Tabla 3-1). Los índices de severidad de la enfermedad medida tanto externa como internamente mostraron que los aislamientos más virulentos sobre banano Gros Michael fueron IB y VR, lo cual se confirmó con el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), donde no se presentaron diferencias significativas entre estos tratamientos (Tabla 3-1). De acuerdo con esta prueba, se seleccionó el aislamiento IB para continuar con las pruebas en bioensayos.

Tabla 3-1. Evaluación de virulencia de diferentes aislados de Foc R1 en plantas de banano Gros Michael.

AISLAMIENTO	Incidencia (%)	Índice de enfermedad (%)		ABCPE
		Externos	Internos	
VR	100	93	65	1256 ± 68 a
IB	100	81	67,5	1123 ± 64 a
VE	100	77	56.2	738 ± 50 b

ddi: Días después de la inoculación, IB: Isla Bonita, VR: Varonesa, VE: Villa Ester.

Las diferencias significativas en el ABCPE de los aislamientos de Foc se indican con letras diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de ($n = 20$).

Conocer la virulencia de diferentes cepas de fitopatógenos es de vital importancia en la investigación de agentes de control biológico. Para el caso específico de Foc, Caballero (2011) encontró diferencias en la efectividad de cepas de *Trichoderma* sobre Foc R1, en banano Gros Michael en Costa Rica. Además, las cepas de Foc R1 y R4T pueden tener diferentes niveles de patogenicidad en las variedades de banano (Costa *et al.*, 2015) conocimiento que se constituye en un paso esencial en el desarrollo de métodos de control de la marchitez por *Fusarium* (Ordoñez *et al.*, 2015). Por tales motivos, para las pruebas *in vivo*, se seleccionó la cepa IB, patógeno en el cual se realizó la selección de microorganismos en condiciones *in vitro* (Capítulos 1 y 2), y que demostró alta patogenicidad en banano Gros Michael.

3.3.3 Bioensayo en suelo contaminado con Foc R1

Para las plantas del tratamiento donde solamente se aplicó Foc (Control Foc) se observó que las plantas empezaron a presentar síntomas de la enfermedad a los 7 días después de la inoculación, mientras que las plantas tratadas con *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) los síntomas se hicieron visibles 14 ddi (Tabla 3-2). De igual manera, se determinó una mayor incidencia en el tratamiento con Foc, puesto que 21 ddi el total de las plantas ya presentaban síntomas externos, mientras que en el tratamiento con *Bacillus* un 30% de las plantas se mantuvieron aparentemente sanas hasta 63 ddi (Tabla 3-2). De acuerdo con los datos obtenidos con el índice de enfermedad (IE) de síntomas externos, se observó una mayor agresividad para el tratamiento control Foc en todos los tiempos de evaluación en comparación con el tratamiento con *Bacillus* spp. Sin embargo, tras tomar estos datos para calcular el ABCPE acumulado para cada semana de evaluación, se pudo establecer que solamente hasta el día 28 ddi hay una diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 3-2). De igual forma, al finalizar el ensayo, se determinó un mayor IE de síntomas externos e internos para el tratamiento control Foc en comparación con el tratamiento de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959), obteniendo una reducción del 20 y 5%, respectivamente, por parte del ACB.

Tabla 3-2. Efecto de la aplicación del cultivo bacteriano de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) sobre el desarrollo de la marchitez por *Fusarium* en banano Gros Michael.

ddi	Control Foc			<i>Bacillus</i> + Foc			% de control*	
	Incidencia (%)	IE (%)		ABCPE	Incidencia (%)	IE (%)		
		Ext	Int				Ext	Int
7	30	6		21 ± 11 a	0	0	0 ± 0 a	0
14	80	26		133 ± 37 a	30	8	28 ± 11 b	69,2
21	100	40		364 ± 88 a	70	20	126 ± 39 b	50
28	100	60		714 ± 141 a	70	42	343 ± 93 b	30
35	100	68		1162 ± 191 a	70	48	658 ± 173 a	33,3
42	100	68	90	1638 ± 242 a	70	48	994 ± 259 a	33,3
49	100	70		2121 ± 295 a	70	60	1372 ± 352 a	14,3
56	100	70		2611 ± 348 a	70	66	1813 ± 450 a	5,7
63	100	78		3129 ± 395 a	70	70	2289 ± 548 a	10,3
70	100	88		3710 ± 426 a	90	74	2793 ± 640 a	15,9
77	100	92		4340 ± 728 a	90	74	3311 ± 728 a	20,5

ddi: Días después de la inoculación, IE: Índice de enfermedad, Ext: Externos, Int: Internos.

*% de control con respecto al índice de enfermedad de síntomas externos.

El ABCPE para cada ddi corresponde al valor acumulado. Tratamientos con la misma letra en cada tiempo no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de ($n = 10$).

Las plantas del control absoluto (sin inoculación de patógeno y/o ACB) no presentaron ningún síntoma de la enfermedad, y no fueron incluidos dentro de la comparación.

Se ha documentado que el éxito del control biológico contra fitopatógenos del suelo, se ve promovido cuando el ACB se aplica algunos días antes de la inoculación del patógeno (Raza *et al.*, 2016). No obstante, hasta donde se conoce, los productores de banano a nivel mundial, no realizan aplicaciones preventivas de ACB (Liu & Prada, 2018). En el presente estudio, se realizó la aplicación del fitopatógeno 24 h antes de la aplicación de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959). Siguiendo esta misma propuesta, Cao *et al.* (2018) determinaron que la aplicación de *Bacillus velezensis* (Y6) 48 ddi de Foc R4T, redujo en un 48% el índice de enfermedad 30 ddi, un porcentaje mucho más alto al encontrado en el presente estudio, donde se determinó un 30 a 33% de control entre los 28 y 35 ddi. Sin embargo, en el caso de Cao *et al.* (2018) la inoculación del patógeno se realizó por inmersión de raíces en una suspensión de 1×10^6 conidias/mL por 30 min, un método de inoculación mucho más directo donde el ACB puede encontrarse desfavorecido, razón por la cual la forma de inoculación y la concentración del patógeno son factores vitales en las pruebas con ACB, puesto que se ha encontrado que el nivel de protección que le puede brindar el microorganismo a la planta depende de la proporción patógeno-ACB (Alabouvette *et al.*, 2009; Moreno, 2017).

