

Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*

Ivian Poveda^{1,2}, Mileidy Cruz-Martín¹, Cynthia Sánchez-García¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Michel Leiva-Mora¹, Berkis Roque¹, Yelenys Alvarado-Capó^{1*} *Autor para correspondencia

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

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

RESUMEN

El estudio de la interacción *Musa* – *Mycosphaerella fijiensis* así como su interrelación con microorganismos asociados a la filosfera de *Musa* spp. puede contribuir al desarrollo de estrategias de mejoramiento genético para lograr resistencia más duradera y fungicidas altamente selectivos. Sin embargo, poco se conoce sobre la microbiota presente en este cultivo y su posible relación con el agente causal de la enfermedad. Teniendo en cuenta este criterio el trabajo tuvo como objetivo aislar bacterias de la filosfera de bananos y plátanos así como caracterizar aquellas que presentaron actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*. Se tomaron fragmentos de tejido con síntomas y sin síntomas de la enfermedad, de tres cultivares parcialmente resistentes y tres susceptibles. Para el aislamiento de las bacterias se empleó el método de impresión de la hoja sobre medio de cultivo sólido. El aislamiento y caracterización se realizó según las pruebas tradicionales descritas para estos fines. La actividad antifúngica *in vitro* se determinó por cultivo dual. Se aislaron 317 cepas bacterianas, de las cuales 20 presentaron actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. De ellas, el 80.0% provenía de tejidos con síntomas de Sigatoka negra y el 75.0% de cultivares parcialmente resistentes. Predominaron los representantes de la familia *Bacillaceae*. Una característica común de las cepas seleccionadas fue la presencia de pigmentos y la capacidad de degradar varios sustratos.

Palabras clave: biocontrol, interacción *Musa-M. fijiensis*, Sigatoka negra

ABSTRACT

The study of *Musa* - *Mycosphaerella fijiensis* interaction and their interaction with microorganisms in *Musa* spp. phyllosphere may contribute to the development of breeding strategies to achieve more durable resistance and highly selective fungicides. However, little is known about the microbiota present in this crop and its possible relationship to the causal agent of the disease. Then, the aimed of this research was to isolate bacterium from the phyllosphere of bananas and plantains and to characterize those with *in vitro* antifungal activity against *M. fijiensis*. Tissue samples were taken from leaves, with and without symptoms of the disease, from three partially resistant and three susceptible cultivars. The method of leaf printing on solid medium was used to isolate the bacterium. Isolation and characterization was carried out by traditional tests described for these purposes. The *in vitro* antifungal activity was determined by dual culture. An amount of 317 bacterial strains were isolated out of which 20 of them showed antifungal activity against *M. fijiensis*. The 80.0% came from tissues with symptoms of black Sigatoka and 75.0% from partially resistant cultivars. Representatives of the *Bacillaceae* family were predominant. A common feature of selected strains was the presence of pigments and the ability to degrade different substrates.

Key words: biocontrol, Black Sigatoka, *Musa-M. fijiensis* interaction

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos son afectados por la enfermedad conocida como Rayado negro de la hoja o Sigatoka negra que es causada por

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

Sin embargo, el control químico trae problemas colaterales, como son la contaminación ambiental, afectaciones a la salud humana y la aparición de cepas de *M. fijiensis* resistentes a los fungicidas químicos (Chin *et al.*, 2001).

La tendencia cada vez más acentuada a disminuir los costos de producción y los niveles de residuos químicos en los productos agrícolas, el respeto por el medio ambiente y la falta de productos eficaces en muchos casos, sitúa al control biológico como una alternativa o al menos un complemento del control químico (Salazar *et al.*, 2006). El empleo de bacterias antagonistas juega en esto un papel importante.

En este sentido se ha demostrado que la microbiota epifita puede defender a las plantas de los agentes patógenos al ejercer una acción antagonista contra estos. Varios investigadores han aislado bacterias de las partes aéreas de las plantas con el fin de utilizarlas como control biológico de muchos patógenos debido a su capacidad de producir sustancias con propiedades antifúngicas (Enya *et al.*, 2007; Alvindia y Natsuaki, 2009).

