



Rizobacterias con potencial antagonista *in vitro* a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Rhizobacteria with potential antagonist *in vitro* to *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Karen Tatiana Chávez Arteaga¹, Jefferson Javier Guato Molina², Jorge Luis Rodríguez Acosta^{3a}, Ángel Virgilio Cedeño Moreira^{3b}, Ricardo Fernando Romero Meza^{3c}, Hayron Fabricio Canchignia Martínez^{4*}

¹Departamento Bionintanga, NINTANGA S.A. Panamericana Norte km 10, Latacunga, Ecuador. Código Postal: 050103. Mail: (binintanga@nintanga.com.ec), Tel: (593-2) 3959 878, ORCID: 0000-0002-7615-2145

²Fincas Experimentales Nestlé, R&D. Tours, Quevedo, EC. Estación experimental (El Chollo), Valencia, El Vergel. Código Postal: 121150. Mail: (jefferson94@hotmail.com), Tel: (593-05) 999132067, ORCID: 0000-0002-6442-0149

^{3a}Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, km 1.5 a Santo Domingo de los Tsáchilas, EC. Código Postal: 120501. Mail: (jorgelaco.rodriguez@uteq.edu.ec), Tel: (593-05) 978990046, ORCID: 0000-0001-7207-8702

^{3b}Mail: (anvirced125.55@hotmail.com), Tel: (593-05) 999132067, ORCID: 0000-0002-6564-5569

^{3c}Mail: (ricarhapo@hotmail.com), Tel: (593-05) 0969347127, ORCID: 0000-0002-3915-3309

^{4*}Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, km 1.5 a Santo Domingo de los Tsáchilas, EC. Código Postal: 120501. Autor de correspondencia Mail: (hcanchignia@uteq.edu.ec), Tel: (593-05) 091279346, ORCID: 0000-0003-1195-5446

Rec.: 13.05.2019. Acept.: 04.04.2020.

Publicado el 30 de diciembre de 2020

Resumen

El empleo de bio-controladores en la agricultura beneficia los aspectos fisiológicos en plantas, a diferencia de la constante aplicación de pesticidas en el cultivo del banano ha ocasionado la pérdida de la sensibilidad en *M. fijiensis*, reduciendo la microbiota del suelo. El objetivo se enfocó en caracterizar el potencial antagonístico de las PGPR en inhibición de germinación de ascósporas y desarrollo micelial de *M. fijiensis*. Se realizaron cultivos monosporicos de *M. fijiensis* e identificado por PCR. Se evaluaron los extractos celulares de *Pseudomonas putida* PB3-6, *Klebsiella variicola* BO3-4, *Enterobacter asburiae* BA4-19, *Serratia marcescens* PM3-8, *Enterobacter asburiae* PM3-14, *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas fluorescens* WCS417, *Pseudomonas veronii* R4 y *Bacillus subtilis* ATCC 5540 para sus evaluaciones antagonistas: a) Inhibición del tubo germinativo de las ascósporas al 2% y b) Desarrollo micelial al (2 y 10 %). La PCR empleado en la identificación de *M. fijiensis* se confirma el producto de amplificación de 1018 pb. El factor antagonístico de los extractos celulares al 2 % de PM3-14 y CHA0 inhibe sobre el 80 % al desarrollo de los tubos germinativos. La inhibición al desarrollo micelial del extracto celular al 2 %, de CHA0 logró una efectividad del 54 % y las cepas (PM3-8, PM3-14 y BA4-19) con (32, 26 y 26 %). Al 10 % del extracto de la cepa PM3-8 inhibe el desarrollo micelial con niveles de turbidez de 0,47 (OD₆₀₀ nm). El empleo de estos bio-controladores en la agricultura ofrecerá una alternativa para beneficiar en la reducción del uso de agroquímicos.

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*, rizobacterias, actividad antagonista, extracto celular.

