

Bacterias fluorescentes productoras de metabolitos antagónicos de cultivares nativos de *Musa* sp. y su diversidad filogenética al gen ARNr 16S

Fluorescent bacteria producers of metabolitos antagónicos de cultivares nativos de *Musa* sp. And their phylogenetic diversity the 16S rRNA gene

Chávez-Arteaga Karen Tatiana¹, Guato-Molina Jefferson Javier², Peñafiel-Jaramillo María Fernanda³, Mestanza-Uquillas Camilo Alexander⁴, ⁵Canchignia-Martínez Hayron Fabricio⁵

¹Departamento Bionintanga, NINTANGA S.A. Panamericana Norte km 10, Latacunga, Ecuador.

Tel. y Fax (593-3) 2690 001/(593-2) 3959 878.

²Fincas Experimentales Nestlé, R&D. Tours, Quevedo, EC. Estación experimental (El Chollo), Valencia, El Vergel.

Tel (593-05) 999132067.

³Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Ambientales, Carrera de Ingeniería Ambiental,

⁴Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agropecuaria.

⁵Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Agronomía, Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología. km 1.5 a Santo Domingo de los Tsáchilas, EC. 120501, Quevedo, Ecuador.

Tel. y Fax (593 -05) 753 300 / 753 303. ^ohfcanma@gmail.com; hcanchignia@uteq.edu.ec

Rec.: 11.10.2018. Accept.: 12.12.2018

Publicado el 30 de diciembre de 2018

Resumen

El objetivo del trabajo se enfocó en identificar bacterias fluorescentes productoras de metabolitos secundarios antagónicos y analizar su biodiversidad al gen ARNr 16S. Las bacterias se aislaron de cultivares nativos de *Musa* de las provincias: Los Ríos, Cotopaxi y Bolívar. El escrutinio de las cepas antagónicas se basó en la actividad proteolítica y la amplificación de genes antifúngicos. Además, se realizó el análisis filogenético al ARN ribosomal 16S por análisis de restricción ARDRA y secuenciación. Desde rizósfera de siete cultivares nativos de *Musa* se rescató y seleccionó 16 cepas nativas con emisión fluorescente, observando la actividad proteasa (PR) para las cepas (PB3-6, BO3-4, BA4-19, PM3-8 y PM3-14). Verificando por PCR la presencia del gen hcnABC (HCN) de 570 pb en las cepas (PB3-6, BO3-4, PM3-8 y PM3-14) y pirrolnitrina (Prn) de 786 pb en las cepas (BMR2-2, BMR2-4, BMR2-12, BO3-4 y PM3-14). Los perfiles genéticos por ARDRA agruparon las cepas nativas de *Musa* productoras a PR, Prn y HCN (BMR2-2, BMR2-12, PB3-6, BO3-4, BA4-19, PM3-8 y PM3-14). La caracterización molecular por secuenciación del gen ARNr 16S, se verificaron los géneros: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Considerando siete cepas de bacterias candidatas de actividad antagónica que servirán para la continuidad de la investigación al efecto positivo en incremento de biomasa en plantaciones de banano y efecto bio-controlador a *Mycosphaerella fijiensis*.

Palabras clave: *Musa*, *Pseudomonas*, *Mycosphaerella fijiensis*, bacterias, proteasa, cianuro de hidrogeno, pirrolnitrina.

Abstract

The objective of the work was to identify fluorescent bacteria producing antagonistic secondary metabolites and analyze their biodiversity to the 16S rRNA gene. The bacteria were isolated from native *Musa* cultivars of the provinces: Los Ríos, Cotopaxi and Bolívar. The screening of the antagonistic strains was based on the proteolytic activity and the amplification of antifungal genes. Further, phylogenetic analysis was performed on 16S ribosomal RNA by ARDRA restriction analysis and sequencing. From the rhizosphere of seven native *Musa* cultivars, 16 native strains with fluorescent emission were rescued and selected, observing the protease activity (PR) for the strains (PB3-6, BO3-4, BA4-19, PM3-8 and PM3-14). Verifying by PCR the presence of the hcnABC gene (HCN) of 570 bp in the strains (PB3-6, BO3-4, PM3-8 and PM3-14) and pyrrolnitrine (Prn) of 786 bp in the strains (BMR2-2, BMR2-4, BMR2-12, BO3-4 and PM3-14). The genetic profiles by ARDRA grouped the native strains of *Musa* producers to PR, Prn and HCN (BMR2-2, BMR2-12, PB3-6, BO3-4, BA4-19, PM3-8 and PM3-14). The molecular characterization by sequencing of the 16S rRNA gene, the genera were verified: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. Considering seven strains of candidate bacteria of antagonistic activity that will serve for the continuity of the research to the positive effect in increase of biomass in banana plantations and biocontrol effect to *Mycosphaerella fijiensis*.

Keywords: *Musa*, *Pseudomonas*, *Mycosphaerella fijiensis*, bacteria, protease, hydrogen cyanide, pyrrolnitrine.

Introducción

Las medidas de control de este patógeno *M. fijiensis* Morelet (Sigatoka Negra), en plantaciones de banano incluyen aplicaciones constantes de productos químicos, no consiguiendo el control de esta enfermedad. Sin embargo, la grave preocupación sobre los residuos de los fungicidas como triazoles y procloraz, y su empleo excesivo da a lugar a residuos químicos en frutos (Fu *et al.*, 2010) y su impacto en la contaminación ambiental está ocasionando cambios en la microbiota del suelo. Adicionalmente, el desarrollo de la resistencia a los fungicidas ha desencadenó a la búsqueda de alternativas sostenibles al empleo de microorganismos antagónicos. El sector agropecuario desde 1990 ha iniciado con trabajos de identificación y manipulación de PGPR, del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Las bacterias empleadas como bio-controladores y con capacidades simbióticas son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (Döbereiner *et al.*, 1995). Estas bacterias habitan la rizósfera y promoviendo el desarrollo en plantas, así como de suprimir enfermedades (Van Loon, 2007). El género *Pseudomonas* spp fluorescentes son conocidos por exhibir múltiples características en promover el desarrollo en plantas e involucradas en el proceso de bio-control (Frey *et al.*, 2005).