Cabe destacar, que las poblaciones de Foc que están presentes en un suelo infectado con el patógeno, no han sido cuantificadas con exactitud. Por ejemplo (Deltour *et al.*, 2016) estimaron que la cantidad máxima de *Fusarium* spp., en diferentes predios afectados por Foc R1, fue de 3,3 log UFC/g de suelo, lo que corresponde a $2,1 \times 10^3$ UFC/g suelo; mientras que en suelos contaminados con Foc R4T se ha estimado un máximo de $1,2 \times 10^3$ conidias/g suelo (García-Bastidas, 2016). Para las condiciones experimentales del presente estudio se realizó una inoculación del patógeno a una concentración de 1×10^6 UFC/mL y de 1×10^9

UFC/mL para el caso de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959). Sin embargo, múltiples estudios de control biológico para Foc, no tienen en cuenta estas proporciones en el suelo. Por ejemplo, Sun et al. (2011) determinaron que la aplicación de 10 mL de *B. subtilis* (KY-21) a una concentración de 5×10^5 UFC/g suelo, dos semanas antes de la aplicación de Foc R4 (igual concentración y volumen), generaba una reducción del índice de enfermedad con síntomas internos y externos en un 49 y 62%, respectivamente, 60 ddi, donde enzimas como polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) estaban en altas concentraciones, lo cual se relaciona con los hallazgos de Akila et al. (2011) quienes encontraron estas mismas enzimas relacionadas con la reducción de la incidencia (37,1%) de Foc R1 *Bacillus subtilis* (TRC 54).

3.3.4 Bioensayo en suelo poscuarentena infectado con Foc R1

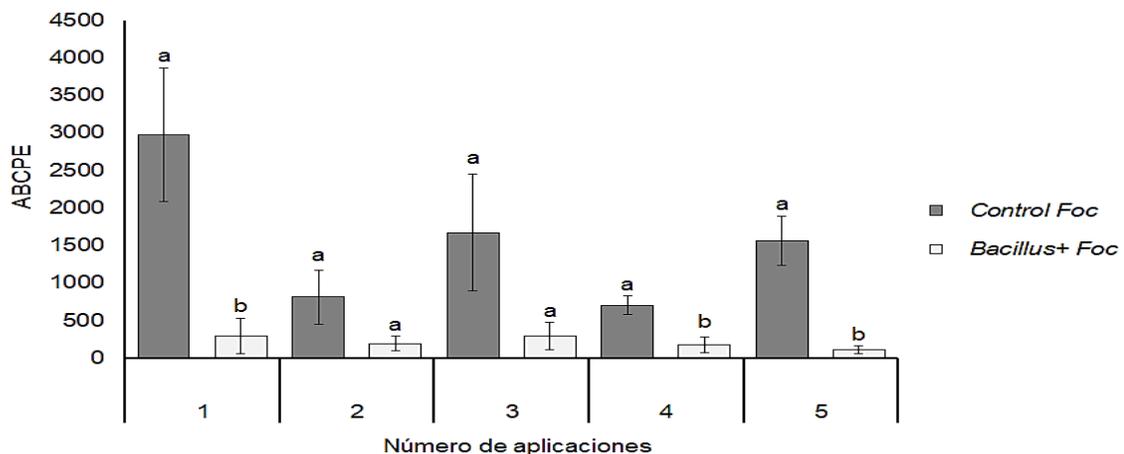
Tras la aplicación sucesiva del cultivo bacteriano de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) sobre suelo poscuarentena infestado con Foc R1, se pudo determinar que, la incidencia y el índice de enfermedad tanto de síntomas externos como internos, fue más bajo en el tratamiento con *Bacillus* con respecto al control negativo (suelo con Foc) 63 ddi, en los diferentes números de aplicaciones del ACB (Tabla 3-3). La incidencia de la enfermedad estuvo entre un 28,6 a un 42,9% para los suelos tratados con el ACB, mientras para el control de Foc la incidencia fue del 100% (Tabla 3-3), lo cual se corroboró con la evaluación de síntomas internos de la enfermedad. Observando el índice de enfermedad de síntomas externos, se pudo encontrar que las aplicaciones de *Bacillus* controlaron la marchitez por *Fusarium* entre 74 y 88%, siendo este último valor, el obtenido después de realizar 5 aplicaciones semanales (una por semana) a suelos infectados con el patógeno, antes de realizar la siembra de las plantas. De igual forma, tras analizar el ABCPE del índice de síntomas externos, se observó una reducción significativa de la enfermedad para los suelos tratados con 1, 4 y 5 aplicaciones consecutivas del ACB (Figura 3-3).

Tabla 3-3. Efecto de aplicaciones del cultivo bacteriano de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) sobre el desarrollo de la marchitez por *Fusarium* en banano Gros Michael en suelos poscuarentena.

Número de aplicaciones	Tratamiento	Incidencia (%)	Índice de enfermedad (%)		% de control*
			Externos	Internos	
1	Control Foc	85,7	65,7	82	78,2
	<i>Bacillus</i> + Foc	28,6	14,3	29	
2	Control Foc	100	51,4	46	83,3
	<i>Bacillus</i> + Foc	42,9	8,6	21	
3	Control Foc	100	54,3	57	73,7
	<i>Bacillus</i> + Foc	42,9	14,3	29	
4	Control Foc	100	34	54	74,7
	<i>Bacillus</i> + Foc	42,9	8,6	11	
5	Control Foc	100	74,3	79	88,4
	<i>Bacillus</i> + Foc	42,9	8,6	14	

*% de control con respecto al índice de enfermedad de síntomas externos.

Figura 3-3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad marchitez por *Fusarium* en plantas de banano Gros Michael sembradas en suelo poscuarentena tratado con aplicaciones consecutiva de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en cinco diferentes experimentos.



El análisis estadístico del ABCPE se realizó de manera individual para cada número de aplicaciones. Las diferencias significativas en el ABCPE entre los tratamientos se indican con letras diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar de ($n = 7$).

Hasta el momento, ningún estudio ha evaluado el efecto de ACB en suelos poscuarentena infectados con Foc. Se debe destacar que, aunque el glifosato es la única herramienta para la erradicación de plantas de banano infectadas con marchitez *Fusarium* (Dita, Echegoyén, & Pérez-Vicente, 2013), en los últimos años se ha especulado que este producto induce la producción de clamidosporas, sin embargo, hasta el momento no ha sido comprobado (Dita *et al.*, 2018).

