



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniera Agrónoma.

Título del Proyecto de Investigación:

**“IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS DEL GÉNERO
Pseudomonas spp DE CULTIVARES ENDÉMICOS DE *Musa* spp CON
ACTIVIDAD ANTAGONISTA AL HONGO *Mycosphaerella fijiensis*”**

Autora:

Karen Tatiana Chávez Arteaga

DIRECTOR PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2016

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **KAREN TATIANA CHÁVEZ ARTEAGA** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

KAREN TATIANA CHÁVEZ ARTEAGA

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresada Chávez Arteaga Karen Tatiana, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma titulado **“Identificación y selección de rizobacterias del género *Pseudomonas* spp de cultivares endémicos de *Musa* spp con actividad antagonista al hongo *Mycosphaerella fijiensis*”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

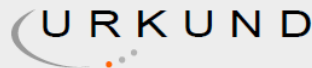
Dr. Hayron Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO



Dokument	TESIS CHA 1.docx (D23258455)
Inskickat	2016-11-12 08:17 (-05:00)
Mottagare	hcanchignia.uteq@analysis.orkund.com
Meddelande	tu madre Visa hela meddelandet

7% av det här c:a 36 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 2 st källor.



Urkund Analysis Result

Analysed Document:	TESIS CHA 1.docx (D23258455)
Submitted:	2016-11-12 14:17:00
Submitted By:	hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance:	7 %

Sources included in the report:

tesiskarenchavezurkum.docx (D22352339)
GALLEGOS ARANA MANUEL VICENTE1.docx (D11406019)

Instances where selected sources appear:

3

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Identificación y selección de rizobacterias del género *Pseudomonas* spp de cultivos endémicos de *Musa* spp con actividad antagonista al hongo *Mycosphaerella fijiensis*”.

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma.

Aprobado por:

Ing. Ludvick Amores
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Dr. Fernando Abasolo
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Marisol Rivero
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

La autora de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjo mis conocimientos.

Le agradezco a mi Director de tesis, Dr. Hayron Canchignia Martínez, por su enseñanza, apoyo y estimulación para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A la Ing. Vanessa Canchignia por brindarme su amistad y confianza en el tiempo que estuve en el laboratorio.

A mi mejor amigo Jefferson Guato por su amistad, confianza y apoyo durante el proyecto de investigación.

También a mis amigos que han formado parte de mi vida profesional a las que les encantaría agradecerles su amistad, apoyo ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme lograr esta meta en mi vida, también por darme a unos padres maravillosos, ya que con sus esfuerzos, confianza, amor y apoyo incondicional permitieron culminar mis estudios y poder ser una profesional, este logro se los dedico a Esther Arteaga y Jorge Chávez.

A mis hermanos que siempre me apoyaron y estuvieron pendientes de mí sacándome una sonrisa en todo momento.

A Ronald Valarezo por ser una persona muy especial en mi vida que en todo momento ha estado brindándome su apoyo.

RESUMEN EJECUTIVO

La constante aplicación de fungicidas para el control de *M. fijiensis*, ha ocasionado que este patógeno adquiera resistencia. El uso de biocontroladores en la agricultura ofrece una alternativa para beneficiar los aspectos fisiológicos y a su vez la reducción del uso de agroquímicos. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar rizobacterias nativas de *Pseudomonas* spp por caracteres morfológicos y bioquímicos de actividad antagonista hacia el hongo. Se analizó un conjunto de 50 cepas provenientes de las provincias Los Ríos (Quinsaloma y Patricia Pilar), Cotopaxi (La Maná) y Bolívar (Las Naves), que fueron inoculados para identificar sus caracteres morfológicos. Las colonias que emitieron fluorescencia fueron seleccionadas y analizadas para detección de proteasa y la identificación del antibiótico Cianuro de hidrogeno (HCN). Los sobrenadantes se obtuvieron de las cepas proteolíticas mediante el proceso de centrifugación. Para el aislamiento de *M. fijiensis* se realizó descargas de ascosporas para la obtención de cultivos monoascospóricos. Se estudió un solo factor, las rizobacterias, se realizaron tres ensayos: 1) Ensayo antagonista de germinación de ascosporas de *M. fijiensis*, el porcentaje de germinación se determinó contando 10 ascosporas por 0,5 cm²; 2) Ensayo antagonistas evaluados por absorbancia al crecimiento micelial de *M. fijiensis*, se realizó una concentración de fragmentos miceliales y se evaluó el efecto de los sobrenadantes sobre el crecimiento micelial al 10 % y 3) Ensayo antagonista de inhibición de crecimiento en diámetro de micelio *M. fijiensis*, con la evaluación de inhibición de crecimiento se evaluó al 10 % del sobrenadante. Se empleó el diseño completamente alzar (D.C.A) para evaluar el efecto antagonista de las rizobacterias, se utilizó la prueba de Duncan al 95 %. Se obtuvieron resultados de 20 cepas que emitieron fluorescencia, ocho cepas fueron proteolíticas y en la identificación de HCN fueron cinco. Las *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* PM3-8 mostraron mayor actividad antagónica hacia *M. fijiensis* en todos los ensayos evaluados.

