

## Antagonismo *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*

Liliana Leyva Rodríguez<sup>1,2</sup>, Mileidy Cruz-Martín<sup>2</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>2</sup>, Tatiana Pichardo<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez-Carabaloso<sup>2</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

<sup>2</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 54 830 e-mail: mileidy@ibp.co.cu

### RESUMEN

Dentro de las enfermedades que más afectan al cultivo de plátanos y bananos (*Musa* spp.) se encuentra el Marchitamiento por *Fusarium*, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (*Foc*). Hasta el presente, los métodos químicos y culturales empleados para su manejo han sido poco efectivos. No obstante, una alternativa prometedora podría ser el empleo de bacterias antagonistas. Este trabajo tuvo el objetivo de determinar la capacidad antagónica de cepas de *Bacillus* spp. frente a *Foc* raza 1. Para ello, mediante cultivo dual, se determinó y cuantificó la actividad antagónica de las cepas bacterianas, así como su capacidad de producir metabolitos antifúngicos volátiles y difundidos. De las 17 cepas estudiadas, nueve mostraron capacidad antifúngica. De estas últimas, una no produjo ni difundidos ni volátiles (CCIBP-B4), siete presentaron difundidos y solo una (CCIBP-A5) ambos tipos de metabolitos. De todas las cepas estudiadas la CCIBP-A5, muestra las mejores potencialidades para el posible uso en programas de manejo de *Foc* raza 1.

Palabras clave: biocontrol, cultivo dual, metabolitos antifúngicos, *Musa* spp.

### *In vitro* antagonist of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*

### ABSTRACT

*Fusarium* wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (*Foc*) is a diseases that most affect the plantains and bananas (*Musa* spp.) cultivation. Until now, the chemical and cultural methods used for its management have been ineffective. However, a promising alternative could be the use of antagonist bacteria. This work had the objective of determining the antagonistic capacity of *Bacillus* spp. strains against *Foc* race 1. By means of dual culture, the antagonistic activity of the bacterial strains was determined and quantified, as well as their capacity to produce volatile and diffused antifungal metabolites. Of the 17 strains studied, nine showed antifungal capacity. Among then, one did not produce either diffused or volatile (CCIBP-B4), seven presented diffused metabolites and only one (CCIBP-A5) both types of metabolites. Of all the strains studied, CCIBP-A5 shows the best potential for possible use in *Foc* race 1 management programs.

Keywords: biological control, dual plate assays, *Musa* spp.

### INTRODUCCIÓN

Los bananos (*Musa* spp.) están considerados como uno de los cultivos frutales tropicales de mayor importancia a nivel mundial (Ploetz, 2015 a).

Para muchos países de América Latina este cultivo representa una fuente esencial de ingresos y de alimentación (Dita *et al.*, 2013).

Sin embargo, su producción se ve afectada por numerosas enfermedades, entre las que se encuentra el Marchitamiento por *Fusarium*. Esta es considerada la de mayor efecto destructivo sobre la planta (Anthony *et al.*, 2017).

El agente causal es el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cupense* (E.F. Sm.) Snyder & Hansen (*Foc*) que es genética y

patogénicamente diverso, con más de 20 grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) distribuidos en cuatro razas patogénicas (Ploetz, 2015 a).

En la década de 1940 la raza 1 destruyó la industria bananera en América Latina, basada principalmente en el cultivar 'Gros Michel'. Este problema se solucionó parcialmente con su reemplazo por Cavendish (Stover *et al.*, 1986). No obstante, el hongo persiste en donde se emplean cultivares susceptibles (Ploetz, 2015 a) como 'Gros Michel' (AAA), 'Manzano' (AAB), 'Prata' (AAB) y los bananos de cocción tipo 'Bluggoe' (ABB).

Así mismo, a principios de los años 90 del pasado siglo, apareció en el sudeste asiático la raza 4 tropical (RT4), la cual, además de infectar a los cultivares mencionados anteriormente, afecta severamente a los cultivares del grupo Cavendish (Ploetz, 2015 a; Ploetz, 2015 b). Aunque no existe información oficial de la entrada de la raza 4 a América Latina, este hongo fitopatógeno constituye una seria amenaza para la industria bananera en esta región.