Enfoques que involucren las condiciones de campo han sido evaluados recientemente para el control biológico de Foc. Por ejemplo, la aplicación del biofertilizante BIO compuesto por *B. amyloliquefaciens* (NJN-6) y compost, redujo la incidencia de Foc R4 en 68,5% en aplicaciones en campo (Xue *et al.*, 2015). Bajo esta misma metodología, Wang *et al.* (2016) reportaron una reducción en la incidencia de la marchitez por *Fusarium* entre un 43 a 45% en pruebas en campo, tras aplicar *B. amyloliquefaciens* (W19) cepa que bajo cultivo *in vitro* produce altas cantidades de iturinas y bacilomicina D. Además, se debe destacar que la aplicación de ACB como *Bacillus* inducen la supresión *Fusarium oxysporum*, no solo por sus mecanismos de acción directos, sino también, a través de la alteración del microbioma del suelo (Xiong *et al.*, 2017). Específicamente en el patosistema Foc R4T-Banano, se ha determinado que la aplicación continua del biofertilizante con *B. amyloliquefaciens* (NJN-6) cambia la composición de la comunidad microbiana de la rizósfera, incrementando la abundancia de bacterias benéficas, y reduciendo la cantidad de géneros microbianos potencialmente patogénicos como *Fusarium*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (Fu *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2017), lo cual es importante en el manejo de Foc, puesto que se ha determinado que el microbioma del suelo se altera en el monocultivo de banano a través de los años, lo cual se ha correlacionado con una mayor incidencia de la marchitez por *Fusarium* (Shen *et al.*, 2018).

En búsqueda de otras alternativas para el control de la marchitez por *Fusarium*, Kavino y Manoranjitham (2018) determinaron que aplicaciones tempranas de *B. subtilis* (EPB56), *P.*

fluorescens (EPB10) y (Pf1) en fases de micropropagación *in vitro* generan una reducción del 74 y 78% del índice de enfermedad de la marchitez por *Fusarium* R1 bajo condiciones de invernadero y campo. Mientras que Shen et al. (2019) proponen fumigaciones con amonio a suelos infectados con Foc R4 para reducir la población del patógeno, y posteriormente incorporar biofertilizantes a base de materia orgánica para reestablecer las comunidades microbianas del suelo.

Todas estas perspectivas evidencian que para obtener un control biológico exitoso se deben tener en cuenta múltiples factores que ocurren en la interacción planta-patógeno, y así favorecer aquellos que pueden beneficiar a la planta, entre los cuales es de vital importancia, la reducción de la viabilidad del patógeno, es decir, la densidad de la población y/o la funcionalidad, lo cual va a afectar la capacidad de infectar al huésped (Khan, Maymon & Hirsch, 2017). Se debe resaltar que estas prácticas de control biológico, orientadas a reducir la población del patógeno y mejorar la salud del suelo, son actividades a largo plazo. Sin embargo, los agricultores buscan respuestas rápidas con pesticidas, herbicidas o fertilizantes que terminan empeorando el problema (Dita *et al.*, 2018). Los resultados en conjunto del presente estudio permiten sugerir que *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) puede ser utilizado como una alternativa para reducir el inóculo de Foc R1 en suelos contaminados con el patógeno, y que aplicaciones en suelos poscuarentena pueden reducir en la incidencia y la severidad de la enfermedad. Cabe destacar, que aún quedan múltiples preguntas por resolver, entorno a encontrar un control integrado para la marchitez por *Fusarium*, en donde la aplicación de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) se combine con enfoques como el mejoramiento vegetal, la aplicación de la bacteria a plántulas en fases de micropropagación, el mejoramiento de la formulación y el posible efecto que pueda estar ejerciendo este ACB sobre las redes ecológicas del suelo.

3.4 Conclusiones

- Los ensayos en microcosmos permitieron establecer que las células de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) no tienen la capacidad de reducir la población de Foc R1 en suelo estéril, mientras que el caldo de fermentación de la bacteria en medio líquido disminuyó la población del patógeno en 100 y 61,7% cuando Foc R1 se aplica a 1×10^3 y 1×10^6 microconidias/mL, respectivamente.
- Los aislamientos de Foc R1 Varonesa (VR) e Isla Bonita (IB) demostraron ser los más virulentos en plantas de banano Gros Michael, por lo cual se seleccionó la cepa IB para pruebas *in vivo*.
- *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) presenta una tendencia a la reducción de la incidencia y severidad de la marchitez por *Fusarium* en suelos contaminados artificialmente con Foc R1, sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa a partir del día 28 después de la inoculación del patógeno.
- Las aplicaciones consecutivas *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en suelos poscuarentena, redujeron la incidencia y la severidad de la marchitez por *Fusarium*, herramienta biológica que ayudará a reducir la población del patógeno y a la rehabilitación de suelos contaminados con Foc R1.

Bibliografía

- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. *Biological control*, 57(3), 175-183.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184(3), 529-544.
- Anitha, A., & Rabeeth, M. (2009). Control of *Fusarium* wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. *Afr J Basic Appl Sci*, 1, 9-14.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In *Bacteria in agrobiología: Plant growth responses* (pp. 41-76). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Borriss, R. (2015). *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. In *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 379-391). Springer, Cham.
- Cubica, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in microbiology*, 10, 616.
- Caballero, A. J. (2011). *Uso de hongos endofíticos de Trichoderma spp., para el biocontrol del mal de Panamá (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) raza 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA)*. (Tesis de Maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba. Costa Rica.

- Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., & Shen, Q. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 495-506.
- Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., ... & Shen, Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia horticulturae*, 135, 32-39.
- Cao, Y., Pi, H., Chandransu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., ... & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific reports*, 8(1), 4360.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial biotechnology*, 8(2), 281-295.
- Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., ... & Borriss, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of biotechnology*, 140(1-2), 27-37.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 780.
- Costa, S. N., Bragança, C. A. D., Ribeiro, L. R., Amorim, E. P., Oliveira, S. A. S., Dita, M. A., ... & Haddad, F. (2015). Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil. *Plant pathology*, 64(1), 137-146.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

- Debois, D., Jourdan, E., Smargiasso, N., Thonart, P., De Pauw, E., & Ongena, M. (2014). Spatiotemporal monitoring of the antibiome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Analytical chemistry*, 86(9), 4431-4438.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., De Brogniez, A., Willems, L., ... & Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental microbiology reports*, 7(3), 570-582.
- Deltour, P., França, S. C., Pereira, O. L., Cardoso, I., De Neve, S., Debode, J., & Höfte, M. (2017). Disease suppressiveness to *Fusarium* wilt of banana in an agroforestry system: influence of soil characteristics and plant community. *Agriculture, ecosystems & environment*, 239, 173-181.
- Dita, M. A., Echegoyén, P. E., & Pérez-Vicente, L. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en un país de la región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria – OIRSA. 155pp. San Salvador, El Salvador.
- Dita, M. A., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S., & Staver, C. P. (2018). *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in plant science*, 9.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 337-359.
- Fu, L., Ruan, Y., Tao, C., Li, R., & Shen, Q. (2016). Continuous application of bioorganic fertilizer induced resilient culturable bacteria community associated with banana *Fusarium* wilt suppression. *Scientific Reports*, 6, 27731.

