

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

Escuela de Biología

Ingeniería en Biotecnología



Corporación Bananera Nacional, S.A.
CORBANA

“Aislamiento y cuantificación de bacterias epífitas del filoplano de banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) y selección de cepas quitinolíticas y glucanolíticas como potenciales antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra”

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Biología como requisito parcial para optar al grado de Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología.

Fabiola Alfaro Alvarado

Cartago Enero, 2013.

RESUMEN

La Sigatoka negra es considerada la enfermedad más limitante del cultivo de banano, reduce el rendimiento y la productividad dentro de la plantación. Actualmente, su combate se realiza principalmente con la aplicación de fungicidas químicos sin embargo, el patógeno ha desarrollado resistencia a algunos de los primordiales fungicidas de acción sitio-específico, lo que ha conllevado progresivamente a aumentos en el número de aplicaciones y en el costo de combate de la enfermedad con el consiguiente mayor riesgo ambiental. Ante la tendencia por una demanda de banano con mayores exigencias de inocuidad, calidad, sanidad y nutrición, surge la necesidad de buscar un método alternativo y complementario de manejo como lo es el control biológico. Varios estudios han identificado el potencial de las bacterias del filoplano para el control biológico de la Sigatoka negra. Por lo tanto, esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la población de bacterias epífitas presentes en hojas de banano y aislar cepas con potencial antagonistas de *M. fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra.

Las muestras se obtuvieron de una plantación experimental donde se realizan todas las prácticas agronómicas excepto la aplicación de fungicidas. En dicha plantación, se seleccionaron aleatoriamente diez plantas con seis hojas para la recolección de las muestras y de cada hoja se evaluaron dos secciones de la lámina foliar: el borde y el interior (paralelo a la vena central). Las bacterias totales fueron aisladas y cuantificadas en un medio pobre en nutrientes con fungicida mientras que las bacterias con potencial antagonista se aislaron en dos medios semiselectivos (con fungicida, pobre en nutrientes y rico en quitina y harina de cebada [como fuente de $\beta(1-3)$ glucano], respectivamente). La densidad poblacional fue estimada mediante la técnica de dilución en medios de cultivo y las características físicas de cada bacteria fueron obtenidas mediante observación de cada colonia formada. Adicionalmente, mediante PCR tiempo real se cuantificó el ADN total de bacterias, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y hongos en las muestras.

El número de bacterias totales y glucanólíticas presentaron una tendencia lineal en la cual aumentaron sostenidamente de la hoja 1 a la 6; asimismo, se cuantificó una mayor concentración de estas en el borde de la hoja que en la vena central de la misma. Por el contrario, la población de bacterias quitinolíticas fue similar en las seis hojas evaluadas y no se observaron diferencias en la cantidad presente entre el borde y la vena central. En total se aislaron 182 bacterias con potencial antagonista contra *M. fijiensis* de las cuales 70 (38,5 %) mostraron evidencias de actividad glucanólítica, 35 (19,2 %) presentaron actividad quitinolítica y 77 (42,3 %) revelaron actividad glucanólítica y quitinolítica.

El análisis molecular reflejó una mayor biomasa de ADN bacterial total en el borde que en la vena central; sin diferencias en la biomasa de *Bacillus* y *Streptomyces*, así como de hongos. En cuanto a la edad de la hoja, todos los microorganismos evaluados presentaron un comportamiento similar, que se reflejó una mayor biomasa de ADN en las hojas viejas que en las hojas nuevas. Los resultados obtenidos en esta investigación confirman el potencial que pueden tener los microorganismos epífitos del filoplano de banano como potenciales agentes de control biológico de la Sigatoka negra.

Palabras clave: Control biológico, antibiosis, filosfera, quitina coloidal, harina de cebada.

ABSTRACT

Black Sigatoka is considered the most limiting disease of banana cultivation, reduces plantation yield and productivity. Currently, the control of the disease is focuses on the application of chemical fungicides however; the pathogen has developed resistance to them, increasing the number of applications and the cost of the disease control with a greater environmental risk. The increased demand for more safety, quality, health and nutritional bananas arises the requirement to find an alternative and complementary method like the biological control. Studies have identified the potential of the phylloplane bacteria for biological control against black Sigatoka. Therefore, this research was conducted with the aim of evaluate the epiphyte bacteria population present in the banana leaves and to isolate strains with potential antagonistic for *M. fijiensis*, causal agent of black Sigatoka.

The samples were obtained from an experimental farm where are perform all agronomic practices except fungicide application. In such planting, were selected ten randomly plants with six leaves and from each leaf were analyzed two positions (edge and the central vein). Total bacteria were isolated and quantified in a nutrient poor medium with fungicide while potentially antagonistic bacteria were isolated in two semi-selective media (with fungicide, poor in nutrients and rich in chitin and barley flour [as a source of $\beta(1\ 3)$ glucan]). The population density was estimated by dilution technique in culture media and the characteristics of each bacterium were obtained by observation the colony formed. Additionally, with real time PCR was quantified bacteria, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. and fungi DNA in each sample.

The total and glucanolytic bacteria showed a linear trend in which the population increase steadily from leaf 1 to 6; also, higher bacteria concentration were quantified on the outside of the leaf. By contrast, the chitinolytic bacteria population was similar in all six leaves tested and no present differences between the rim and the central vein. A total of 182 potential antagonistic bacteria against *M. fijiensis* were isolated from the

banana phylloplane which 70 (38.5%) showed evidence of glucanolytic activity, 35 (19.2%) had chitinolytic activity and 77 (42.3%) revealed glucanolytic and chitinolytic activity.

Molecular analysis showed a higher biomass of total bacterial DNA in the edge than in the central vein, with no differences in the biomass of *Bacillus* and *Streptomyces* and fungi. As for the age of the leaf, all microorganisms tested showed a similar pattern, reflected a higher biomass of DNA in old leaves than in young leaves. The results obtained in this study confirm that biological control agents of black Sigatoka can be isolated from the banana phylloplane.

Keywords: biological control, antibiosis, phyllosphere, colloidal chitin, barley flour.

“Aislamiento y cuantificación de bacterias epífitas del filoplano de banano (*Musa AAA* cv. Grande Naine) y selección de cepas quitinolíticas y glucanolíticas como potenciales antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra”

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al Título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal



**Ing. M.Sc. William Rivera Méndez,
Profesor Asesor-ITCR**



**Ing. M.Sc. Mauricio Guzmán Quesada,
Asesor-Empresa**



**Ing. Claudiana Carr Rodríguez,
Lectora**

DEDICATORIA

A mi estrella, Adilia Solís Chávez.

A mis padres, hermanos y sobrino por todo el amor y apoyo que me han brindado en cada momento de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fuerza de no desfallecer y estar conmigo en todo momento.

A la Corporación Bananera Nacional S.A. (CORBANA) por el apoyo económico e institucional en la realización de esta investigación.

En forma especial al Ing. Mauricio Guzmán y a la Ing. Claudiana Carr por su apoyo, consejos, confianza, colaboración y por los conocimientos adquiridos gracias a ellos.

Al Ing. William Rivera por su apoyo y colaboración.

A Jose Corrales Ramírez por su incondicional cooperación.

Al Ing. Olmán Quirós y personal del Laboratorio de Biología Molecular por su contribución a esta investigación.

Al personal del laboratorio de Fitopatología por su ayuda y paciencia.

A todo el personal de CORBANA, S.A. por hacerme sentir como un miembro más de la corporación. Especialmente a Donny Vargas, Claudiana Carr, Luis Mario Jiménez, Islany Carrillo, Jorge Mario Arias, Franklin Rojas y Marco Madrigal por tantos buenos momentos compartidos a lo largo de este período, mil gracias.

Y a todas las personas que de una u otra manera fueron partícipes de este proceso y me apoyaron, que Dios les bendiga por siempre.

ÍNDICE GENERAL

Índice General

RESUMEN	i
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 REVISIÓN DE LITERATURA	6
3.1 Cultivo de Banano (<i>Musa</i> spp.).....	6
3.2 Estado actual de la producción bananera en Costa Rica.....	7
3.3 Generalidades de la Filosfera	8
3.3.1 La superficie de la hoja como un hábitat microbiano.....	9
3.3.2 Modelo de colonización bacteriana en la filosfera	10
3.3.3. Modificaciones bacterianas del hábitat foliar	12
3.3.4 Localización bacteriana en la filosfera.....	14
3.4 Control Biológico	15
3.4.1 Antibiosis como control biológico.....	16
3.5 Sigatoka negra	20
3.5.1 Modo de infección de <i>M. fijiensis</i>	22
3.5.2 Síntomas de la enfermedad	24
3.5.3 Combate biológico de la Sigatoka negra	26
4 MATERIALES Y MÉTODOS	29

4.1 Localización	29
4.2 I Etapa: Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de las bacterias totales y aquellas con potencial como agentes de control biológico (ACB)	29
4.2.1 Determinación de un medio semiselectivo con bajos requerimientos nutricionales para aislar bacterias totales y aquellas con actividad quitinolítica y glucanolítica.	29
4.3 II Etapa: Técnica de muestreo en campo.....	33
4.3.1 Colecta de muestras en fincas y aislamiento de los potenciales ACB.....	34
4.3.2 Aislamiento y cuantificación de bacterias epífitas productoras de quitinasas y glucanasas	34
4.4 III Etapa: Purificación y conservación de las bacterias quitinolíticas y/o glucanolíticas	35
4.4.1 Purificación de los aislamientos.....	35
4.4.2 Conservación de los aislamientos	35
4.5 IV Etapa: Análisis estadístico	36
4.6 V Etapa: Análisis Molecular	36
4.6.1 Extracción de ADN	36
4.6.2 Cuantificación de ADN de bacterias, <i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp. y hongos.....	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 I Etapa: Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de las bacterias totales y aquellas con potencial como agentes de control biológico (ACB)	39

5.1.1	Determinación de un medio semiselectivo con bajos requerimientos nutricionales para aislar las bacterias totales y aquellas con actividad quitinolítica y glucanolítica.	39
5.2II	Etapa: Técnica de muestreo en campo.....	41
5.2.1	Colecta de muestras en fincas y aislamiento de los potenciales ACB	41
5.2.2	Aislamiento y cuantificación de bacterias epífitas totales y productoras de quitinasas y glucanasas	42
5.3III	Etapa: Purificación y conservación de las bacterias quitinolíticas y/o glucanolíticas	46
5.4IV	Etapa: Análisis Molecular	46
5.4.1	Cuantificación de ADN	46
6	DISCUSIÓN	51
7	CONCLUSIONES.....	61
8	RECOMENDACIONES	63
9	BIBLIOGRAFÍA.....	64
10	ANEXOS	77
11	APÉNDICES	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de colonización bacteriana del filoplano.....	11
Figura 2. Composición general de la pared celular fúngica	18
Figura 3. Ciclo de vida de <i>M. fijiensis</i>	24
Figura 4. Diagrama de las zonas muestreadas en la hoja. Óvalo rojo representa la muestra externa (borde de la hoja) y el óvalo celeste indica la muestra interna (paralelo a la nervadura central).....	31
Figura 5. Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo. A) bacterias totales en medio AN, B) bacterias glucanolíticas en medio AHC y C) bacterias quitinolíticas en medio AQ. Nótese en B y C la formación de halos de hidrólisis en algunos aislamientos.	40
Figura 6. Hojas muestreadas de una planta. A) Hoja 1, B) Hoja 2, C) Hoja 3, D) Hoja 4, E) Hoja 5 y F) Hoja 6. Nótese el aumento progresivo de la severidad de la Sigatoka negra.	41
Figura 7. LN (UFC) de bacterias totales cultivables / cm ² aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa</i> AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.	43
Figura 8. LN (UFC de bacterias glucanolíticas cultivables) / cm ² aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa</i> AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.....	44
Figura 9. LN (UFC) de bacterias quitinolíticas cultivables / cm ² aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa</i> AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.....	45
Figura 10. Crecimiento de algunos aislamientos sometidos a la primera fase de purificación.	46
Figura 11. Cantidad de ADN (pg/ml) bacteriano cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa</i> AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.	47

Figura 12. Cantidad de ADN (pg/ml) de *Bacillus* spp. cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad. 48

Figura 13. Cantidad de ADN (pg/ml) de *Streptomyces* spp. cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad..... 49

Figura 14. Cantidad de ADN (pg/ml) fúngico cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad. 50

Figura 15. Estructura química de las moléculas de quitina y glucano. A) Molécula de quitina y B) Molécula de glucano..... 53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio Agar nutriente (AN) (Oxoid®) (25 %)*.....	31
Cuadro 2. Composición del medio Agar-Quitina (AQ) rico en nutrientes*.....	32
Cuadro 3. Composición del medio Agar-Harina de cebada (AHC) rico en nutrientes*.	32
Cuadro 4. Composición del medio Agar nutriente (Oxoid®) (10 %)*	33
Cuadro 5 . Primers específicos utilizados, temperatura de alineamiento y tamaño del fragmento aproximado para cada grupo filogenético.....	37
Cuadro 6. Cantidad (UFC/cm ²) de bacterias totales, glucanolíticas y quitinolíticas aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa AAA cv. Grande Naine</i>) de diferente edad.	42
Cuadro 7 . Cantidad de ADN (pg/ml) bacterias, <i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp. y hongos cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa AAA cv. Grande Naine</i>) de diferente edad.	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Parámetros utilizados para la caracterización morfológica de las bacterias aisladas.	77
Anexo 2. Protocolo sistema de crioconservación CRYOBANK.	78

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Aislamientos obtenidos en los ensayos preliminares.	79
Apéndice 2. Características morfológicas y producción de enzimas líticas de las bacterias aisladas como antagonistas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	80
Apéndice 3. Análisis de varianza de las bacterias totales, glucanolíticas y quitinolíticas aisladas dos secciones (borde y vena central) de seis hojas de diferente edad de <i>Musa</i> AAA cv. Grande Naine.....	87
Apéndice 4. Análisis de regresión de las bacterias totales, glucanolíticas y quitinolíticas aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa</i> AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.....	87
Apéndice 5. Análisis estadístico en unidades de Ln (UFC)/cm ² de las bacterias totales, glucanolíticas y quitinolíticas aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (<i>Musa</i> AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.....	88

1 INTRODUCCIÓN

La producción de banano se ha desarrollado a nivel mundial, principalmente en América Latina y el Caribe, Asia y África. La región de América Latina y el Caribe produce el 90 % del banano que se comercializa en el mundo. Para ello se requiere el uso de alta tecnología e insumos agrícolas como fertilizantes, insecticidas, nematocidas, herbicidas y fungicidas (Frison y Sharrock 1999).

En Costa Rica la producción y exportación del banano se inició hace más de 100 años y actualmente es uno de los principales países productores de banano en el mundo gracias a una productividad promedio de 2.535 cajas por hectárea (46,0 toneladas métricas), una de las más altas a nivel mundial (Rodríguez *et al.* 2011). Esto unido a un área de siembra de 42.017 hectáreas, le permite alcanzar una producción total de cerca de 100 millones de cajas y percibir anualmente \$ 804.986.150 (Rodríguez *et al.* 2011, Sánchez *et al.* 2012) lo que le da al banano un posicionamiento privilegiado en el ámbito agrícola nacional y lo identifica como un motor de desarrollo económico y social.

Los cultivares utilizados actualmente son de muy alto potencial productivo, pero a la vez, muy susceptibles al ataque de plagas y enfermedades. La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada como la enfermedad foliar más limitante para la producción de bananos y plátanos a nivel mundial, y de mayor impacto económico para la industria de banano de exportación (Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Pérez *et al.* 2003, Romero y Guzmán 2006). La Sigatoka negra no causa una muerte súbita de la planta, ni tampoco la destruye en su totalidad; la importancia de la misma reside en su capacidad para alcanzar el 100 % de incidencia y su marcado impacto sobre la producción y la calidad (Guzmán 2006, Marín *et al.* 2003, Rodríguez y Cayón 2008).

M. fijiensis infecta las hojas en sus primeras etapas de desarrollo y evoluciona rápidamente hasta la aparición de manchas necróticas, lo que culmina en un rápido deterioro del área foliar que afecta el crecimiento y productividad de la planta al disminuir la capacidad fotosintética; también puede inducir la maduración prematura de los racimos (Rodríguez y Cayón 2008, Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Guzmán 2006, Romero y Guzmán 2006, Chillet *et al.* 2008). En ausencia total del control de la enfermedad, variables importantes como el peso del racimo puede reducirse hasta un 50 % (Belalcazar 1991), mientras que la calidad de la fruta puede verse afectada hasta en un 100 % (Guzmán 2006).

Actualmente, el combate de la Sigatoka negra se realiza principalmente con la aplicación de fungicidas químicos (Stover 1980, Mourichon *et al.* 1997, Romero 1997, Marín *et al.* 2003). Sin embargo, el patógeno ha desarrollado resistencia a algunos de los principales fungicidas de acción sitio-específico, lo que ha conllevado progresivamente a aumentos en el número de aplicaciones y en el costo de combate de la enfermedad con el consiguiente mayor riesgo ambiental (Stover 1980, Sánchez *et al.* 2002, Romero 2006, Guzmán 2006).

Existen otras opciones de manejo de la enfermedad que pueden integrarse con el combate químico; como el uso de cultivares resistentes, el desarrollo de nuevos fungicidas botánicos que generan menor impacto en el ambiente, la aplicación de inductores de resistencia, las prácticas culturales para la reducción del inóculo del patógeno y el control biológico. De estas, el control biológico siempre despierta mucho interés, porque no tiene efectos colaterales y disminuye la aplicación de agroquímicos que pueden deteriorar los suelos y se acumulan en el ambiente y los alimentos (González 1995, Patiño *et al.* 2006). Sin embargo y lamentablemente, para el caso de la Sigatoka negra el control biológico ha sido poco estudiado.

El control biológico es la utilización intencionada de organismos vivos para reducir las actividades y las poblaciones de uno o más patógenos de plantas (Ceballos 2009); esto se puede realizar mediante la incorporación de agentes biocontroladores específicos al hábitat, o bien por medio del manejo del ambiente, para favorecer los organismos biocontroladores nativos (Arauz 1998). En varias investigaciones se ha identificado el gran potencial de los organismos del filoplano para el control biológico de enfermedades foliares causadas por patógenos. Se ha logrado detectar la presencia de diferentes géneros de bacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas y con una menor frecuencia protozoos y nemátodos, de los cuales muchos pueden ser benéficos para las plantas ya que estimulan su crecimiento o bien pueden suprimir la colonización e infección de sus tejidos por patógenos (Lindow y Brandl 2003).

Varios mecanismos pueden estar involucrados en el modo de acción de estos organismos biocontroladores, entre los que se destacan: el parasitismo, la protección cruzada, la activación de la resistencia sistémica inducida en la planta hospedera, la antibiosis y la competencia por nutrientes y espacio (Blakeman y Fokkema 1982, Andrews 1990, Baker y Griffin 1995, Arauz 1998, Haggag y Mohamed 2007). La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o destruye a un organismo por medio de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, compuestos volátiles y de enzimas líticas. Estas últimas disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y $\beta(1-3)$ glucano, principales componentes de la pared celular de los hongos fitopatógenos (Fravel 1998, Baker y Griffin 1995, Brodhagen *et al.* 2003).

En algunos estudios se ha encontrado que microorganismos provenientes de la filosfera; tanto hongos (Arzate-Vega *et al.* 2006, Osorio 2006, Carr 2009) como bacterias de los géneros *Bacillus* (González 1995, Miranda 1996, Riveros *et al.* 2003, Villalta y Guzmán 2006, Ceballos 2012), *Pseudomonas* (Jiménez *et al.* 1985, Osorio *et al.* 2004) y *Serratia* (Rodríguez 1995, González 1995, Miranda 1996, Patiño 2006) tienen capacidad antagonista contra *M. fijiensis*.

Sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento existente sobre la diversidad ecológica y caracterización de las poblaciones epífitas de microorganismos presentes en el filoplano de las musáceas ya que esto podría contribuir a la selección de microorganismos más eficientes como antagonistas y a un manejo más adecuado de los mismos para que expresen su máximo potencial. Las bacterias en particular representan un grupo de especial interés, dada su capacidad para colonizar superficies foliares y formar estructuras de resistencia que les ayudan a sobrevivir en condiciones ambientales adversas (Blakeman y Fokkema 1982, Marín *et al.* 2003) Asimismo, esta alternativa de control presenta la ventaja de poder aplicarse a los sistemas convencionales de banano y aquellos basados en producción limpia u orgánica, lo que contribuiría con la sostenibilidad y competitividad de la industria de banano de exportación.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la población de bacterias epífitas presentes en hojas de banano y aislar cepas con potencial como antagonistas de *M. fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra.

2.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar por la técnica de dilución en medios de cultivo las bacterias epífitas cultivables totales, quitinolíticas y glucanolíticas presentes en el filoplano de banano.
2. Comparar las poblaciones de las bacterias epífitas quitinolíticas y glucanolíticas en hojas de banano de diferente edad.
3. Comparar la población de bacterias epífitas presentes en el borde y la posición central de la hoja de banano.
4. Aislar cepas de bacterias epífitas con propiedades quitinolíticas y glucanolíticas como potenciales antagonistas de *M. fijiensis*.
5. Cuantificar por técnicas moleculares la biomasa de ADN de bacterias, hongos y actinomicetes en hojas de banano de diferente edad.

3 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Cultivo de Banano (*Musa* spp.)

El banano es una planta monocotiledónea de porte alto, que se originó de cruces intra e inter-específicos entre *Musa acuminada* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B) que pertenecen a la familia *Musaceae* (Nadal *et al.* 2009). Estas especies diploides provienen de los genomas A y B, respectivamente (Simmonds y Shepherd 1955; Simmonds 1962). La literatura reporta que su punto de origen se localiza en el sur-este asiático (India a Polinesia) y que su centro de distribución se encuentra ubicado en Malasia o Indonesia (Stover y Simonds 1987).

La planta de banano, morfológicamente presenta un sistema de raíces fibrosas, un cormo subterráneo y un falso tallo (pseudotallo) que sostiene las hojas, flores y frutos. Las raíces poseen forma de cordón y aparecen en grupos de 3 ó 4, estas se caracterizan por ser de color blanco cuando emergen, y a medida que aumenta la edad de la planta, adquieren una tonalidad amarillenta y textura dura. El cormo es un tallo subterráneo con ramificación monopódica. En el ápice se encuentra anidado el punto vegetativo o meristemo apical, a partir de los cuales emergen las raíces y el pseudotallo. La forma del cormo está influenciada por la textura y estructura del suelo, puede variar desde cónica en suelos pesados a cilíndrica achatada en suelos livianos. El diámetro no excede de los 30 cm. La consistencia suele ser carnosa debido a su alto contenido de parénquima. El pseudotallo ofrece a la planta apoyo y capacidad para almacenar reservas amiláceas; también, le permite alcanzar mayor altura y elevar el nivel de las láminas foliares que captan la luz solar. En una planta adulta puede medir 5.0 m de altura y 40 cm de diámetro según el clon. Su estructura es resistente y puede soportar el peso de las láminas foliares y de su inflorescencia que llega hasta 75 kg. Las hojas son grandes y oblongas (2-4 m de largo y hasta de 0.5 m de ancho), poseen seudopetiolos largos que se ensanchan en vainas, cuyo conjunto forma el pseudotallo (Belalcázar 1998).

En orden de importancia económica, existen bananos triploides (AAA, AAB y ABB), diploides (AA y AB) y tetraploides (AAAA, AAAB y AABB). Los principales cultivares comerciales son triploides, altamente estériles, partenocárpicos y propagados asexualmente (Simmonds y Shepherd 1955; Simmonds 1962; Ortiz y Vuylsteke 1996, Nadal *et al.* 2009).

3.2 Estado actual de la producción bananera en Costa Rica

Sánchez *et al.* (2012), en las estadísticas de exportación bananera nacional del año 2011, establecen que para ese año se presentó un aumento de un 5,21 % en el volumen exportado de banano en relación con el año 2010, llegando a los 106.496.113 cajas. Esto representa un aumento del 8,11 % en el ingreso de divisas en relación al año previo para un total de US \$ 804.986.150 (Ochocientos cuatro millones novecientos ochenta y seis mil ciento cincuenta dólares).

Para el 2011, el área ponderada en producción de Costa Rica fue de 42.017 hectáreas. De las cuales el 57,7 % pertenece a fincas de las comercializadoras (Corporación de Desarrollo Agrícola Del Monte, Bonanza Fruit Company, Standard Fruit Company, Compañía Bananera del Atlántico Ltda. (COBAL) entre otras) y el resto (42,3 %), corresponde a productores independientes cuyo capital social pertenece mayoritariamente o en su totalidad a costarricenses o extranjeros con más de 5 años de vivir en el país (Sánchez *et al.* 2012).

Actualmente, el cultivo de banano se desarrolla principalmente en la vertiente del Caribe, donde se encuentran en producción 41.287 hectáreas, que representan el 98,3 % del área nacional. Matina es el mayor cantón exportador de banano con 9.929 hectáreas en producción, lo que simboliza el 23,6 % del área bananera total de Costa Rica. En el segundo lugar se ubica Pococí con el 20,6 % de la superficie bananera costarricense, lo que equivale a 8.664 hectáreas. En orden descendente se encuentra Siquirres, Sarapiquí, Guácimo, Limón y Talamanca. En la región del Pacífico la

superficie bananera es de 729 hectáreas que constituyen el 1,7 % de las plantaciones bananeras del país (Sánchez *et al.* 2012).

