

## Diversidad de cepas bacterianas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Mileidy Cruz-Martín<sup>1</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Tatiana Pichardo<sup>1</sup>, Rosa Castro<sup>2</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830. e-mail: mileidy@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Recursos Naturales, Departamento de Fitopatología, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). Panamericana Sur km 1 ½. Riobamba. Chimborazo. Ecuador. CP 06-01-4703.

### RESUMEN

La búsqueda de alternativas a los plaguicidas agrícolas que se emplean para el manejo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) incluye la selección de cepas de microorganismos con potencial para el control de este patógeno. El objetivo del trabajo fue caracterizar cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. con efecto antifúngico frente a *M. fijiensis*. Se realizó una caracterización morfológica, cultural, fisiológica y molecular de las cepas y se cuantificó la actividad antifúngica de estas mediante cultivo dual. Se comprobó la diversidad de bacterias con propiedades antifúngicas frente a *M. fijiensis* presentes en la filosfera *Musa* spp. Además, se constató que la filosfera de estos cultivos puede utilizarse como fuente de obtención de posibles controles biológicos de *M. fijiensis*.

Palabras clave: bacterias, biocontrol, epifitos, Sigatoka negra

## Bacterial strains diversity in *Musa* spp. phyllosphere with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

### ABSTRACT

The search for alternatives to agricultural pesticides used for the management of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) includes the selection of microorganisms strains with potential for the control of this pathogen. The objective of the work was to characterize bacterial strains isolated from the phyllosphere of *Musa* spp. with antifungal effect against *M. fijiensis*. A morphological, cultural, physiological and molecular characterization of the strains was performed and the antifungal activity of these strains was quantified by dual culture. It was verified the diversity of bacteria with antifungal properties against *M. fijiensis* present in the phyllosphere of *Musa* spp. In addition, it was found that the phyllosphere of these crops can be used as a source of obtaining possible biological controls of *M. fijiensis*.

Keywords: bacteria, biocontrol, Black Sigatoka, epiphytes

### INTRODUCCIÓN

El control biológico para patógenos foliares, puede ser una alternativa complementaria dentro del manejo de enfermedades, la cual frecuentemente involucra la aplicación del microorganismo antagonista sobre la superficie de la hoja (Agrios, 2005). El uso de productos biológicos está encaminado además del propio control, lograr la seguridad alimentaria, al adquirir alimentos libres de sustancias tóxicas (Cawoy *et al.*, 2011).

Sin embargo, el éxito de dicho antagonista depende de su capacidad para establecerse

como miembro de la microbiota epifita, especialmente cuando se requiere disminuir el inóculo del patógeno (Marín *et al.*, 2003). Por tal motivo, el uso de antagonistas microbianos nativos debería preferirse al uso de antagonistas aislados de otros ambientes, pues los primeros se encuentran adaptados a las condiciones que determinan el hábitat en la superficie de la hoja (Ceballos *et al.*, 2012).

Las tendencias actuales en la búsqueda de alternativas a los plaguicidas agrícolas incluyen el aumento del uso de los procesos

de selección para identificar cepas de microorganismos con potencial para el control de patógenos causantes de enfermedades. Esta etapa preliminar, podría proporcionar herramientas adicionales para las alternativas de manejo de enfermedades con productos biológicos que posean diferentes mecanismos de acción que los plaguicidas químicos (Alvinda, 2012).

Entre las enfermedades foliares más devastadoras de los plátanos y bananos (*Musa* spp.) se encuentra la Sigatoka negra, causada por el ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Está considerada la enfermedad más limitante de estos cultivos ya que reduce el rendimiento y la productividad dentro de la plantación (Churchill, 2011).