- García-Bastidas, F. A. (octubre, 2016). Mal de Panamá en banano: Soluciones multinivel para un problema global. En: VI *Reunión Técnica Bananera de Colombia*. Santa Marta, Colombia.
- Garbeva, P., Hol, W. G., Termorshuizen, A. J., Kowalchuk, G. A., & De Boer, W. (2011). Fungistasis and general soil biostasis—a new synthesis. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3), 469-477.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 1-15.
- Glick, B. R. (2015). Introduction to plant growth-promoting bacteria. In *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* (pp. 1-28). Springer, Cham.
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *Annual review of phytopathology*, 55, 23-39.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., & Annapurna, K. (2010). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 333-364). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Grosu, A. I., Siciua, O. A., Dobre, A., Voaideş, C., & Cornea, C. P. (2015). Evaluation of Some *Bacillus* spp. strains for the Biocontrol of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* in Wheat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, 559-566.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., ... & Kolstø, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—

- one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6), 2627-2630.
- Huang, J., Pang, Y., Zhang, F., Huang, Q., Zhang, M., Tang, S., ... & Li, P. (2019). Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. *European Journal of Plant Pathology*, 1-12.
- Khan, N., Maymon, M., & Hirsch, A. (2017). Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. *Microorganisms*, 5(4), 75.
- Kavino, M., & Manoranjitham, S. K. (2018). *In vitro* bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: Novel ways to combat *Fusarium* wilt. *European journal of plant pathology*, 151(2), 371-387.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.
- Liu, P., & Prada, V. (2018). World Banana Forum. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/economic/worldbananaforum/en/>.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Madden, L. V., Hughes, G., & Van Den Bosch, F. (2007). The study of plant disease epidemics.
- McHughen, A., & Wager, R. (2010). Popular misconceptions: agricultural biotechnology. *New biotechnology*, 27(6), 724-728.

- McSpadden Gardener, B. B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94(11), 1252-1258.
- Moebius-Clune, B. N., Moebius-Clune, D. J., Guagino, B. K., Idowu, O. J., Schindelbeck, R. R., Ristow, A. J., van Es, H. M., Thies, J. E., Shayler, H. A., McBride, M. B., Wolfe, D. W., & Abawi, G. S. (2016). Comprehensive assessment of soil health. The Cornell framework manual. 3rd edition. Cornell University, Geneva, NY.
- Moreno, C.A. (2017). *Interactions between Bacillus amyloliquefaciens Bs006, Fusarium oxysporum Map5 and Cape gooseberry (Physalis peruviana)*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection*, 26(4), 697-705.
- Nelson, P. E. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. *Fungal wilt diseases of plants*, 51-80.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., & Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement= Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 15(2), 327-337.
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 176-191.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.

- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(1), 29.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Ordóñez, N., Seidl, M. F., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B. P., ... & Kema, G. H. (2015). Worse comes to worst: bananas and Panama disease—when plant and pathogen clones meet. *PLoS pathogens*, 11(11), e1005197.
- Pérez-García, A., Romero, D., & De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187-193.
- Pérez-Vicente, L., Dita, M., & Martínez, E. (2014). Technical Manual: Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 (R4T). FAO.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Raza, W., Ling, N., Zhang, R., Huang, Q., Xu, Y., & Shen, Q. (2016). Success evaluation of the biological control of *Fusarium* wilts of cucumber, banana, and tomato since 2000 and future research strategies. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 202-212.
- Romero, D., De Vicente, A., Olmos, J. L., Dávila, J. C., & Pérez-García, A. (2007). Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podospaera fusca*. *Journal of applied microbiology*, 103(4), 969-976.

- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2011). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 141-172.
- Royal Botanic Gardens, Kew. (2016). The state of the world's plants report–2016. *Royal Botanic Gardens, Kew, UK*. Recuperado de https://stateoftheworldsplants.org/2016/report/sotwp_2016.pdf.
- Schenk, P. M., Carvalhais, L. C., & Kazan, K. (2012). Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends in biotechnology*, 30(3), 177-184.
- Shen, Z., Penton, C. R., Lv, N., Xue, C., Yuan, X., Ruan, Y., ... & Shen, Q. (2018). Banana *fusarium* wilt disease incidence is influenced by shifts of soil microbial communities under different monoculture spans. *Microbial ecology*, 75(3), 739-750.
- Shen, Z., Xue, C., Penton, C. R., Thomashow, L. S., Zhang, N., Wang, B., ... & Shen, Q. (2019). Suppression of banana Panama disease induced by soil microbiome reconstruction through an integrated agricultural strategy. *Soil Biology and Biochemistry*, 128, 164-174.
- Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant disease. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(6), 515-521.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857.
- Sun, J. B., Peng, M., Wang, Y. G., Zhao, P. J., & Xia, Q. Y. (2011). Isolation and characterization of antagonistic bacteria against *Fusarium* wilt and induction of defense related enzymes in banana. *African Journal of Microbiology Research*, 5(5), 509-515.

- Vitullo, D., Di Pietro, A., Romano, A., Lanzotti, V., & Lima, G. (2012). Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 61(4), 689-699.
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, R., ... & Shen, Q. (2013). Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 435-446.
- Wang, B., Shen, Z., Zhang, F., Raza, W., Yuan, J., Huang, R., ... & Shen, Q. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* strain W19 can promote growth and yield and suppress *Fusarium* wilt in banana under greenhouse and field conditions. *Pedosphere*, 26(5), 733-744.
- Xiong, W., Guo, S., Jousset, A., Zhao, Q., Wu, H., Li, R., ... & Shen, Q. (2017). Bio-fertilizer application induces soil suppressiveness against *Fusarium* wilt disease by reshaping the soil microbiome. *Soil Biology and Biochemistry*, 114, 238-247.
- Xue, C., Penton, C. R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., ... & Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific reports*, 5, 11124.
- Zacky, F. A., & Ting, A. S. Y. (2013). Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *Biological control*, 66(3), 204-208.
- Zhao, Q., Ran, W., Wang, H., Li, X., Shen, Q., Shen, S., & Xu, Y. (2013). Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. *BioControl*, 58(2), 283-292.
- Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S. Q., Zhang, Z. H., Shen, B., ... & Shen, Q. R. (2011). A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant and soil*, 344(1-2), 87-97.