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*, rizobacterias, *Pseudomonas fluorescentes*, proteasa, HCN, actividad antagonista.

ABSTRAC

The constant application of fungicides for the control of *M. fijiensis*, has caused this pathogen to acquire resistance. The use of biocontrol in agriculture offers an alternative to benefit aspects physiological and at the same time reducing the use of agrochemicals. This study aimed to identify native *Pseudomonas* spp. rhizobacteria by morphological and biochemical characters of antagonist activity towards the fungus. A set of 50 strains provinces Los Ríos (Quinsaloma and Patricia pillar), Cotopaxi (La Mana) and Bolivar (the ships), which were inoculated for their morphological traits analyzed. The colonies that emitted fluorescence were selected and analyzed for protease detection and identification of antibiotic cyanide in hydrogen (HCN). The supernatants were obtained through the process of centrifugation proteolytic strains. For the isolation of *M. fijiensis* was carried out downloads of ascospores to the production of crop monoascosporicos. We studied a single factor, rhizobacteria, three trials were conducted: 1) antagonist assay of germination of *M. fijiensis* ascospores, germination percentage was determined by counting 10 ascospores per 0.5 cm²; ((2) trial evaluated by absorbance at the Mycelial growth of *M. fijiensis*, antagonists was a concentration of Mycelial fragments, and evaluated the effect of the supernatants on Mycelial growth to 10% y3) antagonist inhibition test of diameter growth of mycelium *M. fijiensis*, with the evaluation of growth inhibition was assessed at 10% of the supernatant. The design was used completely lift (D.C.A) to evaluate the antagonistic effect of rhizobacteria, Duncan's test was used to 95%. Results of 20 strains that emitted fluorescence is obtained, eight strains were proteolytic and five were the identification of HCN. The *p. protegens* CHA0 and *p. fluorescens* PM3-8 showed more antagonistic activity towards *M. fijiensis* in all evaluated trials.

Keywords: *Mycosphaerella fijiensis*, rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescent*, protease, HCN, activity antagonist.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO	viii
TABLA DE CONTENIDO	x
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
Código Dublín	xvi
Introducción.....	1
 CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	 3
1.1 Problema de Investigación.....	4
1.1.1 Planteamiento del Problema	4
1.1.2 Formulación del Problema.....	5
1.1.3 Sistematización del Problema.....	5
1.2 Objetivos.....	6
1.2.1 Objetivo General.....	6
1.2.2 Objetivos Específicos	6

1.3	Justificación	7
CAPITULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN		8
2.1	Marco Referencial	9
2.1.1	Musáceas.....	9
2.1.1.1	Clasificación	9
2.1.1.2	Características.....	9
2.1.1.3	Géneros	10
2.1.2	Sigatoka Negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>).....	10
2.1.2.1	Agente Causal	11
2.1.2.2	Estado Sexual.....	11
2.1.2.3	Estrategias para el Control de Sigatoka Negra	12
2.1.3	Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR).....	14
2.1.3.1	Utilización de las PGPR en la Agricultura	17
2.1.3.2	<i>Pseudomonas</i> sp.....	18
2.1.3.3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
2.1.3.4	Mecanismos de Acción de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
2.1.3.5	Producción de Reguladores de Crecimiento Vegetal.....	19
2.1.3.6	Colonización	19
2.1.4	Identificación Morfológica de las Bacterias	20
2.1.5	Identificación Bioquímica de las Bacterias	20
2.1.5.1	Metabolitos Secundarios.....	20
2.1.6	Gen del ARN ribosómico 16S	22
2.1.7	Actividad Antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp <i>in vitro</i>	23
CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		25
3.1	Localización.....	26