Los antibióticos producidos por las bacterias antagónicas son: pioluteorina (Plt), pirrolnitrina (Prn), ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) y 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4 DAPG), que actúan como principales controladores biológicos de hongos y bacterias (Raaijmakers *et al.*, 1997). Los antifúngicos 2,4-DAPG, Plt y Prn están involucradas en las interacciones antagonistas y supresión de enfermedades como: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamoni*, *Thielaviopsis basicola* (Haas y Défago, 2005). Metabolitos antagónicos como el cianuro de hidrogeno (HCN) y proteasa (PR) producidas por *P. brassicacearum* J12 inhibiendo el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* (Zhou *et al.*, 2012). Donde estos extractos celulares de bacterias son empleados como agentes bio-controladores (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Los estudios en identificación de bacterias inician con el gen del ARNr 16s, esto ha permitido agrupar o discriminar genéticamente entre *Pseudomonas* spp con otras especies. Dentro de las alternativas tenemos la restricción del ARNr 16s amplificado (ARDRA) (Ross *et al.*, 2000). Estudios de secuenciación al gen ARNr 16S, proporciona una identificación a género–especie del (90%) de mayor concordancia por el empleo de herramientas informáticas a diferencia pruebas convencionales por identificación en análisis de perfiles

celulares (Janda y Abbott, 2007; Kolbert y Persing, 1999). El ARNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas, por sus regiones altamente conservadas y una variabilidad suficiente en otras regiones que sirven como cronómetro evolutivos (Mechihi *et al.*, 2002).

La rizósfera de cultivares tradicionales de *Musa*, exhibe gran diversidad de microorganismo y son empleados como estrategias en agricultura sustentable, estas poblaciones de bacterias mantienen la estabilidad de los cultivos y ejercen actividades antagonistas a enemigos naturales. El muestreo de filósfera de *Musa* seleccionó un cinco por ciento de bacterias aerobias formadoras de endosporas con actividad antifúngica *in vitro* a *M. fijiensis* (Ceballos *et al.*, 2012). Sobrenadantes de cultivos celulares de bacterias son empleados como bio-controladores, estos purificados de quitinasa de *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 inhiben la germinación y desarrollo del tubo germinativo de las acósporas de *M. fijiensis* (Gutiérrez *et al.*, 2015). La aplicación de microorganismo está siendo incorporando al control de Sigatoka negra, donde *Trichoderma* spp nativas del Ecuador ha demostrado tener actividad antagonista *in vitro* (Galarza *et al.*, 2015). Por lo tanto, la búsqueda de nuevos agentes bio-controladores para Sigatoka negra es de importancia para el sector agrícola del Ecuador y de algunos países de América.

El empleo excesivo de agro-químicos al control de hongos en el cultivo de *Musa* ha originado un creciente deterioro del ecosistema y su fruta producida bajo esta condición esté contaminada. Frente a este problema, se ha visto la necesidad de incorporar nuevas tecnologías que permitan dar paso a la utilización de productos de origen ecológico y disminuir así el empleo de productos químicos al control de *M. fijiensis*. Los micro-ecosistemas de cultivares nativos de *Musa* guardan una amplia riqueza microbiana, donde estos sistemas de producción agrícola mantiene un equilibrio entre las poblaciones de hongos patógenos sin presentar una reducción en su rendimiento. Con este antecedente, se rescataría y generaría colecciones de bacterias al generó *Pseudomonas* spp fluorescentes para así iniciar con plataformas de estudios en agentes bio-controladores. Por tanto, el objetivo se enfatizó en analizar la biodiversidad al gen ARNr 16S e identificación de metabolitos secundarios antagónicos de bacterias nativas de cultivares de *Musa*.

Materiales y métodos

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo–Santo

Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 01' de latitud Sur y 79° 47' de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

Rizósfera de cultivares endémicos de *Musa*

Se recolectaron cuatro muestras de tejido radicular por siete cultivares nativos de *Musa* de las provincias, 1) Cotopaxi: [Banano Morado] *Musa acuminata* - Red Dacca. 2) Los Ríos: [Banano Morado], [Plátano Barraganete] y [Plátano Dominicano] *Musa balbisiana* AAB, Simmonds. 3) Bolívar: [Banano Orito o Baby Banana] *Musa acuminata* AA, [Banano Almendro - Gros Michel] *Musa acuminata* AAA y [Plátano Maqueño] *Musa balbisiana* AAB, Simmonds. Esto generó un total de 28 muestras, donde se trasladaron al laboratorio de Biotecnología para su procesamiento. Las zonas de colecta de rizósfera se registraron por el sistema de coordenadas Universal Transversal de Mercator (UTM).

Identificación y caracterización de bacterias fluorescentes

Las 28 muestras de tejido radicular de los cultivares nativos de *Musa*, fueron sumergidas en agua estéril para retirar el exceso de partículas de suelos y siendo transferidas a Erlenmeyer con 50 mL de agua estéril más 0,01% de Tween 40 / 200 rpm por 10 min. Las raíces se segmentaron en 2 cm e inmersas en el tampón PBS amortiguadora de fosfato y sal ($K_2P_0_4$ - $KH_2P_0_4$ 10 mM, NaCl 0,14 M, pH 7,2) por 10 min (De Souza *et al.*, 2003). Las muestras de tejido radicular de cada procedencia se ubicó King B líquido selectivo [(g/L): peptona, 20,0; glicerol, 15 mL; K_2HPO_4 , 1,5 g; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1,5 g; agar, 15 g; agua destilada (pH 7,2)], por 48 h (King *et al.*, 1954). Se recuperó 4 μ L del crecimiento bacteriano en dilución seriada de 1×10^{-2} células/mL, e inoculada en caja Petri de King B (agar 15 g/L) suplementado con chloramphenicol (13 μ g/mL), ampicilina (40 μ g/mL) (Simon y Ridge, 1974), e incubada a 27 °C por 24 h. Se registró la pigmentación fluorescente en King B sólido, bajo luz ultravioleta (Kuarabachew *et al.*, 2007). Seleccionando las colonias puras positivas para fluorescencia e inoculadas individualmente en placas Petri en King B sólido y almacenando las cepas puras en glicerol a -80 °C.

Identificación de actividad proteolítica de bacterias fluorescentes

La actividad proteolítica se realizó en placas Petri, las células crecieron en King B líquido a 27 °C por 24 h / 200 rpm, se recuperó 20 μ L de células e inoculadas en medio Gelatin [(g/L): peptona, 4 g; extracto de levadura, 1 g; gelatina, 12 g; agar, 15 g] (Smith y Dner,

1958). Evaluando la actividad degradación visible por la formación de halos claros alrededor de la zona inoculada por la bacteria a 48 h, se emplearon como bacterias control *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 productoras de proteasa (Canchignia *et al.*, 2016) y *Bacillus subtilis* ATCC 5540.