Abstract

The use of biocontrollers in agriculture benefits the physiological aspects in plants, unlike the constant application of pesticides in the cultivation of banana has caused the loss of sensitivity in *M. fijiensis*, reducing soil microbiota. The objective was to characterize the antagonistic potential of PGPR in inhibition of ascospore germination and mycelial development of *M. fijiensis*. Monosporic cultures of *M. fijiensis* and identified by PCR were performed. The cellular extracts of *Pseudomonas putida* PB3-6, *Klebsiella variicola* BO3-4, *Enterobacter asburiae* BA4-19, *Serratia marcescens* PM3-8, *Enterobacter asburiae* PM3-14, *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas fluorescens* WCS417, *Pseudomonas veronii* R4 and *Bacillus subtilis* ATCC 5540 were evaluated for its antagonistic evaluations: a) Inhibition of the germination tube of the ascospores at 2% and b) Mycelial development at (2 and 10%). The PCR used in the identification of *M. fijiensis* confirms the amplification product of 1018 bp. The antagonistic factor of the cellular extracts at 2% of PM3-14 and CHA0 inhibits over 80% the development of germ tubes. The inhibition to the mycelial development of the cellular extract to 2%, of CHA0 achieved an effectiveness of 54% and the strains (PM3-8, PM3-14 and BA4-19) with (32, 26 and 26%). 10% of the extract of strain PM3-8 inhibited mycelial development with turbidity levels of 0.47 (OD₆₀₀ nm). The use of these biocontrollers in agriculture will offer an alternative to benefit in reducing the use of agrochemicals.

Keywords: *Mycosphaerella fijiensis*, rhizobacteria, antagonist activity, cellular extract.

Introducción

Las bananas comestibles como fruta fresca pertenecen al género *Musa acuminata*, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Aguilar y Kohlmann, 2006). En Ecuador al 2015 la producción de banano fue de 4.1 millón de toneladas de 162,039 ha (Proecuador, 2016). La disminución en producción de fruta se da por efecto del hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Sigatoka negra) principal problema fitopatológico en el cultivo de banano y plátano en América, Asia y África, causando pérdidas estimadas en 33 a 69 % al no controlarse la enfermedad (Marin, Romero, Guzmán, y Sutton, 2003). Para el control de Sigatoka negra se realizan aplicaciones constantes de fungicidas de acción sistémica, siendo potencialmente perjudicial para el medio ambiente (Fu et al., 2010), y su continua aplicación ha llevado a generar resistencia *M. fijiensis* (Romero, 1995).

La resistencia del hongo a fungicidas como: benomyl (Romero y Sutton, 1998), azoxystrobin (Amil, Heaney, Stanger y Shaw, 2007) y trifloxystrobin (Pérez, Hernández, Hernández y Pérez, 2002), se debe a su empleo frecuente y extensivo de estos químicos para el control de la enfermedad antes y después de la cosecha del banano. Aunque recientemente se han desarrollado fungicidas eficientes como triazoles y procloraz, pero el uso excesivo da a lugar a residuos químicos en frutos y causan daños a la salud humana (Fu et al., 2010).

El sector agropecuario ha iniciado trabajos de identificación y manipulación de PGPR, de la expresión en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria, que se destacan por sus capacidades simbióticas como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (Döbereiner, Baldani y Reis, 1995). Las bacterias al género *Pseudomonas* spp son las más estudiadas, al tener la capacidad de producir metabolitos secundarios y antibióticos que actúan como compuesto fúngicos: *pioluteorina* (Plt), *pirrolnitrina* (Prn), ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) y 2,4- *diacetilfloroglucinol* (2,4 DAPG) (Dwivedi y Johri, 2003). Los bio-controladores reportados en inhibir el desarrollo o germinación de ascósporas *M. fijiensis* están enfocados al empleo de extractos celulares de plantas, donde la obtención de un péptido antimicrobiano Ib-AMP4 e Ib-AMP2 de *Impatiens balsamina* inhibe el desarrollo micelial del hongo y germinación de sus ascósporas (Vasquez, Guzman, Patarroyo y Arango, 2009). La aplicación de microorganismo es otra de las estrategias que se están incorporando al control de Sigatoka negra, donde *Trichoderma* spp nativas del Ecuador han demostrado tener actividad antagonista a *M. fijiensis 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 de algunos países de América.

La rizosfera de los cultivares tradicionales de musáceas, exhibe gran diversidad de microorganismo que son empleados como estrategias al control biológico, entre ellas, estas poblaciones de *Pseudomonas* spp. mantienen la estabilidad de los cultivos y ejercen actividades antagonistas a sus enemigos naturales. Donde el objetivo es caracterizar el potencial antagónico de las PGPR en inhibición de germinación de ascósporas y desarrollo micelial de *M. fijiensis*.

Materiales y métodos

La investigación se realizó 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.

Selección y preparación de inóculo bacteriano

Del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microbiología de la UTEQ, fueron seleccionadas las rizobacterias provenientes de cultivares endémicos de Musáceas con su clasificación a metabolitos antagónicos (Cuadro 1). Además, se emplearon dos cepas control *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* WCS417 (donadas por el Dr. Dieter Haas y Dr. Ientse van der Sluis) y *Bacillus subtilis* ATCC 5540 (donada por el Dr. Humberto Prieto). Las rizobacterias se incubaron en King B líquido selectivo [(g/L): peptona, 20.0; glicerol, 15 mL; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1.5; agar, 15; agua destilada (pH 7.2)], suplementado con chloramphenicol (13 µg/mL), ampicilina (40 µg/mL) por 48 h (King et al., 1954).