En la búsqueda de productos biológicos efectivos contra *M. fijiensis* se han estudiado diferentes microorganismos (bacterias y hongos) asociados a estos cultivos (Alvinda y Natsuaki, 2008; Ceballos *et al.*, 2012). Por esta razón el objetivo del trabajo fue caracterizar fisiológica, bioquímica y molecularmente bacterias presentes en la filosfera de *Musa* con efecto antifúngico frente a *M. fijiensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas bacterianas*

Para este estudio se emplearon 19 cepas bacterianas pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Estas fueron aisladas de la filosfera de diferentes cultivares de *Musa* spp. y se seleccionaron por su actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010).

### *Caracterización cepas*

Se realizó una caracterización morfológica, cultural, fisiológica y molecular de las cepas. Para ello se llevaron a cabo observaciones microscópicas, se describieron los caracteres culturales y se determinó la respuesta a pruebas bioquímicas de acuerdo con los protocolos descritos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg y Holt, 1984; Krieg y Holt, 1986).

Para la caracterización molecular se empleó la técnica de amplificación de la región 16S ribosomal. Para la purificación del ADN genómico de los aislados bacterianos se empleó el protocolo propuesto por Pereira de Melo *et al.* (2009). Se utilizaron los cebadores 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 907R (5'CCGTC AATTCMTTTRAGTTT 3') que amplifican regiones específicas de la subunidad 16S del ADN ribosomal.

El producto de la amplificación del gen de 16S fue aplicado en geles de agarosa 1%. Las bandas fueron purificadas con el uso del Kit GENE CLEAN II (Q-BIOgene) y el ADN resultante se cuantificó en espectrofotómetro Nanodrop (Thermo sciences). El amplicón fue secuenciado por MacroGen Inc. (Seul, Korea) y con las secuencias obtenidas se realizó un árbol filogenético que fue elaborado mediante el método del vecino más cercano y las secuencias se agruparon juntas basado en un *bootstrap* de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Probabilidad Máxima Compuesta (Tamura *et al.*, 2004) y utilizando el programa MEGA 7.0.14.

### *Cuantificación de la actividad antifúngica*

Para la cuantificación de la actividad antifúngica de las cepas se empleó el método de cultivo dual y como inóculo fúngico se utilizaron suspensiones miceliales de *M. fijiensis*. Se prepararon placas de Petri (90.0 mm) como se describe a continuación. En un Erlenmeyer con 200.0 ml de Agar Papa Dextrosa (PDA) (Fluka) fundido (~ 40 °C) se añadieron 20.0 ml de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (para una concentración final de  $5.0 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $\text{ml}^{-1}$ ). Se homogenizó la mezcla y se vertió en las placas de Petri. Cuando las placas estuvieron secas, se añadieron en el centro de la placa 7.0  $\mu\text{l}$  de cada suspensión bacteriana (una cepa por placa de Petri) ajustada a  $\text{DO}_{600} = 0.1$  (Eppendorf Biophotometer), a partir de cultivos bacterianos de 24 horas de crecidos en Agar nutriente (Biocen). Como control se emplearon 7  $\mu\text{l}$  de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 horas.

La evaluación se realizó mediante la medición del halo de inhibición (mm) del crecimiento

del patógeno a las 72 horas de incubación. Se emplearon tres réplicas por cada cepa bacteriana y el ensayo se repitió tres veces. Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la caracterización de las bacterias antagonistas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. se pudo comprobar la diversidad presente entre estas cepas que poseen actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*.

Se identificaron tres familias *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Micrococcaceae*. Predominaron los bacilos esporulados (*Bacillus*) (52.6%) y otro 31.5% de las cepas se agruparon como otros bacilos Gram+ no formadores de esporas. Entre las características distintivas de las cepas analizadas estuvo su diversidad metabólica ya que fueron capaces de degradar *in vitro* varios sustratos tales como caseína (63% de las cepas) gelatina (53%) y almidón (11%). Las características principales de cada una de las cepas se presentan en las tablas 1, 2, 3 y 4.