3.2	Tipo de Investigación	28
3.3	Método de Investigación	28
3.4	Fuentes de Recopilación de Información	28
3.5	Diseño de la Investigación.....	28
3.5.1	Manejo del Experimento.....	30
3.5.1.1	Aislamiento e Identificación de <i>Pseudomonas</i> spp de Cultivares Nativos de <i>Musáceas</i>	30
3.5.1.2	Selección de Colonias Fluorescentes y Extracción de ADN genómico	30
3.5.1.3	Amplificación y Recuperación del ARN ribosomal 16S.....	31
3.5.1.4	Detección de Proteasa en <i>Pseudomonas</i> spp	31
3.5.1.5	Identificación del Cianuro de Hidrogeno (HCN) en <i>Pseudomonas</i> spp con Actividad Proteolítica	32
3.5.1.6	Obtención de Sobrenadantes de <i>Pseudomonas</i> spp con Actividad Proteolítica ...	32
3.5.1.7	Aislamiento e Identificación de <i>M. fijiensis</i>	32
3.6	Instrumento de Investigación	33
3.7	Tratamientos Evaluados	33
3.7.1	Ensayo antagonista a Germinación de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	35
3.7.2	Ensayos antagonistas Evaluados por Absorbancia al Desarrollo Micelial de <i>M. fijiensis</i>	35
3.7.3	Ensayo Antagonista de Inhibición de Crecimiento en Diámetro de Micelio <i>M. fijiensis</i>	36
3.8	Recursos Humanos y Materiales	36
3.8.1	Material de Laboratorio	36
3.8.2	Reactivos de Laboratorio.....	37
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		38
4.1	Resultados.....	39

4.1.1	Aislamiento e Identificación de <i>Pseudomonas</i> spp de Cultivares Endémicos de Musáceas.....	39
4.1.2	Identificación por Caracteres Morfológicos y Bioquímicos de <i>Pseudomonas</i> spp.	40
4.1.3	Amplificación y Recuperación del Amplicón de 1500 pb al Gen del ARN ribosomal 16S	44
4.1.4	Aislamiento e Identificación del Hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	45
4.1.5	Evaluación del Efecto Antagonista de los Sobrenadantes en la Germinación de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	46
4.1.6	Inhibición de Crecimiento Micelial de <i>M. fijiensis</i>	49
4.1.7	Efecto Antagónico del Sobrenadante al Crecimiento en Diámetro del Micelio <i>M. fijiensis</i>	51
4.2	Discusión	53
4.2.1	Aislamiento e Identificación de Cultivo de Cepas de <i>Pseudomonas</i> desde Muestras de las Raíces de Musáceas	53
4.2.2	Evaluación por Caracteres Morfológicos y Bioquímicos de las <i>Pseudomonas</i> spp.	53
4.2.3	Obtención de Bandas del ARN ribosomal 16S.....	55
4.2.4	Aislamiento e Identificación de <i>M. fijiensis</i>	55
4.2.5	Efecto Antagónico de los Sobrenadantes en la Germinación de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	56
4.2.6	Inhibición de Crecimiento Micelial de <i>M. fijiensis</i>	57
4.2.7	Efecto Antagónico del Sobrenadante al Crecimiento en Diámetro del Micelio <i>M. fijiensis</i>	57
CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		59
5.1	Conclusiones.....	60
5.2	Recomendaciones	61

CAPITULO VI BIBLIOGRAFÍA	62
6.1 Bibliografía.....	63
CAPITULO VII ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Características agroclimáticas y distribución geográfica de zonas de recolección de muestras.....	27
Cuadro 2	Esquema del Análisis de varianza.....	28
Cuadro 3	Esquema del Análisis de varianza.....	29
Cuadro 4	Esquema del Análisis de varianza.....	29
Cuadro 5	Tratamientos y dosificación para germinación de ascosporas.....	34
Cuadro 6	Tratamientos y dosis para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial.....	34
Cuadro 7	Tratamientos y dosis para evaluación de inhibición de crecimiento en diámetro de micelio <i>M. fijiensis</i>	35
Cuadro 8	Obtención de cepas de <i>Pseudomonas</i> desde muestra de raíces de <i>Musáceas</i>	39
Cuadro 9	Identificación morfológica y bioquímica de <i>Pseudomonas</i> spp.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Detección de la enzima proteasa en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	43
Figura 2	Amplificación del gen <i>hcnABC</i> por PCR en <i>P. fluorescens</i>	44
Figura 3	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra la amplificación del ARNr 16S mediante PCR de 10 <i>P. fluorescentes</i>	44
Figura 4	Electroforesis del gen ARNr 16S purificado.....	45