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

Teniendo en cuenta este criterio el trabajo tuvo como objetivo aislar bacterias de la filosfera de bananos y plátanos así como caracterizar aquellas que presentaron actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de hojas se recolectaron de parcelas particulares cultivadas con diferentes genotipos de *Musa* spp. situadas en de diferentes regiones de la provincia de Villa

Clara. Estas no habían sido sometidas a la aplicación de fungicidas. Se tomaron fragmentos de tejido de la tercera y cuarta hojas, con síntomas y sin síntomas de la enfermedad, de tres cultivares parcialmente resistentes a la Sigatoka negra [(‘FHIA-18’ (AAAB), ‘FHIA-21’ (AAAB) y Bluggoe (ABB)] y tres susceptibles [(‘Parecido al rey’ (AAA), ‘Cavendish enano’ (AAA) y ‘Cavendish gigante’ (AAA)].

Para el aislamiento de las bacterias de la filosfera se empleó el método de impresión de la hoja sobre medio de cultivo sólido. Para ello se utilizaron fragmentos de tejidos con síntomas (lesiones necróticas, estados 3-5 de la escala propuesta por Fouré (1985)) y sin síntomas de cada uno de los cultivares (tratamientos). Pasado el tiempo de incubación se cuantificó el número de colonias crecidas por cada tratamiento. Se compararon los resultados entre cultivares y para cada cultivar por tipo de tejido (con síntomas y sin síntomas). Los resultados se informaron como número de colonias.cm⁻² de tejido.

Las colonias de bacterias que presentaban características morfológicas y culturales diferentes, se aislaron y se les determinó actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (aislado CCIBP-Pf-83). Para ello se empleó el método de cultivo dual sobre medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (BioCen). En un Erlenmeyer con 200.0 ml de medio de cultivo PDA fundido a 40°C se añadieron 20.0 ml de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (5.0x10⁵ fragmentos de micelio. ml⁻¹). Se homogenizó la mezcla y se vertió en placas de Petri de 90mm de diámetro. A las 24 horas de incubación a 28°C, se inocularon las bacterias (cultivos bacterianos de 24 horas de crecidos en medio de cultivo Agar nutriente) mediante punción (ocho aislados por placa de Petri). Como control se utilizó agua desionizada estéril en lugar del crecimiento bacteriano. Se emplearon dos réplicas por cada cepa bacteriana y se repitió dos veces.

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

A las cepas bacterianas con actividad antifúngica se les realizó una caracterización morfológica, cultural y fisiológica. Para ello se llevaron a cabo observaciones microscópicas, se describieron los caracteres culturales y se determinó la respuesta a pruebas bioquímicas acorde con los protocolos descritos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg y Holt, 1984,1986). La identificación de las cepas se realizó hasta la categoría de familia.

El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 9.0 para Windows. Para la comparación estadística de los valores obtenidos entre cultivares fue utilizada la prueba de Kruskal-Wallis y dentro de cada cultivar entre tipo de tejido se empleó la prueba de Mann-Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron diferencias significativas entre todos los cultivares en cuanto al número de colonias.cm⁻² aisladas de tejidos con síntomas y sin síntomas de Sigatoka negra (Figura 1).

Solo se aislaron las bacterias cultivables que se encontraban en la superficie de las hojas. Aunque se obtuvieron colonias aisladas, el método empleado (impresión de la hoja sobre medio de cultivo sólido) no permite precisar la localización de las bacterias o afirmar que cada colonia tuvo su origen en una sola célula, por ello no es posible informar los resultados como ufc.cm⁻² o células.cm⁻². Se comprobó que en los cultivares susceptibles el número de colonias.cm⁻² de tejido fue significativamente mayor tanto en tejido con síntomas como sin síntomas (Figura 1).