La preponderancia del género *Bacillus*, en la superficie de hojas de *Musa* spp. bajo las condiciones de cultivo en Cuba coinciden con los resultados referidos por Ceballos *et al.* (2012) en Urabá, Colombia. Estos autores encontraron que el 44% del total de las bacterias cultivables, pertenecían al grupo de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas. La presencia de estas estructuras y la producción de sustancias con actividad antifúngica puede ser la causa del predominio de cepas pertenecientes al género *Bacillus*. Estas características les permiten la subsistencia y competencia en condiciones ambientales desfavorables (Todar, 2003). Según Setlow (2006), la formación de una spora genera un tipo de células que pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo con poco o nada de nutrientes y le confieren resistencia a la radiación, el calor y productos químicos. También su actividad antimicrobiana puede estar dada por la producción de péptidos

antimicrobianos (Arguelles-Arias *et al.*, 2009), enzimas líticas como glucanasas y quitinasas (Rao-Podile y Neeraja, 2011) y lipopéptidos. Los bioproductos basados en *Bacillus* son ampliamente empleados en la agricultura convencional y representan la clase más importante de productos viables para el uso fitosanitario (Pérez-García *et al.*, 2011). Según Cawoy *et al.* (2011) entre los bioproductos disponibles en el mercado formulados a partir de bacterias, la mayoría de ellos contienen especies de *Bacillus*.

Mediante el análisis molecular se logró la amplificación del ADN bacteriano y se corroboró la diversidad bacteriana presente en la filosfera de *Musa* spp. (Figura 1). Autores como Yang *et al.* (2001) demostraron con estudios que no requieren el cultivo del microorganismo, que los habitantes de las hojas son mucho más diversos que lo predicho por los estudios tradicionales. Sumado a esto, Yadav *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2010) en análisis de las comunidades bacterianas de la filosfera de plantas han revelado que estas son diversas tanto cuantitativa como cualitativamente.

El método de cultivo dual empleado permitió cuantificar la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas bacterianas frente *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 (Figura 2).

En cuanto a la actividad antifúngica, propiedad que fue utilizada como criterio de selección, también se observaron diferencias significativas entre las cepas mediante el método de evaluación empleado (Tabla 5).

Se observaron halos de inhibición bien definidos a las 72 horas de incubación y estos oscilaron entre 11.2 y 42.0 mm. Mediante esta técnica se pudieron observar diferencias entre las cepas en cuanto a la actividad antifúngica *in vitro* y corroborar los resultados anteriores sobre la diversidad de las bacterias presentes en la filosfera de bananos (Ceballos *et al.*, 2012). Incluso, dentro de una misma familia se observaron diferencias significativas en cuanto al diámetro del halo de inhibición, de ahí la importancia de realizar este tipo de determinaciones cuantitativas para la selección de cepas.

Tabla 1. Principales características de los aislados de la familia *Bacillaceae* aisladas de la filofera de *Musa spp.*

Características	CCIBP-A2	CCIBP-A3	CCIBP-A5	CCIBP-B1	CCIBP-B2	CCIBP-B3	CCIBP-B4	CCIBP-B5	CCIBP-B.1	CCIBP-C5
Color colonia (AN)	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B
Agrupación	S	S	S	S	S	S	P	S	S	S
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Espora	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deformación esporangio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hugh y Leifson oxidativo	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
fermentativo	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Indol	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Hidrólisis almidón	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hidrólisis caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Hidrólisis gelatina	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Voges Proskauer	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Leyenda: B- beige, A-amarillo, S-solos, P-parejas

Tabla 2. Principales características de otros bacilos Gram+ no formadores de esporas aislados de la filosfera de *Musa* spp.