Identificación de genes antifúngicos

Las bacterias positivas en emisión de fluorescencia se incubaron en King B líquido a 28 °C a 150 rpm por 24 h, recuperando 1800 μ L del cultivo celular por centrifugación a $10.0 \times g$ / 1 min. El sedimento con las células se empleó para la extracción de ADNg bacteriano, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante UltraClean® Microbial DNA isolation (MOBIO, EE.UU.). Procediendo a la amplificación del gen parcial hcnAB para HCN, empleando la pareja de oligonucleótidos específicos PM2 (5'-TGC GG CATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCTGG 3') y PM7-26R (5' CCGCTCTTGATCTGCAATT GCAGGCC 3') producto de amplificación de 570 pb (Svercel *et al.*, 2007). La amplificación al antibiótico Prn se empleó la pareja de partidores PrnCf (5'-CCACAAGCCCGGCCAGGAGC-3') y PrnCr (5'-GAGAAGAGCGGGTCGA TGAAGCC-3') fragmento de 786 bp (Mavrodi *et al.*, 2001). El perfil térmico empleado para PCR: 94 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg; 60 °C por 30 seg a 72 °C por 1 min; extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñidos en bromuro de etidio.

Análisis filogenético del ARN ribosomal 16S

Se amplificó el gen del ARNr 16S empleando los partidores universales 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACACTT-3') de 1500 pb. (Hernández *et al.*, 2008). El perfil térmico empleado para PCR: 94 °C por 3 min; 40 ciclos a 94 °C por 30 seg; 60 °C por 30 seg; 72 °C por 1'45 seg; extensión final 72 °C por 3 min. El producto amplificado se purificó empleando el kit Invitrogen PureLink™ (GERMANY), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción Afa1, Ecor1 y Taq1 (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Los perfiles ARDRA contenía (10 μ L del producto digerido al gen ARNr 16S) y se visualizaron en geles de agarosa al 3% por 2 h a 50 V y el marcador de peso molecular 100 bp DNA (Invitrogen: 156228019) y teñidos en bromuro de etidio. Los perfiles generados por los cortes enzimáticos del gen al ARNr 16S, generó información binaria de (0 y 1), reemplazo por las letras (A y T). La historia evolutiva se infirió empleando al

método Neighbor-Joining, el árbol filogenético al gen del ARNr 16S se construyó empleando Maximum Composite Likelihood con el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

Los fragmento de 1500 pb, al ARNr 16S se secuenció por MACROGEN empleando los partidores universales 518 (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATAC-3') y 800 (3'-TACCAGGGTATCTAATCC-5') por (Macrogen, Seúl, Korea). Las secuencias se compararon con la base de datos de GenBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), empleando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). El árbol filogenético al gen ARNr 16S, se construyó empleando el método Neighbor joining y alineados con múltiples secuencias bacterianas disponible en NCBI. El porcentaje de la réplica del árbol se obtuvo con 'bootstrap' de valores de 1000 (Felsenstein, 1985). Se eligió el mejor modelo de acuerdo al criterio de información Bayesian (BIC), Kimura 2-parámetros con el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

Resultados

Origen y aislamiento de las bacterias fluorescentes

Los tejidos radiculares de los cultivares de *Musa* (Balbisiiana-Acuminata), permitió el aislamiento de 150 cepas bacterianas por el método de dilución en placas en King B, donde fueron seleccionadas 16 cepas con emisión fluorescente (Figura 1), rescatando de los cultivares del Cotopaxi: las cepas (BMC4-23, BMC4-9). Los Ríos: cepas (BMR2-2, BMR2-4, BMR2-12, BMR4-2), (PB3-6) y (PD4-7, PD4-25). Bolívar: cepas

(BO4-4, BO3-4), (BA5-3, BA4-19) y (PM3-14, PM4-5, PM3-8) (Cuadro 1).

Identificación de metabolitos secundarios de actividad antagonista

De la colección de bacterias con emisión de fluorescencia, cinco de ellas mostraron capacidad proteolítica (BO3-4, PM3-14, PM3-8, BA4-19 y PB3-6) con degradación de la gelatina alrededor en la zona de inoculación observado por 24 h, aumentando el diámetro a 48 h (Figura 2). Verificando la capacidad proteolítica en los controles positivos: *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* WCS417.

La presencia del gen *hcnABC* que codifica la enzima sintasas responsable de la producción de HCN (Svercel *et al.*, 2007), se verificó en (PM3-14, BO3-4, PB3-6, PM3-8) y el control positivo *P. protegens* CHA0 con un producto de amplificación de 570 pb (Figura 3A). El gen *prnD* uno de cuatro genes del operon de la codificación para biosíntesis de Prn, (Ligon *et al.*, 2000), amplificó el fragmento de 786 pb en las cepas (BMR2-2, BMR2-4, BMR2-12, BO3-4, PM3-14), *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* RE4 (Figura 3B).

Caracterización filogenética al gen del ARNr 16S

La combinación de patrones de restricción por *Afa*1, *Eco*r1 y *Taq*1 al gen del ARNr 16S define dos grandes grupos. El Grupo I, reúne a los sub-grupos: (A-B) de mayor homología en las cepas nativas (PB3-6, PM3-8, BO3-4, PM3-14) y (BA4-19) productoras de tres y dos de los metabolitos antagónicos. El Grupo II, reúne al sub-grupo (C) relacionando filogenéticamente

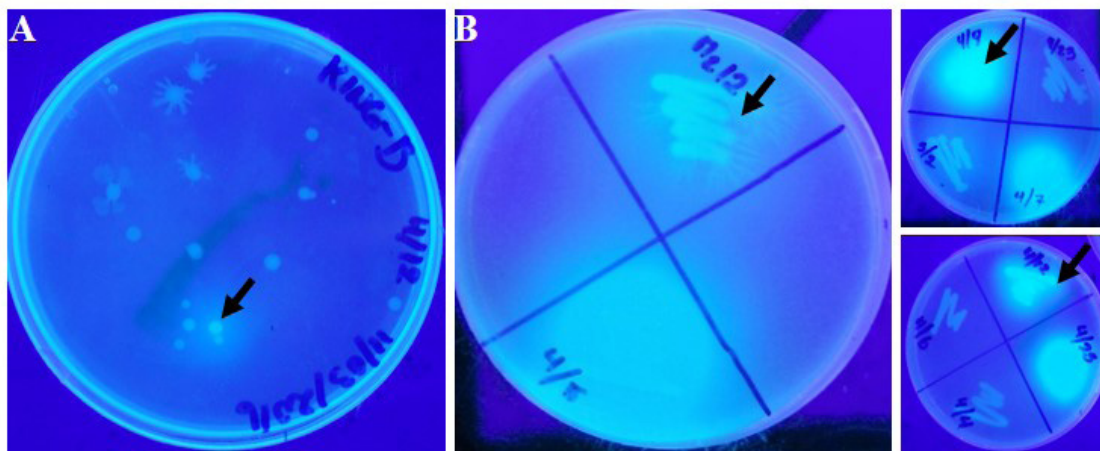


Figura 1. Identificación y selección de bacterias con fluorescencias de cultivares nativos de *Musa*. A. Colonias bacterianas con pigmentación fluorescentes; B. Banco de cepas aisladas con emisión de fluorescencia. Las flechas marcan las colonias puras con emisión de fluorescencia