CAPÍTULO 4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

En este estudio se determinó que el 9,2% (28 bacterias) del total de microorganismos evaluados, presento actividad de inhibición *in vitro* contra Foc R1, un porcentaje bajo, como es común en este tipo de investigaciones. Los géneros con actividad antagonica corresponden a géneros comúnmente reportados (*Bacillus* spp., *Burkholderia* sp. *Pseudomonas* spp.), con excepción de *Corynebacterium* spp., y *Stenotrophomonas* spp., microorganismos que han sido hallados en diferentes tejidos de banano, más no habían sido catalogados como antagonistas de Foc. Dichas bacterias antagonistas provienen de diferentes tejidos de *Musa* spp., por lo que se puede suponer que microorganismos de tejidos aéreos como la filósfera presentan antagonismo sobre patógenos del suelo como Foc. Las bacterias con mayor actividad inhibitoria pueden reducir el crecimiento de Foc R1 entre un 40 y 66%, causando daños a nivel citoplasmático de hifas; sin embargo, bajo las condiciones experimentales del presente estudio, los consorcios microbianos de dos bacterias tuvieron una respuesta negativa ante la inhibición de Foc R1, por lo que se trabajó con cepas individuales en pruebas subsiguientes.

De manera global se estableció que la producción de compuestos activos presentes en SLC está ligada al medio de cultivo donde se realice la fermentación microbiana, encontrando que la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) puede inhibir en un 100% el crecimiento del patógeno cuando se cultiva en medio MOLP por 72 h. Por su parte, *Burkholderia* sp., presenta una actividad media con SLC producidos en medio LB (56 % de inhibición), puesto que esta se complementa con la producción de VOCs, actividad que se ve reducida conforme transcurre el tiempo de interacción entre la bacteria y el patógeno. Factores como el aumento de la concentración de los compuestos del SLC tuvieron un incremento en la actividad antimicrobiana de *B. subtilis* (EA-ED0161) y *Burkholderia* sp., (EA-ED0047), sin embargo, no hubo un aumento significativo referente a la actividad presentada por *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959). Finalmente, para las bacterias en las cuales no se encontró actividad por parte de sus sobrenadantes, se evaluaron tiempos de

fermentación de 12, 24 y 48 h, los cuales no tuvieron efecto sobre dicha actividad antifúngica.

El SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) demostró ser altamente resistente ante los cambios de temperatura, pH y actividad de la enzima proteinasa K, conservando en cada prueba su alta capacidad antifúngica; lo que permite seleccionar dicha cepa para pruebas *in vivo*, debido a su alta capacidad inhibitoria y resistencia a condiciones ambientales que pueden estar presentes en suelos contaminados con Foc R1.

Para las pruebas en microcosmos se determinó el sobrenadante de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) producido en medio MOLP con presencia de células, permite reducir la población de Foc R1 en un 100 y 61,7%, cuando el patógeno se inocula en suelos estériles a una concentración de 1×10^3 y 1×10^6 UFC/mL, respectivamente; mientras que solo las células bacterianas de EA-CB0959 producidas en medio TSB no tienen efecto sobre el patógeno.

En suelos inoculados con Foc R1 a una concentración de 1×10^6 UFC/g suelo, la fermentación de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en medio MOLP redujo la incidencia y severidad de la marchitez por *Fusarium* en plantas de banano Gros Michael; sin embargo, dicha reducción no es estadísticamente diferente con respecto al control negativo a partir del día 28 ddi del patógeno. De forma contraria, y acercándose un poco más a la naturaleza del patosistema en campo, el tratamiento a suelos poscuarentena con cuatro y/o cinco aplicaciones semanales del ACB al 50% antes de la siembra, pueden reducir de forma significativa en un 57% la incidencia y en un 88,4 la severidad de la marchitez por *Fusarium* en banano Gros Michael, por lo que este tratamiento con la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) se constituye como una herramienta para el control de suelos afectados con Foc R1, en pro de reducir el patógeno y rehabilitar suelos infestados.

4.2 Recomendaciones

Evaluar nuevas metodologías *in vitro* que permitan encontrar consorcios microbianos con efecto antagónico significativo sobre Foc R1; del mismo modo, establecer nuevas condiciones para la producción de SLC para aquellas bacterias que no pudieron ser optimizadas en el presente estudio.

Desarrollar una estrategia donde se aíslen, identifiquen y se evalúen bajo condiciones *in vivo* los VOCs de las bacterias que demostraron tener actividad inhibitoria sobre Foc R1, en búsqueda de combinar mecanismos de acción que ayuden a reducir las afecciones por este patógeno.

Comprobar que la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) tiene la capacidad de sintetizar CLPs y corroborar su actividad antifúngica sobre Foc R1.

Emplear un método como qPCR para cuantificar con mayor precisión la población de Foc R1 y *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en suelos no estériles en pruebas de microcosmos y biocontrol.

Determinar el efecto inhibitorio *in vivo* de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) sobre Foc R1 a diferentes concentraciones del ACB y el fitopatógeno.

Demostrar el impacto del *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959) en el microbioma rizosférico de plantas de banano Gros Michael.

Anexos

Anexo I. Análisis estadístico de pruebas de inhibición cuantitativa individual

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas e independencia.

TEST	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson
P-value	0,0001	0,0002	0,0067

- Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Wilcoxon.