Por otro lado, no existen agentes químicos eficaces y económicamente viables para el control de la enfermedad (Ploetz, 2015 b). Una vez que el suelo es infectado por *Foc* sus esporas pueden estar latentes durante largos periodos de tiempo (Dita *et al.*, 2010). Ante este escenario, el uso de microorganismos antagonistas resulta de gran interés ya que pudiera representar una alternativa más económica y ecológicamente sustentable.

Varios estudios han demostrado que determinadas cepas bacterianas bajo condiciones controladas, suprimen el crecimiento de *Foc*. Dentro de estos grupos se han descrito cepas de los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas* (Zhang *et al.*, 2013) y *Bacillus* (Xue *et al.*, 2015).

*Bacillus* spp., en particular, ha sido ampliamente estudiado como agente de control biológico debido a sus múltiples mecanismos de acción antagonista entre los que se encuentran antibiosis, competencia por los nutrientes e inducción de resistencia sistémica en las plantas (Chowdhury *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017).

Además, se distingue de otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* por formar endosporas que les permiten sobrevivir por largos periodos de tiempo bajo condiciones ambientales desfavorables (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

El laboratorio de Microbiología del Instituto de Biotecnología de las Plantas, cuenta con una colección de cepas pertenecientes al género *Bacillus* las cuales han mostrado efectos antagonistas frente a diferentes agentes patógenos de cultivos de interés agrícola (Poveda *et al.*, 2010; Cruz-Martín *et al.*, 2014). Sin embargo, la ausencia de información sobre la posible capacidad antifúngica de estas cepas frente a *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, limita su empleo como agentes de biocontrol en programas de manejo del Marchitamiento por *Fusarium*.

Este trabajo tuvo como objetivo, por tanto, determinar la capacidad antagonista de cepas de *Bacillus* spp. frente a *Foc* raza 1 en ensayos *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas de microorganismos*

Se utilizaron 17 cepas de *Bacillus* spp. (Tabla 1) y una cepa de *Foc* raza 1 (CCa 1.1 VCG) donada por el Instituto Nacional de Sanidad Vegetal INISAV (La Habana). Todos los microorganismos utilizados pertenecen a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP).

### *Suspensiones bacterianas (SB)*

Para el desarrollo de los diferentes bioensayos, las cepas bacterianas fueron subcultivadas a partir de cultivos puros conservados a 4 °C en medio de cultivo Agar Nutriente (AN) (Fluka). Se inocularon por agotamiento por estrías en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo AN y se incubaron a 30 °C y oscuridad durante 24 h. A partir de la observación de los caracteres culturales de las colonias, en microscopio estereoscópico (NOVEL), se seleccionaron colonias con idénticas características, se resuspendieron en agua desionizada estéril y cada suspensión resultante se ajustó a  $DO_{600} = 0.1$  ( $\sim 5 \times 10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>) en espectrofotómetro (Eppendorf).

Tabla 1 Cepas de *Bacillus* spp. empleadas en este estudio.

Cepa	Procedencia	Identificación
1. CCIBP-P1	Contaminante de cultivo <i>in vitro</i>	<i>Bacillus</i> sp.
2. CCIBP-M27	Contaminante de cultivo <i>in vitro</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
3. CCIBP-Sp105	Contaminante de cultivo <i>in vitro</i>	<i>Bacillus licheniformes</i>
4. CCIBP-CC32	Contaminante de cultivo <i>in vitro</i>	<i>Bacillus licheniformes</i>
5. CCIBP-Sp35	Contaminante de cultivo <i>in vitro</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
6. CCIBP-Er35	Contaminante de cultivo <i>in vitro</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
7. CCIBP-C5	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i>
8. CCIBP-F1	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>
9. CCIBP-A5	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
10. CCIBP-B.1	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
11. CCIBP-A2	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
12. CCIBP-A3	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
13. CCIBP-F4	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
14. CCIBP-B2	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
15. CCIBP-B3	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
16. CCIBP-B4	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
17. CCIBP-B5	Filosfera de <i>Musa</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.