Cuadro 1. Zonas de recolección de rizósfera en cultivares de *Musa* y su ubicación geográfica

Provincia	Cantón	Cultivar	Coordenadas geográficas UTM	Codificación de las cepas
1 Cotopaxi	La-Mana	Banano-Morado	X 698446 Y 9896788	BMC4-23
2 Cotopaxi	La-Mana	Banano-Morado	X 698446 Y 9896788	BMC4-9
3 Los Ríos	Quinsaloma	Banano-Morado	X 683591 Y 9870994	BMR2-2
4 Los Ríos	Quinsaloma	Banano-Morado	X 683591 Y 9870994	BMR2-4
5 Los Ríos	Quinsaloma	Banano-Morado	X 683591 Y 9870994	BMR2-12
6 Los Ríos	Quinsaloma	Banano-Morado	X 683591 Y 9870994	BMR4-2
7 Los Ríos	Quinsaloma	Plátano-Barraganete	X 683591 Y 9870994	PB3-6
8 Los Ríos	Patricia Pilar	Plátano-Dominico	X 674344 Y 9935500	PD4-7
9 Los Ríos	Patricia Pilar	Plátano-Dominico	X 674344 Y 9935500	PD4-25
10 Bolívar	Las Naves	Banano-Orito	X 681939 Y 9856090	BO3-4
11 Bolívar	Las Naves	Banano-Orito	X 681939 Y 9856090	BO4-4
12 Bolívar	Las Naves	Banano-Almendro	X 681939 Y 9856090	BA5-3
13 Bolívar	Las Naves	Banano-Almendro	X 681939 Y 9856090	BA4-19
14 Bolívar	Las Naves	Plátano-Maqueño	X 681939 Y 9856090	PM3-8
15 Bolívar	Las Naves	Plátano-Maqueño	X 681939 Y 9856090	PM3-14
16 Bolívar	Las Naves	Plátano-Maqueño	X 681939 Y 9856090	PM4-5

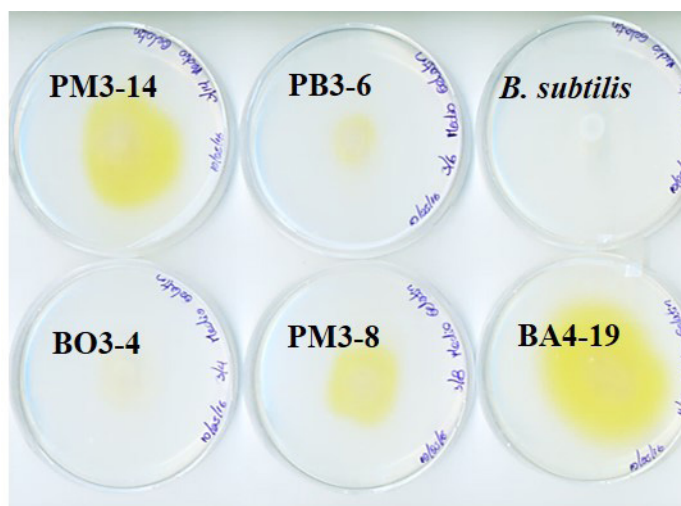


Figura 2. Actividad proteolítica de las bacterias. Producción de proteasa en las cepas (PM3-14, PB3-6, BO3-4, PM3-8 y BA4-19) en placa Petri con agar-gelatin por 48 h a 25 °C

las cepas controles *P. veronii* R4 y *P. protegens* CHA0 de capacidad proteolítica y productoras de reguladores de crecimiento vegetal AIA (Canchignia *et al.*, 2016). El sub-grupo (D), reúne a las cepas nativas (BMR2-4, BMC4-9, PD4-7, PD4-25, BO4-4, BA5-3) carentes de los metabolismo antagonista estudiados (Figura 4).

La caracterización molecular al gen ARNr 16S se sintetiza en el Cuadro 2, demostrando un grado similitud

de 94 a 99% para los géneros: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Las bacterias con los tres metabolitos antagónicos corresponde a *Klebsiella variicola* (BO3-4) y *Enterobacter asburiae* (PM3-14), de los cultivares de *Musa*: Banano-Orito y Plátano-Maqueño. Las cepas (PB3-6 y PM3-8) mostraron un 98% de identidad a (*Pseudomonas putida* y *Serratia marcescens*) respectivamente. La cepa BA4-

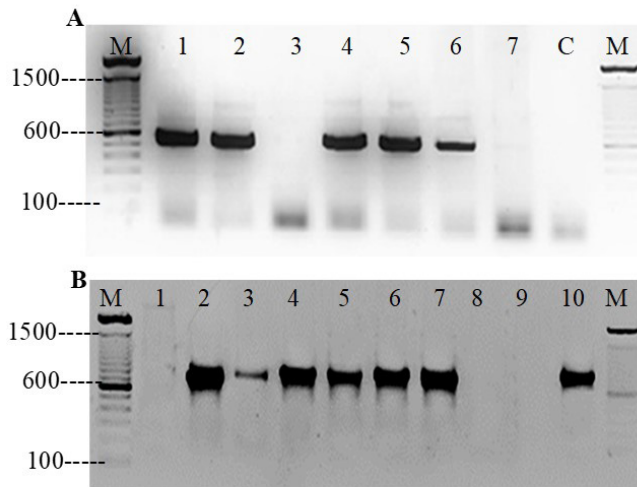


Figura 3. Amplificación de los genes *hcnABC* y *prnD* por PCR para la identificación de cepas bacterianas productoras de metabolitos antagónicos. **A.** Amplificación del gen *hcnABC* de 570 pb. M, marcador de masa molecular (Lader 100 pb Invitrogen); Carril 1 (*P. protegens* CHA0); Carriles 2 - 6 las bacterianas (PM3-14, BA4-19, BO3-4, PB3-6, PM3-8); Carril 7 (*P. veronii* R4); **B.** Amplificación del gen *prnD* de 786 pb; Carril 1 (*B. subtilis*); Carril 2 (*P. protegens* CHA0); Carril 3 (*P. veronii* R4); Carriles 4 – 10 las bacterias nativas (BMR2-2, BMR2-4, BMR2-12, BO3-4, PB3-6, PM3-8, PM3-14)