Figura 5	Aislamiento de cultivos monoascospóricos de <i>M. fijiensis</i>	45
Figura 6	Identificación de <i>M. fijiensis</i> mediante PCR.....	46
Figura 7	Efecto de los sobrenadantes en la germinación de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	48
Figura 8	Crecimiento micelial de <i>M. fijiensis</i> en cubetas de espectrofotómetro para medir el OD.....	51
Figura 9	Inhibición de crecimiento micelial de <i>M. fijiensis</i> en placas de Petri a los 12 días de inoculación.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1	Evaluación del efecto de sobrenadantes de <i>Pseudomonas</i> en la germinación de ascosporas	43
Grafico 2	Evaluación del crecimiento micelial de <i>M. fijiensis</i> mediante OD.....	44
Grafico 3	Inhibición de crecimiento micelial de <i>M. fijiensis</i>	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Identificación de caracteres morfológicos y selección de <i>P. fluorescens</i> ...	73
Anexo 2	Protocolo de extracción de ADN bacteriano.....	73
Anexo 3	Protocolo del kit de purificación Pure-Link Invitrogen.....	77
Anexo 4	Obtención de los sobrenadantes de las <i>Pseudomonas fluorescens</i>	78
Anexo 5	Aislamiento del hongo <i>M. fijiensis</i>	79
Anexo 6	Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit.....	79
Anexo 7	Conteo de germinación de ascosporas.....	81

Código Dublín

Título:	“Identificación y selección de rizobacterias del género <i>Pseudomonas</i> spp de cultivares endémicos de <i>Musa</i> spp con actividad antagonista al hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ”.		
Autor:	Chávez Arteaga Karen Tatiana		
Palabras clave:	Rizobacterias	<i>M. fijiensis</i>	Actividad antagonista
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2016		
Resumen: (hasta 300 palabras)	Resumen.- La constante aplicación de fungicidas para el control de <i>M. fijiensis</i>, ha ocasionado que este patógeno adquiera resistencia. El uso de biocontroladores en la agricultura ofrece una alternativa para beneficiar los aspectos fisiológicos y a su vez la reducción del uso de agroquímicos. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar rizobacterias nativas de <i>Pseudomonas</i> spp por caracteres morfológicos y bioquímicos de actividad antagonista hacia el hongo. Se analizó un conjunto de 50 cepas provenientes de las provincias Los Ríos (Quinsaloma y Patricia Pilar), Cotopaxi (La Maná) y Bolívar (Las Naves), que fueron inoculados para identificar sus caracteres morfológicos. Las colonias que emitieron fluorescencia fueron seleccionadas y analizadas para detección de proteasa y la identificación del antibiótico Cianuro de hidrogeno (HCN). Los sobrenadantes se obtuvieron de las cepas proteolíticas mediante el proceso de centrifugación. Para el aislamiento de <i>M. fijiensis</i> se realizó descargas de ascosporas para la obtención de cultivos monoascospóricos. Se estudió un solo factor, las rizobacterias, se realizaron tres ensayos: 1) Ensayo antagonista de germinación de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>, el porcentaje de germinación se determinó contando 10 ascosporas por 0,5 cm²; 2) Ensayo antagonistas evaluados por absorbancia al crecimiento micelial de <i>M. fijiensis</i>, se realizó una concentración de fragmentos miceliales y se evaluó el efecto de los sobrenadantes sobre el crecimiento micelial al 10 % y3) Ensayo antagonista de inhibición de crecimiento en diámetro de micelio <i>M. fijiensis</i>, con la evaluación de inhibición de crecimiento se evaluó al 10 % del sobrenadante. Se empleó el diseño completamente alzar (D.C.A) para evaluar el efecto antagonista de las rizobacterias, se utilizó la prueba de Duncan al 95 %. Se obtuvieron resultados de 20 cepas que emitieron fluorescencia, ocho cepas fueron proteolíticas y en la identificación de HCN fueron cinco. Las <i>P. protegens</i> CHA0 y <i>P. fluorescens</i> PM3-8 mostraron mayor actividad antagónica hacia <i>M. fijiensis</i> en todos los ensayos evaluados.		
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