3.3 Generalidades de la Filosfera

La superficie y el interior de las partes aéreas de las plantas, incluyendo el tallo, las hojas, las flores y los frutos de las plantas son hábitat de poblaciones microbianas epífitas (Bailey *et al.* 2006). La palabra filosfera o filoplano fue utilizado por Last (1955) y Ruinen (1956) para hacer mención a “la superficie de las hojas de las plantas como un ambiente que es física, química y biológicamente diferente del resto de la hoja o del ambiente exterior que lo rodea” (Riederer y Muller 2006). Las hojas representan la estructura aérea dominante de las plantas con aproximadamente $6,4 \times 10^8$ km² de área superficial que puede ser colonizado por diversos microorganismos (Lindow y Brandl 2003).

Las bacterias han sido el objetivo de estudio en la filosfera, ya que son las colonizadoras más abundantes de este ambiente (Gnanamanickam e Immanuel 2007); estudios revelan que se encuentran en promedio de 10^6 a 10^7 células bacterianas/cm² (hasta 10^8 células/g) de hoja (Lindow y Brandl 2003). Asimismo, se han logrado identificar más de 78 especies en el filoplano, lo que representa 37 géneros (Lindow y Brandl 2003). Dado el gran número de bacterias en las hojas de las regiones templadas del mundo, y a que las poblaciones de las regiones tropicales son probablemente mayores, la población bacteriana en la filosfera planetaria puede ser tan grande como 10^{26} células (Morris y Kinkel 2002).

Es evidente que, en conjunto, estas bacterias son suficientemente numerosas como para contribuir en muchos procesos de importancia para los procesos globales, así como en las plantas individuales en las que viven. Esta gran diversidad convierte a las hojas en un nicho de importancia agrícola ya que, gracias a los organismos que en ella

se desarrollan, se generan múltiples interacciones que intervienen directamente sobre el desarrollo y la productividad de los cultivos (Ceballos 2009).

3.3.1 La superficie de la hoja como un hábitat microbiano

La superficie de la hoja es considerada como un ambiente hostil para el desarrollo de microorganismos debido a las fluctuaciones en las condiciones físicas y químicas que las caracterizan. La filosfera es un hábitat que está expuesto a fuertes cambios de temperatura, humedad relativa, lluvia, vientos y radiación solar que pueden variar a lo largo de la hoja por causas como posición y facilidad de difusión. Estas variables difieren en períodos cortos de tiempo lo que provoca un ambiente inestable con altas condiciones de estrés (Lindow y Brandl 2003, González 1995).

La cantidad de nutrientes, la especie de la planta, la edad de la hoja, el estado fisiológico de la planta y hasta las lesiones presentes en las hojas pueden alterar rápidamente la microbiota presente en el filoplano (Yang *et al.* 2000). Por lo tanto, la mayoría de los inmigrantes a una hoja pueden encontrarse en un ambiente oligotrófico, con un crecimiento limitado y por consiguiente una actividad metabólica lenta, mientras que algunos otros microorganismos pueden estar en puntos con alta concentración de nutrientes (Lindow y Brandl 2003). Esta heterogeneidad en el entorno de la filosfera pone restricciones sobre los patrones de competencia y otras interacciones que pueden producirse entre las bacterias y el filoplano.

La disponibilidad de los nutrientes en las hojas es una limitante para el desarrollo de los microorganismos. Las comunidades microbianas en plantas están limitadas por la disponibilidad de carbono y sólo secundariamente por la disponibilidad de nitrógeno (Wilson y Lindow 1994). Los nutrientes del filoplano que son utilizados por los microorganismos para su desarrollo pueden originarse endógenamente, como en el caso de los exudados de las hojas o exógenamente a partir de partículas del suelo,

polvo, iones, solutos de la lluvia muerte de microorganismos y excremento de insectos (Andrews 1990).

La composición, cantidad y calidad de los nutrientes son afectadas por la especie de la planta hospedera, la edad de la hoja, su estado fisiológico y nutricional, al igual que la presencia de tejido dañado, alterando así en un tiempo en específico una determinada población de microorganismos (Andrews 1992, Jacques 1994, Yang 2000).

Además, varios estudios han revelado que las pequeñas cantidades de nutrientes pueden ser lavados de las hojas (Mercier y Lindow 2000, Tukey 1970), lo que favorece así a que la disponibilidad de nutrientes en las láminas sea espacialmente heterogénea. Por ejemplo, Mercier y Lindow (2000) comprobaron mediante un análisis químico que aproximadamente de 0,2 a 10 g de azúcar (suficiente para estimular el crecimiento de 10^7 a 10^8 bacterias/hoja) puede ser lavados de las hojas de frijol sin colonizar.

3.3.2 Modelo de colonización bacteriana en la filosfera

La colonización de la filosfera se realiza en función del inóculo disponible, ambiente y el hospedero. Parece haber una temprana preponderancia de bacterias, seguida por un agudo incremento en el número de levaduras y eventualmente un aumento en hongos filamentosos. Este patrón es afectado por efectos locales tales como el grado de infestación de insectos, prácticas de cultivo y eventos climáticos (Andrews 1990, Yang *et al.* 2000).

Las especies bacterianas colonizan la filosfera de diferentes maneras. Sin embargo, debido a las similitudes entre los requisitos para el crecimiento y la supervivencia Beattie y Lindow (2003) propusieron un modelo general para la colonización bacteriana de la hoja. El primer paso consiste en la llegada de la bacteria a la superficie de la hoja por el aire, agua o deposición de algún vector. Posteriormente, se distribuyen al azar en toda la superficie de la hoja, normalmente en forma de células individuales o pequeños

grupos de células. Seguidamente, algunas de estas células logran entrar en la hoja a través aberturas tales como estomas o hidátodos, mientras que otras se quedan en la superficie y una vez establecidas en la hoja, las bacterias modifican su ambiente para garantizar su colonización y sobrevivencia. Las bacterias que pueden modificar el medio y adaptarse al mismo se multiplican dando origen a la formación de colonias homogéneas y/o heterogéneas y a su vez a la generación de grandes agregados (Figura 1).

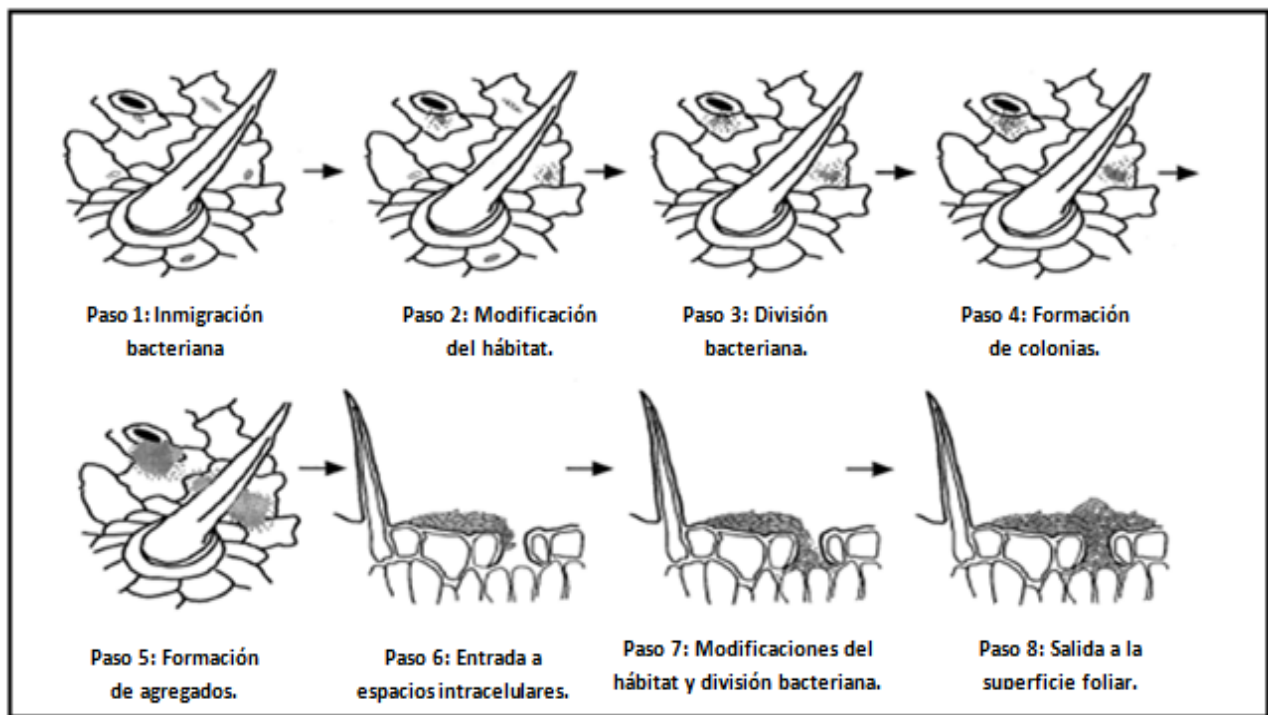


Figura 1. Modelo de colonización bacteriana del filopiano. Fuente: Beattie y Lindow (2003).

Los microorganismos liberados a partir de las plantas, aparentemente pueden mantenerse viables por períodos de tiempos suficientes como para ser transportados más de 100 m y la capacidad de carga de células microbianas inmigrantes, puede ser aproximadamente de 1.000 células por día (Lindow y Andersen 1996). Sin embargo, esto no garantiza la capacidad de colonización de la superficie foliar, ya que depende también de las características de las células inmigrantes de mantener la viabilidad

frente a las condiciones de estrés encontradas durante su transporte (Lindow y Andersen 1996).

3.3.3. Modificaciones bacterianas del hábitat foliar

Existe evidencia que comprueba que las bacterias pueden modificar su ambiente para favorecer su colonización en las plantas y así garantizar su supervivencia (Beattie y Lindow, 1999). Entre las estrategias mencionadas en la literatura están la tolerancia a los rayos UV, la producción de surfactantes, la liberación de AIA (ácido indol-acético), la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) y la capacidad de crecer en agregados (formar biopelícula) (Whipps *et al.* 2007, Lindow y Brandl 2003, Morris *et al.* 1997, Sundin 2002).

La tolerancia a los rayos ultravioleta (UV) es fundamental para la supervivencia y el crecimiento de las bacterias en este hábitat y es por esta razón que la mayoría de los microorganismos aislados de la filosfera son capaces de soportar altos niveles de radiación UV en la superficie de la hoja (Sundin 2002). La producción de compuestos biosurfactantes no sólo se ha relacionado con la capacidad de algunas bacterias para antagonizar patógenos (Ongena y Jacques 2008) sino con estrategias de colonización en las hojas (Bais *et al.* 2004, Leclère *et al.* 2006). La producción de bio-surfactantes permite a los microorganismos liberar sustancias que rompen las membranas de las células de la planta con el fin de incrementar la disponibilidad de agua y nutrientes (Beattie y Lindow 1999; Lindow y Brandl 2003). La película de agua creada por el surfactante le permite a la bacteria desplazarse a través de la superficie de las hojas a las áreas donde los nutrientes son más abundantes. Por lo tanto, la producción de surfactantes puede ser un rasgo por el que las bacterias pueden alterar su hábitat para explotar de manera más eficiente el filoplano. Por ejemplo algunas especies de *Pseudomonas* liberan surfactantes en la hoja, lo que les permite incrementar la mojabilidad de la superficie y les permite una mayor solubilización y difusión de

nutrientes (Bunster *et al.* 1989). Asimismo, Hutchison y Johnstone (1993) comprobaron esto en *Pseudomonas tolaasi* la cual produce la toxina tolaasin, un potente surfactante.

Igualmente, existe evidencia que revela la capacidad de muchas bacterias para producir ácido 3-indol acético (AIA) con el objetivo de aumentar las concentraciones de nutrientes en las superficies de las plantas (Manulis *et al.* 1998, Brandl y Lindow 1998, Beattie y Lindow 1999, Lindow y Brandl 2003). Goldberg (1975) y Fry (1989) comprobaron que la producción bacteriana de AIA estimula la liberación de sacáridos de la pared celular de la planta. Debido a que las bacterias que colonizan el filoplano se enfrentan a condiciones nutricionales deficientes, se planteó la hipótesis de que la principal función que cumple la producción de AIA es que los microorganismos tengan una mayor disponibilidad de nutrientes causado por la salida creciente de sacáridos de células vegetales en sus proximidades (Beattie y Lindow 2003, Brandl y Lindow 1998). En un estudio realizado por Brandl y Lindow (1998), la producción de AIA por *E. herbicola* le otorgó una ventaja selectiva para colonizar hojas de plantas de frijol durante períodos de crecimiento activo sobre la colonización de cepas mutadas deficientes en la producción de AIA.

Las bacterias también pueden modificar su ambiente mediante la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) los cuales cumplen la función de protegerlos de la desecación y de la presión osmótica del medio (Lindow y Brandl 2003, Morris *et al.* 1997). Al mismo tiempo, los EPS brindan protección a la asociación planta-microorganismo de las especies oxígeno reactivas que a menudo son encontradas sobre éstas e incrementan la concentración de nutrientes para su desarrollo (Bettie y Lindow 1999, Leben 1981, Wilson *et al.* 1965, Morris *et al.* 1997). Además de modificar el ambiente en el que se desarrollan los microorganismos para favorecer su crecimiento y sobrevivencia, esta modificación permite concentrar los nutrientes a partir de fuentes diluidas, proporcionan protección contra los depredadores, enzimas líticas, antibióticos y otros compuestos inhibidores (Costerton *et al.* 1995).

Por otra parte, las bacterias crecen en forma de agregados en la superficie de la hoja para garantizar su sobrevivencia (Lindow y Brandl 2003). La literatura informa que el comportamiento de las bacterias en las plantas varía de una manera dependiente de la densidad. Los resultados iniciales sugieren que tales agregados pueden constituir entre 30 y 80 % de la población bacteriana total en ciertas especies de plantas (O'Brien y Lindow 1989). Por ejemplo, la supervivencia de una cepa de *P. syringae* expuesta a la desecación en condiciones controladas fue fuertemente dependiente de la densidad de la población de la bacteria aplicada. Las células con inóculos de altas concentraciones celulares exhibieron hasta cien veces mejor supervivencia en hojas que las células con inóculos de baja concentración de células (Wilson y Lindow 1994). La implicación de esta modificación es que las interacciones bacterianas en los agregados pueden inducir características cualitativamente diferentes a los expresados en células individuales. Tales rasgos logran ser favorables para el crecimiento y supervivencia, además, podría causar una distribución no uniforme de las bacterias a desarrollar con el tiempo en la superficie de las hojas (Beattie y Lindow 2003).

3.3.4 Localización bacteriana en la filosfera

En términos espaciales, el patrón de colonización sobre las hojas es localizado y heterogéneo, los sitios preferidos son a lo largo de las venas y en las ranuras de las paredes de las células epidérmicas, posiblemente por la concentración de nutrientes, protección a la erosión y retención de agua (Andrews 1992, Leben 1988, Leben *et al.* 1970, Weller *et al.* 1980). La naturaleza de estos sitios ha sido examinada por diversas técnicas microscópicas y se logró determinar que los lugares más comunes de la colonización bacteriana son en la base de los tricomas, estomas y en las uniones de la pared celular epidérmica especialmente en las ranuras a lo largo de las venas (Bettie y Lindow 1999). Las bacterias también se encuentran en las depresiones, debajo de la cutícula y cerca de los hidátodos (Bettie y Lindow 1999).

En general, los números más grandes de bacterias se encuentran en la parte inferior de las hojas superiores (Surico 1993, Weller y Saettler 1980) posiblemente debido a que la superficie inferior posee mayor densidad de estomas o tricomas o una capa más delgada cuticular (Mansvelt y Hattingh 1987, Surico 1993). Sin embargo, las diferencias cuantitativas en las poblaciones bacterianas en una hoja pueden ser significativas. Así por ejemplo Kinkel *et al.* (1995) identificaron que las poblaciones de bacterias totales varían en más de 100 veces entre los pequeños segmentos (9 mm^2) de hojas de papa y que la variación de las bacterias entre los segmentos de la hoja fue mejor descrita por una distribución log-normal. Morris *et al.* (1997) describieron la presencia de grandes agregados de bacterias en una variedad de plantas cultivadas en el campo, los cuales fueron con frecuencia muy localizadas y con pocas bacterias en sus alrededores. La propiedad que presentan las bacterias de crecer en forma de agregados en la superficie de las plantas es una característica que, presumiblemente, tiene importantes implicaciones para las interacciones entre microorganismos en las hojas, así como con la propia planta (Beattie y Lindow 1999).

3.4 Control Biológico

El control biológico es la utilización intencionada de organismos vivos para reducir las actividades y las poblaciones de uno o más patógenos de plantas (Ceballos 2009, Blakeman y Fokkema 1982, Haggag y Mohamed 2007). Sin embargo, para obtener buenos resultados con esta técnica se deben identificar los organismos que tengan potencial para llevar a cabo esta tarea, identificar sus hábitos y el papel que juegan en el ecosistema y en la regulación de organismos patógenos (Arzate *et al.* 2006).

El control biológico es una alternativa complementaria del control integrado de enfermedades, la cual frecuentemente involucra la aplicación del microorganismo antagonista sobre la superficie de la hoja (Blakeman y Fokkema 1982). Sin embargo, el éxito de dicho antagonista depende de su capacidad para establecerse como miembro

de la microbiota epífita, especialmente cuando se requiere disminuir el inóculo del patógeno (Spurr 1981, Blakeman y Fokkema 1982). Algunos autores consideran que el uso de antagonistas microbianos aislados de la microbiota epífita 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 (Blakeman y Fokkema 1982, Andrews 1992).

Dentro de los organismos epífitos que benefician la planta, los que suprimen la colonización o la infección de tejidos por patógenos se conocen como agentes de control biológico (ACBs) (Ceballos 2009). Estos organismos poseen diferentes modos de acción como por ejemplo el parasitismo, la protección cruzada, la activación de la resistencia sistémica inducida en la planta hospedera, la antibiosis y la competencia por nutrientes y espacio (Blakeman y Fokkema 1982, Andrews 1990, Baker y Griffin 1995, Arauz 1998, Haggag y Mohamed 2007).

3.4.1 Antibiosis como control biológico

Uno de los mecanismos más utilizados en la regulación biológica de fitopatógenos es la antibiosis. La antibiosis se define como el fenómeno mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o destruye a un organismo por medio de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, compuestos volátiles y de enzimas líticas, las cuales se van a encargar de disolver o dañar polímeros estructurales de la pared celular de los microorganismos fitopatógenos como lo son la quitina y $\beta(1-3)$ glucano (Fravel 1998, Baker y Griffin 1995, Brodhagen *et al.* 2003).

La utilización de microorganismos productores de quitinasas y/o glucanasas en la regulación de hongos basidiomicetos y ascomicetos ha sido de gran efectividad ya que la pared celular de dichos hongos se encuentra compuesta principalmente por microfibrillas de quitina y glucanos, lo que los hace susceptibles al ataque de estas

enzimas, especialmente a nivel de hifa, tubos germinativos y esporas en su fase epífita de crecimiento (Andrews 1992, Calvo *et al.* 2002, Sahai y Manocha 1993, Alexopoulos *et al.* 1996, Mahadevan y Crawford 1997; Pontón 2008).

El glucano es el principal polisacárido estructural de la pared ya que simboliza el 50-60 % del peso seco de esta estructura (Figura 2). La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90 %), aunque también hay glucanos con enlaces β -1,6, β -1,4, α -1,3 y α -1,4. El β -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se le une covalentemente otros componentes de esta estructura (Pontón 2008). El β -1,3-D-glucano se sintetiza gracias a un complejo enzimático ubicado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetasas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1500 residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada. Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular (Pontón 2008).

Por otra parte, la quitina es un polisacárido versátil unido mediante enlaces β -1,4 y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Este polisacárido se sintetiza a partir de N-acetil glucosamina por la enzima quitin sintasa, que deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplasmática. El contenido en quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo, sin embargo, la literatura reporta que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20 % del peso seco (Figura 2) (Pontón 2008). Las cadenas de quitina de más de seis o siete monómeros son insolubles; las cadenas pueden comprimir muchos miles de monómeros. Las formas rígidas y extendidas de las moléculas son una consecuencia de los enlaces β -1,4 que generan una disposición en zig-zag entre los puentes de oxígeno vecinos (Warren 1996, Satoque 2005).

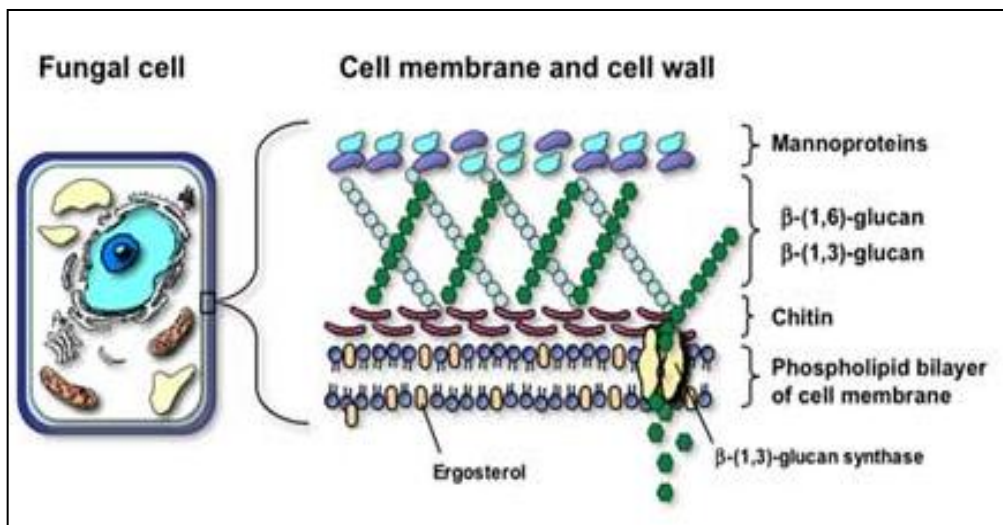


Figura 2. Composición general de la pared celular fúngica. Fuente: <http://conocimientos-micologia.blogspot.com/2010/11/micologia-clinica.html>

La mayoría de las búsquedas de ACBs relacionadas con bacterias se han centrado en la capacidad que éstas tienen para producir enzimas quitinolíticas y glucanolíticas que puedan atacar la pared del hongo (Marín *et al.* 2003, González 1995, Osorio 2004, Patiño 2006). Propiamente, estas enzimas rompen los enlaces glucosídicos de la quitina y el glucano, hidrolizando el respectivo polímero en oligómeros y monómeros. La pared celular es una estructura fundamental para los hongos por lo que su eliminación o su malformación puede generar efectos negativos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, lo que podría causar su muerte por lisis (Sastoque *et al.* 2007, Pontón 2008). Los modos de acción incluyen: limitación de la formación de la pared celular o su degradación, inhibición o interferencia en la síntesis de proteínas y ADN, bloqueo de procesos metabólicos, entre otros (Fravel 1988, Haggag y Mohamed 2007).

Las bacterias quitinolíticas y glucanolíticas poseen la ventaja de que tienen potencial biorregulador contra agentes patógenos; además, están presentes de manera natural en los ecosistemas de las plantas cultivadas lo que garantiza su adaptabilidad a las condiciones que determinan el hábitat en la superficie de la hoja (Ceballos 2009). Este método de combate biológico ha sido aplicado a diferentes organismos patógenos entre los cuales se menciona *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora fragariae* var. rubi,

Phytophthora capsici, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, entre otros (Chernin *et al.* 1995; Valois *et al.* 1996; Ordentlich *et al.* 1998, Singh *et al.* 1999, Zhang y Yuen 2000, Parra y Ramírez 2002; Ji y Wilson 2003, Sid Ahmed *et al.* 2003).

Fridlender *et al.* (1993), identificaron que un aislamiento de *Pseudomonas cepacia* bajo condiciones de invernadero, redujo el ataque de enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* en un 85 %, *Sclerotium rolfsii* en un 48 % y *Pythium ultimum* en un 71 %. La capacidad inhibitoria de la bacteria se debió a la producción de β -(1,3) glucanasas.

Chernin *et al.* (1995) lograron aislar de suelo tres cepas quitinolíticas de *Enterobacter agglomerans* (IC960, IC993 y IC1270) las cuales disminuyeron en 64 a 86 % la incidencia de *Rhizoctonia solani* en algodón bajo condiciones de invernadero; mientras que dos mutantes (IC1270-E1 y IC1270-2h) de una de las cepas (IC1270) que no presentaba capacidad quitinolítica fueron incapaces de proteger a las plantas contra la enfermedad.

Valois *et al.* (1996), trabajaron con 30 actinomicetos que fueron obtenidos de suelo por su habilidad para producir diversos tipos de β -(1, 3) glucanasas. Dichas enzimas, hidrolizaron los glucanos presentes en la pared celular de *Phytophthora* spp. Once de tales cepas, lograron disminuir significativamente el índice de pudrición en la raíz, causado por *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, cuando fueron inoculadas en plantas de frambuesa.