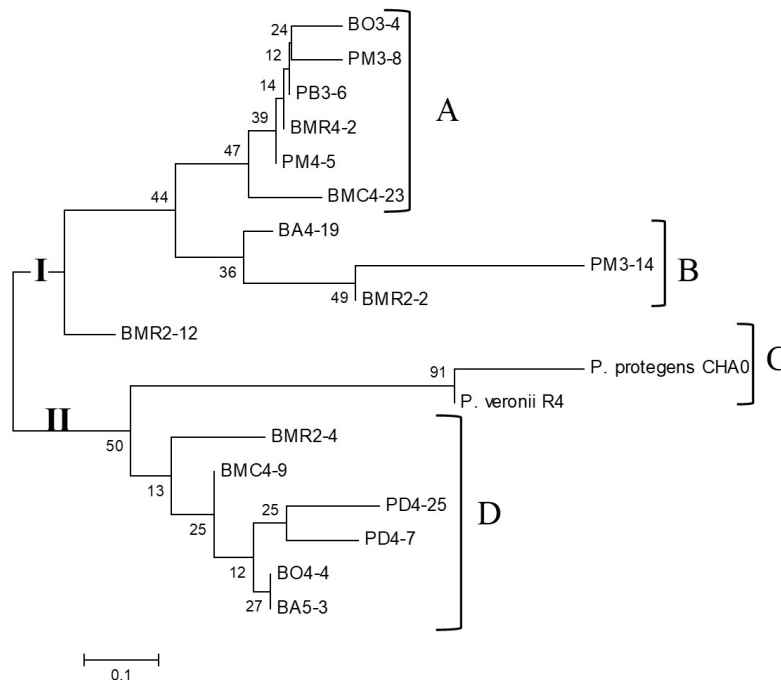


Figura 4. Relación filogenético de bacterias fluorescentes de *Musa* basados en patrones ARDRA. Fue realizado un Dendrograma de perfiles al gen del ARNr 16S de las bacterias fluorescentes, la distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap de (1000)

Cuadro 2. Caracterización de los aislados bacterianos al compararse por GenBank de NCBI

Cepas	Metabolitos antagónicos			Identidad a la Base de datos de NCBI de GenBank			
	PR	HCN	Prn	Organismo	Cepa	Identidad (%)	Número de Accesoión
1 BMC4-23				<i>Serratia marcescens</i>	PWN146	99	LT575490.1
2 BMC4-9				<i>Pseudomonas putida</i>	Ppnb1	99	FJ545651.1
3 BMR2-2			+	<i>Acinetobacter sp</i>	Ebas6	94	EU252078.1
4 BMR2-4			+	<i>Pseudomonas putida</i>	CDd-9	99	GU248219.1
5 BMR2-12			+	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NBRC13006	99	AB680365.1
6 BMR4-2				<i>Enterobacter aerogenes</i>	FCC47	98	JF772092.1
7 PB3-6	+	+		<i>Pseudomonas putida</i>	C11	98	KJ569371.1
8 PD4-7				<i>Pseudomonas putida</i>	L1	98	CP007546.1
9 PD4-25				<i>Pseudomonas putida</i>	100	94	KX821734.1
10 BO3-4	+	+	+	<i>Klebsiella variicola</i>	GJ3	97	CP017289.1
11 BO4-4				<i>Pseudomonas putida</i>	DLL-E4	99	CP007620.1
12 BA5-3				<i>Pseudomonas putida</i>	CDd-9	99	GU248219.1
13 BA4-19	+			<i>Enterobacter asburiae</i>	L1	98	KU212142.1
14 PM3-8	+	+		<i>Serratia marcescens</i>	LPK411	99	MF455219.1
15 PM3-14	+	+	+	<i>Enterobacter asburiae</i>	ZJB-LLJ	99	JQ824856.1
16 PM4-5				<i>Serratia marcescens</i>	P3	97	GU826157.1

Producción de metabolitos secundarios: PR-Proteasa, HCN-cianuro de hidrogeno, Prn-pirrolnitrina

19 con la producción de PR tiene similitud genética del 98% con *Enterobacter asburiae*.

De la rizósfera de Banano Morado se recuperaron las cepas (BMR2-2, BMR2-4, BMR2-12) con identidad genética para (*Acinetobacter sp*, *Pseudomonas putida* y *Acinetobacter calcoaceticus*).

El análisis filogenético al gen ARNr 16S generó dos grandes grupos. El Grupo I, reúne diez aislados nativos, donde cinco de ellas corresponden a *P. putida* cepas: (PD4-25; PD4-7; BO4-4; BMC4-9; BA5-3; BMR2-4) cercanamente agrupados con *P. putida* BIRD-1. Asimismo, se observó el agrupamiento de bacterias nativas de *Acinetobacter* cepas: (BMR2-2 y BMR2-12), con homología para este género. Además, se verifica el distanciamiento de *P. putida* PB3-6 cepa productora de los dos de los metabolitos antagónicos agrupado al género *P. putida* F1, con capacidad de biosíntesis de sideróforos de actividad antagónica (Ren *et al.*, 2005).

Dentro de este grupo se excluye la cepa BMR4-2 que corresponde a *Enterobacter aerogenes*. El Grupo II,

reúne las cepas nativas con la presencia de tres y dos metabolitos antagonistas para las cepas (BO3-4, PM3-14 y PM3-8), agrupándose con las cepas *K. variicola* DX120E, *E. asburiae* JAS5 y *S. marcescens* B2 (Figura 5). Este resultado al análisis filogenético demuestra la existencia de una estrecha relación filogenética para la selección de cuatro cepas candidatas para cumplir con la función de PGPR.

Discusión

La rizósfera de las siete plantaciones de *Musa* favoreció al aislamiento de 16 aislados bacterianos nativos, por la pigmentación de color amarillo verdoso en King B líquido. En particular *P. fluorescens* y *P. putida*, produce un agua soluble de color amarillo-verdoso fluorescente, por la presencia de sideróforos de tipo pioverdina (Hohnadel y Meyer, 1988). Los sideróforos producidos por bacterias colonizadoras de raíces, inhiben el crecimiento hongos patógenos