Características	CCIBP-A4	CCIBP-A6	CCIBP-C1	CCIBP-C2	CCIBP-C3	CCIBP-C4
Color colonia (AN)	Amarillo claro	Amarillo oscuro	Amarillo claro	Rosado	Amarillo claro	Amarillo claro
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Hugh y Leifson						
oxidativo	-	-	-	-	-	-
fermentativo	+	+	+	+	+	+
Indol	-	+	+	-	+	+
Hidrólisis						
almidón	+	-	-	-	-	-
Hidrólisis						
caseína	+	-	+	-	+	-
Hidrólisis						
gelatina	+	-	+	+	+	-
Voges						
Proskauer	-	-	-	-	+	-

Tabla 3. Principales características de las cepas de la familia *Pseudomonadaceae* aisladas de la filosfera de *Musa* spp.

Características	CCIBP-A1	CCIBP-C6
Color colonia en AN	Beige	Blanco
Motilidad	+	+
Catalasa	+	+
Hugh y Leifson		
oxidativo	+	+
fermentativo	-	-
Indol	-	-
Hidrólisis almidón	-	-
Hidrólisis caseína	-	-
Hidrólisis gelatina	-	-
Voges Proskauer	-	-

Teniendo en cuenta los resultados de la caracterización de las cepas bacterianas tanto bioquímica, fisiológica, molecularmente así como de su actividad antifúngica se pudo constatar la diversidad existente en las bacterias presentes en la filosfera de *Musa* spp., que poseen actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*. Estos resultados coinciden con los

referidos por otros autores como Osorio *et al.* (2004) para las condiciones de cultivo en Colombia.

Los resultados alcanzados en este trabajo reafirman, además, lo planteado por Redford *et al.* (2010) acerca de que las bacterias presentes en la filosfera no son simples

Tabla 4. Principales características de las cepas de la familia *Micrococcaceae* aisladas de la filosfera de *Musa* spp.

Características	CCIBP-C7
Color colonia (AN)	Beige
Agrupación	Tétradas
Catalasa	+
Hugh y Leifson oxidativo	-
fermentativo	-
Indol	-
Hidrólisis almidón	-
Hidrólisis caseína	-
Hidrólisis gelatina	-
Voges Proskauer	-

Tabla 5. Actividad antifúngica *in vitro* de diferentes cepas bacterianas frente a *Mycosphaerella fijiensis* (CCIBP-Pf 83) en cultivo dual a las 72h de incubación.

Cepas bacterianas	Diámetro del halo de inhibición (mm)	Rangos medios
CCIBP-B.1	29.5	78.7 ef
CCIBP-A1	29.1	74.2 f
CCIBP-A2	28.7	72.5 fg
CCIBP-A3	33.0	95.1 de
CCIBP-A4	38.2	138.1 bc
CCIBP-A5	32.0	92.4 de
CCIBP-A6	24.0	45.6 g
CCIBP-B1	29.4	88.2 def
CCIBP-B2	29.7	73.3 f
CCIBP-B3	40.6	155.8 ab
CCIBP-B4	34.5	119.7 bcd
CCIBP-B5	33.8	105.9 cd
CCIBP-C1	35.3	116.2 cd
CCIBP-C2	32.0	95.1 de
CCIBP-C3	36.3	116.2 cd
CCIBP-C4	42.0	165.1 a
CCIBP-C5	35.7	109.3 cd
CCIBP-C6	11.2	9.3 h
CCIBP-C7	36.3	115.3 cd

Valores de rangos medios con letras desiguales indican diferencias entre las medias según Kruskal-Wallis/Mann Whitney para  $p < 0.05$