Asimismo, Ordentlich *et al.* (1998) trabajaron con una cepa de *Serratia marcescens* aislada de suelo que bajo condiciones controladas de invernadero resultó ser efectivo contra *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. La actividad antagónica de la cepa se relacionó con la producción y liberación de enzimas quitinolíticas.

Singh *et al.* (1999), demostraron que la combinación de dos cepas bacterianas aisladas de suelo, *Paenibacillus* sp. 300 y *Streptomyces* sp. 385, suprimieron el daño producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* a una planta de pepino cohombro (*Cucumis sativus*). Tal actividad supresora, se cree involucró la acción de enzimas quitinolíticas y glucanolíticas.

Zhang y Yuen (2000), reportaron que *Stenotrophomonas maltophilia* cepa C3 inhibió la germinación de conidias de *Bipolaris sorokiniana*. Se presume que el mecanismo involucrado en la inhibición es la producción y liberación de quitinasas por parte de la bacteria.

3.5 Sigatoka negra

La Sigatoka negra, causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada como el principal problema fitopatológico del cultivo del banano y plátano en América, Asia y África (Rodríguez y Cayón 2008) y su combate representa más del 25 % del costo de producción (Lapeyre *et al.* 2010). Esta enfermedad fue reportada inicialmente en las Islas Fiji en 1963 y la primera aparición, fuera del continente asiático, fue en Honduras en el año 1972 (Lapeyre *et al.* 2010, Stover 1980, Stover y Simmonds 1987, Marín *et al.* 2003), de donde se cree que se diseminó a través de varias regiones de América Latina y el Caribe: Belice en 1975, Guatemala, Costa Rica, El Salvador y Nicaragua en 1977, México y Panamá en 1980, Colombia en 1981, Ecuador en 1986, Venezuela y Cuba en 1991 (Martínez *et al.* 1999; Vidal 1992); Jamaica y Perú en 1994, Republica Dominicana en 1996, Bolivia en 1997 (Tejerina 1998) y Brasil en 1998 (Maciel *et al.* 1998).

M. fijiensis genera un rápido deterioro del área foliar lo que a su vez reduce el área fotosintética de la hoja por lo tanto, la planta llega a la floración con un reducido número de hojas funcionales. Al no producirse suficientes carbohidratos se ve perjudicado el eficiente llenado de los frutos, el número de manos son drásticamente reducidos, se

generan racimos más pequeños de lo normal, dedos pequeños y angulares, y se acelera el proceso de maduración de la fruta, lo que disminuye el valor comercial del fruto y las posibilidades de exportación (Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003). Asimismo, la Sigatoka negra retrasa el crecimiento vegetativo de la planta y sus hijos y el promedio de emergencia de hojas nuevas (Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Guzmán 2006, Romero y Guzmán 2006, Chillet *et al.* 2008, Rodríguez y Cayón 2008). No obstante, la incidencia y severidad de la enfermedad se ven condicionados por las interacciones que existan entre patógeno y los factores climáticos como humedad relativa, temperatura y precipitación y la susceptibilidad del cultivar (Stover 1980, Marín *et al.* 2003).

Este hongo se caracteriza por presentar dos formas reproductivas claramente diferenciadas en su fase sexual y asexual. Esto le proporciona una amplia capacidad de infección y mayor plasticidad genética, gracias a la recombinación (Barrios 2006). La fase asexual, genera conidios que son liberados desde los conidióforos a partir de las primeras lesiones de la enfermedad (pizcas o estrías). La fase sexual produce una gran cantidad de ascosporas desde estructuras llamadas peritecios, los cuales se forman sobre la superficie del estado de lesión más avanzado de la enfermedad (Meredith 1970).

M. fijiensis se caracteriza por la presencia de conidióforos simples que emergen de los estomas en forma de estrías jóvenes en el envés de las hojas. Los conidióforos producen conidios que forman un hilum o cicatriz distintiva que son fácilmente desprendidas por el viento. La principal fuente de inóculo son las ascosporas, que pueden propagarse a través del viento a grandes distancias (Meredith y Lawrence 1969). Los conidios tienen menor impacto, los cuales se forman a partir de los conidióforos, ya sea uno por cada conidióforo o en pequeños grupos compuestos por 4 a 8 conidios. Su longitud puede estar entre las 30 a 132 μm (Stover y Simmonds 1987).

Los peritecios difieren en sus características, pero generalmente son globulares con un diámetro entre 47 y 85 μm , se observan incrustados en el tejido de la hoja y pueden estar presentes en ambas superficies, aunque son más abundantes en el haz que en el envés. Las paredes del peritecio son de color marrón oscuro y están formadas por tres o cuatro capas de células con forma poligonal. Dentro del peritecio se forman numerosas ascas que son bitunicadas y oclavadas. Las ascosporas tienen dimensiones que alcanzan las 12.5 – 16.5 μm x 2.5 – 3.8 μm y son biceldadas con la célula más predominante unida al asca (Mulder y Holliday 1974).

3.5.1 Modo de infección de *M. fijiensis*

La infección de *M. fijiensis* a la planta se realiza casi en forma exclusiva, por medio de la superficie inferior de la hoja y se lleva a cabo vía poro estomático. Esto debido a que la densidad de estomas en las hojas de musáceas es mayor en el envés de la hoja y en el ápice, sitios donde el tubo germinativo del hongo tiene una mayor probabilidad de penetrar (Sandoval y Muller 1999, Cayón *et al.* 1991, Rodríguez y Cayón 2008). El hongo se disemina por medio de esporas (ascosporas y conidios) que son liberados principalmente por la acción de la lluvia y del rocío (Smith *et al.* 1997). Propiamente, el ciclo de vida de *M. fijiensis* (Figura 3), se inicia con la germinación de las esporas, seguida de la penetración. Ambos procesos requieren de la presencia de una película de agua sobre la superficie de la hoja (Sallé *et al.* 1989, Stover 1987).

Las ascosporas y conidios de *M. fijiensis*, después de su deposición sobre las hojas, y bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, germinan en un período aproximado de 6 horas. El tubo germinativo se alarga durante la noche, favorecido por la película de rocío que se forma sobre la hoja, pudiendo penetrar los tejidos del hospedante entre 12-15 horas después de la inoculación (Vásquez *et al.* 1989). La infección, ya sea mediante ascosporas o conidios, produce el mismo efecto de mancha, sin embargo, se ha afirmado que las infecciones que se observan en las puntas de las

hojas son causadas por ascosporas y las de la base a lo largo de la nervadura central son causadas por conidios (Jiménez 2000).

Una vez que el hospedante es penetrado por una hifa de infección se da la formación de una vesícula en la cavidad subestomática. De esta vesícula, una fina hifa se desarrolla directamente a través de una o más capas de mesófilo hacia el interior de los tejidos de la hoja (Sallé *et al.* 1989).

Los estudios citológicos llevados a cabo por Lepoivre *et al.* (2002) demuestran que *M. fijiensis* es un parásito biotrófico en los primeros estadios, el cual coloniza inicialmente los espacios intercelulares sin la formación de haustorios. Posteriormente a la penetración, las hifas crecen entre las células dentro del tejido que se torna necrótico reflejado en el desarrollo de lesiones en las hojas, momento en que el hongo crece saprofiticamente en el tejido muerto; por lo tanto, se le clasifica como un hongo hemibiotrófico es decir que utiliza tanto la forma de nutrición biótrofa como necrótrofa (Beveraggi *et al.* 1995; Rodríguez y Cayón 2008, Lapeyre *et al.* 2010).

Una vez que ocurre la infección, las hifas del patógeno salen por el estoma y desarrollan conidióforos, o bien, crecen sobre la superficie de la hoja para luego penetrar los estomas cercanos. Este movimiento de un estoma a otro parece ser corriente en *Sigatoka* negra, lo que trae como consecuencia el desarrollo y aparición de más lesiones sobre toda la lámina (Strover 1980).

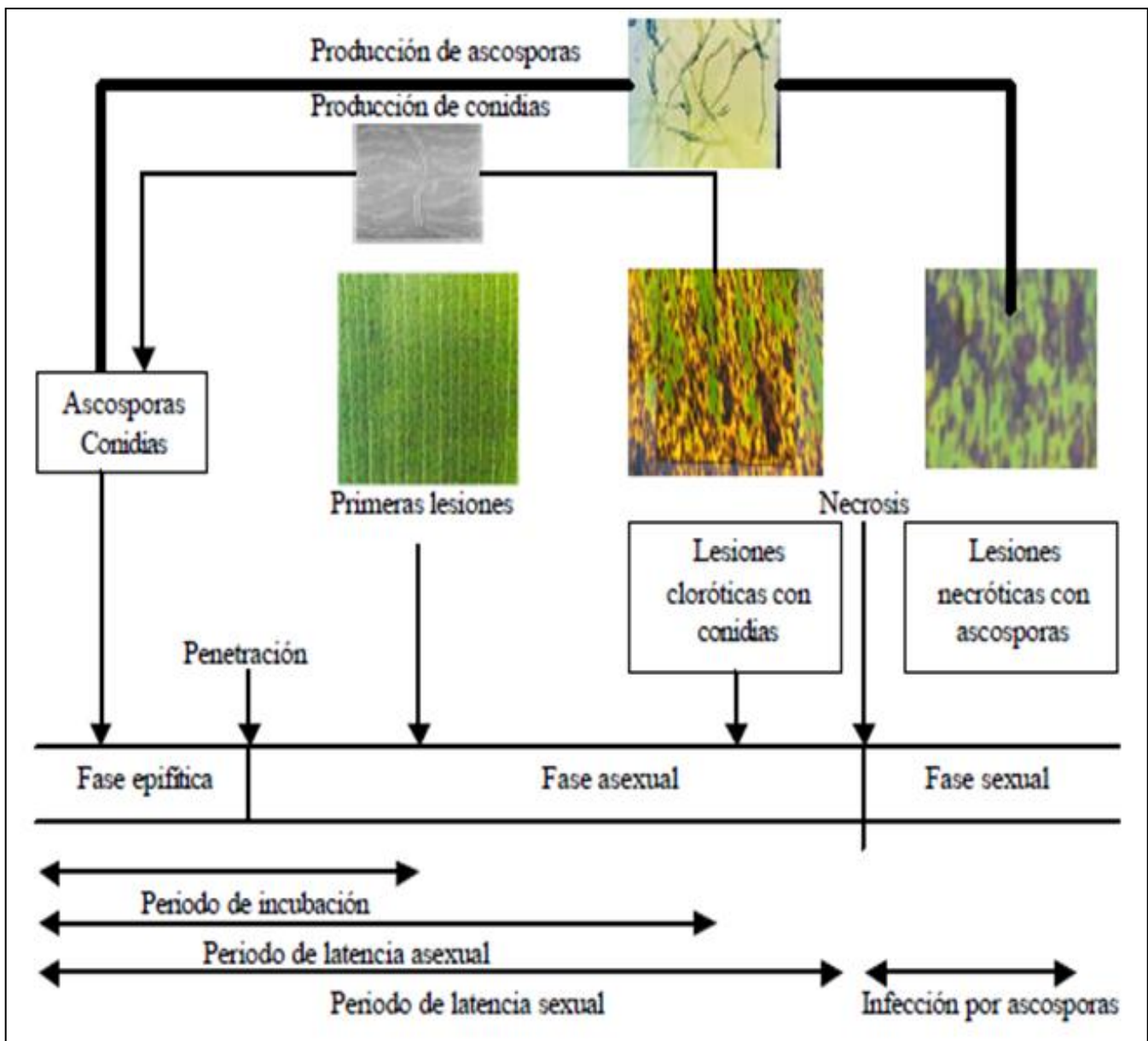


Figura 3. Ciclo de vida de *M. fijiensis*. Fuente: Díaz 2003.

3.5.2 Síntomas de la enfermedad

En 1969, Meredith y Lawrence describieron la secuencia del desarrollo de síntomas de la Sigatoka negra en seis pasos (Meredith y Lawrence 1969, Fouré 1985, Marín *et al.* 2003).

1. *Estado de mancha inicial (pizca)*: En este estado aparecen pequeñas manchas de aproximadamente 0,25 mm de diámetro. Éstas se caracterizan por presentar un color amarillo pálido y son visibles por el envés de la hoja.

2. *Primer estado de estría:* Las manchas iniciales se alargan y se fusionan formando estrías paralelas a la venación secundaria de la hoja y alcanzan una longitud promedio de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, generalmente son de color castaño y son visibles por el haz.
3. *Segundo estado de estría:* Este estado se caracteriza por que las rayas se alargan hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, además, adquieren una coloración café oscuro y son visibles sobre el envés como rayas amarillas.
4. *Primer estado de mancha:* Las estrías se ensanchan y se vuelven más o menos fusiformes o elípticas, además, se tornan de un color marrón oscuro y son rodeadas por un halo claro y acuoso. No se observa hundimiento.
5. *Segundo estado de mancha:* En este estado, los centros de las lesiones adquieren una coloración negruzca y algunas veces aparece un ligero amarillamiento alrededor de estas y en su centro se observa una ligera depresión o hundimiento.
6. *Estado de mancha madura:* El estado 6 se caracteriza por que los centros de las manchas se necrosan, toman una coloración grisácea y aumenta el hundimiento. La mancha se rodea por un halo angosto de color pardo oscuro o negro y forma bien definida. Al incrementarse el número de lesiones, se observa una coalescencia de éstas sobre la lámina foliar que toma una coloración oscura.

3.5.3 Combate biológico de la Sigatoka negra

Las bacterias son los principales grupos de microorganismos que se han evaluado como controladores biológicos de *M. fijiensis* por su capacidad de producir enzimas líticas y de sobrevivir en el filoplano. Entre los géneros más estudiados se encuentran *Pseudomonas* sp. (Jiménez *et al.* 1985), *Serratia* sp. (Rodríguez 1995, González 1995, Miranda 1996, Patiño *et al.* 2006) y *Bacillus* sp. (González 1995, Miranda 1996, Riveros *et al.* 2003, Villalta y Guzmán 2006, Ceballos *et al.* 2012).

Entre los trabajos pioneros para el control biológico de la Sigatoka negra, se encuentra el realizado por Jiménez y colaboradores (1985) quienes aislaron 225 bacterias epífitas de hojas de banano en Costa Rica y encontraron que 12 de estas presentaron actividad antagónica contra *M. fijiensis in vitro* y uno de estas (*Pseudomonas* sp.) fue la que mejor control produjo en invernadero.

González y colaboradores (1996) lograron aislar 120 microorganismos quitinolíticos de la filosfera de plantas de banano alta capacidad para producir halos de hidrólisis en medio agar quitina y agar glucano. Pruebas de antagonismo *in vitro*, mostraron que las cepas pertenecientes a la especie *S. marcescens*, inhibieron la longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* en un 74,2 % y 71,4 %, respectivamente.

Osorio *et al.* (2004), realizaron pruebas de antagonismo sobre ascosporas de *M. fijiensis*, con bacterias quitinolíticas aisladas del filoplano de banano. En un ensayo *in situ*, encontraron que algunos de los aislados inhibieron la germinación de las ascosporas o deformaron sus tubos germinativos, hasta en un 40 y 85 %, respectivamente. Tal efecto fue explicado en parte por la actividad de las enzimas quitinolíticas sobre la pared celular del patógeno (Osorio *et al.* 2004).

Por otra parte, Salazar (2005), realizó una caracterización química de lavados de la filosfera de *Musa* AAA, lo cual permitió determinar las condiciones nutricionales para la

microbiota epífita de este tipo de cultivos. Éste demostró que las bacterias líticas epífitas podían estar presentes en bajas poblaciones en la filosfera de plantas de banano cultivadas y que además, algunas de estas bacterias producían quitinasas y/o glucanasas en un período inferior a las 48 horas de incubación, cuando una fuente de quitina ó β (1,3) glucano estuvo presente en el medio de cultivo. Adicionalmente, en esta investigación se observó que la época lluviosa disminuye la disponibilidad de macronutrientes para la microbiota epífita, principalmente el contenido proteico y nutrimentos como el sodio, el magnesio y el amonio.

Riveros *et al.* (2006) analizaron el efecto de lixiviados de compost y vermicompost en campo, sobre el desarrollo de Sigatoka negra en hojas de plátano. Encontraron que los lixiviados de compost provenientes de broza de café y de estiércol vacuno, mostraron tasas más bajas de crecimiento de la enfermedad que en los testigos: agua más adherente y clorotalonil; según los autores los lixiviados funcionaron principalmente como protectantes.

La información obtenida por Salazar (2005) fue utilizada por Patiño *et al.* (2007) para la formulación de un sustrato foliar que incrementara las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas en el filoplano de las musáceas estudiadas. Los autores reportan que la aplicación en la filosfera de sustratos foliares con base en quitina coloidal, harina de cebada como fuente de glucano, úrea y una solución mineral base incrementaron en más de 10.000 veces las poblaciones nativas de bacterias con actividad lítica sobre *M. fijiensis*. En la experimentación en campo la aplicación de dichos sustratos en rotación con fungicidas convencionales permitió una reducción entre un 43 % y 46 % en el número de ciclos con respecto al control químico estándar (Patiño *et al.* 2007).

Soto (2008) llevó a cabo una investigación donde se evaluaron bioles (biofermentos) inoculados con microorganismos naturalmente antagónicos, para el manejo biológico de *M. fijiensis* y observó un efecto inhibitorio del patógeno. Además, los tratamientos con

biol + aceite mineral tuvieron un mejor control que el testigo comercial. La autora reporta que la incorporación de microorganismos generó un efecto positivo en el combate de la enfermedad.

Villalta y Guzmán (2008) evaluaron la eficacia en campo de tres bacterias (*Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Bacillus subtilis*) y tres fermentos de microorganismos benéficos (EM Plus®, TerraBiosa® y Microorganismos Descomponedores®) para el combate biológico de la Sigatoka negra en banano (*Musa AAA*). Los tratamientos con microorganismos presentaron valores más bajos de severidad que el testigo absoluto, lo que evidencia un efecto de control de la enfermedad.

Ceballos *et al.* (2012) obtuvieron aislamientos de bacterias antagonistas a *M. fijiensis* formadoras de endósporas del filoplano de musáceas, algunos de los cuales (*B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*) produjeron metabolitos que alteraron la estructura de la pared celular del micelio y las ascosporas inhibiendo fuertemente, *in vitro*, el desarrollo del patógeno.

Bacterias quitinolíticas y glucanolíticas con potencial para degradar la pared celular de *M. fijiensis*, han sido evaluadas por su capacidad de control de la Sigatoka negra, observándose reducción significativa en el uso de fungicidas convencionales (Arango 2002, Osorio *et al.* 2004). En resumen, las bacterias han mostrado un alto potencial como antagonista de *M. fijiensis*. Además, algunas de éstas han sido aisladas de la filosfera de plátano y banano, lo que confirma el potencial que pueden tener los microorganismos epífitos para convertirse en agentes de control biológico.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología y en la finca experimental del Centro de Investigaciones Agrícolas La Rita de CORBANA, S.A. en la Rita de Pococí, Limón; a una altura de 135 msnm y con una precipitación anual promedio de 3.800 mm. El período experimental comprendió los meses de julio a diciembre de 2012.

4.2 I Etapa: Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de las bacterias totales y aquellas con potencial como agentes de control biológico (ACB)

4.2.1 Determinación de un medio semiselectivo con bajos requerimientos nutricionales para aislar bacterias totales y aquellas con actividad quitinolítica y gluconolítica.

En esta etapa se realizaron diferentes ensayos preliminares con el propósito de obtener un medio pobre en nutrientes (condición similar al filoplano) para el aislamiento y cuantificación de las bacterias totales y además, un medio rico en quitina y harina de cebada (como fuente de $\beta(1-3)$ glucano) que permitiera el aislamiento y selección de las bacterias con bajos requerimientos nutricionales y con capacidad para degradar la quitina y/o el glucano.

4.2.1.1 Ensayo preliminar #1: Evaluación de la eficacia del medio suplementado con Cloranfenicol (Sigma[®]).

Primeramente se realizó un ensayo para evaluar la eficacia de la quitina coloidal preparada, así como la adición del antibiótico cloranfenicol (Sigma[®]) al medio para la reducir la contaminación. Para esto se trabajó con tres medios de cultivo: 1) Agar Papa Dextrosa (Oxoid[®]) (23,4 g/L) + Cloranfenicol (100 mg/L), 2) Quitina coloidal 1 % + Cloranfenicol (100 mg/L) + Agar Bacteriológico (Oxoid[®], Agar N°1) 2 % y 3) Harina de cebada (Nutresol, S.A.) (2 %) + Cloranfenicol (100 mg/L) + Agar Bacteriológico (Oxoid[®],

Agar N°1) 2 %, esto con el propósito de aislar las bacterias totales, bacterias quitinolíticas y bacterias glucanolíticas, respectivamente. Cada uno de estos medios fue llevado a un pH de 7.

La quitina coloidal fue preparada por modificación del método de Hsu y Lockwood (1975), el cual consistió en disolver 40 g de quitina en polvo (Sigma®) en 400 ml de HCl concentrado en agitación constante durante 50 min. Posteriormente, se añadieron 2 litros de agua destilada fría. La mezcla fue dejada en agitación continua durante 12 horas a temperatura ambiente. Después, se procedió a filtrar la mezcla por gravedad en papel filtro (Grado 292, Sartorius stedim biotech) y posteriormente, con el fin de eliminar el ácido, al producto obtenido se le efectuaron sucesivos lavados con agua destilada mediante centrifugación a 9.000 rpm por 10 minutos hasta obtener un pH de 7. Luego se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso (Castro *et al.* 2011).

Para evaluar los medios se utilizaron las hojas 2, 4 y 6 y de cada una de ellas se tomaron dos muestras de diferente zona, una de la parte exterior de la hoja (borde) y otra de la parte interior de la misma (vena central) (Figura 4). Cada muestra correspondió a 20 discos (10 de cada semilimbo de la hoja) de 10 mm de diámetro, los cuales inmediatamente fueron colocados en tubos de ensayo con 10 ml de buffer fosfato estéril a pH=7 (5,8 g/L de K₂HPO₄ y 3,5 g/L de KH₂PO₄ y Tween® 80 al 0,1 % v/v). Seguidamente, las muestras fueron transportadas al laboratorio y se agitaron por un espacio de 3 minutos con la ayuda de un vortex (Thermolyne®, Maxi Mix II) a máxima velocidad. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁴ y se inocularon por duplicado 200 µl de las dos últimas diluciones en los tres medios anteriormente detallados. Finalmente se procedió a incubar las muestras a 27 °C por 72-96 horas. Para comparar y evaluar el efecto del antibiótico, como control se realizó la misma metodología anteriormente detallada pero sin la adición del cloranfenicol al medio.

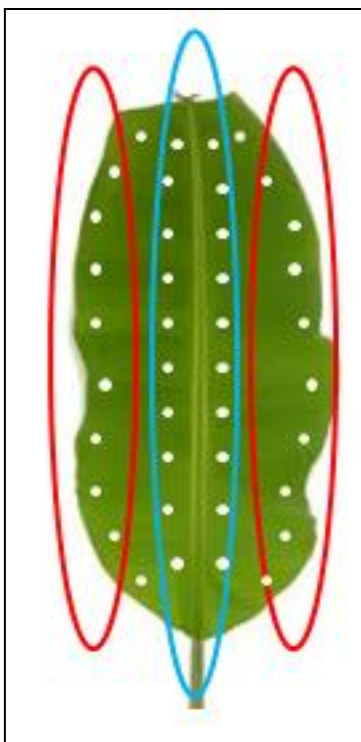


Figura 4. Diagrama de las zonas muestreadas en la hoja. Óvalo rojo representa la muestra externa (borde de la hoja) y el óvalo celeste indica la muestra interna (paralelo a la nervadura central).

4.2.1.2 Ensayo preliminar #2: Adición de nutrientes al medio y utilización de Agar Nutritivo.

Para una mayor facilidad de cuantificar las bacterias totales se procedió a cambiar el medio de cultivo por Agar Nutriente (Oxoid[®]) al 25 % (Cuadro 1). Además, para estimular el crecimiento de las bacterias quitinolíticas y glucanolíticas, se decidió adicionar nutrientes al medio de cultivo utilizado, tal como lo realizó Ceballos (2009). La composición de los medios probados para el aislamiento de las bacterias con potencial antagonista se indica en los cuadros 2 y 3.

Cuadro 1. Composición del medio Agar nutriente (AN) (Oxoid[®]) (25 %)*.

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
Agar Nutriente (Oxoid [®])	7
Agar Bacteriológico (Oxoid [®] , Agar N° 1) (1,5 %)	8

*pH =7.

Cuadro 2. Composición del medio Agar-Quitina (AQ) rico en nutrientes*.

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	1
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0,5
Cloruro de Sodio (NaCl)	1
Quitina coloidal (1,5 %)	15
Agar Bacteriológico (Oxoid, Agar N° 1) (1,5 %)	15

*pH =7.

Cuadro 3. Composición del medio Agar-Harina de cebada (AHC) rico en nutrientes*.

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	1
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0,5
Cloruro de Sodio (NaCl)	1
Harina de cebada (1,5 %)	15
Agar Bacteriológico (Oxoid, Agar N° 1) (1,5 %)	15

*pH =7.