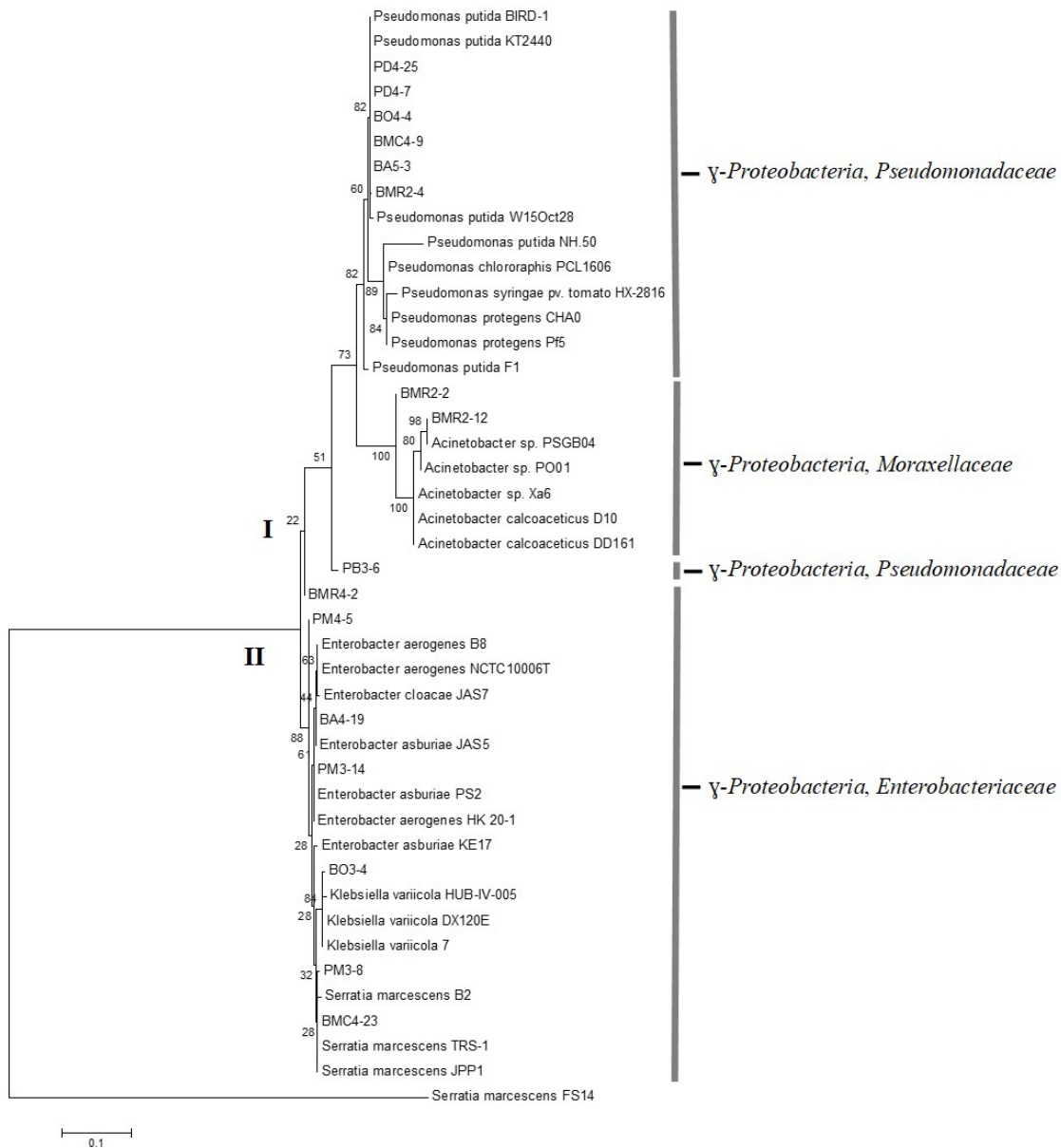


Figura 5. Árbol filogenético de los aislados bacterianos basados en la secuenciación del gen ARNr 16S. El árbol filogenético se basó al método Neighbour-joining, las distancias evolutivas se basaron a Kimura 2-parámetro. Distancias horizontales son proporcionales a las distancias filogenéticas están expresadas en sustituciones para un porcentaje de 1000 repeticiones

de plantas (Kumar, Arasu y Gunasekaran, 2002). Las *Pseudomonas* spp al desarrollarse en condiciones limitantes de hierro incrementan la producción de sideróforos (Almeida y Almeida, 2006), responsable de una eficiente estrategia de captación de hierro (Mirleau *et al.*, 2000). Observando la formación de color amarillo-verdoso fluorescente para las cepas nativas (BMC4-9, BMR2-4, PB3-6, PD4-7, PD4-25, BO4-4 y BA5-3) (Figura 1), donde Sutra *et al.* (2000), explica la presencia de mayores poblaciones de *Pseudomonas* spp

en la rizósfera de cultivares de bananos. Por lo tanto, las *Pseudomonas* son los microorganismos antagonistas más frecuentemente aislados de la rizósfera (Hebbar *et al.*, 1992).

Los metabolitos secundarios son componentes claves en la respuesta antagónica de las bacterias, verificando la actividad proteolítica en las cepas nativas: BO3-4, PM3-14, PM3-8, BA4-19, PB3-6 (Figura 2). Esta metodología es determinante para el escrutinio de *Pseudomonas*, donde la actividad proteolítica resulta

tener antagonismo a *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea* (Naik et al., 2008). Esta enzima lítica degrada la pared celular de hongos fitopatógenos que actúan como factores bio-controladores (Infante et al., 2009). Esto demuestra que la proteasa alcalina AprA de tipo metalopeptidasas, secretada por *P. protegens* CHA0 está involucrada en la actividad nematocida a *Meloidogyne incognita* (Siddiqui et al., 2005). La característica de la actividad proteolítica de las cepas nativas (BO3-4, PM3-14, PM3-8, BA4-19, PB3-6) se proyectaría en su selección para su actividad antagonista a *M. fijiensis* y *Radopholus similis*. Donde Yang et al. (2013), explica que las enzimas secretadas por *Pseudomonas* y *Bacillus* tiene la capacidad en degradar los componentes estructurales (proteínas, quitina y lípidos) permitiendo la penetración y colonización de las bacterias a los tejidos internos del patógeno.

Con la intención de caracterizar aún más el potencial de las cepas nativas (BO3-4, PM3-14), se detectó por PCR la presencia del gen hcnABC y Prn con los fragmentos de 570 y 786 pb (Figura 3). Donde los agentes bio-controladores *P. protegens* CHA0 y Pf-5 produce los componentes fenólicos DAPG, Plt y Prn de actividad anti-fúngica de amplio espectro (Maurhofer y Keel, 2005). Las bacterias que producen estos compuestos volátiles de (HCN; PR) y antibióticos (Prn; PCA) lideran las actividades antagonista a problemas fitopatógenos (Fischer et al., 2010). Al efecto inhibitorio en crecimiento micelial de *R. solani* se debe principalmente a la producción de PR y HCN por *P. fluorescens* UTPF5 (Afsharmanesh et al., 2010). Con esta perspectiva nos estaríamos anticipando la selección de cepas nativas (BO3-4, PM3-14, PM3-8, PB3-6) para determinar su actividad antagonista a *M. fijiensis* y *R. similis*.