#### Suspensión micelial (SM)

Para obtener la suspensión micelial, se inocularon tres discos de micelio de *Foc* de 7 mm de diámetro, procedentes de colonias previamente crecidas en Agar Papa Dextrosa (PDA) (Difco), en Erlenmeyer de 100 ml de volumen con 50 ml de Caldo Papa Dextrosa (PDB). Estos se incubaron en zaranda termostata (FLY-111B) a 28 °C y 120 rpm durante siete días. Transcurrido ese tiempo, se filtró en tamiz de 100 µm, se colectó el micelio y se desechó el medio de cultivo filtrado. Posteriormente, este micelio se homogenizó con agua desionizada estéril en mezcladora (Ultraturrax T25) durante un minuto y luego se ajustó a una concentración en el orden de aproximadamente 10<sup>6</sup> fragmentos de micelio ml<sup>-1</sup>.

#### Determinación de la capacidad antagónica de las cepas

Para determinar la capacidad antagónica de las cepas bacterianas se emplearon Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con 45 ml de medio de cultivo PDA y se añadieron 5 ml de SM de *Foc* cuando el medio de cultivo se enfrió hasta aproximadamente 45 °C. Esta

mezcla se homogenizó y se vertió en placas Petri de 90 mm de diámetro (25 ml aproximadamente por placa). Cuando el medio de cultivo se solidificó, se inocularon las SB mediante punción (10 por placa). Como control se empleó agua desionizada estéril en lugar de las cepas bacterianas. Las placas se incubaron a 28 °C y oscuridad. Se incluyeron dos réplicas por cada cepa y el ensayo se repitió dos veces. La evaluación se realizó diariamente hasta las 96 h mediante la observación de la presencia o no de halo de inhibición del crecimiento de *Foc* alrededor del sitio de inoculación.

#### Cuantificación de la capacidad antagónica de las cepas

Para cuantificar la capacidad antagónica de las cepas bacterianas que mostraron actividad antifúngica en el primer bioensayo, se determinó el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) en cultivo dual. Para ello, se colocaron discos de micelio (7mm) de *Foc* en el centro de placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio de cultivo PDA y AN en una proporción 1:1. Se añadieron 3.5 µl de cada SB a una distancia de 2 cm de los discos de micelio. Las placas se incubaron

a 28 °C en oscuridad. Como control se utilizó agua desionizada estéril en lugar de las SB. Se realizaron tres réplicas por cada cepa bacteriana y el ensayo se repitió dos veces. El efecto inhibitorio de las cepas fue medido a los cinco días de incubación. Para el cálculo del PICR se empleó la fórmula descrita por Hernández-Rodríguez *et al.* (2010):

$$PICR = \left( \frac{R1 - R2}{R1} \right) 100$$

dónde: R1= crecimiento radial (mm) del hongo en el control y R2= crecimiento radial (mm) del hongo en interacción con la bacteria. Los valores se analizaron estadísticamente mediante las pruebas de H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney para  $p < 0.05$ .

#### *Determinación de la producción de metabolitos volátiles y/o difundidos*

Para determinar si la inhibición del crecimiento fúngico de *Foc* era ocasionada por la producción de metabolitos secundarios antifúngicos difundidos y/o volátiles, se siguió el protocolo propuesto por Cruz-Martín *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Se utilizaron las cepas bacterianas que mostraron halo de inhibición en los primeros bioensayos.

Para determinar la capacidad de producción de metabolitos antifúngicos difundidos en una placa Petri de 150 mm de diámetro se añadió medio de cultivo PDA mezclado con una SM de *Foc*. Cuando el medio de cultivo se solidificó se le colocó encima un filtro estéril de acetato de celulosa (Sartorius) de 0.22 µm. Se depositaron sobre la superficie del filtro las SB (3 µl por cepa) separadas por 2 cm. Como control se empleó agua desionizada estéril en lugar de las SB y como control del crecimiento bacteriano se siguió el mismo procedimiento, pero sin utilizar membrana. Las placas se incubaron a 28 °C y oscuridad y se les retiró la membrana a las 48 horas de incubación y se dejaron bajo estas condiciones 24 horas más. Se utilizaron dos réplicas por cada cepa y el experimento se repitió dos veces. Se tomaron como positivos los aislados bacterianos que produjeron un halo de inhibición del crecimiento de *Foc*.

Con el objetivo de determinar producción de metabolitos antifúngicos volátiles por las cepas bacterianas en una de las tapas de placas Petri de 50 mm de diámetro se añadió medio de cultivo AN y se inoculó una SB (50 µl).