Para la toma de muestra de este ensayo se utilizó la misma metodología descrita en el ensayo preliminar #1; no obstante, se garantizó que la hoja candela (hoja en desarrollo) estuviera grado 6-8, según la escala de Brun (1963), para certificar que la hoja 6 se encontrara fuertemente atacada por *M. fijiensis* y así incrementar la posibilidad de aislar bacterias que estuviesen colonizando las lesiones de la enfermedad. Asimismo, se procedió a inocular 100 µl de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁶, por duplicado, en los tres medios de cultivo especificados en los cuadros 1, 2 y 3. Se seleccionaron estas diluciones para facilitar el conteo de las bacterias debido a la carga microbiana presente. Finalmente, las muestras fueron incubadas a 27° por 72-96 horas.

4.2.1.3 Ensayo preliminar #3: Cantidad y diluciones a inocular

El siguiente ensayo se realizó con el objetivo de determinar el volumen a inocular en los medios de cultivo y la dilución ideal que permitieran una adecuada cuantificación de la población bacteriana epífita. Para la toma de muestra se utilizó la metodología del ensayo preliminar #1; no obstante, se inoculó 50 µl de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , por duplicado, en los tres medios de cultivo utilizados en el ensayo preliminar #2. También se disminuyó la concentración del medio Agar Nutriente al 10 % (Cuadro 4). Los medios AQ y AHC se mantuvieron como se describe en los cuadros 2 y 3.

Cuadro 4. Composición del medio Agar nutriente (Oxoid®) (10 %)*

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
Agar Nutriente (Oxoid®)	2,8
Agar Bacteriológico (Oxoid, Agar N° 1) (1,5 %)	12,2

*pH =7.

Una vez inoculadas las muestras se procedió a incubar las placas Petri a 27 °C por 72-96 horas.

4.2.1.4 Ensayo preliminar #4: Adición de fungicida Tilt® (propiconazol) al medio de cultivo

Para disminuir la presencia y contaminación por hongos en el crecimiento microbiano se adicionó el fungicida Tilt® (propiconazol) (5 mg/L) a los tres medios de cultivo utilizados. Para la toma de muestra se siguió la metodología del ensayo preliminar #1, sin embargo, únicamente se inoculó 50 µl de la dilución 10^{-4} , por duplicado, en los tres medios de cultivo (AQ, AHC y AN) detallados en los cuadros 2, 3 y 4, respectivamente, cada uno suplementado con el fungicida. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 27 °C por 72-96 horas.

4.3 II Etapa: Técnica de muestreo en campo

4.3.1 Colecta de muestras en fincas y aislamiento de los potenciales ACB

Las muestras se obtuvieron de una plantación experimental de aproximadamente 0,5 ha en La Rita, donde se realizan todas las prácticas agronómicas excepto la aplicación de fungicidas. En dicha plantación, se seleccionaron de manera aleatoria diez plantas de banano (*Musa* AAA, CV. Grande Naine) con seis hojas para la recolección de las muestras. El muestreo se realizó en todas las hojas de cada una de las plantas (numeradas de acuerdo a como emergen, teniendo en cuenta que la hoja candela es la 0, la que sigue 1 y así sucesivamente).

Al igual que en la etapa I, de cada una de las hojas se tomaron dos muestras de diferente zona, una de la parte exterior de la hoja (borde) y otra de la parte interior de la misma (vena central) (Figura 4). Cada muestra correspondió a 20 discos (10 de cada limbo de la hoja) de 10 mm de diámetro, los cuales inmediatamente fueron colocados en tubos de ensayo con 10 ml de buffer fosfato estéril a pH= 7 (5,8 g/L de K_2HPO_4 y 3,5 g/L de KH_2PO_4 y Tween[®] 80 al 0,1 % v/v). Finalmente, los tubos fueron transportados al laboratorio en una hielera para mantener la temperatura baja y evitar la desecación y la pérdida de microorganismos.

4.3.2 Aislamiento y cuantificación de bacterias epífitas productoras de quitinasas y glucanasas

Para el aislamiento y cuantificación de las bacterias se siguió el siguiente procedimiento. Cada tubo de ensayo con los discos de hoja se agitó a máxima velocidad en un vórtex (Thermolyne[®], Maxi Mix II) por 3 minutos a temperatura ambiente, esto con el propósito de realizar un lavado de las bacterias epífitas adheridas a las hojas. Para cada una de las muestras se realizan diluciones seriales y se inocularon 50 μ L mediante la técnica de siembra en superficie en los medios de cultivo agar nutriente 10 % (AN) (Cuadro 4), Agar quitina coloidal 1,5 % (AQ) (Cuadro 2) y Agar harina de cebada 1,5 % (AHC) (Cuadro 3) cada uno suplementado con propiconazol (5

mg/L). Debido a la carga microbiana presente en las primeras tres hojas (1, 2 y 3) se inocularon las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} , mientras que para las últimas tres hojas (4, 5 y 6) se inocularon las diluciones 10^{-4} y 10^{-6} .

La evaluación de la capacidad determinada de un aislamiento de producir las enzimas líticas (quitinasas y glucanasas) se realizó visualmente mediante la cuantificación de colonias que formaron un halo de consumo translúcido (halo de degradación) sobre los medios con estas fuentes de carbono (harina de cebada y quitina coloidal). Cada uno de los aislamientos se realizó por duplicado y las mediciones se efectuaron después de 72-96 horas de incubación a 27°C.

4.4 III Etapa: Purificación y conservación de las bacterias quitinolíticas y/o glucanolíticas

4.4.1 Purificación de los aislamientos

Las bacterias glucanolíticas y quitinolíticas aisladas fueron seleccionadas y purificadas en una cámara de flujo laminar (EACI[®], Envirco) mediante cultivos sucesivos en PDA (39 g/L) hasta que se obtuvo colonias aparentemente puras. Posteriormente, las bacterias purificadas fueron inoculadas nuevamente en los medios AQ y AHC por 72 horas a 27 °C para corroborar su capacidad hidrolítica.

4.4.2 Conservación de los aislamientos

Para la conservación de las bacterias que presentaron halo de consumo sobre los medios selectivos (actividad lítica) se seleccionaron dos métodos: en viales con agua destilada y el sistema CRYOBANK. Para el primer método, se utilizaron aislamientos de no más de 48 horas, los cuales se inocularon en viales de vidrio con 10 ml de agua destilada estéril hasta obtener un cultivo turbio y posteriormente, fueron sellados y almacenados a temperatura ambiente. Cada bacteria fue conservada por duplicado.

Para la conservación mediante el sistema CRYOBANK™ se utilizó una muestra concentrada proveniente de una placa que contenía un cultivo fresco (de no más de 18 horas) la cual se disolvió en el medio que contenía el tubo de CRYOBANK™. Posteriormente, se agitó el tubo hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el tubo, esto con el objetivo de que las bacterias se adhirieran a las perlas y posteriormente, con una pipeta estéril, se removió el medio de cultivo del tubo CRYOBANK™. Inmediatamente después el tubo de CRYOBANK™ se almacenó a – 80°C. Cada aislamiento se conservó por duplicado (Anexo 2).

4.5 IV Etapa: Análisis estadístico

Considerando que el número de UFC/cm² tiene una distribución del tipo binomial negativo, para cada variable se aplicó un modelo lineal generalizado, con función de enlace logarítmica y distribución binomial negativa de los residuos. La función lineal fue planta + número de hoja + planta* número de hoja + posición de la muestra + número de hoja* posición de muestra. Los resultados fueron transformados a unidades logarítmicas base e (Logaritmo natural).

4.6 V Etapa: Análisis Molecular

4.6.1 Extracción de ADN

Para esta etapa se siguió la metodología de extracción de ADN PVP-SDS propuesta por Orsini y Romano-Spica (2001). Se tomó una muestra de 100 µl de la suspensión madre obtenida de los 20 discos de hojas de banano en el buffer fosfato y se suspendieron en 1 ml de buffer de extracción (50 mM Tris-HCL, 25mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) PVP, pH 8,0). Las muestras fueron centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto y resuspendidas en 500 µl de buffer lisis (50 mM Tris-HCL, 25mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) PVP, (pH 8,0). Los tubos fueron calentados en un horno de microondas por 1 minuto. Se le adicionaron 500 µl de solución extractora precalentada a 65 °C (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, 300mM de acetato de sodio, 1 % (w/v) de PVP) y

se agitó con vortex a 2.000 rpm. Un volumen igual de Phenol:cloroformo:isoamilaalcohol (25:24:1) fue adicionado y mezclado nuevamente a 2.000 rpm recuperándose el sobrenadante y precipitando el ADN con un volumen igual de isopropanol. El pellet fue lavado con etanol al 70 % y resuspendido en buffer TE (pH 8,0). Finalmente el ADN fue almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

4.6.2 Cuantificación de ADN de bacterias, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y hongos.

La cuantificación de bacterias, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y hongos se realizó utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de polipropileno para uso en un 7500 real time PCR System (Applied Biosystems). Cada reacción de 25 mL contenía: 12,5 mL de PCR Master Mix (AB gene), 1,25 mL de cada primer (10 mM; Invitrogen), 2,5 mL albúmina de suero de bovino (10 mg/mL; Promega), 1,0 mL SybrGreen dye, 1,0 mL ROX dye 0,5 mL H₂O, y 5 mL de ADN (0,5 ng/mL). Las condiciones de PCR fueron 15 minutos a 95 ° C, seguido por 40 ciclos de 95 ° C durante 1 minuto, 30 s a 72 ° C por 1 min; las temperaturas de alineamiento se describen en cuadro 5.

Cuadro 5 . Primers específicos utilizados, temperatura de alineamiento y tamaño del fragmento aproximado para cada grupo filogenético.

Grupo Filogenético	Secuencia del primer (5'-3')	Nombre del primer	Temperatura de alineamiento °C	Tamaño del fragmento aproximado (bp)
Bacterias Totales	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Eub33813	53	200
	ATTACCGCGGCTGCTGG	Eub51818		
	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS1f		
Hongos Totales	CGCTGCGTTCTTCATCG	5.8s	53	300
	TGAGCCTTGTAAGGGTCCAC	StrepF1		
<i>Streptomyces</i> spp.	TTCATCCCGTGCTTCTCCAG	StrepR-2	51	290
	ACGGTCATTGGAACTGGG	BacF-1		
<i>Bacillus</i> spp.	CGTGTTGTAGCCGAGGTCATA	BacR-2	48	230

Los análisis de la curva de fusión de los productos de PCR se realizaron después del ensayo para confirmar que la señal de fluorescencia se originó a partir de productos de PCR específicos y no de dímeros del primer u otro artefacto. Los estándares de plásmidos que contiene la región objetivo (diana) fue generada para cada conjunto de primers utilizando el ADN de referencia para cada grupo filogenético obtenido de la empresa German Culture Collection (DSMZ, Braunschweig, Germany). Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 1,5 % para confirmar la especificidad de la amplificación, y se clonaron utilizando el Kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Los plásmidos se aislaron utilizando el kit Qiaprep plásmido Miniprep (QIAGEN, Valencia, CA) con concentraciones de ADN determinadas por un fluorómetro marca Eppendorf. Las curvas de calibración se generaron por triplicado utilizando ADN del plásmido y diluido 10 veces. Las cantidades de picogramos de cada grupo filogenético se calcularon a partir de las curvas estándar, suponiendo que la masa molecular promedio de una doble hebra de la molécula de ADN es de 660 g/mol.

5 RESULTADOS

5.1 I Etapa: Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de las bacterias totales y aquellas con potencial como agentes de control biológico (ACB)

5.1.1 Determinación de un medio semiselectivo con bajos requerimientos nutricionales para aislar las bacterias totales y aquellas con actividad quitinolítica y glucanolítica.

En los diferentes medios probados en los ensayos preliminares se logró obtener un crecimiento bacteriano. En el ensayo preliminar #1 se observó la formación de halos de hidrólisis, tanto para bacteria glucanolíticas como quitinolíticas, lo que comprobó la eficacia de la quitina coloidal preparada con la metodología propuesta por Hsu y Lockwood (1975) así como la utilización de la harina de cebada como fuente de glucano; sin embargo, se descartó la adición de chloramphenicol ya que este, al ser una antibiótico de amplio espectro, podría estar inhibiendo el crecimiento de muchas bacterias.

La adición de nutrientes al medio de cultivo permitió un crecimiento acelerado y abundante de diversas bacterias tanto totales como glucanolíticas y quitinolíticas. Sin embargo, fue hasta la variación de PDA por AN, la inocularon de 50 μ l de la suspensión bacteriana en los medios de cultivo, la reducción del AN a un 10 % y la adición del propiconazol al medio de cultivo que se logró un adecuado crecimiento bacteriano, en niveles de cantidad y tasa de crecimiento, como para permitir cuantificar las bacterias totales y seleccionar las bacterias con actividad lítica. Con la reducción del AN a un 10 % se limitó los nutrientes presentes en el medio de cultivo y con la incorporación del antibiótico propiconazol se observó una menor contaminación fúngica, lo que facilitó cuantificar las bacterias totales y separar aquellas menos exigentes a condiciones nutricionales y con actividad lítica.

Con base a lo anterior, se estableció que el medio AN compuesto por Agar Nutriente 10 % + Agar 1,5 % + propiconazol 5 mg/L fue el adecuado para permitir el aislamiento y cuantificación de las mismas (Figura 5.A). Por otra parte, para aislar y cuantificar las bacterias glucanólíticas el medio AHC, compuesto por 1 g/L NH_4NO_3 + 1 g/L KH_2PO_4 + 0,5 g/L MgSO_4 + 1 g/L NaCl + harina de cebada 1,5 % + propiconazol 5 mg/L + Agar 1,5 %, fue con el que se obtuvo mejores resultados (Figura 5.B). Finalmente el medio AQ, conformado por 1 g/L KH_2PO_4 + 0,5 g/L MgSO_4 + 1 g/L NaCl + quitina coloidal 1,5 % + 5 mg/L + Agar 1,5 %, fue el que permitió un óptimo crecimiento y conteo de las bacterias quitinolíticas presentes en las hojas muestreadas (Figura 5.C).

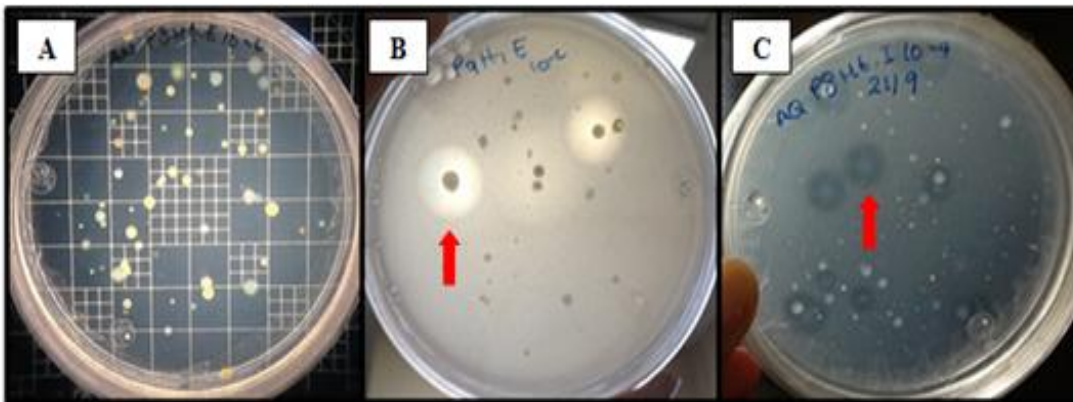


Figura 5. Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo. A) bacterias totales en medio AN, B) bacterias glucanólíticas en medio AHC y C) bacterias quitinolíticas en medio AQ. Nótese en B y C la formación de halos de hidrólisis en algunos aislamientos.

La actividad quitinolítica y glucanólítica se distinguió por la formación de halos de hidrólisis que se observaban en los medios de cultivo, producto del crecimiento de las bacterias con capacidad para degradar los biopolímeros. En los diferentes ensayos preliminares realizados se logró obtener once aislamientos de bacterias, seis con capacidad glucanólítica y cinco con propiedad quitinolítica. En el apéndice 1 se detalla las características morfológicas de cada bacteria con potencial como antagonista contra *M. fijiensis*.

5.2 II Etapa: Técnica de muestreo en campo

5.2.1 Colecta de muestras en fincas y aislamiento de los potenciales ACB

Las plantas utilizadas en esta investigación provenían de una parcela en la cual se realizan todas las prácticas agronómicas excepto la aplicación de fungicidas, por lo que las mismas presentaban una severa infección de *M. fijiensis*. En cada planta muestreada se evidenciaba un aumento progresivo de la severidad del ataque del hongo conforme aumentaba la edad de la hoja (Figura 6).

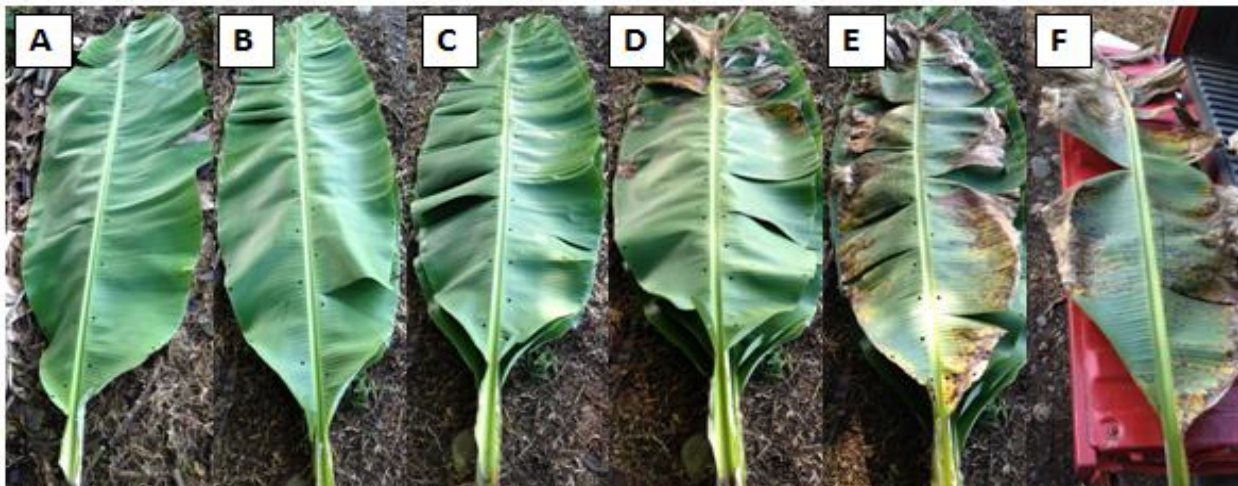


Figura 6. Hojas muestreadas de una planta. A) Hoja 1, B) Hoja 2, C) Hoja 3, D) Hoja 4, E) Hoja 5 y F) Hoja 6. Nótese el aumento progresivo de la severidad de la Sigatoka negra.

La densidad de bacterias, en UFC/cm² fue estimada por conteo directo de colonias en placas (Cuadro 6). De las diez plantas muestreadas se logró aislar y cuantificar las bacterias totales y bacterias candidatas a ACB de *M. fijiensis*. En total se aislaron 182 bacterias candidatas a ACB, de los cuales 70 (38,5 %) mostraron evidencias de actividad glucanолítica, 35 (19,2 %) presentaron evidencias de actividad quitinolítica y 77 (42,3 %) revelaron evidencia de actividad glucanолítica y quitinolítica. En el apéndice 2

se presenta una caracterización morfológica de las bacterias así como su potencial como ACB de *M. fijiensis* (Apéndice 2).

Cuadro 6. Cantidad (UFC/cm²) de bacterias totales, glucanólíticas y quitinolíticas aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa AAA* cv. Grande Naine) de diferente edad.

Hoja ¹	Bacterias Totales		Bacterias Glucanólíticas		Bacterias Quitinolíticas	
	Borde ²	Vena Central ²	Borde ²	Vena Central ²	Borde ²	Vena Central ²
1	4,9 x10 ³	4,8 x10 ⁴	3,9 x10 ³	5,0 x10 ²	1,3 x10 ³	0,0
2	1,3 x10 ⁴	1,4 x10 ⁵	3,0 x10 ⁴	1,7 x10 ³	1,3 x10 ²	635,0
3	2,5 x10 ⁵	2,8 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶	1,7 x10 ³	1,4 x10 ³	127,4
4	9,0 x10 ⁶	1,0 x10 ⁸	5,8 x10 ⁶	6,4 x10 ⁵	7,7 x10 ⁶	3,8 x10 ³
5	6,4 x10 ⁷	1,5 x10 ⁸	4,7 x10 ⁷	2,7 x10 ⁷	5,5 x10 ⁶	1,3 x10 ⁵
6	2,8 x10 ⁸	5,0 x10 ⁸	5,1 x10 ⁷	3,3 x10 ⁷	1,8 x10 ⁷	2,8 x10 ⁶

¹Se refiere a la posición de la hoja en la planta al momento del muestreo.

²Valores son el promedio de 10 hojas provenientes de diferentes plantas.

5.2.2 Aislamiento y cuantificación de bacterias epífitas totales y productoras de quitinasas y glucanasas

5.2.2.1 Aislamiento y cuantificación de bacterias totales

Los tamaños de las poblaciones de bacterias epífitas totales cultivables muestreados en diferentes hojas y zonas de la hoja, presentaron altos niveles de variabilidad. Se cuantificaron tamaños de bacterias totales cultivables $4,9 \times 10^3$ y $5,0 \times 10^8$ UFC/cm² (Cuadro 6).

El número de bacterias totales aumentó ($P < 0,0001$) sostenidamente de la hoja 1 a la 6 (Figura 7). El análisis de regresión mostró una tendencia lineal ($P < 0,0001$), de modo que el aumento promedio fue de 2,38 unidades logarítmicas base “e” ($10,80$ UFC/cm²) por cada aumento de 1 unidad de número de hoja (desde hoja 1 a hoja 6) (Apéndice 4).

En cuanto a la posición en la hoja, se obtuvo ($P < 0,0001$) una mayor concentración de bacterias en el borde de la hoja que en la vena central de la hoja; el borde dio en promedio 2,3 unidades logarítmicas base “e” ($9,97 \text{ UFC/cm}^2$) más que la vena central. Según el cuadro de análisis de varianza (Apéndice 3), las diferencias entre las dos posiciones de hoja evaluadas son semejantes desde la hoja 1 a la 6 (ausencia de interacción Hoja*posición, $P = 0,4499$).

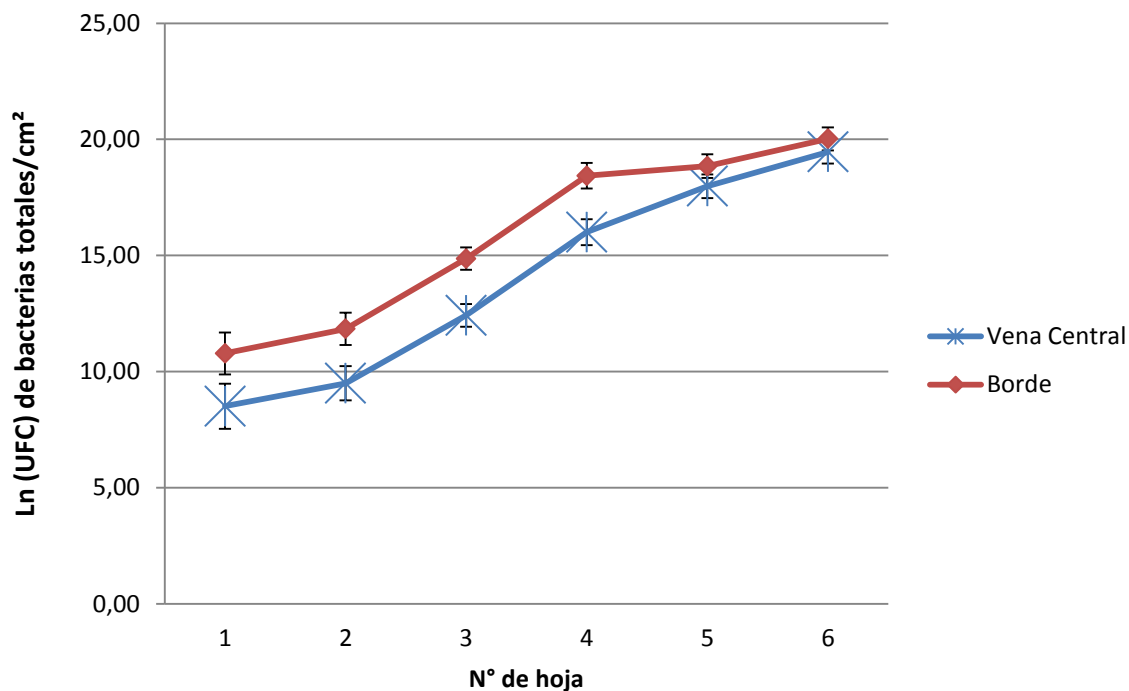


Figura 7. LN (UFC) de bacterias totales cultivables / cm^2 aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa AAA cv. Grande Naine*) de diferente edad.