Critical value: 99,4387

Degrees of freedom: 27

P-value Chisq: $3,181 \times 10^{-10}$

t-Student: 1,988

Alpha: 0,05

Minimum Significant Difference: 16,893

Anexo II. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de combinaciones bacterianas

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

COMBINACIÓN	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
(EA-ED0047) + (EA-CB1315)	0,2055	0,0973	0,2006	$1,697 \times 10^{-11}$
(EA-CB0959) + (EA-ED0055)	0,3816	0,1161	0,0542	0,0119
(EA-CB0959) + (EA-CB1315)	0,7613	0,0528	0,2380	$1,592 \times 10^{-14}$
(EA-CB0959) + (EA-CB1057)	0,8554	0,0515	0,0540	$1,62 \times 10^{-15}$
(EA-ED0161) + (EA-CB1315)	0,3329	0,0575	0,5387	0,069
(EA-ED0161) + (EA-ED0055)	0,0539	0,3263	0,1729	$5,115 \times 10^{-15}$
(EA-ED0161) + (EA-CB1057)	0,0517	0,1515	0,0934	$8,011 \times 10^{-13}$
(EA-ED0055) + (EA-CB1057)	0,1446	0,0502	0,4994	$1,01 \times 10^{-11}$
(EA-ED0055) + (EA-ED0316)	0,0624	0,0507	0,5395	$7,783 \times 10^{-15}$
(EA-ED0242) + (EA-ED0268)	0,0555	0,0626	0,3349	$8,195 \times 10^{-9}$
(EA-ED0268) + (EA-ED0316)	0,0517	0,0515	0,9896	$6,603 \times 10^{-11}$

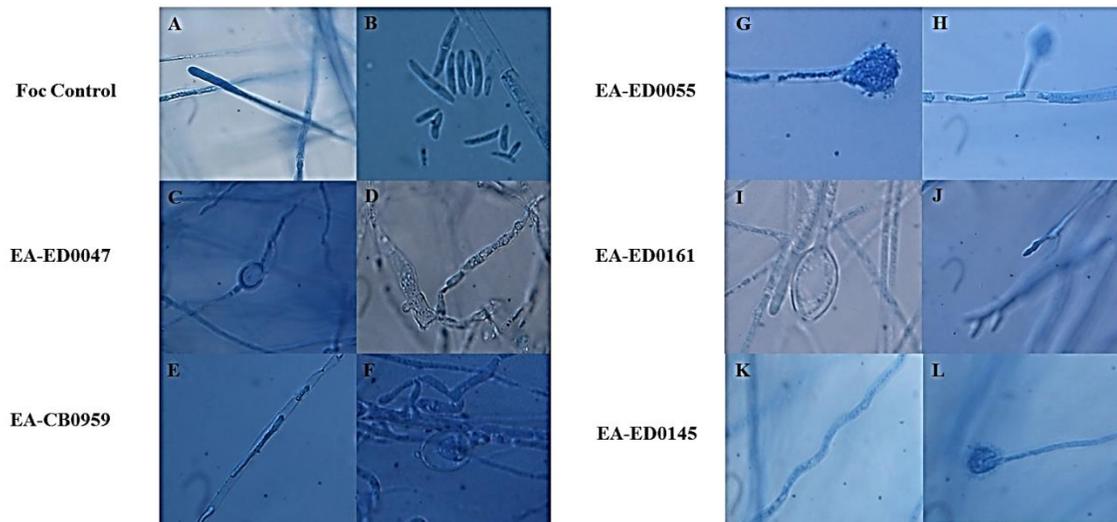
- Comparación entre tratamientos (Prueba de Dunnett)

COMBINACIÓN	P-value*
(EA-ED0047) + (EA-CB1315)	$2,9 \times 10^{-11}$
(EA-CB0959) + (EA-ED0055)	0,0087
(EA-CB0959) + (EA-CB1315)	0,0521

(EA-CB0959) + (EA-CB1057)	0,0521
(EA-ED0161) + (EA-CB1315)	0,0529
(EA-ED0161) + (EA-ED0055)	0,0053
(EA-ED0161) + (EA-CB1057)	0,0514
(EA-ED0055) + (EA-CB1057)	$1,4 \times 10^{-11}$
(EA-ED0055) + (EA-ED0316)	$1,4 \times 10^{-14}$
(EA-ED0242) + (EA-ED0268)	$1,1 \times 10^{-8}$
(EA-ED0268) + (EA-ED0316)	0,0508

* El control (bacteria individual con más alto porcentaje de inhibición) contra el efecto de la combinación.

Anexo III. Efecto de bacterias antagonistas a Foc sobre la estructura de hifas.



(A) Desarrollo de hifas, (B) micro y macroconidias en tratamiento control, sin presencia de bacterias. (C) Hinchazón intercalar y terminal de hifas, (D) pérdida de contenido citoplasmático y deformación de hifas por *Burkholderia* sp. (E) Pérdida de contenido citoplasmático de hifas y (F) presencia de clamidosporas por *B. amyloliquefaciens*. (G) Hinchazón terminal de hifas y (H) pérdida de contenido citoplasmático de Foc en presencia de *P. koreensis*. (I y J) Hinchazón y deformación terminal de hifas por *B. subtilis*. (K) Deformación e (L) Hinchazón terminal de hifas por *C. propinquum*. Ninguna de las bacterias causó daños a micro y macroconidias, estructuras que no fueron detectadas en el tratamiento con *Burkholderia* sp.

Anexo IV. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de SLC (dependiente de cultivo)

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas e independencia.

MEDIO	TEST (P-value)		
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson
TSB	$8,8 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	$4,2 \times 10^{-6}$
MOLP	$5,3 \times 10^{-7}$	$2,9 \times 10^{-6}$	0,9962
LB	$9,5 \times 10^{-11}$	$2,4 \times 10^{-5}$	0,2321
PDB	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	0,0969

- Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Wilcoxon.

DATA	MEDIO			
	TSB	MOLP	LB	PDB
Critical value	43,554	57,509	57,808	107,517
Degrees of freedom	10	4	4	8
P-value Chisq	$3,9 \times 10^{-6}$	$9,7 \times 10^{-12}$	$8,4 \times 10^{-12}$	0
t-Student	1,979	2,004	2,004	1,983
Alpha	0,05	0,05	0,05	0,05
Minimum Significant Difference	-	2,275	1,862	-

Anexo V. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de SLC (dependiente de concentración)

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas e independencia.

Bacteria	TEST (P-value)		
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson
EA-CB0959	0,0087	0,0005	0,9887
EA-ED0047	0,0111	0,0469	0.2960
EA-ED0161	$5,4 \times 10^{-5}$	0,0936	0,0014
EA-CB1057	$4,2 \times 10^{-6}$	0,0142	0,3405

- Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Wilcoxon.

DATA	Bacteria			
	EA-CB0959	EA-ED0047	EA-ED0161	EA-CB1057
Critical value	0,2137	7,0594	5,6033	2,1926
Degrees of freedom	1	1	1	1
P-value Chisq	0,6438	0,0078	0,0179	0,1386
t-Student	2,0738	2,0738	2,0738	2,0738
Alpha	0,05	0,05	0,05	0,05
Minimum Significant Difference	6,0861	5,0938	5,3236	5,4482

Anexo VI. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de SLC (dependiente de tiempo de cultivo)

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas e independencia.

