

Efecto de filtrados cultivo bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* en la interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis*

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

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

RESUMEN

Aunque se ha demostrado que determinados géneros bacterianos pueden ser antagonistas *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, son discretos los resultados que se tienen sobre el efecto de estos en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*. Tales conocimientos pudieran contribuir a diseñar nuevas estrategias de mejoramiento genético y a la formulación de productos biológicos para el control de la Sigatoka negra. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de filtrados de cultivo bacterianos, con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*, en la interacción entre el patógeno y plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente en casa de cultivo. Se emplearon filtrados de cultivo de dos cepas de *Bacillus* sp. (CCIBP-B.1 y CCIBP-M27) con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* y se conformaron dos tratamientos: aplicación de los filtrados de cultivo bacterianos tres horas antes y tres días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis*. Se comprobó que la aplicación de filtrados de cultivo bacterianos tuvo efecto retardante sobre el desarrollo de la enfermedad y que este dependió de la cepa y del momento de aplicación.

Palabras clave: *Bacillus* sp., biocontrol, inoculación artificial, Sigatoka negra

ABSTRACT

Although certain bacterial species may be *in vitro* antagonistic of *Mycosphaerella fijiensis*, as it was demonstrated, they are discrete results that have their effect on the *Musa* spp.-*M. fijiensis* interaction. The results will help to design new strategies for genetic improvement and development of biological products for control of black Sigatoka. The aim of this study was to determine the effect of bacterial culture filtrates, with antifungal activity *in vitro* against *M. fijiensis* in the interaction between the pathogen and plants of *Musa* spp., artificially inoculated in greenhouse. Culture filtrates of two strains of *Bacillus* sp. (CCIBP-B.1 and CCIBP-M27) with *in vitro* antifungal activity against *M. fijiensis* were used, with two treatments: application of bacterial culture filtrates three hours before and three days after inoculation of *M. fijiensis*. The application of bacterial culture filtrates delayed the development of the disease. It also depended on the strain and time of application.

Keywords: artificial inoculation, *Bacillus* sp., biocontrol, Black Sigatoka

INTRODUCCIÓN

La denominada Sigatoka negra, causada por el hongo ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), se considera la enfermedad foliar de mayor impacto económico para la industria de banano en el mundo (Arzanlou *et al.*, 2008). La enfermedad produce una rápida destrucción del área foliar de la planta y ocasiona un efecto negativo sobre la calidad del fruto. Adicionalmente, se presenta una maduración prematura de los racimos, lo cual es la principal causa de pérdidas ocasionadas por la enfermedad (Marín *et al.*, 2003).

Según Raut y Ranade (2004) el control químico y el empleo de plantas resistentes son las únicas estrategias, por excelencia, para combatir la Sigatoka negra. No obstante, el incremento a nivel mundial de las demandas por las medidas de seguridad ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas para el control de la Sigatoka negra (Marín *et al.*, 2003).

En tal sentido, una mejor comprensión de las interacciones que se establecen en el patosistema *Musa*-*M. fijiensis*, en particular, microorganismo-microorganismo contribuiría a encontrar mejores y más eficientes métodos de control. Sin embargo, el efecto de factores

bióticos que no sean la planta o el hongo filamentoso en la interacción *Musa-M. fijiensis* han sido poco abordados en las investigaciones científicas. Los esfuerzos en este sentido se han encaminado fundamentalmente a la identificación de microorganismos capaces de contribuir a las estrategias de control. Y dentro de ellos, las bacterias, han sido el principal grupo de microorganismos evaluados (Marín *et al.*, 2003).

Por ejemplo, González *et al.* (1996) identificaron 120 cepas de microorganismos quitinolíticos provenientes de hojas de banano con habilidad para producir quitinaza. Igualmente, Osorio *et al.* (2004), en un ensayo *in situ* sobre discos de hojas de plantas encontraron inhibición de la germinación de las ascosporas o deformación de los tubos germinativos cuando emplearon bacterias con actividad quitinolítica aisladas de hojas de bananos.