5.2.2.2 Aislamiento y cuantificación de bacterias glucanólíticas

Los tamaños de las poblaciones de bacterias epífitas glucanólíticas cultivables muestreados en diferentes hojas y zonas de la hoja, presentaron igualmente altos niveles de variabilidad. Se lograron cuantificar tamaños de bacterias glucanólíticas cultivables entre $5,0 \times 10^2$ y $5,1 \times 10^7 \text{ UFC/cm}^2$ de hoja (Cuadro 6).

Igual que las bacterias totales, el número de bacterias glucanolíticas aumentó ($P < 0,0001$) progresivamente de la hoja 1 a la 6 (Figura 8) (Apéndice 3). El análisis de regresión mostró una tendencia lineal ($P < 0,0001$) (Apéndice 4), de modo que el aumento promedio fue de 2,61 unidades logarítmicas base “e” (14 UFC/cm²) por cada aumento de 1 unidad de número de hoja (desde hoja 1 a hoja 6) (Figura 8).

En cuanto a posición en la hoja, el borde dio en promedio 3,51 unidades logarítmicas base “e” (33,45 UFC/cm²) más que la vena central de la hoja ($P < 0,0001$). Según el cuadro de análisis de varianza, existe diferencias en las poblaciones bacterianas entre el borde y la parte interna (paralelo a la vena central) desde la hoja 1 a la 6 (presencia de interacción Hoja*posición, $P = 0,0001$) (Figura 8).

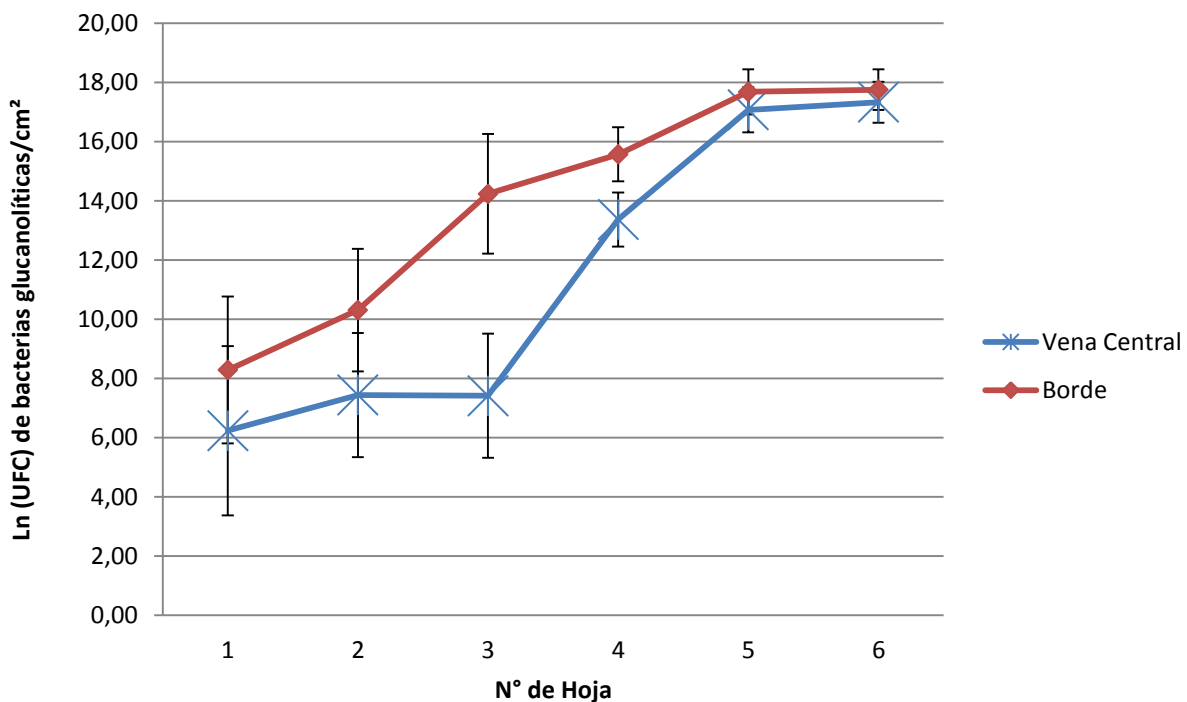


Figura 8. LN (UFC de bacterias glucanolíticas cultivables) / cm² aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

5.2.2.3 Aislamiento y cuantificación de bacterias quitinolíticas

Al igual que en las bacterias totales y glucanolíticas, los tamaños de las poblaciones de bacterias epífitas quitinolíticas cultivables muestreados en diferentes hojas y zonas de la hoja, presentaron altos niveles de variabilidad. Se logró cuantificar tamaños de bacterias quitinolíticas de hasta $2,8 \times 10^6$ UFC/cm² (Cuadro 6). Sin embargo, como se muestra en la figura 9, el número de UFC/cm² no aumentó sostenidamente de la hoja 1 a la 6 ($P= 0,6159$) además; el análisis de regresión no mostró una tendencia lineal ($P= 0,4707$) (Apéndice 4).

En cuanto a la posición en la hoja, según el cuadro de análisis de varianza (Apéndice 3), no existe diferencia entre el borde y el interior de la hoja (paralelo a la vena central) para el aislamiento de bacterias quitinolíticas ($P= 0,9303$). No obstante, se logró determinar presencia de interacción Hoja*posición ($P<0,0001$) por lo que existe diferencia entre exterior e interior con respecto a cada número de hoja (Apéndice 3) (Figura 9).

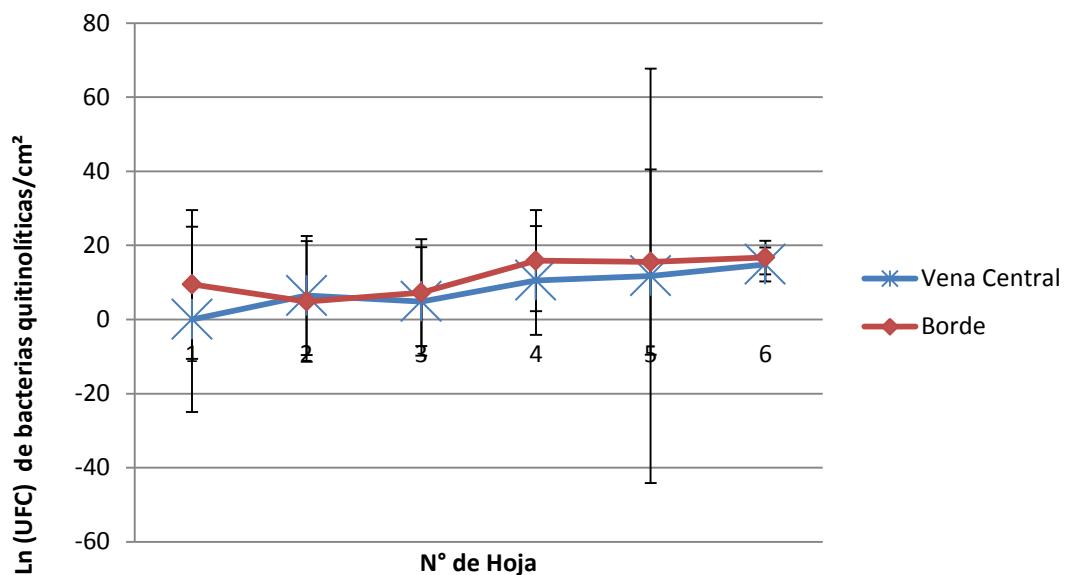
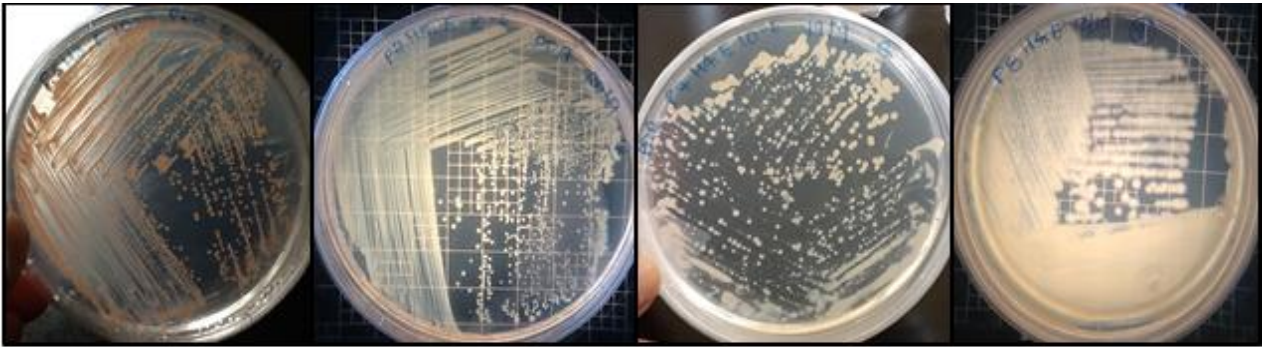


Figura 9. LN (UFC) de bacterias quitinolíticas cultivables / cm² aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

5.3III Etapa: Purificación y conservación de las bacterias quitinolíticas y/o glucanolíticas

Se logró purificar exitosamente los aislamientos obtenidos. En la figura 10 se muestra el crecimiento de algunas de las bacterias después de la primera purificación. Por otra parte, todas las bacterias aisladas se lograron conservar tanto en los viales con agua destilada como en los viales CRYOBANK. La conservación de los aislamientos servirá



como respaldo para futuras investigaciones.

Figura 10. Crecimiento de algunos aislamientos sometidos a la primera fase de purificación.

5.4IV Etapa: Análisis Molecular

5.4.1 Cuantificación de ADN

Mediante el análisis molecular se logró cuantificar el ADN de bacterias, *Bacillus* spp, hongos y *Streptomyces* spp (Cuadro 7). En la cuantificación de bacterias se observó una tendencia donde el ADN bacteriano aumentó de la hoja 1 a la 6 (Figura 11). Los resultados obtenidos revelan que en las primeras tres hojas la cantidad de ADN fue similar tanto en borde como en la vena central de las mismas. En la hoja 4 se dio un incremento considerable en el ADN de la zona exterior de la hoja en comparación con el interior (paralelo a la nervadura central). Finalmente, en las hojas 5 y 6 se dio un aumento en la cantidad de material genético cuantificándose más ADN en el borde que en la vena central.

Cuadro 7 . Cantidad de ADN (pg/ml) bacterias, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y hongos cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

Hoja ¹	ADN							
	Bcaterias		<i>Bacillus</i> spp.		<i>Streptomyces</i> spp.		Hongos	
	Borde ²	Vena Central ²	Borde ²	Vena Central ²	Borde ²	Vena Central ²	Borde ²	Vena Central ²
1	19,3	13,4	0,6	0,6	0,6	1,4	269,7	483,4
2	12,7	16,6	0,6	0,4	1,5	1,3	464,8	406,2
3	19,6	18,3	0,7	0,7	3,8	1,7	1.333,9	642,2
4	2.383,3	14,3	0,8	1,4	4,8	1,9	2.296,6	1.781,2
5	2.724,5	2.307,2	0,6	2,5	5,0	6,2	2.664,9	4.223,7
6	1.038,8	461,8	1,0	0,6	7,6	7,2	1.451,1	3.547,2

¹Se refiere a la posición de la hoja en la planta al momento del muestreo.

²Valores son el promedio de 10 hojas provenientes de diferentes plantas.

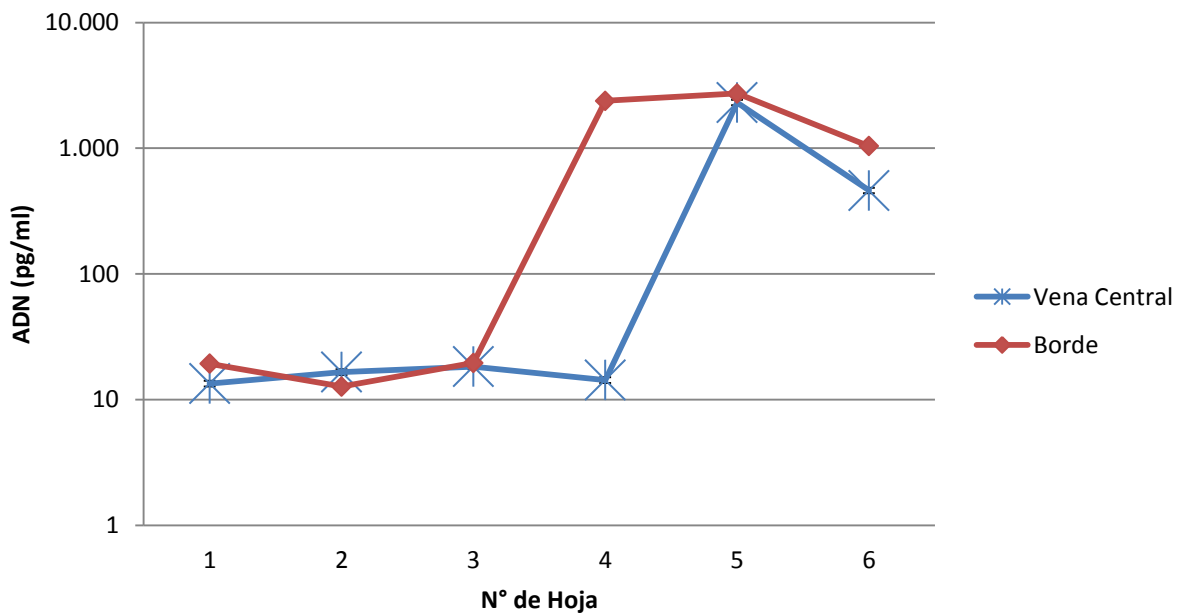


Figura 11. Cantidad de ADN (pg/ml) bacteriano cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

Posteriormente, se logró comprobar la presencia del género *Bacillus* spp. en las muestras para lo cual se obtuvo los resultados indicados en la figura 12. Para este caso, se determinó que existe una mayor concentración de *Bacillus* spp. en la vena central de la hoja 5 en la cual se cuantificó el dato máximo de 2,47 pg de ADN (Figura 12). En la cuantificación de *Bacillus* spp. no se observó una tendencia de aumento sostenido de la hoja 1 a la 6 además, no se obtuvo mayor cantidad de ADN en el borde de la hoja con respecto al interior (paralelo a la vena central) de la misma, ya que los datos fueron muy fluctuantes.

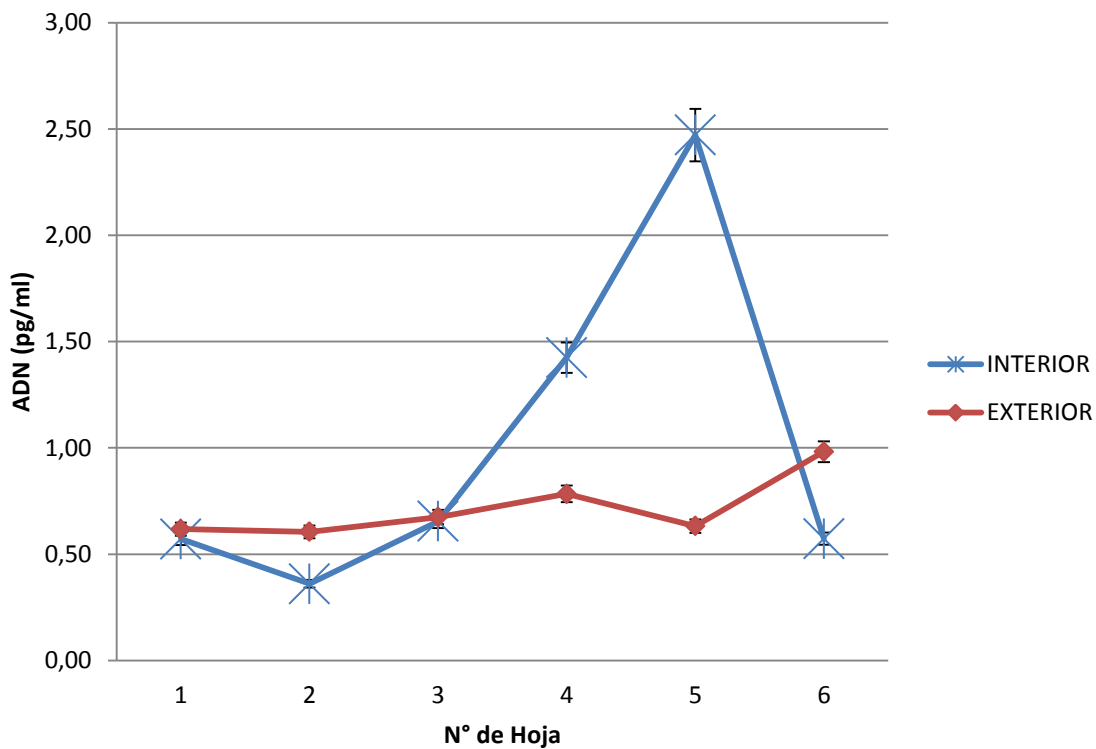


Figura 12. Cantidad de ADN (pg/ml) de *Bacillus* spp. cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

Adicionalmente de la detección molecular de bacterias en el filoplano analizado se logró comprobar la presencia de actinobacterias, específicamente *Streptomyces* spp. y otros géneros como hongos. Para la cuantificación de *Streptomyces* spp. se obtuvo los resultados reflejados en la figura 13. En este caso sí se dio un aumento desde la hoja 1

a la hoja 6. Con respecto a la posición de la hoja, se cuantificó una mayor cantidad en el borde de la lámina foliar en las hojas 2, 3, 4 y 6 mientras que en las hojas 1 y 5 se observó una mayor concentración en la vena central.

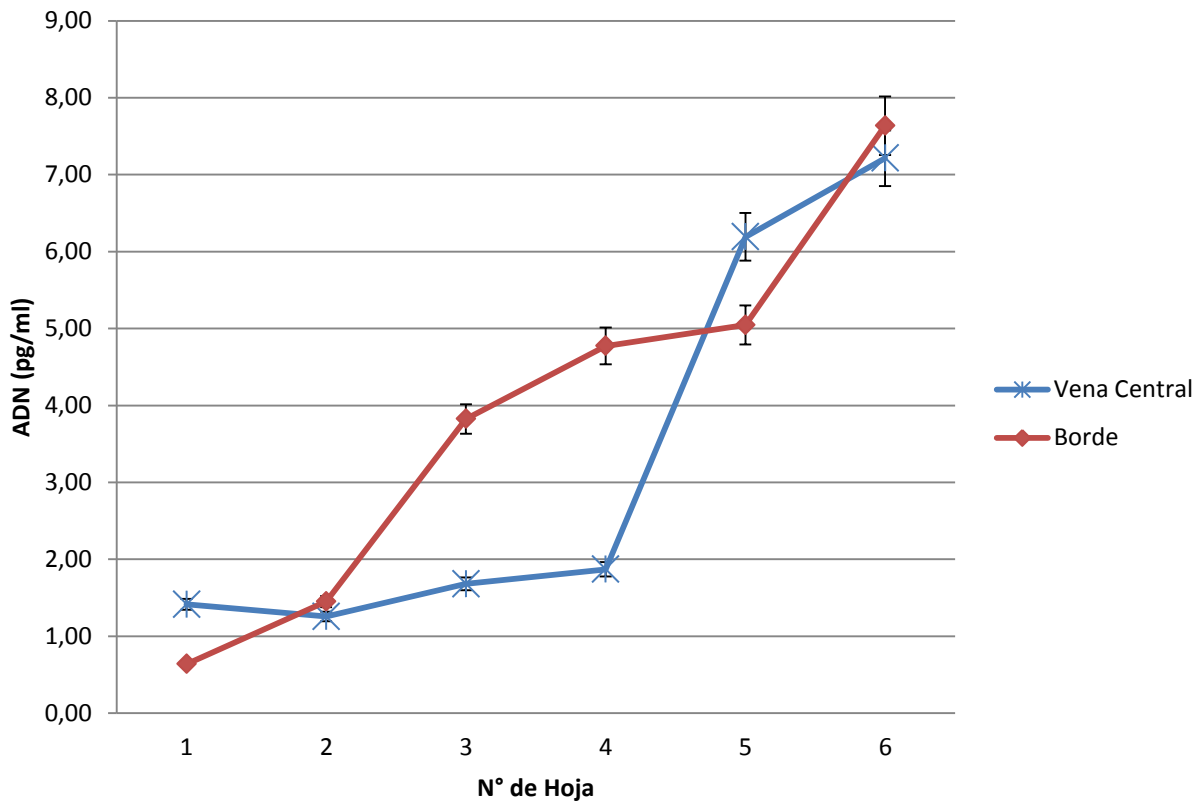


Figura 13. Cantidad de ADN (pg/ml) de *Streptomyces* spp. cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

En la figura 14 se detallan los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN fúngico en las muestras. En este caso, igual que en *Bacillus* spp. se obtuvo una mayor cantidad de hongos en el interior (paralelo a la vena central) de la hoja 5. Sin embargo, se observó un aumento de ADN bacteriano de la hoja 1 a la hoja 5, en la hoja 6 se dio una disminución importante en la cantidad de ADN. Por otra parte, para el caso de hongos, se detectó una mayor cantidad en el borde de la hoja en la número 2, 3 y 4; en las hojas

1, 5 y 6 se manifestó una mayor concentración en la vena central de las láminas foliares.

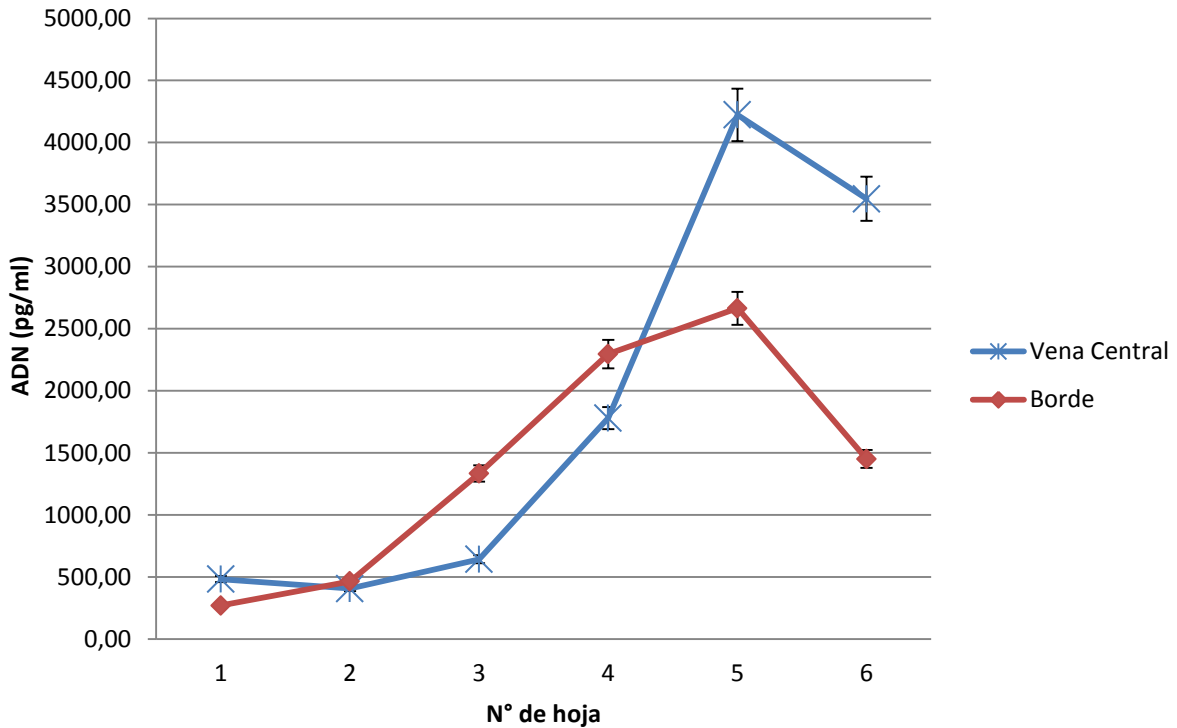


Figura 14. Cantidad de ADN (pg/ml) fúngico cuantificado de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

6 DISCUSIÓN

Mediante los diferentes ensayos preliminares se logró establecer los medios de cultivo semiselectivos para la cuantificación y aislamiento de las bacterias de interés del filoplano de banano. Asimismo, se obtuvo una metodología que permitió el aislamiento y la selección de potenciales ACB directamente de hojas de banano. Para el aislamiento bacteriano se escogió el lavado con buffer ya que la literatura reporta que esta técnica logra remover el 80 % de los posibles colonizadores foliares, incluyendo aquellos que forman biopelículas, que en el caso de las bacterias constituyen cerca de un 10 a 40 % de la población total (Morris1998, Yadav *et al.* 2010).

El medio agar nutriente 10 % (AN) se utilizó para el aislamiento de las bacterias totales cultivables presentes en las muestras analizadas. El agar nutritivo es un medio de cultivo enriquecido sin aditivos preparado para la recuperación y aislamiento de toda clase de microorganismos gram-positivos y gram-negativos, hongos y levaduras que no requieren elementos especiales para su crecimiento, se usa principalmente para el mantenimiento de cepas y realización de subcultivos para confirmar la pureza de los aislamientos (BioBacter 2007). El objetivo de disminuir la concentración al 10 % fue facilitar la cuantificación de las UFC/cm² pues así crecerían más lentamente y se propiciaría la aparición de microorganismos menos exigentes en sus requerimientos nutricionales.