Cuadro 1. Caracterización de los aislados bacterianos a producción de metabolitos antagónicos

	Organismo	Cepas	Metabolitos antagónicos		
			PR	HCN	Prn
1	<i>Pseudomonas putida</i>	PB3-6	+	+	
2	<i>Klebsiella variicola</i>	BO3-4	+	+	+
3	<i>Enterobacter asburiae</i>	BA4-19	+		
4	<i>Serratia marcescens</i>	PM3-8	+	+	
5	<i>Enterobacter asburiae</i>	PM3-14	+	+	+

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

Identificación de *M. fijiensis*

Del tejido foliar de banano Cavendish infectado con Sigatoka negra en los estadios 5 o 6, fueron colectados y segmentados en 10 cm². Las muestras se limpiaron con hipoclorito al 1 % y ubicadas en cámaras húmedas por 24 h para maduración de ascas y proceder a la descargar de ascósporas. Muestras de hojas de 5 cm² se fijaron al interior de la tapa de la placa Petri para sus descargas en (agar 2 g/L) a temperatura ambiente por 16 h. Las ascósporas se “pescaron” con jeringa de insulina y se inocularon en el medio PDA, para la obtención de cultivos monospóricos del hongo. Del micelio se realizó la extracción de ADN_g, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante DNeasy Plant Mini Kit de (QIAGEN-Start EE.UU.). La identificación de *M. fijiensis* se realizó por PCR empleando los oligonucleótidos específicos MF137 (5'GGCGCCCCGGAGGTCTCCTT 3'), que amplifica la región ITS entre la región ribosomal 18S y 5.8S (Johanson, 1995) y R635 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') en la región 25S del ADN ribosomal, de 1018 pb (Leiva *et al.*, 2013).

Obtención de extractos antagonísticos bacterianos

Las rizobacterias se incubaron en 50 mL de King B líquido a 150 rpm a 27 °C por 48 h en un agitador (Benchmark, Incu-Shaker), recuperando 15 mL de cultivo bacteriano y centrifugado a 6000 x g / 3 min (Centrifuge 800-B), proceso realizado en triplicado para recuperar el sobrenadante y descartar la presencia de células bacterianas. Los extractos del cultivo celular fueron filtrados empleando Nalgene Syringe de 0.2 µm y posteriormente sometidos a choque térmico de 15 min a 90°C a baño de agua (Memmert WNB 22) y 15 min a -40°C en el ultra congelador (Eppendorf-Innova U725) y almacenados a 4°C.

Ensayo de germinación de ascósporas de *M. fijiensis*

Las muestras de hojas de 5 cm² fijadas al interior de la tapa de la placa Petri del producto de las descargas, se sobrepusieron a las placas base con los extractos celulares al 2% con (agar 2 g/L), empleando una muestra del tejido foliar para un total de 25 placas. Se adhirió una hoja de acetato milimetrada en la base para delimitar el conteo de la formación del tubo germinativo de 10 ascósporas por cada 0.5 cm², observado con el microscopio óptico BOECO objetivo 10x, incubado a 27°C para su evaluación a 18, 24 y 48 h.

Ensayos antagonistas al desarrollo micelial de *M. fijiensis*

Se recuperó 0.2 mL de los extractos celulares y se homogenizaron en 9.8 mL del medio PDA y distribuidas en placas Petri, añadiendo tres discos de (1 cm Ø) micelial de *M. fijiensis* e incubados a 27°C. Se evaluó

el porcentaje de inhibición micelial desde el borde del tarugo hasta el crecimiento del hongo por 6, 8 y 12 días empleando la fórmula: % inhibición = (crecimiento del control – crecimiento del tratamiento / crecimiento del control) x 100.