Aunque se ha demostrado que determinados géneros bacterianos pueden ser antagonistas *in vitro* de *M. fijiensis*, son discretos los resultados que se tienen sobre el efecto de estos en la interacción *Musa-M. fijiensis*. Tales conocimientos pudieran contribuir a diseñar nuevas estrategias de mejoramiento genético y a la formulación de productos biológicos para el control de la Sigatoka negra.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de filtrados de cultivo bacterianos, con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*, en la interacción de este patógeno y plantas de *Musa* spp., en casa de cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Filtrados de cultivo bacterianos

Se emplearon dos cepas pertenecientes al género *Bacillus* con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*: CCIBP-B.1, y CCIBP-M27 pertenecientes a la colección de cultivos microbianos de laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Para la obtención de los filtrados de cultivo se tomó 1 ml de suspensiones bacterianas crecidas en Caldo Nutriente durante 24 horas cuya concentración se ajustó a $DO_{600}=1$ y se inocularon Erlenmeyer con 50 ml de Caldo

Nutriente (BioCen). Se incubaron a 30°C durante 48 horas y en agitación (120 rpm). Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 10 000 g por 15 minutos, se tomaron los sobrenadantes y se esterilizaron por filtración (0.22 μ m).

Material vegetal

Se utilizaron plantas de 'Grande naine' (*Musa* AAA) propagadas *in vitro* vía organogénesis según el protocolo descrito por Orellana (1994). El material vegetal para el establecimiento *in vitro* de 'Grande naine' provino de la empresa "La Cuba", Ciego de Ávila.

Las plantas se sembraron en bolsas de polietileno con sustrato compuesto por 50% de casting, 30% de compost y 20% de zeolita y se mantuvieron en fase de aclimatización durante 45 días. Posteriormente, se transfirieron a macetas plásticas de 20 cm de diámetro con 500 ml de capacidad con igual sustrato por 45 días hasta alcanzar como mínimo 20 cm de altura y tres hojas activas.

Las plantas se colocaron en una casa de cultivo con luz solar, con una intensidad luminosa media de 3 841 μ mol.m².s⁻¹ (medido con Extech Light Meter 401025, USA) y riego por aspersión tres veces al día.

La preparación de la suspensión micelial de *M. fijiensis* así como el proceso de inoculación artificial se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Alvarado *et al.* (2003).

Inoculación

Se emplearon dos tratamientos: 1) inoculación de los filtrados de cultivo bacterianos tres horas antes de la inoculación con *M. fijiensis* y 2) la aplicación de los filtrados de cultivo tres días posteriores a la inoculación de *M. fijiensis*.

La inoculación se realizó por la parte abaxial de las hojas y con la ayuda de un pincel tanto para la inoculación con *M. fijiensis* como con los filtrados de cultivo.

Se inocularon las tres primeras hojas de cinco plantas. Se emplearon como controles cinco plantas inoculadas con *M. fijiensis* sin presencia de filtrados de cultivo y cinco plantas inoculadas solo con Caldo nutriente.

Las plantas se ubicaron completamente al azar en casa de cultivo.

La evaluación del desarrollo de la enfermedad se realizó cada siete días hasta los 63 días posteriores a la inoculación (dpi). Para ello se utilizó la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003). En cada tratamiento se calculó la frecuencia de aparición de los síntomas y se determinó el período de incubación (días), el tiempo de evolución de los síntomas (días) y tiempo de desarrollo de la enfermedad (días).

Período de incubación: Tiempo entre la infección y la aparición de las primeras lesiones puntiformes por el envés de la hoja (días).

Tiempo de evolución de los síntomas: número de días entre la aparición de los primeros síntomas (lesiones puntiformes) y la aparición de manchas necróticas con centros secos.

Tiempo de desarrollo de la enfermedad: período entre la inoculación y la aparición de lesiones maduras (manchas necróticas con centros secos).

Además, se cuantificó el número de lesiones necróticas por tratamiento en las hojas de las plantas inoculadas. Los valores obtenidos fueron comparados con el control y analizados estadísticamente mediante la prueba de Mann-

Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de los filtrados de cultivo de las cepas CCIBP-B.1 y CCIBP-M27 sobre las plantas inoculadas con *M. fijiensis* se constataron diferencias.

La frecuencia de aparición de los estados de síntomas en las hojas (según la escala) varió con los tratamientos. A los 63 días después de la inoculación en el tratamiento con la aplicación del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-M27 después de la inoculación del patógeno, se comprobó que había disminuido en un 16.7% la presencia de hojas con síntomas en estado 5 (Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo), con respecto al control (Figura 1). En el resto de los tratamientos las variaciones en la frecuencia de aparición de los estados de síntomas no estuvieron asociadas a menores afectaciones de las plantas.