La relación filogenética al dendrograma de similitud por ARDRA verificó la formación de dos grupos principales (Figura 4). Al grupo I, están relacionadas filogenéticamente las cepas nativas a productoras de uno a los tres metabolitos antagonicos. Esta observación sugiere que existe un vínculo con la habilidad de producción de metabolitos antagonicos indistintamente al origen de su aislamiento. Al grupo II, reunió las cepas controles *P. veronii* R4 y *P. protegens* CHA0. Este resultado muestra una cercana relación de rizobacterias asociadas a plantaciones poco intervenidas por el ser humano que mantienen en equilibrio su microbiota, para la contención de problemas fitopatógenos.

El análisis filogenético al gen del ARNr 16s, la colección de bacterias de *Musa* pertenecen al Filo γ -Proteobacteria (Figura 5). Estas se agrupan en tres familias, siete cepas pertenecen a la familia Pseudomonadaceae que corresponde al (44%), para el género *Pseudomonas* las cepas (BMC4-9, BMR2-

4, PB3-6, PD4-7, PD4-25, BO4-4 y BA5-3) con secuencias de similitud entre 94 a 99% para *P. putida*. La cepa BMR2-4 con la presencia de Prn, mantiene una homología del 99% a *P. putida* CDd-9 de capacidad en absorción de Cadmio, de accesión GU248219.1. Se destaca su agrupamiento con *P. putida* BIRD-1, de versatilidad en solubilizar fosfato inorgánico, hierro y sintetizar fitohormonas de tipo auxínico AIA (Matilla et al., 2011; Roca et al., 2013).

La familia Moraxellaceae reunió dos cepas nativas que corresponde el 12% de la colección, agrupando el género *Acinetobacter* para las cepas BMR2-2 y BMR2-12 positivas en Prn, con valores en similitud de 94 y 99% a *A. calcoaceticus*. Este tipo de bacterias tienen un potencial empleo en la rizósfera a la producción de giberelinas y solubilización de fosfato (Kang et al., 2009). Reportes de actividad antagonista por *A. calcoaceticus* cepa PUCM1018, está regulada por la producción de sideróforos de tipo catecol y hidroximato de gran potencial inhibitorio a *Fusarium oxysporum* (Farokh et al., 2011).

La familia Enterobacteriaceae agrupó siete cepas que corresponde el 44% de la colección, reuniendo tres géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*. Agrupando el género *Enterobacter* las cepas BMR4-2 y PM4-5, carentes de los metabolitos antagonicos. Las cepas nativas de *E. asburiae* BA4-19 y PM3-14, este último presentó los tres componentes antagonicos. Reportes de *E. asburiae* JAS5 y *E. cloacae* JAS7 tienen la habilidad de promover el desarrollo en plantas por biosíntesis de AIA y su empleo en bio-rremediación de pesticidas en agricultura (Abraham y Silambarasan, 2015). La aplicación de *Enterobacter* sp. cepa Xy3 en *Lycopersicon esculentum* tiene la eficacia del 65% en bio-control de *Ralstonia solanacearum* (Xue et al., 2009). Esto fortalece la selección de BA4-19 y PM3-14 que contribuiría al incremento de biomasa en plantaciones de banano y efecto bio-controlador a *M. fijiensis*.

El género *Klebsiella* se agrupó concretamente con *K. variicola* cepa BO3-4, bacterias endófitas que promueven el desarrollo en plantas mediante la transferencia eficiente de *N. fitohormonas* y producen señales químicas para activar el mecanismo en defensa en plantas (Rosenblueth et al., 2004; Wei et al., 2013). Donde, este tipo de género como *K. variicola* DX120E, producen sideróforos y enzimas para la degradación de pared celular en hongos patógenos (Lin et al., 2015). Permitiendo corroborar la selección de *K. variicola* BO3-4 para futuros proyectos de actividad antagonista a problemas fitopatológicos.

En el género *Serratia* se agruparon las cepas nativas BMC4-23 y PM3-8 esta última positiva para PR y HCN con valores de identidad del 99% a *S. marcescens*, este

generó tiene actividad quitinolítica a hongos patogénicos de enfermedades tropicales (Gutiérrez-Román *et al.*, 2012). Aplicaciones de *S. marcescens* B2 en cultivo de *Oriza sativa* ejerce el control biológico a *Rhizoctonia solani* AG-1 (Someya *et al.*, 2014). En condiciones *in vitro* *S. marcescens* CFFSUR-B2, inhibe la germinación y desarrollo del tubo germinativo de acósporas de *M. fijiensis* (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Conclusión

De la rizósfera de *Musa*, se diferenció un 10% de bacterias con emisión de fluorescencia. El 50% de los aislados bacterianos estudiados presentaron dos y tres de los metabolitos antagónicos, en las cepas (PB3-6, PM3-8) y (BO3-4 y PM3-14) respectivamente. La secuenciación al gen del ARNr 16s, se caracterizó tres grandes familias: Pseudomonadaceae, Moraxellaceae y Enterobacteriaceae. Con niveles de similitud de secuencias del 98 a 99% al gen del ARNr 16 para las cepas nativas de *P. putida* PB3-6, *S. marcescens* PM3-8, *K. variicola* BO3-4 y *E. asburiae* PM3-14. Una investigación más exhaustiva requiere de la identificación de sideróforos, quitinasas, reguladores de crecimiento y el mecanismo antagónico a *M. fijiensis*.

Agradecimientos

El trabajo se financió por el Proyecto FOCICYT (UTEQ-AGRICOLA-2-FCA-IAGR-2014-14), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Referencia bibliográfica