Cinética de inhibición micelial del extracto al 10 % en medio líquido Sabouraud, de discos miceliales de (0.5 cm Ø) se re-suspendieron en 500 µl de agua ultra pura, disgregado con pistilo y vortex. Los fragmentos miceliales se ajustaron en agua a 10 x 10⁴ /mL según (Vasquez *et al.*, 2009), observado en cámara Neubauer (fondo del campo central de 0.1 mm y superficie de conteo 0.0025 mm²). En celdas de 1 mL de (12 x 12 x 45 mm) para espectrofotometría se añadieron 720 µL del medio Sabouraud con (20 g Dextrosa y 10 g Peptona), 90 µL de la suspensión micelial y 90 µL de extractos bacterianos. El desarrollo micelial se verificó por turbidez en longitud de onda de 600 nm (OD_{600nm}) en el espectrofotómetro UNICO 1205 Vis. Se empleó como control absoluto los 900 µl del medio Sabouraud como punto de inicio para su evaluación, la turbidez del medio de cultivo se evaluó por 7, 11, 15, 19 y 22 días. Los valores de turbidez del control no varían por la adición del extracto celular y la suspensión micelial.

En todos los experimentos los tratamientos contenían cinco replicas experimentales y cada una con cinco unidades experimentales. Los valores a cada condición están representados con el error estándar promedio individual (±), los tratamientos fueron sujetos al análisis de varianza por ANOVA, y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey SD, al nivel de significancia de (P≤0.05), empleando Statgraphics.

Resultados

Identificación de *Mycosphaerella fijiensis*

De tejido foliar con los síntomas de la enfermedad se recuperaron las ascósporas de *M. fijiensis* (Figura 1A), obteniendo cultivos monospóricos del hongo (Figura 1B) e identificando por PCR con el producto de amplificación de 1018 pb. La especificidad de la reacción fue determinada al no observar amplificación inespecífica en el control con *Fusarium oxysporum* (Figura 1C).

Extractos celulares de PGPR con inhibición al tubo germinativo de ascósporas

El efecto inhibitorio al desarrollo del tubo germinativo determinaron diferencias significativas entre los tratamientos, donde la aplicación del extracto celular de *E. asburiae* PM3-14 se observó escasamente el desarrollo del tubo germinativo de (2.5 – 7.5 – 12.5 %) y con similar respuesta con la cepa control *P. protegens*

CHA0 de (2.5 – 8.75 – 16.25 %), las ascósporas sin los extractos se verificaron la formación del 100% de los tubos germinativos entre los tiempos de evaluación de 18, 24 y 48 h. La aplicación de los extractos de *E. asburiae* BA4-19 y *S. marcescens* PM3-8 no superan el 25% germinación de las ascósporas y el aumento de la tasa de germinación sobre el 30% por aplicación de los extractos de *K. variicola* BO3-4, *P. putida* PB3-6, cepas controles *P. veronii* R4, *P. fluorescens* WCS417 y *B. subtilis* para las 48 h de evaluación (Figura 2).

Las ascósporas presentaron anomalías en sus caracteres morfológicos por aplicación del extracto de *E. asburiae* PM3-14 y *P. protegens* CHA0 causando la inhibición del tubo germinativo de las ascósporas y la turgencia en ellas (Figura 3 A-B). Los extractos de las cepas nativas *E. asburiae* BA4-19 y *S. marcescens* PM3-8 mostraron elongación anormal de un solo tubo germinativo (Figura 3 C), sin aplicación del sobrenadante

mostraron el desarrollo de los tubos germinativos bipolar característico de *M. fijiensis* (Figura 3 D).

Inhibición del desarrollo micelial por extractos celulares al 2 %

Los extractos celulares de las cepas (PM3-14, BA4-19 y PM3-8) de mayor efecto inhibitorio al tubo germinativo fueron seleccionadas para evaluar su respuesta al desarrollo micelial, observando diferencias significativas entre los tratamientos donde el extracto celular de *P. protegens* CHA0 inhibe el desarrollo micelial del hongo con (76, 66 y 54 %) a los 6, 8, 12 días. El efecto de los extractos celulares de las cepas (PM3-8, BA4-19 y PM3-14) refleja actividad antagónica mínima con (34, 26 y 26 %), a los 12 días. La cepa control *P. veronii* R4 no supera el 25 % al doceavo día, sin aplicación del extracto se verifica un normal desarrollo micelial del hongo (Figura 4).