En las variables epifitológicas período de incubación (14 días), Tiempo de evolución de los síntomas (28 días) y Tiempo de desarrollo de la enfermedad (42 días) no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

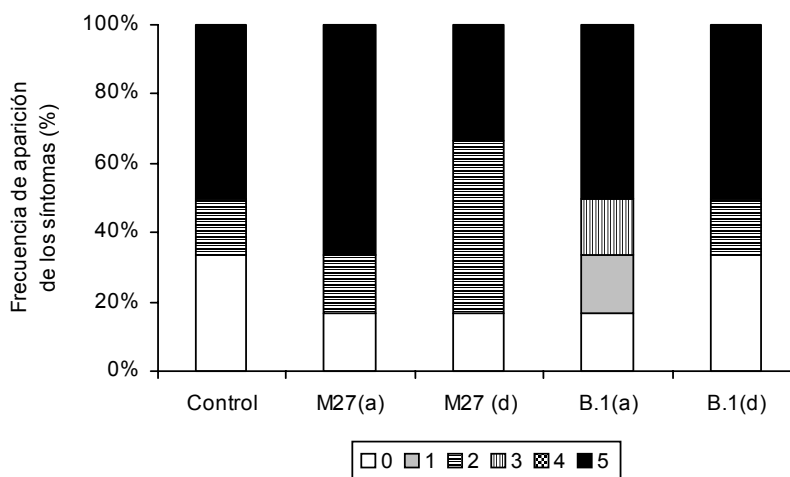


Figura 1. Frecuencia de aparición de estados de síntomas (0-5) ocasionados por *M. fijiensis* en plantas de Grande naine (*Musa AAA*) inoculadas en casa de cultivo a los 63 días después de la inoculación. Estados de síntomas acorde con la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003). M27(a), B.1(a). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-M27 y CCIBP-B.1 tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. M27(d), B.1(d). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-M27 y CCIBP-B.1 tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*.

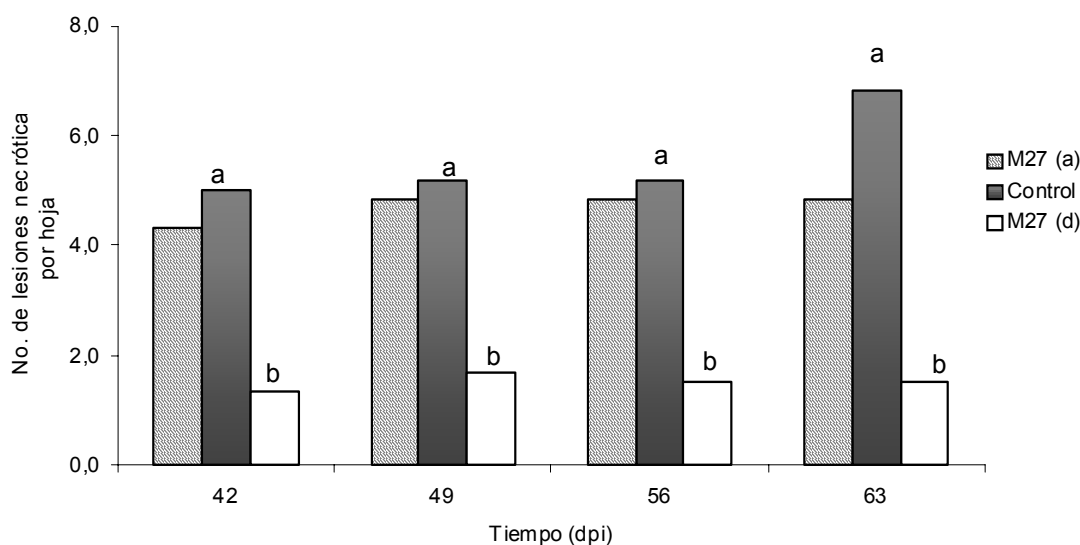


Figura 2. Número de lesiones necróticas por hoja ocasionadas por *M. fijiensis* a partir de los 42 días posteriores a la inoculación (dpi) en presencia de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-M27. M27(a): tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. M27(b): tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*. Medias con letras diferentes sobre barras a un mismo tiempo (dpi) difieren por la prueba de Mann-Whitney para $p < 0.01$, con respecto al control.