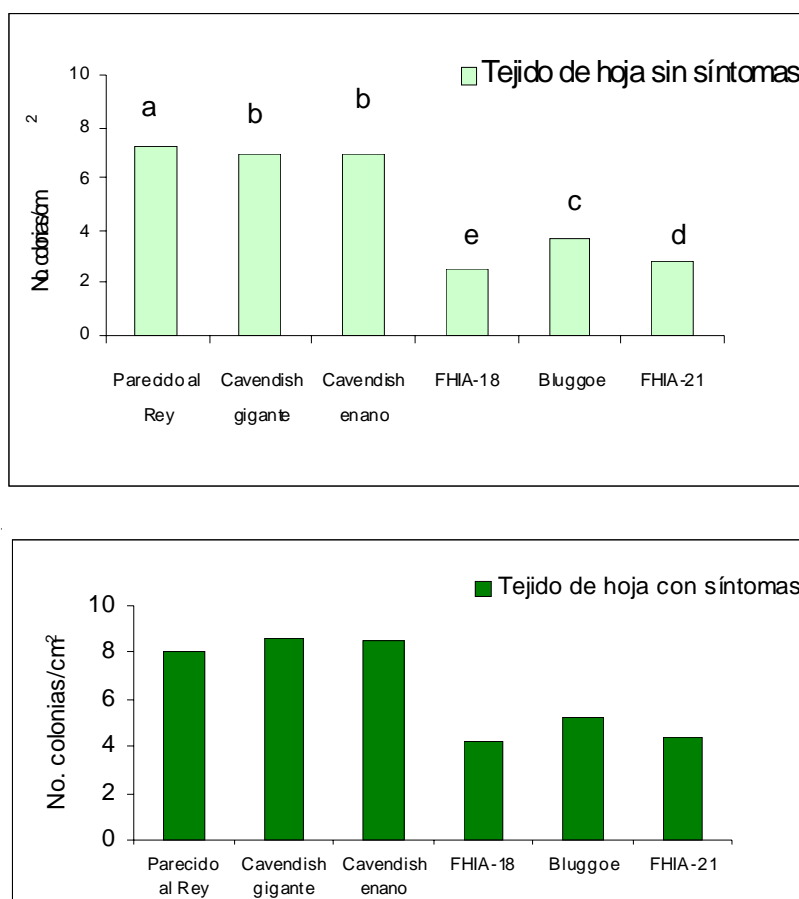


Figura 1. Número de colonias de bacterias epifitas aisladas de hojas de plantas *Musa* spp. cultivadas en campo e infectadas naturalmente con *M. fijiensis*. A. En tejido de hojas sin síntomas. B. En tejido de hojas con síntomas. Barras con letras diferentes en una misma figura difieren por prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0.01$

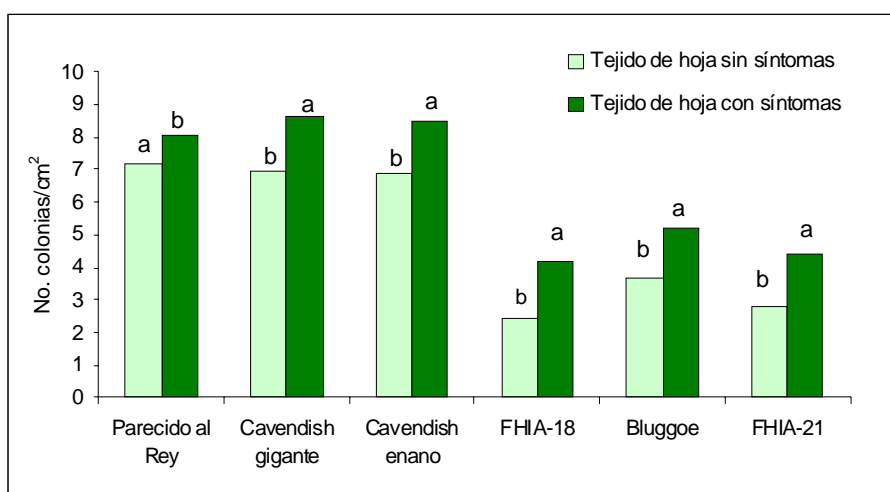


Figura 2. Comparación entre cultivares del número de colonias de bacterias epifíticas aisladas de hojas de plantas *Musa* spp. cultivadas en campo con o sin presencia de síntomas de Sigatoka negra. Barras con letras diferentes en un mismo cultivar difieren por prueba de Mann-Whitney para $p < 0.01$

En todos los cultivares el número de colonias.cm⁻² aisladas fue significativamente superior en el tejido con síntomas (Figura 2).

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

Se lograron aislar de la filosfera de los cultivares de *Musa* utilizados, 317 cepas bacterianas con diferentes caracteres culturales. De ellas, se seleccionaron 20 con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* (CCIBP-A1, CCIBP-A2, CCIBP-A3, CCIBP-A4, CCIBP-A5, CCIBP-A6, CCIBP-B1, CCIBP-B.1, CCIBP-B2, CCIBP-B3, CCIBP-B4, CCIBP-B5, CCIBP-C1, CCIBP-C2, CCIBP-C3, CCIBP-C4, CCIBP-C5, CCIBP-C6, CCIBP-C7 y CCIBP-F.1).

El 80.0% provenía de tejidos con síntomas de Sigatoka negra y el 75.0% de cultivares parcialmente resistentes. De estos últimos, el 50.0% del cultivar Bluggoe. Esto sugiere una prevalencia de cepas con propiedades antifúngicas en lesiones de cultivares resistentes.