Figura 1. Identificación de *Mycosphaerella fijiensis*

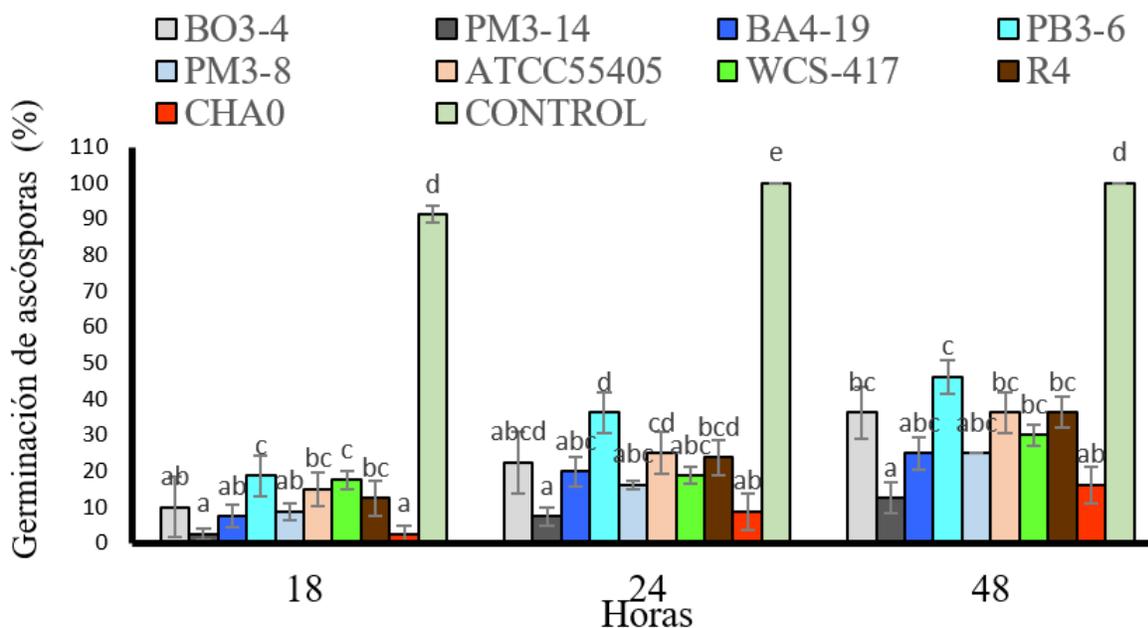


Figura 2. Inhibición del tubo germinativo en ascósporas de *M. fijiensis*. Se evaluó los extractos al 2% al desarrollo del tubo germinativo de ascósporas a 18, 24 y 48 h. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($P \leq 0.05$), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento (\pm).

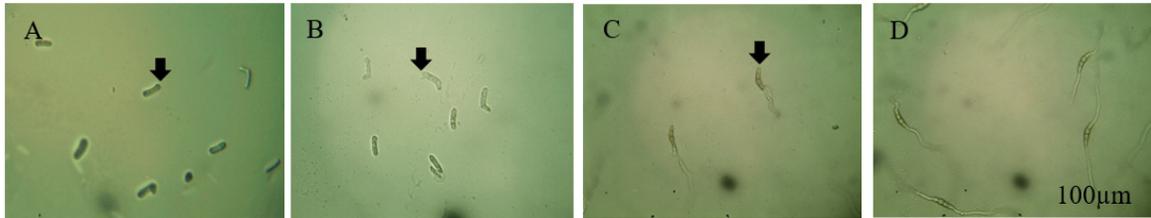


Figura 3. Efecto de los extractos en inhibición al desarrollo del tubo germinativo de ascósporas. A No germinación de las ascósporas tratadas con *E. asburiae* PM3-14, B Aplicación de *P. fluorescens* CHA0, C Germinación anormal de las ascósporas con un tubo germinativo por efecto de *E. asburiae* BA4-19, D Ascósporas no tratadas con germinación normal de *M. fijiensis* observadas bajo microscopio a (10 x), después de 48 h. Las flechas marcan el efecto inhibitorio a la formación del tubo germinativo.