Sin embargo, con el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-M27 cuando se aplicó después de la inoculación del patógeno, se encontró una reducción significativa en el número de lesiones necróticas a partir de los 42 días, lo que indica que el filtrado tuvo un efecto retardante sobre el desarrollo de la enfermedad (Figura 2).

Con el filtrado de la cepa CCIBP-B.1 sucedió lo contrario a la cepa CCIBP-M27, a partir de los 49 días fue encontrada una reducción significativa del número de lesiones necróticas cuando el filtrado fue aplicado antes de la inoculación del patógeno (Figura 3). Esta diferencia entre las cepas pudiera estar relacionada con los mecanismos de acción. En estudios previos se comprobó que la cepa CCIBP-M27 inhibe el crecimiento de *M. fijiensis in vitro* tanto por producción de metabolitos volátiles como por metabolitos difundidos, sin embargo CCIBP.B.1 solo por producción de los últimos. No obstante, otros mecanismos pueden estar presentes o la acción no solo puede ser sobre el patógeno sino también sobre la planta. Ambas cepas pertenecen a la familia *Bacillaceae* y se conoce de la versatilidad metabólica de sus representantes (Krieg y Holt, 1986).

Al respecto, Massomo *et al.* (2004) encontraron diferentes efectos en el desarrollo de la enfermedad de la pudrición negra en

cultivos de col (*Brassica oleraceae*) al utilizar diferentes cepas antagonistas y diferentes métodos de aplicación de estas.

En la figura 4 se muestra el efecto de los diferentes tratamientos aplicados sobre plantas de *Musa* inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo a los 63 días con respecto al control inoculado con *M. fijiensis* y al control sin inocular. Puede observarse que el tratamiento con el filtrado de la cepa CCIBP-M27 tuvo un mayor efecto sobre el desarrollo de la enfermedad.

Algunos autores como Knudsen *et al.* (1997), señalan que la selección de microorganismos para uso en biocontrol basado en métodos *in vitro* como pruebas de antibiosis en placas de agar, pueden no concordar con resultados en campo.

Según Visintin *et al.* (2000) la selección *in vivo* permite observar la actividad del potencial biocontrolador en un medio similar al que se desenvolverá en el campo.

Sin embargo, Massomo *et al.* (2004) demostraron que sólo el 35% de las cepas que mostraron actividad *in vitro* contra *Xanthomonas campestris* redujeron la incidencia y severidad de la pudrición negra en plantaciones de col (*Brassica oleraceae*).

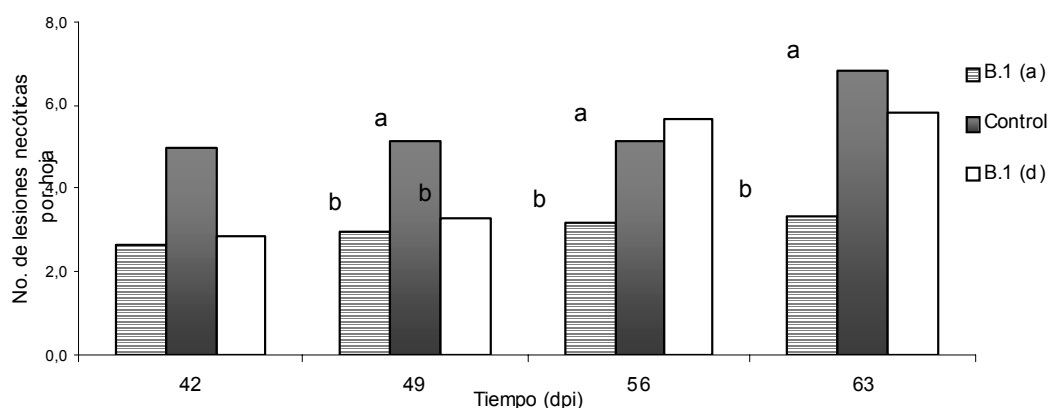


Figura 3. Número de lesiones necróticas por hoja ocasionadas por *M. fijiensis* a partir de los 42 días posteriores a la inoculación (dpi) en presencia de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-B.1 B.1 (a): tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. B.1 (d): tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*. Medias con letras diferentes sobre barras a un mismo tiempo (dpi) difieren por la prueba de Mann-Whitney para $p < 0.01$ con respecto al control.