Sobre las otras tapas que contenía medio de cultivo Agar Sabouraud (AS) (Fluka) se inoculó un disco de micelio de 7 mm de diámetro de *Foc*. Cuando la humedad del inóculo bacteriano se absorbió completamente, se colocaron las dos tapas una frente a la otra y se sellaron con Parafilm® para evitar la pérdida de los metabolitos volátiles. Como control se empleó agua desionizada estéril en lugar de las SB. Las placas se incubaron a 28 °C y oscuridad constante durante seis días. Se incluyeron dos réplicas por cada tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Se tomaron como positivas las cepas bacterianas que produjeron inhibición del crecimiento de la colonia de *Foc* con respecto al control.

#### *Procesamiento estadístico de los resultados*

El procesamiento estadístico se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 23 para Windows. Se comprobó la normalidad de los datos a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Cuando no se cumplieron los supuestos se emplearon pruebas no paramétricas para  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la metodología empleada, se obtuvo como resultado que de las 17 cepas de *Bacillus* spp. evaluadas, nueve (53%) produjeron halos de inhibición del crecimiento de *Foc* raza 1 (Tabla 2). Dentro de estas, se encontraron cepas identificadas en estudios previos como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*.

Varias investigaciones han corroborado las potencialidades de cepas de estas especies como agentes de biocontrol. Por ejemplo, se ha informado que *B. subtilis* tiene capacidad de esporular, producir endotoxinas, antibióticos y proteínas con actividad antifúngica (Agrios, 1997). Esta especie constituye, quizás, una de las más estudiadas debido a su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diferentes hongos dentro de los que se encuentra *F. oxysporum* y son varios los bioproductos comercializables que contienen a *B. subtilis* como componente biológico activo (Zhang *et al.*, 2011; Lacomote *et al.*, 2016). Otros autores como Alvindia y Natsuaki (2009), señalaron las potencialidades antagónicas de *B. amyloliquefaciens*. Ellos indicaron que aplicando una cepa de esta especie, aislada del fructoplano del banano,

se reducía significativamente la incidencia de la podredumbre de la corona causada por los agentes fúngicos *Fusarium semitectum* (Berk y Ravenel) y *Colletotrichum musae* (Berk y Curtis).

También, es de destacar que seis de las nueve cepas que mostraron actividad antifúngica frente a este patógeno, fueron aisladas de musáceas y señaladas en investigaciones previas por tener actividad antifúngica frente a *Pseudocercospora fijiensis* Morelet (Cruz-Martín *et al.*, 2016). Estos resultados constituyen un criterio positivo para el empleo de dichas cepas como posibles controladores biológicos en este cultivo y evidencia las potencialidades de la microbiota natural para defender a las plantas de agentes fitopatógenos. Algunos autores sugieren que las cepas bacterianas autóctonas de determinados ecosistemas, comparadas con cepas exóticas, podrían tener mayor eficiencia como PGPB y agentes de biocontrol (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010). Esto se debe a que el éxito de los microorganismos antagonistas depende, en gran medida, de su capacidad para establecerse como miembro de la microbiota epífita, especialmente cuando se requiere disminuir el inóculo del patógeno. Por tal motivo, el uso de antagonistas microbianos nativos debería preferirse antes del uso de antagonistas aislados de otros ambientes, pues los primeros se encuentran adaptados a las condiciones que determinan su hábitat (Cruz-Martín *et al.*, 2016).

Con la metodología empleada se encontraron diferencias significativas en cuanto al potencial antifúngico *in vitro* de las cepas evaluadas (Tabla 2).

La cepa que produjo los mayores valores de PICR fue CCIBP-A5, identificada previamente como *B. amyloliquefaciens*. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Abdallah *et al.* (2017) donde se indicó que cinco cepas de *Bacillus* spp. (*B. tequilensis* SV39, *B. subtilis* SV41, *B. methylotrophicus* SV44, *B. amylolequifaciens* subsp. *plantarum* SV65, y *B. tequilensis* SV104) aisladas de plantas de *Solanum lycopersicum* L. (tomate), tenían gran potencial inhibitorio frente a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans. Estos autores, utilizando una metodología similar, demostraron que las cepas de *B. subtilis* y *B. amylolequifaciens* empleadas en el estudio, inhibían el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en 75.3% y 64.3% respectivamente.