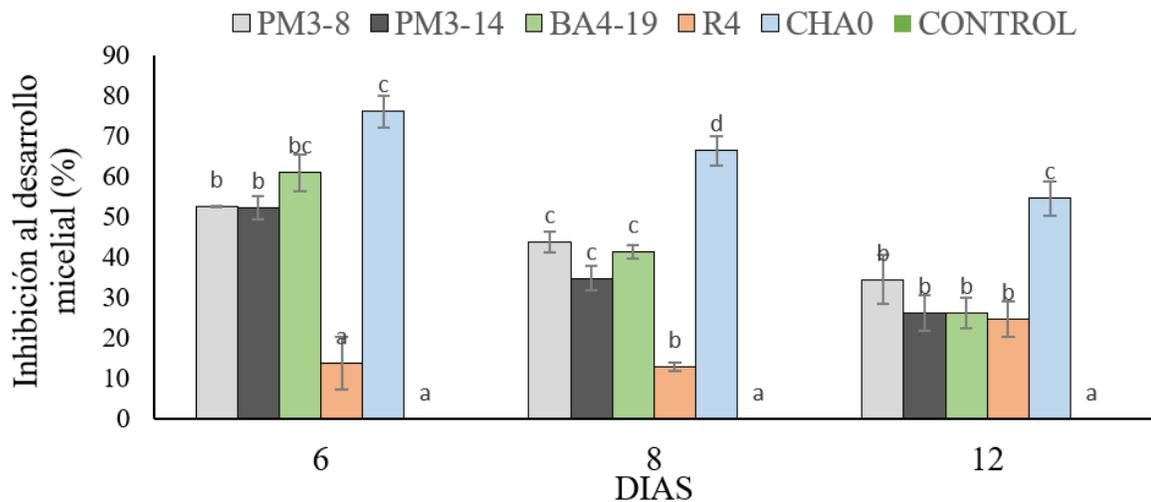


Figura 4. Efecto antagónico de extractos celulares al 2 % en desarrollo micelial. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($P \leq 0.05$), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento (\pm).

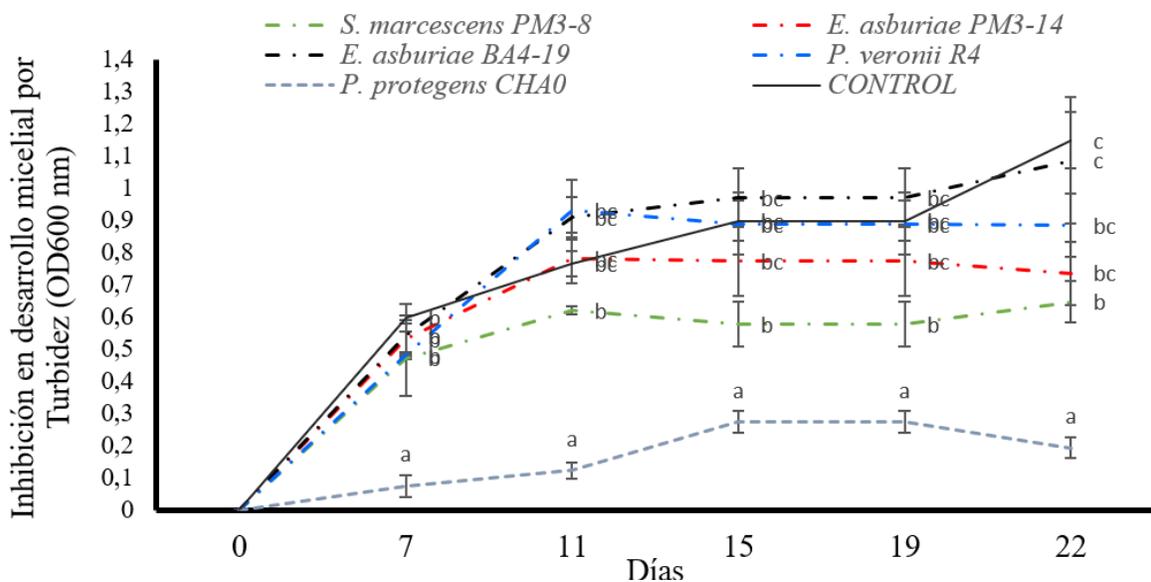


Figura 5. Extracto al 10 % en cinética de inhibición al desarrollo micelial. Desarrollo micelial en medio líquido Sabouraud post-incubado por 7, 11, 15, 19 y 22 días. Los resultados son expuestos y analizados por día de incubación, los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($P \leq 0.05$), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento (\pm).

Inhibición del desarrollo micelial con extractos celulares al 10 %

Los resultados en cinética de inhibición al desarrollo micelial por aplicación de los extractos celulares al 10%, se observaron diferencias significativas entre ellas. El extracto celular de *P. protegens* CHA0 registró la mayor inhibición al desarrollo micelial con niveles de turbidez de 0.272 a los (15 y 19 días) que disminuyen gradualmente hasta 0.19 (OD₆₀₀nm) al día 22. La cepa nativa *S. marcescens* PM3-8 tiene efectividad en inhibición micelial con niveles de turbidez de (0.472; 0.620; 0.577; 0.577 y 0.47 OD₆₀₀nm) que verifican su respuesta antagonista. La actividad del extracto *E. asburiae* PM3-14 es mínima con niveles de turbidez de 0.530 (OD₆₀₀nm) al quinto día y manteniéndose en 0.736 (OD₆₀₀nm) al día 22. La cepa nativa *E. asburiae* BA4-19 no ejerce cambios al desarrollo del micelio siendo similares al control (Figura 5). El control presentó niveles de turbidez de (0.541; 0.910; 0.971; 0.971 y 1.087 OD₆₀₀nm) a sus días de evaluación (7, 11, 15, 19 y 22).