HORA	TEST (P-value)		
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson
12	$4,4 \times 10^{-13}$	$1,1 \times 10^{-5}$	0,7125
24	$4,4 \times 10^{-13}$	$1,1 \times 10^{-5}$	0,7125
48	$4,4 \times 10^{-13}$	$1,1 \times 10^{-5}$	0,7125

- Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Wilcoxon.

DATA	HORA		
	12	24	48
Critical value	58,043	58,043	58,043
Degrees of freedom	4	4	4
P-value Chisq	$7,5 \times 10^{-12}$	$7,5 \times 10^{-12}$	$7,5 \times 10^{-12}$
t-Student	2,004	2,004	2,004
Alpha	0,05	0,05	0,05
Minimum Significant Difference	1,317	1,317	1,317

Anexo VII. Análisis estadístico de pruebas de inhibición de VOCs

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
4	0,0873	0,8223	0,8749	$9,6 \times 10^{-12}$
5	0,1605	0,6141	0,8927	$8,8 \times 10^{-9}$
6	0,0613	0,7091	0,5847	$2,8 \times 10^{-5}$
7	0,0739	0,253	0,5496	$3,4 \times 10^{-5}$

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	MSE ^a	CVSR ^b	HSD ^c	Alpha
4	9,648	4,883	7,586	0,05
5	15,616	4,883	9,648	0,05
6	29,790	4,883	13,326	0,05
7	41,944	4,883	15,812	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cHonestly Significant Difference.

Anexo VIII. Pruebas de estabilidad del SLC de la bacteria *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959)

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

PRUEBA	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
pH	0,3640	0,1964	0,0771	0,7984
Temperatura	0,2862	0,3658	0,5398	0,6194
Proteinasa K	0,0994	0,3886	0,3766	0,4518

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

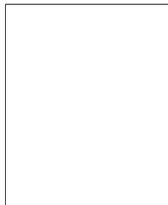
PRUEBA	P-value			
	MSE ^a	CVSR ^b	MSD ^c	Alpha
pH	0,055	3,470	0,234	0,05
Temperatura	0,040	3,776	0,219	0,05
Proteinasa K	0,026	3,470	0,161	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.

Anexo IX. Análisis de suelos de sustrato utilizado en pruebas de patogenicidad de Foc R1, microcosmos, biocontrol de suelo infectado y poscurentena



Identificación

Nombre AUGURA
Nit o C.C. 8909007467
Direccion CALLE 3 SUR N° 41- 65 PISO 9
Telefono 8236602 EX 115
Fax 312 288 33 94
Email largel@augura.com.co
F. Recibo 19-FEB-19

Análisis de Suelos

Municipio Carepa (Antioquia)
Vereda Sin Especificar
Finca Invernadero
Área - Ha.
Profundidad - cms.

Reporte No. 54622

Cultivo actual
Cultivo anterior

Código	Identificación en el campo	Textura				pH	C.E.	M.O.	Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B	N-NO3	N-NH4	N
		A%	L%	Ar%	Clase																			
SB14153	1. Microcosmos	90	4	6	A	5.6		0.8	-	4.9	2.4	0.47	0.20	8	231	7	91	60	2	2	0.2			
SB14154	2. Invernadero	88	6	6	A	4.9		0.5	0.8	5.5	3.	0.96	0.26	10.5	156	343	83	60	2	3	1.7			

Observaciones

Métodos

Textura : Bouyoucos; pH : Agua (1:1); Conductividad eléctrica: Extracto de saturación; Materia orgánica: Walkley Black; Al : KCl 1M; Ca, Mg, K, Na : Acetato de amonio 1M; CICE : Suma de cationes de cambio; S : Fosfato monocálcico 0.008M; Fe, Mn, Cu, Zn : Olsen - EDTA; B : Agua caliente; NO3 : Sulfato de aluminio 0.025M; NH4 : KCl 1M; P : Bray II.

Tener en cuenta:

N.D.=No detectable
N.A.=No aplica
Para las unidades considere:
dSm-1 =mmho cm-1
cmolc kg-1 =meq/100 g suelo
ppm =mg kg-1

Revisión Agronómica

* Microcosmos = Suelo utilizado para pruebas de patogenicidad y microcosmos.

** Invernadero = Suelo utilizado en pruebas de biocontrol y poscurentena.

Anexo X. Análisis estadístico prueba de patogenicidad de Foc R1

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

TEST	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
P-value	0,0824	0,3290	0,2796	3.407x10 ⁻⁷

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

TEST	MSE ^a	CVSR ^b	MSD ^c	Alpha
P-value	74002,	3,403	207,01	0,05
	89		2	

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.

Anexo XI. Análisis estadístico de pruebas en microcosmos

a. Microcosmo inoculado con Foc a 1×10^3 – Conteos (UFC/g suelo) de Foc R1.

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
0	0,1170	0,1492	0,0608	$2,2 \times 10^{-16}$
1	0,0843	0,0702	0,1016	$2,2 \times 10^{-16}$
2	0,0742	0,0679	0,0742	$4,4 \times 10^{-12}$
3	0,0519	0,0548	0,05474	$2,2 \times 10^{-16}$
4	0,0781	0,0592	0,6380	$2,2 \times 10^{-16}$
5	0,0528	0,0517	0,0922	$2,2 \times 10^{-16}$
6	0,0625	0,0751	0,6151	$2,2 \times 10^{-16}$
14	0,1785	0,0735	0,1489	$2,2 \times 10^{-16}$
21	0,1785	0,0853	0,1489	$2,2 \times 10^{-16}$

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	MSE ^a	CVSR ^b	MSD ^c	Alpha
0	0,003	3,532	0,062	0,05
1	0,002	3,532	0,050	0,05
2	0,294	3,532	0,638	0,05
3	0,009	3,532	0,018	0,05
4	0,002	3,532	0,011	0,05
5	0,003	3,532	0,007	0,05
6	0,006	3,532	0,009	0,05
14	0,003	3,532	0,021	0,05
21	0,003	3,532	0,021	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.

b. Microcosmo inoculado con Foc a 1×10^3 – Conteos (UFC/g suelo) de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959).