Otros autores han informado las potencialidades antagonicas de cepas de *B. amyloliquefaciens* frente a *Foc* (Cao *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2015). En este sentido, Xue *et al.* (2015) demostraron que la cepa NJN-6 de esta especie bacteriana, en combinación con compost, producía el decrecimiento significativo de la colonización del hongo en la rizosfera de plantas de banano, aspecto de gran interés en el manejo de la enfermedad.

Tabla 2. Actividad antifúngica *in vitro* de cepas bacterianas de *Bacillus* spp. frente a *Foc* raza 1.

Cepas	PICR	Metabolitos		Origen filosfera de <i>Musa</i> spp.
	Medias $\pm$ DE	Difundidos	Volátiles	
CCIBP-A5	77.18 $\pm$ 5.92 a	+	+	+
CCIBP-P1	70.55 $\pm$ 3.88 b	+	-	-
CCIBP-F1	63.87 $\pm$ 6.29 bc	+	-	+
CCIBP-F4	63.47 $\pm$ 9.96 bc	+	-	+
CCIBP-Sp105	64.52 $\pm$ 6.57 bc	+	-	-
CCIBP-M27	68.48 $\pm$ 5.34 bc	+	-	-
CCIBP-A3	63.42 $\pm$ 3.75 c	+	-	+
CCIBP-B5	53.50 $\pm$ 3.57 d	+	-	+
CCIBP-B4	48.62 $\pm$ 2.51 e	-	-	+

Letras desiguales indican diferencias significativas por prueba H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney para  $p < 0.05$  - No produce; + Produce. DE Desviación Estándar

Por otro lado, las observaciones microscópicas del frente de inhibición entre *Foc* y la cepa con mayor efecto antagonístico, revelaron cambios morfológicos en las hifas tales como: distorsiones y daños en la integridad de la pared celular con ruptura y derrame del contenido celular (Figura 1).

Estos resultados concuerdan con los referidos por otros autores. Según Getha *et al.* (2005) y Ameena y Yien (2013), los cambios observados en la morfología de las hifas de *Foc*, resultan indicios típicos de la actividad de compuestos extracelulares que pueden funcionar como enzimas líticas o como antibióticos. Diferentes especies de *Bacillus*, poseen proteínas con actividad antifúngica que pueden causar lisis y alteraciones morfológicas en las hifas (Sansinenea y Ortiz, 2011).

Todas las cepas evaluadas, con excepción de CCIBP-B4, mostraron actividad antifúngica por la presencia de metabolitos difundidos. La cepa CCIBP-A5 que causó el mayor PICR de *Foc* produjo tanto metabolitos difundidos

como volátiles (Tabla 2). En presencia de estos últimos se observaron cambios en la coloración y textura de la colonia fúngica con respecto a la cepa control (Figura 2). Este hallazgo resulta interesante ya que muestra la versatilidad de esta cepa en mecanismos para la inhibición del crecimiento fúngico que han sido descritos en investigaciones precedentes para diferentes especies del género *Bacillus*. Por ejemplo, Sérgio *et al.* (2016) demostraron que la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (J.G.Kühn) R.T.Moore fue causada por la producción de compuestos volátiles de una cepa de *B. subtilis*. También, Sharifi y Ryu (2016) demostraron que los metabolitos volátiles de *Bacillus* sp. tienen la capacidad de producir cambios en la pigmentación de *F. oxysporum* y *Botrytis cinerea* (Mont.) de Bary y que este efecto depende de la dosis empleada. Ellos indicaron que estos compuestos son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y que existe una linealidad entre la concentración en el medio de cultivo y el grado de supresión.