Discusión

Del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microbiología de la UTEQ, de las cepas seleccionadas: *P. putida* PB3-6, *K. variicola* BO3-4, *E. asburiae* BA4-19, *S. marcescens* PM3-8, *E. asburiae* PM3-14 mostraron tener actividad proteolítica y emitían fluorescencia igual a los controles *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* WCS417. Los metabolitos secundarios son un componente clave de la respuesta antagonista de las rizobacterias a patógenos del suelo, donde la proteasa es una enzima que degrada la pared celular al patógeno, enzimas hidrolíticas que actúan como factores biocontroladores (Infante *et al.*, 2009).

La efectividad de los extractos celulares al 2 % de las cepas nativas PM3-14, PM3-8 y BA4-19 impiden la formación al desarrollo del tubo germinativo de las ascósporas. Esto coincide con Castillo *et al.* (2016), donde la aplicación del extracto de *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 inhibe el desarrollo del tubo germinativo de ascósporas de *M. fijiensis*. La efectividad de *P. protegens* CHA0 en inhibición del tubo germinativo de *M. fijiensis* está vinculado a la producción del 2,4-DAPG, donde este antibiótico inhibe un amplio espectro de hongos patogénicos (Ahmadzadeh y Tehrani, 2009). El potencial antagonista de las PGPR se ha enfocado en su capacidad de producir compuestos anti-fúngicos estos actúan en su estructura celular del patógeno (Kim *et al.*, 2003). Las ascósporas presentaron anomalías en sus caracteres morfológicos: turgencia en las ascósporas, elongación anormal y un solo tubo germinativo y otras no germinaron. Resultados

similares son encontrados por Vasquez *et al.* (2009) con una concentración de 80µg/ml del péptido IC75 causó anomalías al tubo germinativo y otras ascósporas no germinan.

El efecto inhibitorio de los extractos de *P. protegens* CHA0 y *S. marcescens* PM3-8 sobre el micelio del hongo, se atribuye a la producción del conjunto de metabolitos extracelulares a Proteasa, HCN y 2,4-DAPG, al entrar en contacto con el hongo, impiden su desarrollo radial normal. Cuando los metabolitos extracelulares son separados reducen el desarrollo micelial de *M. fijiensis* (Castillo *et al.*, 2016). El rendimiento anti-fúngico efectivo del sobrenadante de *S. marcescens* PM3-8 a *M. fijiensis* requirió la acción combinada de los metabolitos extracelulares y fracción proteica de quitinasas. Las rizobacterias también sintetizan una variedad de quitinasas extracelulares que juegan un papel clave en el control biológico de patógenos fúngicos (Herrera y Chet, 1999). Se puede considerar que los metabolitos secundarios de *P. protegens* CHA0 y *S. marcescens* PM3-8 presentes en los extractos celulares actúan en la fase sexual y asexual del ciclo productivo de *M. fijiensis*, en el tubo germinativo y crecimiento radial del micelio. Estos metabolitos secundarios serían similares a los fungicidas sintéticos como los triazoles que inhiben la bio-síntesis de ergosterol (Ma y Michailides, 2005).

La mayor efectividad antagonista por los 22 días de exposición con los extractos celulares al 10 % de *P. protegens* CHA0 y *S. marcescens* PM3-8 logra la inhibición del desarrollo micelial de *M. fijiensis*, donde los metabolitos producido por las bacterias poseen una naturaleza anfífilica que interviene en la integridad de membrana biológica, formando poros que generan perturbaciones osmóticas o el rompimiento de la membrana celular (Ongena y Jacques, 2007).

Las perspectivas en el futuro se concentrarían en la aplicación de estos microorganismos endofíticos que beneficiarían a las plantas en diferentes mecanismos bioquímicos (Khan *et al.*, 2008). La colonización de raíces por cepas no patogénicas PGPR, dan paso a la Resistencia Sistémica Inducida (RSI) a través de un mecanismo de defensa dependiente Jasmonato/Etileno (Ton *et al.*, 2002). Donde las aplicaciones de *P. protegens* CHA0 en cultivar de banana Virupakshi (*Musa* spp. AAB), mejoran significativamente el rendimiento de racimos y mantienen actividad antagonista a los patógenos (Kavino *et al.*, 2010). Por lo tanto, es importante llevar a cabo investigaciones que permitan la identificación de metabolitos secundarios a producción de sideróforos y reguladores de crecimiento a las cepas nativas de PM3-8, PM3-14 y BA4-19P para estudiar el mecanismo de acción en banano y su respuesta en RSI.