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
0	0,6979	0,1243	0,1319	$2,2 \times 10^{-16}$
1	0,7547	0,0671	0,0873	$2,2 \times 10^{-16}$
2	0,2321	0,0757	0,1225	$2,2 \times 10^{-16}$
3	0,3273	0,0731	0,0746	$2,2 \times 10^{-16}$
4	0,7399	0,0791	0,5153	$2,2 \times 10^{-16}$
5	0,7245	0,0785	0,5231	$2,2 \times 10^{-16}$
6	0,1736	0,4686	0,5327	$2,2 \times 10^{-16}$
14	0,0977	0,1966	0,1367	$2,2 \times 10^{-16}$
21	0,0970	0,2949	0,1217	$2,2 \times 10^{-16}$

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	MSE ^a	CVSR ^b	MSD ^c	Alpha
0	0,003	3,832	0,024	0,05
1	0,001	3,832	0,018	0,05
2	0,001	3,832	0,047	0,05
3	0,004	3,832	0,0277	0,05
4	0,004	3,832	0,0261	0,05
5	0,004	3,832	0,0838	0,05

6	0,002	3,832	0,066	0,05
14	0,001	3,832	0,054	0,05
21	0,001	3,832	0,054	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.

c. Microcosmo inoculado con Foc a 1×10^6 – Conteos (UFC/g suelo) de Foc R1

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
0	0,7271	0,2837	0,1419	0,2144
1	0,0972	0,6887	0,6071	0,5845
1B	0,1869	0,2535	0,3826	$2,2 \times 10^{-16}$
2	0,0568	0,2109	0,3805	$5,4 \times 10^{-15}$
3	0,9834	0,0940	0,2367	$2,2 \times 10^{-16}$
4	0,1192	0,2260	0,2466	$2,2 \times 10^{-16}$
5	0,3092	0,1479	0,3251	$2,2 \times 10^{-16}$
6	0,1998	0,1592	0,6500	$2,2 \times 10^{-16}$
7	0,0549	0,2704	0,1420	$2,2 \times 10^{-16}$
14	0,0560	0,9614	0,7489	$2,2 \times 10^{-16}$
21	0,0691	0,0786	0,4114	$2,2 \times 10^{-16}$

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	MSE ^a	CVSR ^b	MSD ^c	Alpha

0	0,006	3,532	0,029	0,05
1	0,003	3,532	0,023	0,05
1B	0,001	3,532	0,046	0,05
2	0,001	3,532	0,051	0,05
3	0,001	3,532	0,021	0,05
4	0,001	3,532	0,020	0,05
5	0,001	3,532	0,015	0,05
6	0,001	3,532	0,023	0,05
7	0,001	3,532	0,021	0,05
14	0,001	3,532	0,018	0,05
21	0,001	3,532	0,016	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.

d. Microcosmo inoculado con Foc a 1×10^6 – Conteos (UFC/g suelo) de *B. amyloliquefaciens* (EA-CB0959).

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
1B	0,1457	0,6308	0,0948	$2,2 \times 10^{-16}$
2	0,1258	0,3931	0,1396	$5,4 \times 10^{-15}$
3	0,5153	0,2721	0,2637	$2,2 \times 10^{-16}$
4	0,9614	0,4571	0,1658	$2,2 \times 10^{-16}$
5	0,9090	0,1318	0,1345	$2,2 \times 10^{-16}$
6	0,2849	0,1118	0,1107	$2,2 \times 10^{-16}$
7	0,2525	0,0877	0,1082	$2,2 \times 10^{-16}$

14	0,0961	0,0721	0,1226	$2,2 \times 10^{-16}$
21	0,5140	0,7458	0,1322	$2,2 \times 10^{-16}$

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	MSE^a	CVSR^b	MSD^c	Alpha
1B	0,001	3,832	0,048	0,05
2	0,001	3,832	0,032	0,05
3	0,001	3,832	0,033	0,05
4	0,001	3,832	0,024	0,05
5	0,001	3,832	0,026	0,05
6	0,001	3,832	0,033	0,05
7	0,001	3,832	0,030	0,05
14	0,001	3,832	0,030	0,05
21	0,001	3,832	0,023	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.

Anexo XII. Análisis estadístico bioensayo en suelo contaminado con Foc R1

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
7	0,0581	0,0652	0,1544	0,0652
14	0,070	0,0626	0,4946	0,0139
21	0,1017	0,1405	0,6576	0,0239
28	0,1569	0,6008	0,7893	0,0414
35	0,2778	0,1405	0,8527	0,0661
42	0,1658	0,6678	0,8747	0,0861
49	0,1330	0,4893	0,8583	0,1202
56	0,0968	0,4349	0,8114	0,1777
63	0,0757	0,4107	0,7416	0,2298
70	0,0678	0,3719	0,6646	0,2486
77	0,0573	0,3271	0,5966	0,2430

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	MSE ^a	CVSR ^b	MSD ^c	Alpha
7	571,667	2,971	22,464	0,05
14	7431,667	2,971	80,997	0,05
21	46604,44	2,971	202,833	0,05
28	142780,6	2,971	355,025	0,05
35	331784,4	2,971	541,194	0,05
42	628833,3	2,971	745,062	0,05
49	1054185	2,971	964,678	0,05
56	1618361	2,971	1195,26	0,05

63	2282910	2,971	1419,61	0,05
70	2957123	2,971	1615,70	0,05
77	3633105	2,971	1790,87	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.

Anexo XIII. Análisis estadístico bioensayo en suelo poscuarentena infectado con Foc1

- Supuestos de normalidad, igualdad de varianzas, independencia y análisis de varianza (ANOVA).

TRATAMIENTO	P-value			
	Shapiro-Wilk	Levene	Durbin Watson	ANOVA
A1	0,0639	0,1156	0,9881	0,0120
A2	0,0572	0,3066	0,7108	0,1222
A3	0,0549	0,2132	0,4088	0,1110
A4	0,1785	0,5532	0,6007	0,0071
A5	0,1648	0,0537	0,8620	0,0010

- Comparación entre tratamientos (Prueba de Tukey)

DÍA EVALUACIÓN	P-value			
	MSE ^a	CVSR ^b	MSD ^c	Alpha
A1	2922967	3,0813	1991,122	0,05
A2	486383,3	3,0813	812,220	0,05
A3	2252250	3,0813	1747,81	0,05
A4	93800	3,0813	356,687	0,05
A5	395733,3	3,0813	732,634	0,05

^aMean Square Error.

^bCritical Value of Studentized Range.

^cMinimum Significant Difference.