El medio agar harina de cebada 1,5 % (AHC) se utilizó para determinar la capacidad que presentaban las bacterias para producir glucanasas y utilizar la harina de cebada (glucano) como única fuente de carbono. La cebada constituye uno de los cereales con mayor contenido de β -glucanos (entre 2,8-11 %) en términos de porcentaje de peso seco (Michniewicz *et al.* 2003, Johansson 2006) y la harina que de ella se obtiene, contiene casi la misma proporción de β -glucanos que el grano entero (Holmes 1991). Razón por la cual, fue escogida como la fuente primaria de β -(1,3) glucanos. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la harina de cebada no contiene solamente

glucano como única fuente de carbono, por lo que la capacidad de las bacterias para crecer en un medio con harina cebada y formar halos de hidrólisis se puede utilizar como prueba preliminar ya que se pueden generar falsos positivos (Michniewicz *et al.* 2003) Asimismo, el medio agar quitina 1,5 % (AQ) se utilizó para determinar la capacidad que tenían las bacterias para producir quitinasas y emplear la quitina como fuente de carbono bajo condiciones de escasez de nutrientes como suele ocurrir en la filosfera.

Ceballos (2009), con el objetivo de seleccionar bacterias aeróbicas formadoras de endospora aisladas de la filosfera de cultivares de *Musa* spp., con potencial antagónico contra *M. fijiensis*, utilizó los medios AHC y AQ para el aislamiento de bacterias glucanolíticas y quitinolíticas, respectivamente. La autora reporta que logró aislar 646 bacterias aeróbicas formadoras de endospora (BAFEs) de diferentes cultivares de *Musa* spp. y evaluó en condiciones *in vitro* la capacidad antagonista de sus metabolitos contra *M. fijiensis*. El 5 % de la colección de BAFEs, la mayoría del género *Bacillus*, generaron porcentajes de inhibición en el crecimiento del micelio mayores al 85 % durante la prueba inicial de selección de aislados antagonistas.

Sastoque *et al.* (2007) informan que las quitinasas producidas por los microorganismos rompen los enlaces glucosídicos del polímero, para obtener monómeros y así liberar el carbono y el nitrógeno de la molécula, los que utilizan como fuente de energía (Figura 15A). En el caso de las glucanasas, la literatura indica que estas enzimas rompen aleatoriamente los sitios de enlace β de la cadena polisacáridica, liberando pequeños oligosacáridos que utiliza como fuente de energía (Figura 15B) (González *et al.* 2011). La capacidad de las bacterias para producir este tipo de enzimas representa una ventaja en los mecanismos de acción que utilicen los ACBs para atacar el hongo, ya que podrían afectar las paredes celulares del micelio y de las ascosporas por medio de la producción de enzimas líticas.

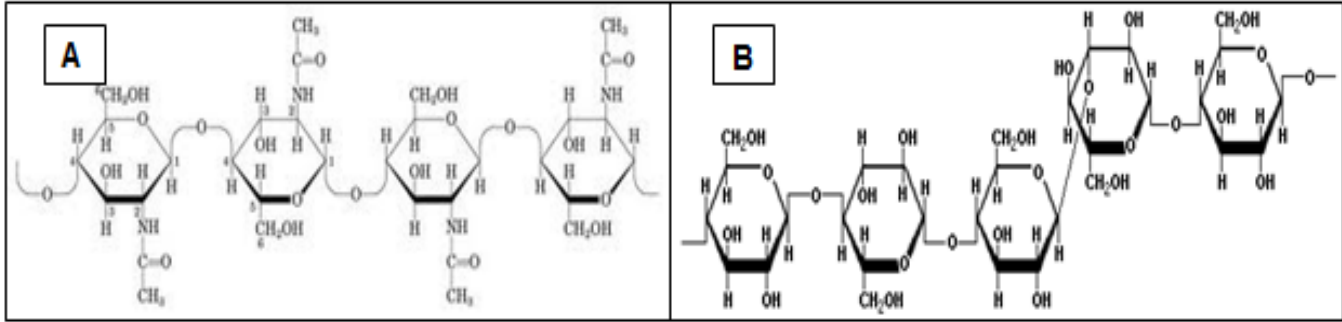


Figura 15. Estructura química de las moléculas de quitina y glucano. A) Molécula de quitina y B) Molécula de glucano. Fuente: <http://bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/15polisacaridos/polisacaridos/homopolisacaridos/quitina/quitina.JPG> y <http://www.scientificpsychic.com/fitness/glucan.gif> respectivamente.

En el presente estudio encontró que la filosfera de *Musa AAA cv. Grande Naine* puede contener tamaños de hasta 10^8 (UFC/cm²) de bacterias totales cultivables que varían dependiendo de varios factores ambientales, microbiológicos y relacionados con la planta, siendo la hoja 1 donde se logró aislar la menor cantidad de bacterias (10^3 UFC/cm²) y la hoja 6 donde se consiguió cuantificar el mayor número de bacterias de hasta 10^8 UFC/cm². Este dato concuerda con lo que encontraron Lindow y Brandl (2003) los cuales indican que en la filosfera, en promedio, se pueden encontrar entre de 10^6 a 10^7 células UFC/cm² de hoja.

En el conteo en placa se obtuvo que las bacterias totales y glucanolíticas aisladas presentaron una tendencia lineal en la cual las UFC/cm² aumentaban sostenidamente de la hoja 1 a la hoja 6. Esta comportamiento se le atribuye posiblemente a factores como la cantidad de nutrientes, la especie de la planta, la edad de la hoja, el estado fisiológico de la planta y hasta a posibles lesiones presentes en las hojas que puedan alterar rápidamente la microbiota allí presente (Yang *et al.* 2000). La literatura reporta que estos factores pueden llegar a definir los recursos endógenos (exudados de la hoja) y el microclima que se desarrolla alrededor de la hoja los cuales determinan directamente el crecimiento microbiano en la filosfera (Kinkel *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos para las bacteria totales y glucanolíticas concuerdan con lo indicado en la literatura, la cual revela que en hojas viejas se reportan mayores poblaciones microbianas que en hojas nuevas debido a las diferencias que existen entre ellas en cuanto a la exudación de nutrientes, las diferencias micro-climatológicas y el tiempo de colonización que lleve la hoja (Tukey 1966, Wilson y Lindow 1994, Weller y Saettler 1980, Lindow y Brandl 2003). Al mismo tiempo, se debe tomar en cuenta que las hojas jóvenes poseen un menor tiempo de exposición y mantienen su cutícula intacta en relación con las viejas, esta característica les permite repeler el agua y prevenir la inmigración de microorganismos a la superficie (Beattie 2002). Además, la distancia que se encuentran las hojas jóvenes del suelo origina un ambiente menos protegido y con menores contenidos de humedad con respecto a las hojas viejas (Kinkel *et al.* 2000).

Es conveniente recalcar que en la parte inferior de la planta se desarrollan distintas condiciones de humedad, temperatura y radiación a las presentes en la zona superior de la misma, lo que afecta directamente la colonización de microorganismos epífitos (Kinkel *et al.* 2000, González 1995). Jacques *et al.* (1994) corrobora esta afirmación al indicar que las condiciones fisiológicas de las hojas, sus condiciones micro-ambientales y la accesibilidad de las bacterias inmigrantes a este ambiente son aspectos importantes que explican variabilidad en los tamaños de las poblaciones totales de bacterias cultivables de la hoja.

Por otra parte, se debe agregar que conforme aumentó la edad de la hoja se incrementó el grado de infección de *M. fijiensis* y que quizás el patógeno secreta metabolitos que directamente afectan la composición de las bacterias y/o que el patógeno fúngico altera las condiciones anatómicas, físicoquímicas y fisiológicas de las hojas lo que podría influir en la colonización y el crecimiento de las bacterias epífitas en las hojas donde se encuentra presente (González 1995, Ceballos 2009). Las diferencias en los tamaños de las poblaciones de bacterias totales cultivables encontradas en esta investigación indican que biológicamente las hojas viejas pueden tener mayor

disponibilidad de recursos y generar un microambiente más apto para albergar mayor cantidad de microorganismos.

En cuanto a la posición de la hoja, las bacterias totales y glucanólíticas presentaron el mismo comportamiento ya que se obtuvo un mayor aislamiento de bacterias en el exterior de la hoja con respecto al interior de la misma. Este hecho probablemente se deba a una diferencia en cuanto a la presencia de estructuras como tricomas, venas, estomas y a la cantidad de nutrientes disponibles para las bacterias en las zonas muestreadas. Además, esto pudo verse influenciado por las precipitaciones a las cuales están expuestas las hojas. Estudios revelan que las pequeñas cantidades de nutrientes presentes en el filopiano pueden ser lavados de las hojas y depositados en el exterior de la lámina. Así por ejemplo Mercier y Lindow (2000) y Tukey (1970) revelaron que azúcares simples tales como glucosa, fructosa y sacarosa, que son las fuentes de carbono dominantes en las plantas, han sido estudiadas y se cree que son lixiviados desde el interior de la planta hacia el exterior de la misma. Por otra parte, Butterworth y McCartney (1991) demostraron que las precipitaciones representan un eficiente mecanismo para remover las bacterias de la superficie foliar. Los autores, determinaron que la proporción de bacterias que se desplaza por causa del golpe de las gotas está relacionado directamente con el número total de bacterias presentes en las hojas. Por lo que es coherente encontrar mayor cantidad de bacterias en el exterior de la hoja que en el interior. Del mismo modo, la variabilidad entre la misma hoja se ha reportado en estudios en los cuales se ha mostrado que las bacterias no se encuentran distribuidas de manera homogénea en la hoja (Leben 1988), debido a que existen sitios de alta colonización como los tricomas, estomas y ranuras a lo largo de las venas (Yadav *et al.* 2005) que favorecen la colonización.

De la misma manera, los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo obtenido por Jacques y colaboradores (1994), quienes evaluaron las diferentes edades y posiciones de las hojas respecto a los microorganismos presentes y concluyeron que estos dos factores influyen tanto en la densidad como en la diversidad de las

poblaciones presentes en el filoplano, ya que las hojas viejas soporta una mayor cantidad de microorganismos que las hojas nuevas, y el número de estos aumenta con la edad de la planta (Jaques *et al.* 1994).

Las bacterias quitinolíticas no presentaron el mismo comportamiento que las bacterias totales y glucanolíticas. En el aislamiento de bacterias con propiedad de degradar quitina no se logró comprobar estadísticamente una tendencia de aumento progresivo desde la hoja 1 a la hoja 6. Además, no se determinó una mayor cantidad de bacterias en el borde de la hoja respecto al interior (paralelo a la vena central) de la misma. Esto podría significar que este grupo de bacterias tienen mayor habilidad para colonizar el filoplano de manera uniforme y que son menos afectadas por las condiciones extremas y de disponibilidad de nutrientes.

De manera general, en el aislamiento de bacterias se observaron colonias con diferentes formas (circulares, puntiformes, irregulares y fusiformes), elevaciones (planas, elevadas, convexas, pulvinadas y umbonadas) y márgenes (enteros, filamentosos y ondulados) (Apéndice 1 y 2, Anexo 1). Igualmente, se detectaron organismos con distintas pigmentaciones (amarillo, rojo, blanco, beige), tal como lo reportado en estudios llevados a cabo en la filosfera (Fokkeman y Schippers 1986, Lindow & Brandl 2003, Sudin y Jacobs 1999). La característica de presentar diferentes colores se le atribuye a estrategias de supervivencia por parte de las bacterias para tolerar los rayos UV provenientes del sol ya que el pigmento actúa como una barrera de protección ante la radiación (Sudin y Jacobs 1999, Sudin 2002).

Las bacterias aisladas como potenciales antagonistas fueron en total 182 (ciento ochenta y dos) (Apéndice 3) entre las cuales 70 bacterias (38,5 %) presentaron capacidad glucanolítica, 35 bacterias (19,2 %) presentaron propiedad quitinolítica y 77 bacterias (42,3 %) mostraron ambas propiedades (glucanolítica y quitinolítica). Esta capacidad lítica puede permitir a las bacterias actuar sobre la quitina y/o β -(1,3) glucanos presentes en la pared celular del hongo, antes de que este penetren en el

estoma, pues se ha observado que transcurren al menos 48 horas entre la llegada del mismo a la hoja y el inicio del proceso de penetración en el estoma (Stover 1980; Sandoval y Muller 1999, Cayón *et al.* 1991, Rodríguez y Cayón 2008). Los resultados obtenidos indican que en la filosfera de las plantas de banano evaluadas se lograron aislar bacterias epífitas que tienen el potencial para producir compuestos con carácter antifúngico con capacidad para inhibir el patógeno en condiciones *in vitro* y se espera que también entre estos existan organismos con capacidad de limitar la enfermedad en campo. Estos resultados concuerdan con diferentes investigaciones que se basan en el uso de antagonistas nativos de la filosfera de musáceas con el objetivo de lograr una biorregulación contra *M. fijiensis* (González *et al.* 1996, Ruíz *et al.* 1997, Arango 2002, Osorio *et al.* 2004, Ceballos 2009, Aristizabal 2011, Ceballos 2012).

Mediante el análisis molecular se comprobó la presencia de bacterias, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y hongos, lo que concuerda con lo establecido por Lindow y Brandl (2003) quienes reportan que en el filoplano se ha detectado la presencia de diferentes géneros de bacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas y con una menor frecuencia protozoos y nemátodos. Los microorganismos identificados molecularmente presentaron el mismo patrón de distribución con respecto a la edad de la hoja que mostraron las bacterias totales en el conteo directo en placa. Éstos (bacterias, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y hongos) mostraron una mayor concentración en las hojas viejas que en las hojas nuevas lo que se ve justificado con lo reportado en la literatura de que las hojas viejas pueden proporcionar una mayor disponibilidad de nutrientes y generar un microambiente más apto para permitir una mayor colonización de microorganismos. (Weller y Saettler 1980, Wilson y Lindow 1994, Tukey 1966, Kinkel *et al.* 2000, Beatie 2002 y Lindow y Brandl 2003). Sin embargo, en cuanto a la posición en la hoja para hongos, *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp. no se mostró el patrón establecido en el conteo directo en placa, ya que no se cuantificó una mayor concentración en el exterior de las hojas que en el interior de las mismas. Esto probablemente se deba a los requerimientos propios de estos géneros o bien que este factor no es determinante para la distribución de los mismos en las hojas. No obstante,

en el análisis molecular de bacterias sí se cuantificó una mayor cantidad de pico gramos de ADN en el exterior de las hojas que en el interior de las mismas, lo que concuerda con lo obtenido en el conteo directo en placa y lo reportado en la literatura detallado con anterioridad.

Molecularmente se comprobó la presencia del género *Bacillus* spp. en todas las hojas y ambas posiciones de la hoja. El género *Bacillus* tiene la ventaja de que las endosporas al ser transportadas por el viento y otros mecanismos de diseminación, logran colonizar diversos lugares, incluso la superficie de las plantas, por lo que es común su presencia en diversos órganos aéreos como el filoplano (Venegas *et al.* 2005). Al ser este género uno de los más estudiados como posible antagonista contra *M. fijiensis* (González 1995, Miranda 1996, Riveros *et al.* 2003, Villalta y Guzmán 2006, Ceballos 2009, Ceballos 2012) el hecho de comprobar su presencia en las muestras hace pensar que probablemente algunas de las bacterias aisladas, como potenciales ACB en esta investigación, pertenecen a este género. Sin embargo, a pesar de que el género *Bacillus* es uno de los más comunes y abundantes en el filoplano (Madigan *et al.* 1998), de la cantidad total de picogramos de ADN bacteriano cuantificado éste representó un bajo porcentaje, por lo que deben estar presentes otros géneros bacterianos que a su vez podrían actuar como posibles ACB contra *M. fijiensis*.

De la misma manera, mediante el análisis molecular se identificó la presencia de *Streptomyces* spp. uno de los principales actinomicetes. La identificación de este género amplía la posibilidad de aislar posibles ACB contra *M. fijiensis* del filoplano de banano ya que las actinobacterias son microorganismos capaces de producir un amplio espectro de antibióticos como metabolitos secundarios y una variedad de enzimas degradadoras de la pared de los hongos tales como celulasas, hemicelulasas, quitinasas, amilasas, y glucanasas (Yuan y Crawford 1995, Sastoque 2005). Así por ejemplo, se ha comprobado que *S. lividans*, *S. plicatus* y *S. olivaceoviridis* producen múltiples quitinasas (Warren 1996). Específicamente, Lahdemperä (1987) demostró la variada actividad antagónica de diversas especies y aislamientos de *Streptomyces* en el control de

Fusarium oxysporium f. sp. *dianthi*, por su capacidad de producir antibióticos y un largo espectro de sustancias fungistáticas. La especie antagonista más efectiva, de acuerdo a esta investigación, fue el aislamiento de *Streptomyces griseoviridis*, la cual actualmente se comercializa con el nombre de Mycostop®. De la misma manera, Yuan y Crawford (1995) determinaron la actividad *in vitro* de *Streptomyces lydicus* WYEC108 sobre diferentes fitopatógenos tales como *Phythium ultimum*, *Aphanomyces aueiches*, *F. oxysporium*, *F. solani* f. sp. *lisi*, *Rhizoctonia solani* y *Phythium ultimum*.

Molecularmente también se logró identificar hongos en las muestras. De los géneros filogenéticos detectados, los hongos fueron los que se cuantificaron en mayor concentración (picogramos de ADN/ml), lo que indica que probablemente sean uno de los principales colonizadores epífitos del filoplano (Lindow y Brandl 2003). Los hongos pueden actuar como posibles ACB ya que son uno de los grupos de microorganismos con la capacidad de producir sustancias antibióticas. Estos metabolitos secundarios pueden generar diferentes efectos sobre el patógeno como los son cambios en la morfología de los organismos, en los mecanismos fisiológicos o en la completa destrucción del organismo (Reilly *et al.* 1945, Calvo *et al.* 2002) lo que, al igual que la detección de *Streptomyces* spp. amplía la posibilidad de aislar ACB contra *M. fijiensis*. Diferentes hongos han sido evaluados para el combate biológico de Sigatoka negra como por ejemplo, Arzate *et al.* (2006) evaluaron el efecto antagónico *in vitro* y en invernadero de cepas de *Trichoderma* sp. sobre *M. fijiensis*, quienes detectaron que el fitopatógeno detuvo su crecimiento al contacto con las cepas de *Trichoderma* sp. que creció sobre el patógeno cubriendo el 100 % del medio de cultivo. En condiciones de invernadero algunas cepas de *Trichoderma* fueron superiores y ejercieron un mejor control de la enfermedad. Por otra parte, Villalta y Guzmán (2008) encontraron que, en condiciones de campo, la mezcla y alternancia de *Trichoderma* sp. con microorganismos eficientes (ME) no mejoró el control de la enfermedad, sin embargo, observaron que la alternancia de mancozeb con los ME resultó efectiva y se aproximó al control logrado con aplicaciones consecutivas de estos. Asimismo, Carr (2009) logró aislar del filoplano de banano un total de 196 hongos candidatos a agentes de combate

biológico los cuales posteriormente fueron evaluados contra *M. fijiensis*; en invernadero, 7 de estos hongos mostraron un efecto inhibitorio sobre el patógeno: SC-19 (*Paecilomyces lilacinus*), VE-05 (*Penicillium* sp.), SCQ-07 (*Fusarium* sp.), SC-03 (no identificado), VMQ-02 (*Fusarium* sp.), LR-12 (*Penicillium* sp.) y T-06 (probable *Chalara* sp.), los resultados obtenidos demuestra que en las plantaciones de banano existen hongos con alto potencial como agentes de combate biológico de la Sigatoka negra.

Por lo tanto, con lo obtenido en la presente investigación se comprobó que en el filoplano de banano (*Musa* AAA. cv. Grande Naine) existen bacterias con potencial antagónico contra *M.fijiensis* que pueden ser utilizados como agentes de control biológico de la Sigatoka negra. Sin embargo, para corroborar el potencial de cada una de estas bacterias es fundamental complementar esta investigación con pruebas de antagonismo *in vitro*, de invernadero y campo así como realizar la identificación de los aislados.

7 CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en la investigación se concluye lo siguiente:

1. Mediante la metodología utilizada se logró cuantificar las bacterias epífitas cultivables totales, quitinolíticas y glucanolíticas presentes en el filoplano de banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) donde se obtuvieron valores de hasta 10^8 UFC/cm². Sin embargo, la densidad bacteriana en la filosfera depende de factores ambientales, microbiológicos y relacionados con la planta.
2. Las bacterias glucanolíticas aisladas presentaron una tendencia lineal en la cual las UFC/cm² aumentaban sostenidamente de la hoja 1 a la hoja 6. Este comportamiento se le atribuye posiblemente a factores nutricionales, la especie, edad y fisiología de la planta así como al microclima que se desarrollo en su entorno y posibles lesiones presentes en las hojas. Por otra parte, las bacterias quitinolíticas cultivables no mostraron un aumento progresivo según la edad de la hoja lo que, probablemente, se deba a que este grupo de bacterias tienen mayor habilidad para colonizar el filoplano de manera uniforme y se ven menos afectadas por las fluctuaciones físicas, químicas y biológicas a las que se enfrentan constantemente.
3. Con base a lo observado, se comprobó que la posición de la hoja afecta la densidad de las poblaciones bacterianas totales y glucanolíticas cultivables presentes en el filoplano pero no la distribución de las bacterias quitinolíticas. En el borde de la lámina se alcanzó aislar una mayor cantidad de microorganismos totales y glucanolíticos que en la vena central, lo que posiblemente se deba a la concentración de nutrientes que se ven frecuentemente lixiviados al exterior de la hoja por efecto de las precipitaciones.

4. Se logró aislar bacterias con capacidad de producir enzimas quitinolíticas y glucanolíticas, lo que le brinda la posibilidad de actuar como ACB contra la *M. fijiensis*. Estas bacterias podrían afectar las paredes celulares del micelio y de las ascosporas por medio de la producción de enzimas líticas antes de que este penetre a la hoja mediante los estomas.

5. Mediante técnicas moleculares se alcanzó detectar que en el filoplano de banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) estudiando existe una mayor proporción de hongos, seguido por bacterias dentro de las cuales se encuentran *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp. De la misma manera, se comprobó que estos microorganismos presentan una mayor concentración en las hojas viejas que en las hojas nuevas. En cuanto a la posición de la hoja, las bacterias presentaron una mayor concentración en el exterior de la lámina; sin embargo, los hongos, *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp. no presentaron un patrón con respecto a la posición de la hoja.

8 RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas *in vitro* a las bacterias aisladas para evaluar su posible capacidad antagonista contra *M. fijiensis*; y aquellas que muestren buenos resultados, evaluarlas en campo para probar su potencial expuestas a condiciones reales.
2. Identificar mediante métodos moleculares los aislados que presenten mejores resultados a la hora de realizar las pruebas de antagonismo.
3. Ampliar la zona de muestreo a más fincas con diferentes manejos y cultivares para aumentar las posibilidades de aislar y seleccionar microorganismos antagonistas altamente eficaces.

9 BIBLIOGRAFÍA

- ALEXOPOULOS C.; MIMS C.; BLACKWELL M.** 1996. Characteristics of fungi. En: Introductory micology (4th edition). USA: John Wiley & Sons. p. 26-56.
- ANDREWS J.**1990. Biological control in the phyllosphere: Realistic goal of false hope? Canadian J. Plant Pathology. 12: 300-307.
- ARANGO M.** 2002. Manejo de sustratos para el control biológico de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo del banano (Musa AAA). (Cit. en: Salazar, L. "Estudio de la filósfera de musáceas alimenticias en el Urabá antioqueño". Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, 2005).
- ARAUZ L.** 1998. Fitopatología un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp 381-389.
- ARISTIZABAL M.** 2011. Dinámica poblacional de bacterias de la filósfera de banano (*Musa sp.*) por acción de sustratos foliares relacionado al control de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín, Colombia.
- ARZATE J.; MICHEL A.; DOMÍNGUEZ V.; SANTOS O.** 2006. Antagonismo de *Trichodrema* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del Plátano (*Musa sp.*) in vitro e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología. 24(2): 98-104p.
- BAILEY M.; LILLEY A.; TIMMS T.** 2006. Microbial ecology of aerial plant surfaces. Oxford: CABI Publishing Series.
- BAIS P.; FALL R.; VIVANCO J.** 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis Root by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. 134: 307-319.
- BAKER R.; GRIFFIN G.** 1995. Novel approaches to integrated pest management. Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Plant Pathogens. Reuveno, R. (ed). CRC Press. 153-182p.
- BARRIOS M.** 2006. Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano. Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 68p.