Conclusión

Las bacterias provenientes de la rizósfera de *Musáceas*, de actividad proteolítica y productoras de HCN por *E. asburiae* PM3-14 se destaca por alterar el tubo germinativo de ascósporas con el 80 %. En inhibición al desarrollo del micelial *S. marcescens* PM3-8 y *E. asburiae* PM3-14 tiene el mayor efecto con 34.51 %. Las rizobacterias estarían participando con gran efectividad antagonista en la etapa inhibición del tubo germinativo y el desarrollo micelial de *M. fijiensis*.

Agradecimientos

El trabajo se financió por el Proyecto de la Quinta Convocatoria FOCICYT-2018 (*Pseudomonas* spp con actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* en *Lycopersicon esculentum*), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Literatura citada

Aguilar, F., y Kohlmann, B. (2006). Willingness to consume and produce transgenic bananas in Costa Rica. *International Journal of Consumer Studies*, 30(6), 544–551. <https://doi.org/10.1111/j.1470-6431.2006.00527.x>

Ahmadzadeh, M., y Tehrani, A. (2009). Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion , antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean , and biocontrol potential. *Biological Control*, 48(7), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.10.012>

Amil, F., Heaney, S., Stanger, C., y Shaw, M. (2007). Dynamics of QoI Sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica During 2000 to 2003. *Phytopathology*, 97(11), 1451–7. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-11-1451>

Castillo, B., Dunn, M., Navarro, K., Melendez, F., Ortiz, M., Guevara, S., y Palacios, G. (2016). Antifungal performance of extracellular chitinases and culture supernatants of *Streptomyces galilaus* CFFSUR-B12 against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1993-0>

Döbereiner, J., Baldani, V., y Reis, V. (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

Dwivedi, D., y Johri, B. (2003). Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science*, 85(12), 1693–1703. <https://doi.org/10.2307/24109974>

Fu, G., Huang, S., Ye, Y., Wu, Y., Cen, Z., y 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., Maekawa, N., Itai, A., Peralta, E., Santos, E., y 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>

Herrera, A., y Chet, I. (1999). Chitinases in biological control. *Birkhauser Verlag Basel/Switzerland*, 171–183.

Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14–21.

Johanson, A. (1995). Detection of banana leaf spot pathogens by PCR. *Bulletin OEPP*, 25(12), 99–107.

Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., y Samiyappan, R. (2010). Effect of chitinolytic PGPR on growth , yield and physiological attributes of banana (*Musa* spp .) under field conditions. *Applied Soil Ecology*, 45, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.02.003>

Khan, Z., Kim, S., Jeon, Y., Khan, H., Son, S., y Kim, Y. (2008). A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1 , suppresses root-knot nematode. *Bioresource Technology*, 99(5), 3016–3023. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.031>

Kim, H., Park, J., Choi, S., Choi, K., Lee, G., Ban, S., Lee, C., y Kim, C. (2003). Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The Journal of Microbiology*, 41(3), 196–201.

King, E., Ward, M., y Raney, D. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002221435490222X>

Leiva, M., Portal, O., Alvarado, Y., Acosta, M., Cruz, M., Sánchez, C., Rojas, L., y Roque, B. (2013). Identificación molecular de aislados cubanos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Protección Vegetal*, 28(3), 229–231.

Ma, Z., y Michailides, T. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24(7), 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>

Marin, D., Romero, R., Guzmán, M., y Sutton, T. (2003). Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87(3).

Ongena, M., y Jacques, P. (2007). *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j>

tim.2007.12.009

- Pérez, L., Hernández, A., Hernández, L., y Pérez, M. (2002). Effect of trifloxystrobin and azoxystrobin on the control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. *Crop Protection*, 21(1), 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00055-2)
- Proecuador. (2016). Análisis sectorial banana. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s03.htm%0AAnálisis>
- Romero Calderon, R. (1995). Dynamics of fungicide resistant populations of *Mycosphaerella fijiensis* and epidemiology of black Sigatoka of bananas. *Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano, (INIBAP)*.
- Romero, R., y Sutton, T. (1998). Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of Black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease*, 82(8), 931–934. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.8.931>
- Ton, J., Pelt, J. A. Van, Loon, L. C. Van, y Pieterse, C. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent Induced Resistance in *Arabidopsis*. *The American Phytopathological Society*, 15(1), 27–34.
- Vasquez, L., Guzman, F., Elkin, M., y Arango, R. (2009). In vitro evaluation of antimicrobial peptides against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and their interaction with some chemical fungicides. *Revista - Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(2), 5063–5069.