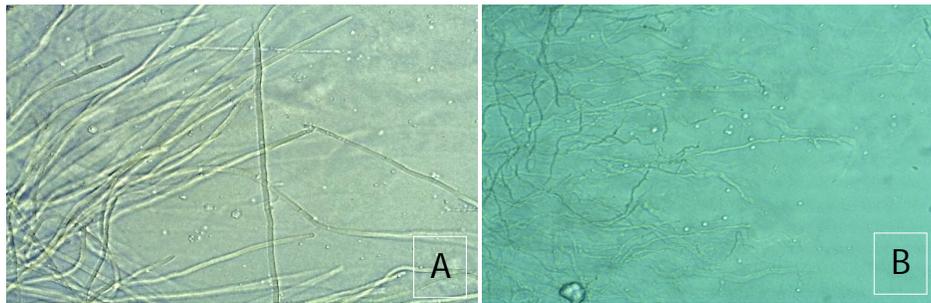


Figura 1. Cambios en la morfología de las hifas de *Foc* raza 1 en presencia de la cepa bacteriana CCIBP-A5 a los cinco días de incubación. Morfología normal de las hifas (A). Observación con microscopio óptico (400x) del frente de inhibición entre ambos microorganismos (B).

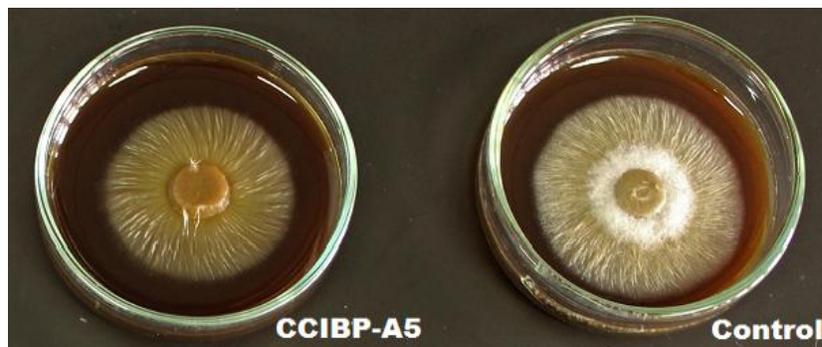


Figura 2. Colonias de *Foc* raza 1 en experimento para la detección de metabolitos antifúngicos volátiles, a los seis días de incubación en condiciones *in vitro*.

Los resultados anteriores corroboran hallazgos previos de otros autores sobre las interacciones microorganismo-microorganismo. En este sentido, Agrios (1997) indicó que muchos microorganismos inhiben el crecimiento de otros a través de la excreción de metabolitos tales como antibióticos, toxinas y biosurfactantes. Además, Poveda *et al.* (2010) y Cruz-Martín *et al.* (2012), siguiendo esta misma metodología, demostraron que aislados de *Bacillus* spp. de la filosfera de *Musa* spp. tenían efecto antifúngico frente a *P. fijiensis* a través de la producción de metabolitos difundidos al medio de cultivo. También Sérgio *et al.* (2016) informaron que un aislado de *B. subtilis* presentaba un elevado potencial antagonico frente a varios hongos fitopatógenos, dentro de los que se incluía *F. oxysporum*, a través de la producción de estos tipos de metabolitos.

#### CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demostraron el potencial antifúngico que presentan cepas del género *Bacillus*, pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas frente *Foc* raza 1. Además, las metodologías usadas pudieran constituir un criterio importante a tener en cuenta para la selección de bacterias como agentes potenciales de control biológico ya que la multiplicidad de sus propiedades antifúngicas refuerza una mejor eficiencia como agentes antagonistas.