- BEATTIE G.; LINDOW S.** 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 33: 145-172.
- BEATIE G.** 2002. Leaf surface waxes and the processes of leaf colonization by microorganisms. *Phyllosphere microbiology* 3-26p.
- BELALCÁZAR S.** 1991. Manejo Integrado de Plagas. En: *El Cultivo del plátano en el trópico*. Inibap, ICA, CIID, Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. 376 p.
- BELÁLCAZAR S.** 1998. El cultivo del plátano en el trópico. Manual de asistencia técnica No. 50. Quindío, Colombia. 290 p.
- BEVERAGGI, A; MOURICHON, X; SALLE, G.** 1995. Etude comparee des premieres etapes de l'infection chez les bananiers sensibles et resistants infectes par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*), agent responsable de la maladie des raies noires. *Canadian Journal of Botany* 73: 1328-1337.
- BIOBACTER.** 2007. Medio de cultivo Nutritivo. Agar Nutritivo - Cat.01016-1. (en línea) Consultado el 19 de noviembre 2012. Disponible en: <http://www.biobacter.com/INSERTOS/AGAR%20NUTRITIVO%20%20pg%201.pdf>.
- BLAKEMAN J.; FOKKEMA N.** 1982. Potencial for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review Phytopathology*. 20: 167-192.
- BRANDL M.; LINDOW S.** 1998. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3256-3263.
- BRODHAGEN M.; HENKELS M.; LOPER J.** 2003. Positive autoregulation and signaling properties of Pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and environmental microbiology*. 70(3):1758-1766.
- BUNSTER L.; FOKKEMA J.; SCHIPPERS B.** 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaves wettability. (Cit. en: Whipps, J. M., P. Hand, D. Pink, and G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." *Journal of Applied Microbiology*, 2007: 1744-1755).
- BUTTERWORTH J.; MCCARTNEY H.** 1991. The dispersal of bacteria from leaf surfaces by water splash. *Journal of Applied Microbiology*. 71(6):484-496.
- CALVO A.; WILSON R.; WOO J.; KELLER N.** 2002. Relationship between Secondary metabolites and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3):447-459.

- CARR C.** 2009. Aislamiento y selección de hongos antagonistas en plantaciones de banano (*Musa AAA*) para el combate biológico de la Sigatoka negra. Lic. San Carlos, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 106p.
- CASTRO R.; ÁLVAREZ A.; MACHADO E.; MENDOZA M.; GÓMEZ R.; GARCÍA P.** 2011. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. biomi-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Rev Soc Quím Perú.* 77 (2).
- CAYÓN G.; LOZADA J.; BELALCÁZAR S.** 1991. Estudios comparativos sobre la actividad fotosintética de clones de plátano (*Musa AAB Simmonds*). *Infomusa* 10(1):12-15.
- CEBALLOS I.** 2009. Selección de bacterias aeróbicas formadoras de endospora aisladas de la filosfera de cultivares de musa en el Urabá Antioqueño, con potencial antagónico contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Trabajo de grado presentado para optar por el título de M.Sc. en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad De Ciencias. Instituto De Biotecnología. Bogotá, Colombia.
- CEBALLOS I.; MOSQUERA S.; ÁNGULO M.; MIRA J.; ARGEL L.; URIBEVELEZ D.; ROMERO-TABAREZ M.; ORDUZ-PERALTA S.; VILLEGAS V.** 2012. Cultivable bacteria population associated with leaves of banana and plantain and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Environmental Microbiology.* 64:641–653.
- CHERNIN L.; ISMAILOV Z.; HARAN S.; CHET I.** 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. En: *Applied and Environmental Microbiology* 61(5):1720-1726.
- CHILLET M.; ABADIE C.; HUBERT O.; CHILIN-CHARLES Y.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE L.** 2008. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Protection.* Doi:10.1016/j.cropro.2008.08.008.
- COSTERTON J.; LEWANDOWSKI Z.; CALDWELL D.; KORBER D.; LAPPIN M.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
- DÍAZ A.** 2003. Desarrollo y evaluación de métodos para tamizado temprano de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en Cultivares de Plátano. Mag. Sc Tesis. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 66p.
- FOKKEMAN N.; SCHIPPERS B.** 1986. Phyllosphere vs rhizosphere as environments for saprophytic colonization. (Cit. en: Lindow, S., and M. Brandl. "Microbiology of the Phyllosphere." *Applied and Environmental Microbiology* 69, no. 4 (2003): 1875-1883).

- FOURÉ E.** 1985. Black leaf streak Disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), Study of the symptoms and stages of the disease in Gabón. IRFE, París.
- FRAVEL D.**1988. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. Annual Review of Phytopathology. 26: 75-91.
- FRIDLENDER M.; INBAR J.; CHET I.** 1999. Biological control of soil-borne pathogens by a β - 1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. Soil Biology and Biochemistry 25, 1211-1221.
- FRISON E.; SHARROCK S.** 1999. The economic, social and nutritional importance of banana in the world. Banana and Food Security. Montpellier: INIBAP, 21-35p.
- FRY S.** 1989. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: A possible relationship. Physiol. Plant. 75:532-536.
- GNANAMANICKAM S.; IMMANUEL J.** 2007. Epiphytic Bacteria, Their ecology and functions. In Plant Associated Bacteria, by Samuel Gnanamanickam. Ed. Springer.
- GOLDBERG R.** 1975. Cell wall polysaccharidase activities and growth processes: A possible relationship. Physiol. Plant. 50:261-264.
- GONZÁLEZ R.** 1995. Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Mag. Sci. Thesis, CATIE; Turrialba, Costa Rica.
- GONZÁLEZ R.; BUSTAMANTE E.; SHANNON P.; OKUMOTO S; LEANDRO G.** 1996. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo Integrado de Plagas 40: 6-11.
- GONZÁLEZ I.; INFANTE D.; PETEIRA B.; MARTÍNEZ B.; ARIAS Y.; GONZÁLEZ N.; MIRANDA I.** 2011. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma spp.* promisorios como agentes de control biológico. ii. expresión de actividad glucanasa. Rev. Protección Veg. 26(1) 23-29.
- GUZMÁN M.** 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. P. 83-91. En: XVII Reunión Internacional ACORBAT (2006, Joinville, Brasil). Memorias. Joinville: Acorbat/Acafruta. Vol. 1.
- HAGGAG W.; MOHAMED H..** 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. World Journal of Agricultural Sciences 3(6):771- 776.

- HOLMES M.** 1991. Opportunities for research in coarse grains (barley and oats) in the Riverina. Riverina Outlook Conference, Food Processing Workshop. Wagga, farrer centre and the regional institute Ltd. (en línea) Consultado el 26 de diciembre 2012. Disponible en: <http://www.regional.org.au/au/roc/1991food/p-04.htm>.
- HSU S.; LOCKWOOD J.** 1975. Powdered chitin agar as a seletive medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *American Society for Microbiology* 29:422-426.
- HUTCHISON M.; JOHNSTONE K.** 1993. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42:373–384.
- JAQUES M.; KINKEL L.; MORIS C.** 1994. Population sizes, inmigration and the growth of epiphytic bacterial on leaves of different ages position of field-growth endive (*Cichorium endivia* var. *Latifolia*). *Applied and Enviromental Microbiology.* 61 (3): 899-906.
- JAQUES P.; HBID C.; DESTAIN J.; RAZAFINDRALAMBO.; PAQUOT M.; DE PAUW E.; THONART P.** 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett- Burman Desing. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77-79: 223-233.
- JI P.; WILSON M.** 2003. Enhancement of population size of a biological control agent and efficacy in control of bacteria speck of tomato through salicylate and ammonium sulfate amendmets. En: *Applied and Environmental Microbiology.* 69(2):1290-1294.
- JIMÉNEZ J.; GALINDO J.; RAMÍREZ C.** 1985. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *Diformis* mediante bacterias epífitas. Páginas 105-109 in: Proc. ACORBAT meeting, 7th. J. J. Galindo and R. Jaramillo, eds. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- JIMÉNEZ, I.** 2000. Sigatoka negra (*Mycospaherella fijiensis*). Primera edición. Editado por Compañía de Aerofumigaciones Calima. Medellín.
- JOHANSSON L.** 2006. Structural analyses of (1→3),(1→4)-β-D-glucan of oats and barley (dissertation). EKT series 1354. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. 85 p.
- KINKEL L.; WILSON M.; LINDOW S.** 1995. Effects of scale on estimates of epiphytic bacterial populations. *Microbiol. Ecol.* 29:283-297.

- LAHDENPERÄ M.** 1987. The control of Fusarium wilt on carnation with Streptomyces preparation. Acta Horticulturae. 216: 85-91.
- LAPEYRE L.; FOURÉ E.; ABADIE C.; CARLIER J.** 2010. BlackLeaf Sreak Disease is challenging the banana industry. Fruits 65: 327-342.
- LAST F.** 1955. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. (Cit. en: Riederer M. and Muller C. "Biology of the plant cuticle". Annual Plant Reviews. Blackwell Publishing, 2006. - Vol. 23.).
- LAVILLE E.** 1964. Études de la mycoflore des racines du bananier "poyo". Fruits19(8): 435-449.
- LEBEN C.; SCHROTH M.; HILDEBRAND D.** 1970. Colonization and movement of Pseudomonas syringae on healthy bean seedlings. Phytopathology 60:677-680.
- LEBEN C.** 1981. How plant-pathogenic bacteria survive. Plant Dis. 65: 633-637.
- LEBEN C.** 1988. Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. Phytopathology 78:179-185.
- LECLÉRE V.; MARTI R.; BÉCHET M.** 2006. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. Arch Microbiology 186: 475-483.
- LEPOIVRE P.; BUSOGORO J.; ETAME J.; EL-HADRAMI A.; CARLIER J.; HARELIMANA G.; MOURICHON X.; PANIS B.; RIVEROS A.; SALLÉ G.; STROSSE H.; SWENNEN R.** 2002. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions.pp. 151-159. En: Proceeding of the 2nd International workshop on M. fijiensis leaf spot diseases. San José (Costa Rica).
- LINDOW S.; ANDERSEN G.** 1996. Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. Applied and Environmental Microbiology. 62(8): 2978-2987.
- LINDOW S.; BRANDL M.** 2003. Microbiology of the Phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology 69(4) 1875-1883p.
- MACIEL C.; PIRES A.; OLIVEIRA S.** 1998. La Sigatoka negra en Brasil. Confirmada la amenaza. Infomusa (Montpellier). 7(1):130-131.
- MAHADEVAN B.; CRAWFORD D.** 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent Streptomyces lydicus WYEC108. En: Enzyme and Microbial Technology. 20:489-493.

- MADIGAN M.; MARTINKOJ.; PARKER J.** 1998. *Biología de los Microorganismos* 8va ed Prentice Hall, New Jersey, USA. 986 p.
- MANZO G.** 2001. Diversidad genética de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plátano enano gigante (*Musa acuminata* AAA) cultivado con diferente manejo. Mag. Sci. Tesis, Universidad de Colima, México.
- MANSVELT E.; HATTINGH M.** 1987. Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Can. J. Bot. 65:2517-2522.
- MANULIS S.; HAVIV-CHESNER A.; BRANDL M.; LINDOW S.; BARASH I.** 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:634-642.
- MARÍN D; ROMERO R.; GUZMÁN M.; SUTTON T.** 2003. Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. Plant Disease 87(3): 208-223p.
- MARTÍNEZ G.; PARGAS R.; MUÑOZ D.** 1999. La Sigatoka negra y su avance en el territorio Venezolano. Implicaciones Socioeconómicas. CENIAP.
- MERCIER J.; LINDOW S.** 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. Appl. Environ. Microbiol. 66:369– 374.
- MEREDITH D.** 1970. Banana leaf spot diseases (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella fijiensis* and *musicola*. In: Sigatoka negra en la región del Pacífico del Sudeste Asiático. Jones, DR. (ed.). Montpellier, Francia. Musaraña/Inibap Agrópolis. p. 2-5.
- MEREDITH D.; LAWRENCE J.** 1969. Black leaf streak disease on bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawiiai and notes of the conidial state of the causal fungus. (Cit. en: Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M. and Sutton T.B. (2003). "Black Sigatoka: an increasing threat of banana cultivation". Plant disease, 87(3): 208-222).
- MICHNIEWICZ J.; KOŁODZIEJCZYK P.; OBUCHOWSKI W.** 2003. Beta-glucan enzymatic hydrolysis in cereal grains and cereal products. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities (EJPAU) 6(1).
- MIRANDA J.** 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Tesis Mag. Sci. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- MORRIS C.; MONIER J.; JACQUES M.** 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. . Applied and Environmental Microbiology 63:1570-1576.

- MORRIS C.; MONIER J.; JACQUES M.** 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12):4789-4795.
- MORRIS C.; KINKEL L.** 2002. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields, p. 365–375. In S. E. Lindow, E. I. Hecht-Poinar, and V. Elliott (ed.), *Phyllosphere microbiology*. APS Press, St. Paul, Minn.
- MOURICHON X.; CARLIER J.; FOURÉ E.** 1997. Enfermedades de Sigatoka: Raya negra de la hoja (Sigatoka negra) Enfermedad de Sigatoka (Sigatoka amarilla). Hoja divulgativa N°8, PROMUSA.
- MULDER J.; HOLLIDAY P.** 1974. *Mycosphaerella fijiensis*. CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and bacteria. No. 413.
- NADAL R.; MANZO G.; OROZCO J.; OROZCO M.; GUZMÁN S.** 2009. Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa spp.*) determinada mediante marcadores RAPD. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (1):1-7.
- O'BRIEN R.; LINDOW S.** 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology* 79:619-627.
- ONGENA M.; THONART P.** 2008. Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. (Cit. en: Ongena, M., and P. Jacques. "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol." *Trends in Microbiology* 16 (3):115-125).
- ORDENTLICH A.; ELAD Y.; CHET H.** 1998. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. En: *Phytopathology*. Vol 78, No.1; p. 84-88.
- ORSINI M.; ROMANO-SPICA V.** 2001. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:17-20.
- ORTIZ R.; VUYLSTEKE D.** 1996. Recent advances in *Musa* genetics, breeding and biotechnology. *Plant Breed. Abst.* 66:1355-1363.
- OSORIO I.; PATIÑO L.; 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 Cenibanano* 6:8-13.
- PATIÑO L.; BUSTAMANTE E.; SALAZAR L.** 2007. Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano (*Musa x paradisiaca* L.) y plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica (Chile)*. 67(4): 437-445.

- PARRA Y.; RAMÍREZ R.** 2002. Efecto de diferentes derivados de la quitina sobre el crecimiento *in vitro* del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn. Cultivos Tropicales. 23(2):73-75.
- PÉREZ L.; ÁLVAREZ J.; PÉREZ M.** 2003. Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Cuba: Impacto económico, resistencia de los clones y manejo de la enfermedad. Fitosanidad 7(1): 31-41.
- PONTÓN J.** 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol 25: 78-82.
- REILLY H.; SCHATS A.; WAKSMAN S.** 1945. Antifungal properties of antibiotic substances. New Jersey Agricultural Experiment Station, Rutgers University, New Brunswick, N. J. 585-595p.
- RIEDERER M.; MULLER C.** 2006. Biology of the plant cuticle. Annual Plant Reviews. Vol. 23. Blackwell Publishing.
- RIVEROS A.; LARCO E.; POLANCO D.; ROSALES F.; POCASANGRE L.** 2006. Evaluación preliminar de la aplicación de lixiviados de compost y vermicompost sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en plátano (*Musa AAB*). En: CORBANA-INIBAMUSALAC. Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe. Resúmenes, Congreso Internacional, San, José, Costa Rica, 21-23 de Marzo. 30p.
- RODRÍGUEZ O.** 1995. Antagonismo endofítico de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* del plátano y *Alternaria solani* del tomate. Mag. Sci. Tesis, CATIE; Turrialba, Costa Rica.
- RODRÍGUEZ A.; CAYÓN G.** 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. Agronomía Colombiana 26(2): 256-265.
- RODRÍGUEZ A.; UVA V.; VALLE H.; SEGURA R.; GUILLÉN C.; SANDOVAL J.; LAPRADE S.** 2011. Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas para Reducir el Ecurrimiento de Plaguicidas en el Cultivo del Banano de la Región Caribe Costarricense. Reporte de Estudio de Caso. CORBANA, S.A. 65p.
- ROMERO R.** 1997. Avances en epidemiología y manejo de la Sigatoka negra del banano. Agronomía Costarricense 21(1): 77-81.
- ROMERO R.** 2006. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas en *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. In: XVII Reunión ACORBAT (2006, Joinville, Santa Catarina, BR). Memorias. Joinville, BR. V. 1, 92-99p.

- ROMERO R.; GUZMÁN M.** 2006. Efectos de la enfermedad de la Sigatoka negra en la producción y la Calidad. Congreso Internacional Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. pp 18.
- RUINEN J.** 1956. Occurrence of *Beijerinckia* species in the phyllosphere. (Cit. en: Riederer, M., and C. Muller. "Biology of the plant cuticle." Annual Plant Reviews. Vol. 23. Blackwell Publishing, 2006).
- RUÍZ C.; BUSTAMANTE E.; JIMÉNEZ F.; SAUNDERS J.; OKUMOTO S.; GONZÁLEZ R.** 1997. Sustratos y bacterias antagonistas para el manejo de en banano. En: Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 45:9-17.
- SAHAI A.; MANOCHA M.** 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. En: FEMS Microbiology Reviews. 11:317-338.
- SALAZAR L.** 2005. Estudio de la filosfera de musáceas alimenticias en el Urabá antioqueño. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- SALLÉ G.; PICHARD V.; MOURICHON X.** 1989. Cytological study of the interaction between *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. In Sigatoka leaf spot disease of bananas. Proceedings of an international workshop hold. International Network for the improvement, of banana and plantain (INIBAP). San José, Costa Rica. 374p.
- SÁNCHEZ R.; ALGORA J.; VALLIN C.; PÉREZ M.; IZNAGA F.; MALPARTIDA F.** 2002. Efecto del fungicida natural F20 contra la enfermedad Sigatoka negra 79 (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (AAB) y banano (AAA). INIBAP. INFOMUSA 11(1):14-16.
- SÁNCHEZ O.; PIZARRO K.; RESTREPO M.** 2012. Estadísticas de Exportación Bananera 2011. Gerencia General. Sección de Estadísticas. Corporación Bananera Nacional.
- SANDOVAL J.; MÜLLER L.** 1999. Anatomía y morfología de la plata de banano (*Musa* AAA). Corbana 24(51), 43-60.
- SASTOQUE E.** 2005. Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis Microbiólogo Industrial, Agrícola y Veterinario. Bogotá, D.C. Pontificia Universidad Javeriana. 123 p.
- SASTOQUE L.; MERCADO M.; MARTÍNEZ M.; QUEVEDO B.** 2007. Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. Revista Mexicana de Ingeniería química 6 (002): 137-146.

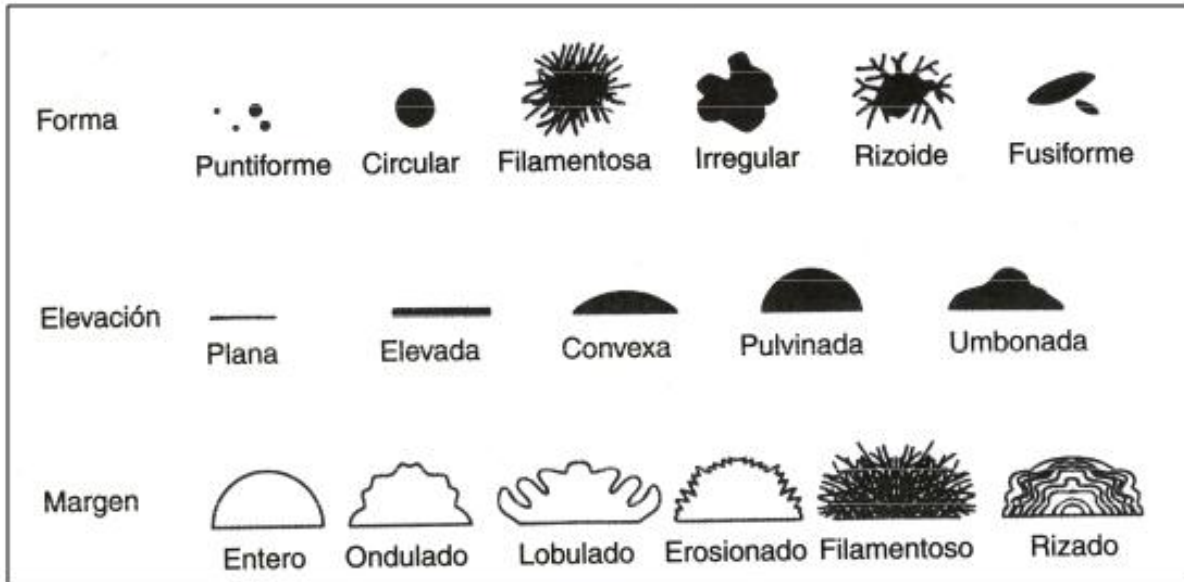
- SID AHMED A.; EZZIYANI M.; PÉREZ C.; CANDELA M.** 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus spp.* and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. En: European Journal of Plant Pathology. 109:633–637.
- SIMMONDS N.** 1962. The evolution of the bananas. Tropical Science Series Longman, Group UK Ltd, London. 170 p.
- SIMMONDS N.; SHEPHERD K.** 1955. Taxonomy and origins of cultivated bananas. Bot. J. Linn. Soc. London. 55:302-312
- SINGH P.; SHIN Y.; PARK C.; CHUNG Y.** 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. En: Phytopathology. 89(1):92-99.
- SMITH M.; RUTER J.; BURT P.; RAMÍREZ F.; GONZALES E.** 1997. Black Sigatoka disease of banana: special and temporal variability in disease development. Annual Applied Biology 131: 063-077.
- SOTO L.** 2008. Evaluación de Bioles Inoculados con Microorganismos Naturalmente Antagónicos, para el Manejo Biológico de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Tesis de Licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Limón, Costa Rica.
- STOVER R.** 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. Plant Diseases. 64: 750-756.
- STOVER R.; SIMMONDS N.** 1987. Bananas. Willey & Sons, New York.
- SUDIN G.; JACOBS, J.** 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field grown peanut (*Arachis hypogaea* L). Cit. en: Whipps, J. M., P. Hand, D. Pink, and G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." Journal of Applied Microbiology, 2007: 1744-1755).
- SUNDIN G.** 2002. Ultraviolet radiation on leaves its influence on microbial communities and their adaptation. (Cit. en: Whipps, J. M., P. Hand, D. Pink, and G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." Journal of Applied Microbiology, 2007: 1744-1755).
- SUPRR H.** 1981. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonists. (Cit. en: Blakeman, J.P." Microbial ecology of the phylloplane." London Academic Press. 369-381p.).

- SURICO G.** 1993. Scanning electron microscopy of olive and oleander leaves colonized by *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi*. J. Phytopathol. 138:31-40.
- TEJERINA J.** 1998. First report of Black Sigatoka in Bolivia. Plant Disease. 81(11):1332.
- TUKEY H.** 1970. The leaching of substances from plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 21:305-324.
- VALOIS D.; FAYAD K.; BARASUBIYE T.; GARON M.; DERY C.; BRZEZINSKI R.; BEAULIEU C.** 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae var. rubi*, the agent causal of raspberry root rot. En: Applied and Environmental Microbiology. 62(5):1630-1635.
- VÁSQUEZ N.; TAPIA A.; GALINDO J.** 1989. Ultrastructural studies of the infection process of *Mycosphaerella fijiensis* on *Musa* cultivars. In Sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceedings of an international workshop held. International Network for the improvement of banana and plantain (INIBAP), San José, Costa Rica. 374 p.
- VENEGAS E.; CIAMPI L.; COLLADO L.; COSTA M.; FUENTES R.; NISSEN J.; SCHOBITZ R.; SCHOEBITZ M.** 2005. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *Bacillus cohn* antagonistas de cepas patógenas de *fusarium link* en cala. AGRO SUR. 33(2):1-12.
- VIDAL A.** 1992. Sigatoka negra en Cuba. Nuevos focos de plagas y enfermedades. Boletín Fitosanitario de la FAO. 40(46):1-2.
- VILLALTA R.; GUZMÁN M.** 2006. Evaluación de una formulación de *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra en banano (*Musa* AAA, cv. Grande Naine). En: CORBANA-INIBA-MUSALAC. Manejo de la Sigatoka negra en banano.
- VILLALTA R.; GUZMÁN M.** 2008. Evaluación de Microorganismos Eficientes y *Trichoderma* como agentes de control biológico de la Sigatoka negra en banana (*Musa* AAA). Pag. 207-211. En Informe Anual 2008. Dirección de investigaciones, Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A). San José, Costa Rica.
- WARREN R.** 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol. 50: 183-212.
- WELLER D.; SAETTLER A.** 1980. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli var. fuscans* in field-grown navy beans. Phytopathology 70:500-506.

- WHIPPS J.; HAND P.; PINK D.; BENDING G.** 2007. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* 1744-1755.
- WILSON M.; LINDOW S.** 1994. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4468–4477.
- WILSON M.; LINDOW S.** 1994. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice) *Pseudomonas syringae* strains and a non icenucleating (Ice) biological control agent. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3128–3137.
- WILSON H.; LILLY G.; LEACH J.** 1965. Bacterial polysaccharides. IV. Longevity of *Xanthomonas phaseoli* and *Serratia marcescens* in bacterial exudates. *Phytopathology* 55:1135-1138.
- YADAV R.; KARAMANOLI K.; VOKOU D.** 2005. Bacterial Colonization of the Phyllosphere of Mediterranean Perennial Species as Influenced by Leaf Structural and Chemical Features. *Microbial ecology* 50: 185-196.
- 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.; CROWLEY H.; BORNEMAN J.; KEEN N.** 2000. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *PNAS, Ecology.* 98(7): 3889-3894.
- YUAN W.; CRAWFORD D.** 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as potencial agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ Microbiol.* 61: 3119-3128.
- ZHANG Z.; YUEN G.** 2000. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of Bipolaris leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *En: Biological Control.* 18:277-286.