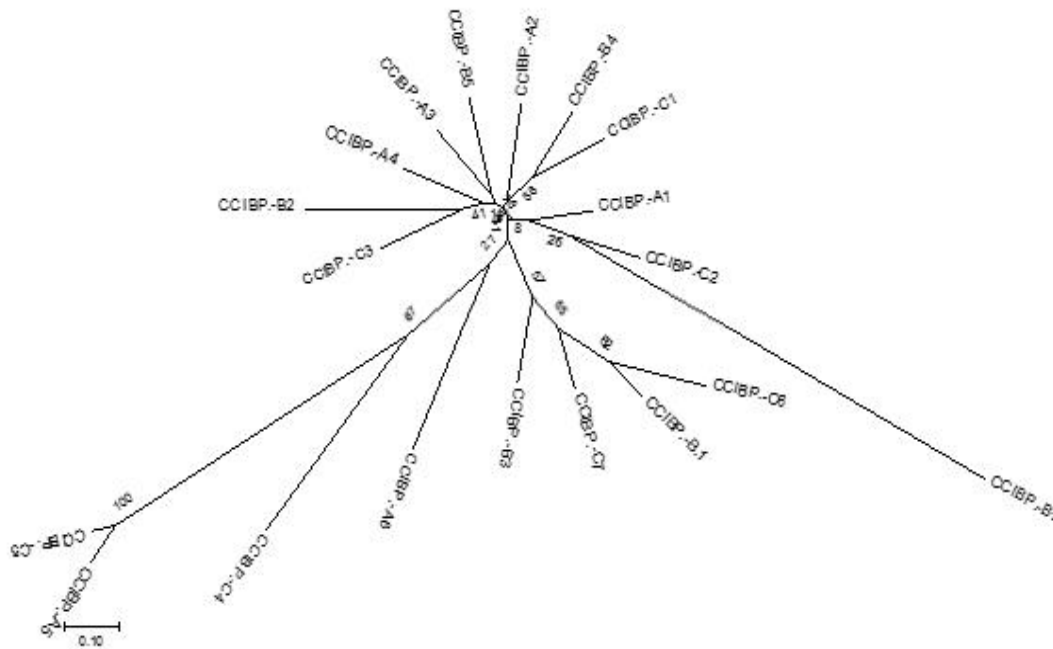


Figura 1. Diversidad genética de bacterias antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis* aisladas de la filósfera de *Musa* spp. basada en las secuencias del 16S rDNA. El árbol filogenético fue elaborado mediante el método del vecino más cercano y las secuencias se agruparon juntas basado en un *bootstrap* de 1000. Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Probabilidad Máxima Compuesta utilizando MEGA 7.0.14.

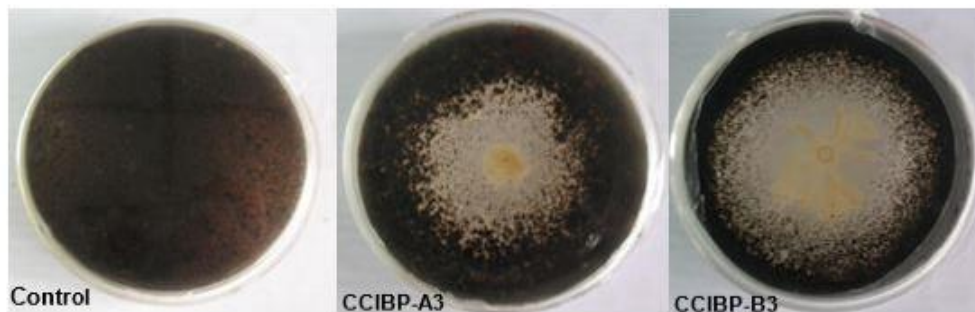


Figura 2. Actividad antifúngica *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de la filósfera de *Musa* spp. frente a *M. fijiensis* en cultivo dual en medio de cultivo PDA después de 72h de incubación a 28°C y oscuridad.

habitantes de la superficie de las hojas sino que están íntimamente relacionadas con las plantas que colonizan y tienen una influencia directa o indirecta en la composición de microorganismos asociados al cultivo. Es por ello que la filósfera de *Musa* spp. puede constituir una fuente importante de obtención de bacterias con características promisorias para el control biológico de *M. fijiensis*. Un conocimiento exhaustivo de estos microorganismos, sus características y su relación con *M. fijiensis* y la planta permitirá la

elaboración de bioproductos eficientes para el control de esta enfermedad.