#### REFERENCIAS

- Abdallah AB, Stedel C, Garagounis C, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddine H, Papadopoulou KK, Daami-Remadi M (2017) Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection* 99: 45-58; doi: 10.1016/j.cropro.2017.05.008
- Agrios GN (1997) *Plant Pathology*. Academic Press, California; ISBN: 9780120445653
- 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(3): 236-242; doi: 10.1016/j.cropro.2008.10.011
- Ameena F, Yien AS (2013) Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *Biological Control* 66(3): 204-208; doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.06.001
- Anthony K K, George D S, Baldev Singh H K, Fung S M, Santhirasegaram V, Razali Z, Somasundram C (2017) Reactive Oxygen Species Activity and Antioxidant Properties of *Fusarium* Infected Bananas. *J Phytopathol* 165(4): 213-222; doi:10.1111/jph.12552
- Cao Y, Zhang Z, Ling N, Yuan Y, Zheng X, Shen B, Shen Q (2011) *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biol Fert Soils* 47(5): 495-506; doi: 10.1007/s00374-011-0556-2
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R (2015) Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Front Microbiol* 6: 780; doi: 10.3389/fmicb.2015.00780
- Cruz Martín M, Sánchez-García C, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Hernández Durán Y, Roque R, Alvarado-Capó Y (2014) Antagonismo *in vitro* de cepas bacterianas frente a *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid). *Rev Protección Vegetal* 9(1): 66-69
- Cruz-Martín M, Acosta-Suárez M, Poveda I, Leiva-Mora M, Roque B, Alvarado-Capó Y (2012) Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediada por metabolitos difundidos y volátiles. *Biotecnología Vegetal* 12(3): 179-82
- Cruz-Martín M, Acosta-Suárez M, Roque B, Pichardo T, Castro R, Alvarado-Capó Y (2016) Diversidad de cepas bacterianas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* 16(1): 53-61
- Dita MA, Waalwijkb CI, Buddenahagenc W, Souza Jr MT, Kema GHJ (2010) A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology* 59: 348-357; doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x
- Dita M, Echegoyen-Ramos P, Pérez-Vicente L (2013) Plan de Contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* en un país de la región del OIRSA. OIRSA, El Salvador

- Fan H, Zhang Z, Li Y, Zhang X, Duan Y, Wang Q (2017) Biocontrol of Bacterial Fruit Blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via Surface-Mediated Antibacterial Activity and Colonization. *Front Microbiol* 8: 1973; doi: 10.3389/fmicb.2017.01973
- Getha K, Vikineswary S, Wong WH, Seki T, Ward A, Goodfellow M (2005) Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32(1): 24–32; doi: 10.1007/s10295-004-0199-5
- Hernández-Rodríguez A, León-Plasencia D, Rives-Rodríguez N, Díaz-de la Osa A, Almaguer-Chávez M, Acebo-Guerrero Y (2010) Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas fluorescences* con actividad antagonica ante *Curvularia* spp. *Revista Protección Vegetal* 25(3): 181-189
- Lecomte C, Alabouvette C, Edel-Hermann V, Robert F, Steinberg C (2016) Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control* 101: 17-30; doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.06.004
- Ploetz RC (2015 a) *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105(12): 1512-21; doi: 10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW
- Ploetz RC (2015 b) Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection* 73: 7-15; doi: 10.1016/j.cropro.2015.01.007
- 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
- Radhakrishnan R, Hashem A, Abd\_Allah EF (2017) *Bacillus*: a Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Front Physiol* (8): 667; doi: 10.3389/fphys.2017.00667
- Sansinenea E, Ortiz A (2011) Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* 33: 1523–1538; doi: 10.1007/s10529-011-0617-5
- Sérgio B, Pereira HM, Alves L, Damasceno K (2016) Potencial antagonístico de *Bacillus subtilis* (bsv-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. *Ciência Agrícola*, Rio Largo 14(1): 59-66
- Sharifi R, Ryu CM (2016) Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis seedlings* for eliciting induced resistance, or both? *Frontiers in Microbiology* 7: 196; doi: 10.3389/fmicb.2016.00196
- Stover RH, Buddenhagen IW (1986) Banana breeding: Polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41(3): 175-191
- Xu Z, Shao J, Li B, Yan X, Shen Q, Zhang R (2013) Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 79(3): 808–815; doi: 10.1128/AEM.03748-12
- Xue C, Penton CR, Shen Z, Zhang R, Huang Q, Li R, Ruan Y, Shen Q (2015) Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Sci Rep* (5): 11124; doi: 10.1038/srep11124
- Yuan J, Yu L, Ling N, Raza W, Shen Q, Huang Q (2015) Plant-growth-promoting traits and antifungal potential of the *Bacillus amyloliquefaciens* YL-25. *Biocontrol Science and Technology* 25(3): 276-90; doi: 10.1080/09583157.2014.971711
- Zhang H, Mallik A, Zeng RS (2013) Control of Panama disease of banana by rotating and intercropping with Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler): Role of plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 39(2): 243-252; doi: 10.1007/s10886-013-0243-x
- Zhang N, Wu K, He X, Li S, Zhang Z, Shen B, Yang X, Zhang R, Huang Q, Shen Q (2011) A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil* 344: 87-97; doi: 10.1007/s11104-011-0729-7

Recibido: 07-09-2017

Aceptado: 13-11-2017