10 ANEXOS

Anexo 1. Parámetros utilizados para la caracterización morfológica de las bacterias aisladas.



Anexo 2. Protocolo sistema de crioconservación CRYOBANK.

MAST CRYOBANK™

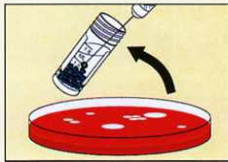
BACTERIAL PRESERVATION AND STORAGE SYSTEM

MAST CRYOBANK™ is based on a cryovial system comprising chemically treated beads covered with a special cryogenic preserving solution. MAST CRYOBANK™ offers a reliable, convenient and versatile system for storing and preserving fastidious bacteria over long periods. MAST CRYOBANK™ is less expensive than lyophilisation, repeated subculture or purchasing commercially available control organisms. MAST CRYOBANK™ permits the easy establishment of culture collections for laboratory accreditation or research purposes. Suitable for use in all laboratories dealing with bacteria including:

- clinical
- brewing
- food
- dairy
- water
- veterinary
- pharmaceutical
- biotechnology

SIMPLE TO USE PROCEDURE

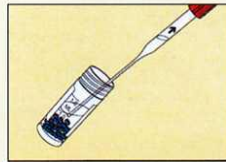
STORAGE OF THE ORGANISM



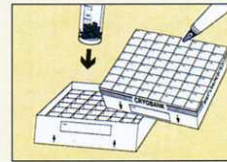
Using a permanent marker, label the code for the organism onto the white panel on the vial. Aseptically inoculate the CRYOBANK™ tube with colonies from a fresh, pure culture to a density equivalent to MacFarland 3 or 4 standard.



Replace cap and mix carefully by inverting the tube to completely distribute the organism.

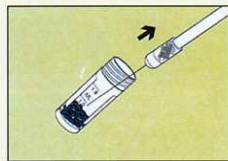


Remove as much of the cryopreservative fluid as possible with a sterile pipette and re-close the tube.

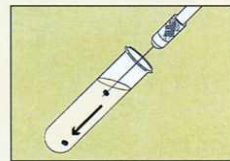


Store the inoculated CRYOBANK™ tube in a suitable freezer. Details of the tube contents may also be recorded on the grid printed on the lid of the storage box. Space is also available for recording the individual box identification if required.

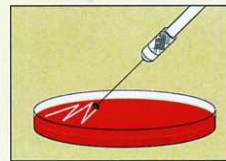
RECOVERY OF THE ORGANISM



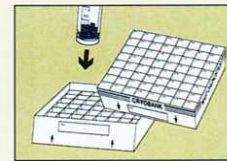
Remove the CRYOBANK™ tube from the freezer. If several tubes are being removed at once, thawing should be prevented by use of a cryoblock. Open the vial and remove a bead by inserting a sterile needle through the hole or by using sterile forceps.



The bead may then be dropped into an appropriate liquid medium



Alternatively, streak the bead immediately over the surface of an appropriate solid medium and incubate under suitable conditions.



Discard the bead safely in the recommended manner for infected material. Close the vial and return it to the freezer as soon as possible.

ORDERING DETAILS

CRYO/M 64 vials (16 of each colour)
CRYO/R 64 vials of red beads
CRYO/G 64 vials of green beads
CRYO/Y 64 vials of yellow beads
CRYO/B 64 vials of blue beads

CRYO/Z Cryoblock - 18 well. Permits easy removal of cryovials from the freezer without risk of defrosting



MAST DIAGNOSTICS

MAST is a registered trademark.

Mast Group Ltd.
Mast House
Derby Road, Boode
Merseyside L20 1EA
UK
Tel: 44 (0)151 933 7277
Fax: 44 (0)151 944 1332
e-mail: sales@mastgrp.com

Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
D-23858 Reinfeld
Germany
Tel: 49 (0)4533 20070
Fax: 49 (0)4533 200768
e-mail: mast@mast-diagnostica.de

Mast Diagnostic
115 Rue Jules Barni
80000 Amiens
France
Tel: 33 (0)3 22 80 80 67
Fax: 33 (0)3 22 80 99 22
e-mail: jcbarral@aol.com

Davies Diagnostics (Pty) Ltd.
PO Box 3222
Randburg 2125
Republic of South Africa
Tel: 27 (0)11 777 7600
Fax: 27 (0)11 787 6917
e-mail: mkt@daviesdiag.co.za

11 APÉNDICES

Apéndice 1. Aislamientos obtenidos en los ensayos preliminares.

Código De Laboratorio	Características morfológicas	Propiedad	Ensayo de aislamiento	Fecha de aislamiento
TFA 01	Colonias amarillas, circulares, elevación convexa y margen entero.	Glucanolítica	EP#1	31 de Julio 2012.
TFA 02	Colonias de color rojo, circulares, elevación convexa y margen entero.	Glucanolítica	EP#2	7 Agosto 2012.
TFA 03	Colonias de color rosado, circulares, elevación convexa y margen filamentosos.	Glucanolítica	EP#1	31 de Julio 2012.
TFA 04	Colonias amarillas, circulares, elevación umbonada y margen entero.	Glucanolítica	EP#2	31 de Julio 2012.
TFA 05	Colonias beige, irregulares, planas y margen entero.	Glucanolítica	EP#3	13 de Agosto 2012.
TFA 06	Colonias amarillo-verduzco, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	Glucanolítica	EP#3	13 de Agosto 2012.
TFA 07	Colonias de color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	Quitinolítica	EP#1	31 de Julio 2012.
TFA 08	Colonias de color blanco, circulares, elevadas y margen entero.	Quitinolítica	EP#1	31 de Julio 2012.
TFA 09	Colonias de color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	Quitinolítica	EP#1	31 de Julio 2012.
TFA 10	Colonias de color amarillo, puntiforme, elevación convexa y margen entero.	Quitinolítica	EP#3	13 de Agosto 2012.
TFA 11	Colonias de color amarillo-verduzco, circulares, elevación convexa y margen ondulado.	Quitinolítica	EP#3	13 de Agosto 2012.

Apéndice 2. Características morfológicas y producción de enzimas líticas de las bacterias aisladas como antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis*.

Código de Laboratorio	Características morfológicas	Propiedad		Material de Aislamiento	Fecha de aislamiento
		Glucanólítica	Quitinolítica		
TFA 01-GQ	Colonias color beige, circulares, elevadas y margen entero.	x	x	P1H3.E	28-ago-12
TFA 02-GQ	Colonias color amarillo claro, fusiforme, planas y margen entero.	x	x	P1H4.I	28-ago-12
TFA 03-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación pulvinada y margen entero.	x		P1H4.E	28-ago-12
TFA 04-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P1H4.E	28-ago-12
TFA 05-CQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P1H4.E	28-ago-12
TFA 06-GQ	Colonias color amarillo claro, irregulares, elevación pulvinada y margen entero.	x	x	P1H5.I	28-ago-12
TFA 07-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P1H5.I	28-ago-12
TFA 08-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P1H5.E	28-ago-12
TFA 09-GQ	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	P1H5.E	28-ago-12
TFA 10-GQ	Colonias color beige, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P2H1.I	28-ago-12
TFA 11-GQ	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	P2H3.E	28-ago-12
TFA 12-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P2H5.I	28-ago-12
TFA 13-GQ	Colonias color blanco, circulares, elevadas y margen entero.	x	x	P2H5.E	28-ago-12
TFA 14-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P2H5.E	28-ago-12
TFA 15-G	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x		P2H6.I	28-ago-12
TFA 16-GQ	Colonias color beige circulares, planas y margen entero.	x	x	P2H6.E	28-ago-12
TFA 17-G	Colonias color blanco, irregulares, elevadas y margen ondulado.	x	x	P3H1.I	5-set-12
TFA 18-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		PEH1.E	5-set-12
TFA 19-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P3H1.I	5-set-12
TFA 20-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		PEH3.I	5-set-12
TFA 21-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P3H4.I	5-set-12
TFA 22-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		PEH4.E	5-set-12
TFA 23-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P3H5.I	5-set-12
TFA 24-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P3H5.I	5-set-12
TFA 25-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P3H5.3	5-set-12
TFA 26-G	Colonias color amarillo, fusiforme, elevación convexa y margen entero.	x		P3H6.E	5-set-12
TFA 27-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P4H6.3	5-set-12
TFA 28-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P1H6.E	28-ago-12

TFA 29-Q	Colonias color amarillo, circulares, elevadas y margen entero.			x	P1H6.E	28-ago-12
TFA 30-Q	Colonias color amarillo, irregulares, elevadas y margen ondulado.			x	P2H6.E	28-ago-12
TFA 31-Q	Colonias color amarillo claro, circulares, elevadas y borde ondulado			x	P2H6.E	28-ago-12
TFA 32-Q	Colonias color beige, circulares, elevadas y margen entero.			x	P2H4.E	28-ago-12
TFA 33-Q	Colonias color amarillo claro, irregulares, elevación convexa y margen entero.			x	P2H4.E	28-ago-12
TGA 34-Q	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación convexa y margen entero.			x	P3H1.E	5-set-12
TFA 35-Q	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.			x	P3H4.E	5-set-12
TFA 36-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		x	P3H4.E	5-set-12
TFA 37-Q	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.			x	P3H4.E	5-set-12
TFA 38-Q	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.			x	P3H4.E	5-set-12
TFA 39-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x			P3H5.E	5-set-12
TFA 40-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		x	P3H5.E	5-set-12
TFA 41-G	Colonias color amarillo claro circulares, elevación convexa y margen entero.	x			P3H5.E	5-set-12
TFA 42-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		x	P3H4.I	5-set-12
TFA 43-Q	Colonias color blanco, circulares, elevación convexa y margen entero.			x	P5H2.I	13-set-12
TFA 44-Q	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.			x	P5H2.I	13-set-12
TFA 45-Q	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.			x	P5H6.I	13-set-12
TFA 46-G	Colonias color amarillo, irregulares, elevadas y margen entero.	x			P5H1.E	13-set-12
TFA 47-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x			P5H1.E	13-set-12
TFA 48-GQ	Colonias color rojo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		x	P5H3.E	13-set-12
TFA 49-G	Colonias color beige, circulares, elevación convexa y margen entero.	x			P5H3.E	13-set-12
TFA 50-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero			x	P5H4.I	13-set-12
TFA 51-G	Colonias color beige, circulares, elevación convexa y margen entero.	x			P5H4.E	13-set-12
TFA 52-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x			P5H5.I	13-set-12
TFA 53-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x			P5H5.E	13-set-12
TFA 54-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación pulvinada y margen entero.	x			P5H5.E	13-set-12
TFA 55-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x			P5H5.E	13-set-12
TFA 56-G	Colonias color amarillo claro, puntiformes, elevadas y margen entero.	x			P5H6.E	13-set-12
TFA 57-G	Colonias amarillas, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x			P6H3.E	13-set-12
TFA 58-G	Colonias color beige, irregulares, elevación convexa y margen entero.	x			P6H4.I	13-set-12

TFA 59-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P6H4.E	13-set-12
TFA 60-G	Colonias color blanco, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P6H5.I	13-set-12
TFA 61-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P6H5.E	13-set-12
TFA 62-G	Colonias color beige, irregulares, elevación convexa y margen entero.	x		P6H5.E	13-set-12
TFA 63-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación pulvinada y margen entero.	x		P6H6.I	13-set-12
TFA 64-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación pulvinada y margen entero.	x	x	P6H6.I	13-set-12
TFA 65-G	Colonias color blanco, irregulares, elevación convexa y margen entero.	x		P6H6.I	13-set-12
TFA 66-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P6H6.E	13-set-12
TFA 74-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P6H6.E	13-set-12
TFA 68-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P6H6.E	13-set-12
TFA 69-G	Colonias color blanco, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P7H4.E	13-set-12
TFA 70-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P7H5.E	13-set-12
TFA 71-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P7H5.E	13-set-12
TFA 72-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P7H5.E	13-set-12
TFA 73-G	Colonias color piel, irregulares, elevadas y margen entero	x		P7H6.I	13-set-12
TFA 74-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P7H6.E	13-set-12
TFA 75-Q	Colonias color beige, puntiformes, elevación convexa y margen entero.		x	P7H5.E	13-set-12
TFA 76-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P7H5.E	13-set-12
TFA 77-Q	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P7H6.I	13-set-12
TFA 78-Q	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P7H6.I	13-set-12
TFA 79-Q	Colonias color beige, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P7H6.I	13-set-12
TFA 80-GQ	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	P4H4.I	5-set-12
TFA 81-GQ	Colonias color amarillo claro, puntiformes, elevadas y margen entero.	x	x	P4H4.I	5-set-12
TFA 82-Q	Colonias color amarillo claro, irregulares, elevadas y margen entero.		x	P4H4.I	5-set-12
TFA 83-GQ	Colonias color amarillo claro, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P4H4.I	5-set-12
TFA 84-GQ	Colonias color beige, irregulares, plana y margen entero.	x	x	P4H5.E	5-set-12
TFA 85-GQ	Colonias color blanco, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	P4H6.I	5-set-12
TFA 86-Q	Colonias color amarillo claro, irregulares, elevación pulvinada y margen entero.		x	P4H6.E	5-set-12
TFA 87-GQ	Colonias color rojo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H3.I	21-set-12
TFA 88-G	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x		P8H3.I	21-set-12

TFA 89-G	Colonias color amarillo claro, irregulares, elevadas y margen entero.	x		P8H3.E	21-set-12
TFA 90-G	Colonias color amarillo-blanco, circulares, elevadas y margen entero.	x		P8H3.E	21-set-12
TFA 91-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación pulvinada y margen entero.	x	x	P8H4.E	21-set-12
TFA 92-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación pulvinada y margen entero.	x		P8H5.I	21-set-12
TFA 93-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P8H5.I	21-set-12
TFA 94-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P8H6.I	21-set-12
TFA 95-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P8H6.I	21-set-12
TFA 96-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.I	21-set-12
TFA 97-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.E	21-set-12
TFA 98-G	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x		P8H6.E	21-set-12
TFA 99-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P8H6.E	21-set-12
TFA 100-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.E	21-set-12
TFA 101-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación pulvinada y margen entero.	x	x	P8H4.E	21-set-12
TFA 102-GQ	Colonias color amarillo claro, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H5.I	21-set-12
TFA 103-GQ	Colonias color amarillo claro, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H5.I	21-set-12
TFA 104-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H5.I	21-set-12
TFA 105-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H5.I	21-set-12
TFA 106-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H5.E	21-set-12
TFA 107-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.I	21-set-12
TFA 108-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.I	21-set-12
TFA 109-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.I	21-set-12
TFA 110-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H5.E	21-set-12
TFA 111-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.I	21-set-12
TFA 112-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.E	21-set-12
TFA 113-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P8H6.E	21-set-12
TFA 114-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P9H1.E	28-set-12
TFA 115-GQ	Colonias color amarillo claro, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	P9H2.I	28-set-12
TFA 116-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P9H2.E	28-set-12
TFA 117-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P9H3.E	28-set-12
TFA 118-GQ	Colonias color amarillo claro, fusiformes, elevadas y margen entero.	x	x	P9H3.E	28-set-12

TFA 119-G	Colonias color beige, circulares, elevadas y margen entero.	x		P9H4.I	28-set-12
TFA 120-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P9H2.E	28-set-12
TFA 121-GQ	Colonias color beige, fusiformes, elevadas y margen entero.	x	x	P9H4.E	28-set-12
TFA 122-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P9H4.E	28-set-12
TFA 123-GQ	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	P9H5.E	28-set-12
TFA 124-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P9H5.E	28-set-12
TFA 125-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P9H6.I	28-set-12
TFA 126-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P9H6.I	28-set-12
TFA 127-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P9H6.E	28-set-12
TFA 128-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x		P9H6.E	28-set-12
TFA 129-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P10H1.E	28-set-12
TFA 130-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P10H1.E	28-set-12
TFA 131-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P10H1.E	28-set-12
TFA 132-G	Colonias color amarillo, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P10H2.I	28-set-12
TFA 133-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P10H2.E	28-set-12
TFA 134-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P10H3.E	28-set-12
TFA 135-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P10H3.E	28-set-12
TFA 136-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevadas y borde ondulado	x		P10H4.E	28-set-12
TFA 137-G	Colonias color amarillo claro, fusiformes, planas y margen entero.	x		P10H4.E	28-set-12
TFA 138-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P10H5.E	28-set-12
TFA 139-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P10H5.E	28-set-12
TFA 140-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P10H6.E	28-set-12
TFA 141-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P10H6.E	28-set-12
TFA 142-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P10H6.E	28-set-12
TFA 143-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P10H6.E	28-set-12
TFA 144-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P10H1.I	28-set-12
TFA 145-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P4BH1.E	28-set-12
TFA 146-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P4BH2.I	28-set-12
TFA 147-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P4BH2.I	28-set-12
TFA 148-GQ	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x	x	P4BH2.E	28-set-12

TFA 149-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P4BH3.I	28-set-12
TFA 150-G	Colonias color amarillo, fusiforme, elevación convexa y margen entero.	x		P4BH3.I	28-set-12
TFA 151- GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P4BH3.E	28-set-12
TFA152-GQ	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.	x	x	P4BH4.I	28-set-12
TFA 153-G	Colonias color amarillo, fusiforme, elevación convexa y margen entero.	x		P4BH4.E	28-set-12
TFA 154-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación	x	x	P4BH5.E	28-set-12
TFA 155-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x		P4BH6.E	28-set-12
TFA 156-G	Colonias color amarillo claro, circulares, elevadas y margen entero.	X		P9H2.I	28-set-12
TFA 157-G	Colonias color beige, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P4BH3.E	28-set-12
TFA 158-GQ	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación umbonada y margen entero.	x	x	P4BHE.E	28-set-12
TFA 159-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevadas y margen entero.	x		P4BH3.E	28-set-12
TFA 160-G	Colonias color amarillo, fusiforme, planas y margen entero.	x		P9H4.I	28-set-12
TFA 161-G	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.	x		P8H6.E	28-set-12
TFA 162-Q	Colonias color amarillo-verdoso, irregulares, elevación convexa y margen entero.		x	P10H6.E	28-set-12
TFA 163-Q	Colonias color beige, irregulares, planas y margen entero.		x	P10H6.I	28-set-12
TFA 164-Q	Colonias color beige, irregulares, planas y margen entero.		x	P10H6.I	28-set-12
TFA 165-Q	Colonias color beige, fusiforme, elevadas y margen entero.		x	P10H6.I	28-set-12
TFA 166-Q	Colonias color amarillo-verdoso, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P10H5.E	28-set-12
TFA 167-Q	Colonias color beige, circulares, elevadas y margen entero.		x	P10H6.I	28-set-12
TFA 168-Q	Colonias color amarillo-verdoso, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P4BH1.E	28-set-12
TFA 169-Q	Colonias color amarillo-verdoso, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P4BH2.E	28-set-12
TFA 170-Q	Colonias color amarillo-verdoso, irregulares, elevación convexa y margen entero.		x	P4BH1.I	28-set-12
TFA 171-Q	Colonias color amarillo-verdoso, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P4BH1.I	28-set-12
TFA 172-Q	Colonias color amarillo, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P4BH2.E	28-set-12
TFA 173-Q	Colonias color amarillo claro, circulares, elevación convexa y margen entero.		x	P4BH4.I	28-set-12
TFA 174-Q	Colonias color amarillo-verdoso, fusiformes, planas y margen entero.		x	P4BH4.I	28-set-12
TFA 175-Q	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.		x	P4BH5.E	28-set-12
TFA 176-Q	Colonias color amarillo-verdoso, puntiformes, elevación convexa y margen entero.		x	H4.E	--
TFA 177-Q	Colonias color amarillo, puntiformes, elevación convexa y margen entero.		x	H4.E	--
TFA 178-GQ	Colonias color beige, circulares, planas y margen entero.	x	x	Cont Quit #1	--

TFA 179-Q	Colonias color beige, fusiformes, elevadas y margen entero.		x	Cont Quit 2	--
TFA 180-GQ	Colonias color blancas, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	Cont 1 #1	--
TFA 181-GQ	Colonias color beige, irregulares, elevadas y margen entero.	x	x	Cont 1 #2	--
TFA 182-G	Colonias amarillo, fusiforme, elevadas y margen entero.	x		--	--

Apéndice 3. Análisis de varianza de las bacterias totales, gluconolíticas y quitinolíticas aisladas dos secciones (borde y vena central) de seis hojas de diferente edad de *Musa* AAA cv. Grande Naine.

Source	DF	Bacterias Totales		Bacterias Gluconolíticas		Bacterias Quitinolíticas	
		Chi-Square	Pr>ChiSq	Chi-Square	Pr>ChiSq	Chi-Square	Pr>ChiSq
Planta	9	32,45	0,0002	24,62	0,0034	0,65	0,9999
Hoja	5	514,42	< 0,0001	125,59	< 0,0001	3,55	0,6159
Hoja*Planta	45	152,07	< 0,0001	124,31	< 0,0001	61,54	0,051
Posición	1	47,93	< 0,0001	29,5	< 0,0001	0,01	0,9303
Hoja*Posición	5	4,73	0,4499	24,92	0,0001	50,43	< 0,0001

Apéndice 4. Análisis de regresión de las bacterias totales, gluconolíticas y quitinolíticas aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

Parámetro	DF	Bacterias Totales			Bacterias Gluconolíticas			Bacterias Quitinolíticas		
		Estimado	% Error	Probabilidad	Estimado	% Error	Probabilidad	Estimado	% Error	Probabilidad
Hoja	1	2,3795	0,1664	< 0,0001	2,6105	0,2015	< 0,0001	1,6095	2,2314	0,4707
Posición	1	3,0323	1,0309	0,0033	4,1117	1,408	0,0035	-1,0905	15,9158	0,9454
Hoja*Posición	1	-0,2655	0,2734	0,3314	-0,5486	0,3745	0,143	1,2005	2,181	0,582

Apéndice 5. Análisis estadístico en unidades de Ln (UFC)/cm² de las bacterias totales, gluconolíticas y quitinolíticas aisladas de dos secciones de la lámina foliar (paralelo a la vena central y del borde) de hojas banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) de diferente edad.

Hoja	Posición	Bacteria Totales			Bacterias Gluconolíticas			Bacterias Quitinolíticas		
		Estimado	Probabilidad	% Error	Estimado	Probabilidad	% Error	Estimado	Probabilidad	% Error
1		6,3743	< 0,0001	0,8315	-0,075	0,9758	2,4784	-18,9244	0,9602	379,1184
2		8,9659	< 0,0002	0,5874	4,1113	0,0358	1,9589	-5,9612	0,7112	16,0988
3		12,3223	< 0,0001	0,3027	7,5872	< 0,0001	1,8552	-5,9476	0,6805	14,4431
4		14,8816	< 0,0001	0,302	13,0811	< 0,0001	0,3942	-6,1394	0,6576	13,8531
5		17,5448	< 0,0001	0,3025	15,8467	< 0,0001	0,3944	-2,3597	0,9663	55,8708
6		18,7494	< 0,0001	0,3026	16,4981	< 0,0001	0,3933	11,877	0,0067	4,3783
	<i>E</i>	14,3185	< 0,0001	0,2556	11,261	< 0,0001	0,675	0,9333	0,9345	11,35579
	<i>I</i>	11,9609	< 0,0001	0,2657	7,7554	< 0,0001	0,724	-10,0851	0,9365	126,5162
1	<i>E</i>	7,6083	< 0,0001	0,902	4,5746	0,065	2,4791	-6,4188	0,8251	29,0519
1	<i>I</i>	5,1402	< 0,0001	0,9696	-4,7247	0,0984	2,8591	-31,4299	0,9669	756,5659
2	<i>E</i>	10,0799	< 0,0001	0,7002	4,2862	0,0386	2,0723	-10,6809	0,5116	16,2715
2	<i>I</i>	7,8519	< 0,0001	0,7399	3,9364	0,0605	2,0971	-1,2415	0,9384	16,068
3	<i>E</i>	13,6859	< 0,0001	0,4861	10,8773	< 0,0001	2,0205	-0,7743	0,9571	14,4068
3	<i>I</i>	10,9588	< 0,0001	0,4871	4,297	0,0408	2,1003	-11,121	0,4476	14,6432
4	<i>E</i>	16,7375	< 0,0001	0,5521	14,7504	< 0,0001	0,9104	2,1672	0,8739	13,6596
4	<i>I</i>	13,0256	< 0,0001	0,5559	11,4118	< 0,0001	0,9116	-14,446	0,3259	14,7056
5	<i>E</i>	18,3776	< 0,0001	0,5082	16,6526	< 0,0001	0,7594	7,0621	0,8994	55,8634
5	<i>I</i>	16,712	< 0,0001	0,5092	15,0409	< 0,0001	0,7595	-11,7815	0,8331	55,0152
6	<i>E</i>	19,4221	< 0,0001	0,4978	16,425	< 0,0001	0,6868	14,2447	0,0016	4,5228
6	<i>I</i>	18,0766	< 0,0001	0,4981	16,5712	< 0,0001	0,6916	9,5093	0,0384	4,592