Figura 4. Efecto del filtrado de cultivo aplicado sobre plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo, en cada uno de los tratamientos a los 63 días posteriores a la inoculación. B.1(a), M27(a). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-B.1 y CCIBP-M27 tres horas antes de la inoculación de *M. fijiensis*. B.1(d), M27(d). Aplicación de filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-B.1 y CCIBP-M27 tres días después de la inoculación de *M. fijiensis*.

Con este estudio se demostró que los filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-M27 que habían mostrado actividad antifúngica *in vitro*, en casa de cultivo, aplicados después de la inoculación de *M. fijiensis* mostraron evidencias de control del patógeno.

En la selección preliminar de potenciales agentes biocontroladores como solución alternativa para el control de enfermedades es importante no solo encontrar al agente biocontrolador sino un método eficiente para detectarlo (Visintin *et al.*, 2000). Los resultados de este experimento demostraron que mediante la aplicación de filtrados de cultivo, con actividad antifúngica *in vitro*, a plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* en casa de cultivo, es posible comprobar *in vivo* su efecto en esta interacción. Además, la efectividad de la aplicación depende de la cepa y posiblemente de los mecanismos de acción sobre el patógeno (inhibición del crecimiento) o la planta (inducción de resistencia). Mediante el empleo de este procedimiento se contribuirá al conocimiento del efecto de factores bióticos (las bacterias o sus filtrados) sobre dicha interacción.

CONCLUSIONES

Se comprobó que la aplicación de filtrados de cultivo bacterianos, con actividad antifúngica *in vitro*, a plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* en casa de cultivo, tuvo un efecto retardador sobre el desarrollo de la enfermedad y que este dependió de la cepa y del momento de aplicación.

A pesar de que no se detectó reducción en el tiempo del periodo de incubación, tiempo de evolución de los síntomas y tiempo de desarrollo de la enfermedad en los filtrados evaluados, el método utilizado permitió detectar una reducción significativa del número de lesiones necróticas.

REFERENCIAS

Alvarado, Y, Leiva M, Rodríguez MA, Acosta M, Cruz M, Portal O, Kosky RG, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance by using mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalante JV (eds.). *Mycosphaerella leaf spot disease of bananas, present status and outlook*. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella leaf spot disease* held in San José, Costa Rica. pp 169-175, INIBAP, Montpellier

Arzanlou, M, Groenewald JZ, Fullerton RA, Abeln ECA, Carlier J, Zapater MF, Buddenhagen IW, Viljoen A, Crous PW (2008) Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs of banana. *Persoonia* 20:19-37

Chen, CQ, Belanger RR, Benhamou N, Paulitz TC (1998) Induced systemic resistance (ISR) by *Pseudomonas* spp. impairs pre- and post-infection development of *Pythium aphanidermatum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:877-886

González, R, Bustamante E, Shannon Ph, Okumoto S, Leandro G (1996). Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en bananos. *Manejo Integrado de plagas* 40:6-11

Knudsen, IMB, Hockenhull J, Jensen DF, Gerhardos B, Hokeberg M, Tahvonen R (1997) Selection of biocontrol agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Plant Pathol.* 103:775-784

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

Kloepper, J, Rodríguez-Kabana R, Zehnder G, Murphy J, Sikora E, Fernández C (1999) Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Plant pathol.* 28:21-26

Marín, D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant disease* 87(3):208-222

Massomo, SMS, Mortensen CN, Mabagala RB, Newman MA, Hockenhull J (2004) Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabagge in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phytopathology* 152:98-105

Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba. 120 p.

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. *Boletín Técnico de Cenibanano* (6):8-13

Raut, SP, Ranade S (2004) Diseases of Banana and their Management. En: Naqui, SAMH (ed) *Diseases of Fruits and Vegetables*. Volume II, pp. 37-52. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht

Visintin, G, Giéco I, García B, Falico L (2007) Bioactividad de microorganismos nativos sobre infecciones en naranjas de *Penicillium digitatum* resistente y sensible a fungicidas. *Cienc. Docencia Tecnol. (Entre Ríos)* 34: 229-242