## CONCLUSIONES

Las bacterias antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis* aisladas de la filósfera de *Musa* spp. son diversas en caracteres morfológicos, culturales y fisiológicos con presencia de representantes de tres familias y predominio del género *Bacillus*. Pueden constituir una fuente importante de candidatos para la elaboración

de productos biológicos que puedan insertarse en el manejo de la enfermedad.

## REFERENCIAS

- Agrios GN (2005) Plant Pathology. Academia Press, New York; ISBN: 0-12-044565-4
- Alvindia DG (2012) Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils, and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*. African Journal of Microbiology Research 6(19): 3690-3695; doi: 10.5897/AJMR12.175
- Alvindia DG, Natsuaki KT (2008) Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. Crop Protection 27 (8):1200–1207; doi: 10.1016/j.cropro.2008.02.007
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GAI as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. Microbial Cell Factories 8 (63): 1-12; doi: 10.1186/1475-2859-8-63
- Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, Ongena M (2011) *Bacillus*-based biological control and plant diseases. En: Stoytcheva M (ed). Pesticides in the modern world, pesticides use and management, pp. 273-303. InTech Europe, Croacia; ISBN: 978-953-307-459-7
- Ceballos I, Mosquera S, Angulo M, Mira J, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V (2012) Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Microb Ecol 64: 641–653; doi: 10.1007/s00248-012-0052-8
- Churchill A (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology 12 (4):307-328; doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00672.X
- Krieg NR, Holt J (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, New York; ISBN: 0683041088
- Krieg NR, Holt J (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore; ISBN: 0683078933
- Marín DH, Romero RA, Guzman M, Sutton TB (2003) Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Disease 87(3):208-222; doi: 10.1094/PDIS.2003.87.3.208
- Osorio I, Patiño LF, Bustamante E, Rodríguez PA (2004) Selección y evaluación de bacterias quitinolíticas provenientes de la zona de Urabá para el control de la Sigatoka negra. Boletín Técnico de Cenibabano (Medellín) 6:8-13
- Pereira de Melo F, Fiore M, de Moraes L, Silva-Stenico M, Scramin S, Teixeira M, de Melo I (2009) Antifungal compound produced by the *Cassava* endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. Sci Agric 66(5): 583-592; doi: 10.1590/S0103-90162009000500002
- Pérez-García A, Romero D, Vicente A (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. Current Opinion of Biotechnology 22 (2):187-193; doi: 10.1016/j.copbio.2010.12.003
- Poveda I, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B, Alvarado-Capó Y (2010) Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filósfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal 10 (1): 57 – 61
- Setlow P (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of Applied Microbiology 101(3): 514-525; doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Nat Acad Sci 101 (30):11030-11035; doi:10.1073/pnas.0404206101
- Todar K (2003) The genus *Bacillus*. University of Winconsin-Madison Department of Bacteriology, Madison
- Rao-Podile A, Neeraja Ch (2011) Microbial chitinases as potential biopesticides. En: Reddy VD, Rao PN, Rao KV (eds). Pest and Pathogens: Management Strategies, pp. 275-300. CRC Press, Leiden; ISBN: 9780415665766
- Redford A, Bowers R, Knight R, Linhart Y, Fierer N (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. Environmental Microbiology 12(11): 2885–2893; doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x
- Yadav R, Karamanoli K, Vokou D (2010) Estimating bacterial population on the phyllosphere by serial dilution plating and leaf imprint methods. ECOPRINT 17: 47-52
- Yang C-H, Crowley DE, Morneman J, Keen NT (2001) Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. Proc Nat Acad Sci 98 (7): 3889-3894; doi: 10.1073/pnas.051633898



Zhang B , Bai Z, Hoefel D , Wang X , Zhang L, Li Z (2010) Microbial diversity within the phyllosphere of different vegetable species. En: Mendez-Vilas A (ed). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp.1067–1077. Formatex Research Center, Badajoz

Recibido: 20-09-2015

Aceptado: 05-12-2015