- Abraham, J., Silambarasan, S. 2015. Plant growth promoting bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in mineralization of endosulfan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 3–13. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1504-7>
- Afsharmanesh, H., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Behboudi, K. 2010. Characterization of the antagonistic activity of a new indigenous strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from onion rhizosphere. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 187–194.
- Almeida, G., Amazonas, E. 2006. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(May), 411–419.
- Canchignia, H., Altimira, F., Montes, C., Sánchez, E., Tapia, E., Miccono, M., ... Prieto, H. 2016. Candidate nematicidal proteins in a new *Pseudomonas veronii* isolate identified by its antagonistic properties against *Xiphinema index*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 62, 1–11. <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.07.001>
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J. J., Argel, L. E., Uribe-velez, D., ... Orduz-peralta, S. 2012. Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0052-8>
- De Souza, J., De Boer, M., De Waard, P., Van Beek, T., Raaijmakers, J. 2003. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7161–7172. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7161-7172.2003>
- Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., Reis, VM. 1995. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in Non-Leguminous crops. In *Azospirillum VI and Related Microorganisms* (pp. 3–14). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79906-8_1
- Farokh, R. Z., Sachdev, D., Pour, N. K., Engineer, A., Pardesi, K. R., Zinjarde, S., ... Chopade, B. A. 2011. Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6), 556–566. <https://doi.org/10.4014/jmb.1012.12006>
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, 39(4), 783–791.
- Fischer, S., Jofré, E., Cordero, P., Gutiérrez, F., Mori, G. 2010. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 97(3), 241–251. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9405-9>
- Frey, P., Chavatte, M., Clausse, M., Courrier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Garbaye, J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist*, 165(1), 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01212.x>
- Fu, G., Huang, S., Ye, Y., Wu, Y., Cen, Z., & Lin, S. 2010. Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacies on controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. *Biological Control*, 55(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.001>
- Galarza, L., Akagi, Y., Takao, K., Kim, C. S., Maekawa, N., Itai, A., ... Kodama, M. 2015. Characterization

- of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 81(3), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0587-x>
- Gutiérrez-Román, M. I., Holguín-Meléndez, F., Bello-Mendoza, R., Guillén-Navarro, K., Dunn, M. F., & Huerta-Palacios, G. 2012. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 145–153. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0803-6>
- Gutiérrez-Román, M. I., Holguín-Meléndez, F., Dunn, M. F., Guillén-Navarro, K., & Huerta-Palacios, G. (2015). Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa* spp.). *BioControl*, 60(4), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9655-6>
- Gutiérrez, M., Holguín, F., Dunn, M., Guillén, K., Huerta, G. 2015. Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa* spp.). *International Organization for Biological Control*. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9655-6>
- Haas, D., Défago, G. 2005. Soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology*, (March). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Hebbar, K., Davey, A., Merrin, J., Dart, P. 1992. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium-Moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: Colonization of rhizosphere and roots. *Soil Biology & Biochemistry*, 24(10), 989–997. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90027-u](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90027-u)
- Hernández García, M., Morgante, V., Ávila Perez, M., Villalobos Biaggini, P., Miralles Noé, P., González Vergara, M., Seeger Pfeiffer, M. 2008. Novel s-triazine-degrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(5). <https://doi.org/10.2225/vol11-issue5-fulltext-4>
- Hohnadel, D., Meyer, J. 1988. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake *Pseudomonas* strains. *Journal of Bacteriology*, 170(10), 4865–4873.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14–21.
- Janda, J. M., Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Kang, S. M., Joo, G. J., Hamayun, M., Na, C. I., Shin, D. H., Kim, H. Y., ... Lee, I. J. 2009. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters*, 31(2), 277–281. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9867-2>
- King, E., Ward, M., Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002221435490222X>
- Kolbert, C. P., & Persing, D. H. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80052-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80052-6)
- Kuarabachew, H., Assefa, F., Hiskias, Y. 2007. Evaluation of *Ethiopian isolates* of *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *Ralstonia* (*Pseudomonas*) solanacearum. *Acta Agriculturae Slovenica*, 902(12), 125–135.
- Kumar, N.R., Arasu, V.T., Gunasekaran, P. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*, 3(March 1977), 1463–1466.
- Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H., Pe, K. Van. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria †. *Pest Management Science*, 56, 688–695.
- Lin, L., Wei, C., Chen, M., Wang, H., Li, Y., Li, Y., Yang, L. 2015. Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. *Standards in Genomic Sciences*, 10(22), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0004-2>
- Matilla, M.A., Pizarro-Tobias, P., Roca, A., Fernández, M., Duque, E., Molina, L., ... Ramos, J.L. 2011. Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *Journal of Bacteriology*, 193(5), 1290. <https://doi.org/10.1128/JB.01281-10>
- Maurhofer, M., Keel, C. 2005. Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0.

- Journal of Applied Microbiology, 0(99), 24–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02597.x>
- Mavrodi, DV, Bonsall, RF., Delaney, SM., Soule, MJ., Phillips, G., Thomashow, LS. 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6454–6465. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6454>
- Mechihi, T., Stackebrant, E., Fuchs, N. 2002. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Archives Microbiology*, 178, 26–35. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0422-6>
- Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J., Mazurier, S., Y, PL. 2000. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *Microbial Ecology*, 34(February), 35–44.
- Naik, PR., Sahoo, N., Goswami, D., Ayyadurai, N., Sakthivel, N. 2008. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microbial Ecology*, 56(3), 492–504. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9368-9>
- Raaijmakers, J., Weller, D., Thomashow, L. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 881–887.
- Ren, D., Zuo, R., Wood, TK. 2005. Quorum-sensing antagonist influences siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*, 689–695. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1691-6>
- Roca, A., Pizarro-Tobías, P., Udaondo, Z., Fernández, M., Matilla, MA., Molina-Henares, MA., ... Ramos, JL. 2013. Analysis of the plant growth-promoting properties encoded by the genome of the rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *Environmental Microbiology*, 15(3), 780–794. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12037>
- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., Martínez-Romero, E. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 27–35. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00261>
- Ross, IL., Alami, Y., Harvey, P., Achouak, W., Ryder, M. 2000. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related pseudomonads isolated from wheat field soils in South Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1609–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1609-1616.2000>
- Siddiqui, I.A., Haas, D., Heeb, S. 2005. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5646–5649. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5646>
- Simon, A., Ridge, E. 1974. The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 37(3), 459–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1974.tb00464.x>
- Smith, H., Dner, K. 1958. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *Department of Bacteriology and Immunology*, 76(6), 662–665.
- Someya, N., Nakajima, M., Watanabe, K. 2014. Biocontrol science and technology potential of *Serratia marcescens* strain B2 for biological control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology*, (December 2014), 37–41. <https://doi.org/10.1080/09583150400016092>
- Sutra, L., Risède, J., Gardan, L. 2000. Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 31(4), 289–293. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2000.00816.x>
- Svercel, M., Duffy, B., Défago, G. 2007. PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnAB* in *Pseudomonas* spp. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.018>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Van Loon, LC. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>
- Wei, C., Lin, L., Luo, L., Xing, Y. 2013. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Bio*. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0878-3>
- Xue, QY., Chen, Y., Li, SM., Chen, LF., Ding, GC., Guo, DW., Guo, JH. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48(3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.11.004>

- Yang, J., Liang, L., Li, J., Zhang, K. 2013. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7081–7095. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5045-0>
- Zhou, T., Chen, D., Li, C., Sun, Q., Li, L., Liu, F., Shen, B. 2012. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. *Microbiological Research*, 167(7), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.003>