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

Varios autores señalan que los microorganismos que pueden crecer en la filosfera pueden ser mejores candidatos de control biológico que aquellos que no pueden. Este hallazgo implica que las bacterias asociadas con hojas de bananos y plátanos pueden ser eficaces como antagonistas contra las enfermedades foliares.

Del total de cepas con actividad antifúngica (20), el 80.0% fueron Gram+ y el 20.0% fueron Gram- y predominó la morfología bacilar (95.0%); sólo un aislado presentó forma de cocos. Se identificaron tres familias. El 45.0% de las cepas seleccionadas correspondieron a la familia *Bacillaceae*; el 15.0% a *Pseudomonadaceae*; el 5.0% a *Micrococcaceae* y el 35.0% se agruparon como otros bacilos Gram+ no formadores de esporas.

El predominio de bacterias pertenecientes a la familia *Bacillaceae* puede deberse en parte a

la presencia de características especiales como la formación de endosporas y la producción de sustancias con actividad antifúngica que les permiten la subsistencia y competencia en condiciones ambientales desfavorables.

El género *Bacillus* se describe en la literatura científica como productor de una amplia gama de compuestos con actividad antifúngica tales como: subtilina, bacilina y bacilomicina, los cuales se encuentran dentro de la familia de las iturinas (Alippi y Mónaco, 1994). Estos autores plantearon la presencia de un gran número de metabolitos antifúngicos excretados, por cepas de este género.

En este estudio se comprobó que las cepas bacterianas aisladas de la filosfera de bananos y plátanos son capaces de degradar varios sustratos diferentes. De ellas, el 20.0% hidrolizó el almidón, el 65.0% hidrolizó la caseína, el 60.0% hidrolizó la gelatina y el 35.0% produjo indol. Estas características evidencian que poseen capacidades metabólicas diversas.

Una característica común de las cepas seleccionadas fue la presencia de pigmentos (colonias de color amarillo claro, amarillo, rosado y blanco). Predominaron las colonias de color amarillo claro (75.0%). Los microorganismos epifitos están expuestos a la luz y son resistentes a los rayos solares. Las bacterias pigmentadas son un ejemplo de esto; ellas raramente son halladas en la rizosfera de la planta, se encuentran dominando la superficie de las hojas. La radiación solar directa influye en la ecología de la filosfera (Sundin y Jacobs, 1999; Jacobs y Sundin, 2001).

CONCLUSIONES

Es posible aislar bacterias de la filosfera de *Musa* spp. que posean actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. Los aislados se caracterizaron por pertenecer en su mayoría a la familia *Bacillaceae*, degradar varios sustratos y por la presencia de pigmentos. Predominaron los aislamientos de tejidos con síntomas de Sigatoka negra y de cultivos parcialmente resistentes.

REFERENCIAS

Alippi, A, Mónaco C (1994) Antagonismo *in vitro* de especies de *Bacillus* contra *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. 70:91-95

Alvinda, DG, Natsuaki KT (2009) Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. Crop Protection. 28:236-242

Chin, KM, Wirz M, Laird D (2001) Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from Banana to Trifloxystrobin. Plant Dis. 85:1264-1270

Enya J, Shinohara H, Yoshida S, Tsukiboshi T, Negishi H, Suyama K, Tsushima S (2007) Culturable Leaf-Associated Bacteria on Tomato Plants and Their Potential as Biological Control Agents. Microbial Ecology 53: 524-536

Fouré, E (1985) Black leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA-CIRAD, París

Jacobs, JL, Sundin GW (2001) Effect of Solar UV-B Radiation on a Phyllosphere Bacterial Community. Appl. Environ. Microbiol. 67(12):5488-5496

Krieg, NR, Holt J (Eds.) (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th edition. Vol. I Williams & Wilkins, New York

Krieg, NR, Holt J (Eds.) (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th edition. Vol. II Williams & Wilkins, Baltimore

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

Peláez, J, Vásquez LE, Díaz TJ, Castañeda DA, Rodríguez E, Arango RE (2006) Use of a microtitre plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Rev. Nac. Agr. Medellín. 59(2):3425-3433

Salazar, LM, Patiño LF, Bustamante E (2006) Sustratos foliares para el incremento de bacterias quitinolíticas y glucanólíticas en la filosfera de banano. Rev. Fac. Nac. Agraria. Medellín. 59(2):3449-3465

Suda, W, Nagasaki A, Shishido M (2009) Powdery Mildew-Infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. Microbes Environ. 24(3):217-223

Sundin, GW, Jacobs JL (1999) Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of old-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). Microb. Ecol. 38:27-38