Introducción

Las musáceas de frutos comestibles, constituye el cuarto rubro alimenticio energético de importancia en el mundo, y primero entre las frutas, al presentar una producción superior a 100 t /año. En el ámbito nacional ocupan el primer lugar, al aportar 44% del volumen total producido en el país (Del Valle, 2006). La superficie sembrada de banano 247.187 hectáreas, (en la Costa 81.43%, en la Sierra 15.36% y en el Oriente 3.21%), mientras que la superficie cosechada es de 232,409 hectáreas (Costa 81.46%, Sierra 15.33%, Oriente 3%). Sus productores solos a nivel nacional son 75.815 de la unión de producción agropecuaria y al igual que sus productores asociados a nivel nacional de la unión de producción agropecuaria 75.814 (Barcia, 2012).

La Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis*, es el principal problema patológico del cultivo de los banano y plátano en América, Asia y África (Echeverría, 2015). Debido a sus características biológicas de mayor producción de ascosporas, mayor número de ciclos sexuales por año y una tasa elevada de colonización de tejidos, la Sigatoka negra logra rápidamente predominar sobre otras enfermedades foliares del banano menos agresivas (Echeverría, 2015).

El combate químico es la principal herramienta para el manejo de la Sigatoka negra. Se realiza mediante la aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectores y sistémicos. Los fungicidas protectores son de acción multisitio (bajo o nulo riesgo de resistencia) y se incluyen en este grupo el mancozeb y el clorotalonil (Romero, Díaz, Castañeda, & Arango, 1999). Los sistémicos son de acción sitio-específico (moderado a alto riesgo de resistencia) e incluyen fungicidas de grupos como benzimidazoles, aminas, triazoles, estrobirulinas y anilino pirimidinas (Romero *et al.*, 1999).

El desarrollo de resistencia por el hongo a los fungicidas antes mencionados, ha incrementado el uso de aminas y anilino pirimidinas, lo cual se vislumbra como un riesgo, debido al aumento en la presión de selección que se ejerce sobre el patógeno (Lepoivre, 2003).

Las motivaciones principales para el desarrollo actual de sistemas de control biológico es la reducción de utilización de plaguicidas químicos. La preocupación que comienza a existir actualmente sobre la salud, seguridad y medio ambiente, y los efectos negativos de

los productos químicos utilizados por la agricultura en las aguas, suelos y alimentos, requieren una disminución en el uso de dichos fungicidas (Bach T. , Díaz, Ferreira , & Laurent, 2007).

El control biológico es de importancia en sistemas donde el control químico no es económico o efectivo, y también puede reducir otros problemas asociados con determinados sistemas de control químico, como son el desarrollo de resistencia del patógeno, reducción de poblaciones de microorganismos benéficos y la creación de vacíos ecológicos (Bashan & Holguin, 1998).

La búsqueda de rizobacterias nativas de suelo endémicos de cultivos de *Musáceas* spp, es el inicio para verificar actividad antagonista *in vitro* a *M. fijiensis*, por efecto de producción de metabolitos secundarios con actividad proteolítica o antibióticos. La selección de estos microorganismos contribuye al desarrollo de temas de investigación al control biológico, y reemplazar la matriz productiva al reducir la dependencia al empleo de fungicidas.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Problema de Investigación

1.1.1 Planteamiento del Problema

El uso excesivo de fungicidas para el control de Sigatoka negra ha ocasionado que genere resistencia hacia el hongo *M. fijiensis*. Las aplicaciones de estos agroquímicos influyen en la pérdida de la biodiversidad de los microorganismos que habitan en el suelo. Los suelos destinados para la agricultura, se encuentran constituidos por una gran diversidad de rizobacterias que benefician los aspectos fisiológicos que favorecen al desarrollo de las plantas por la producción de metabolitos secundarios y simultáneamente ejercen el control de agentes patogénicos incrementando el impacto ambiental de estos agroquímicos que contribuyen a la contaminación de los principales recursos no renovables como es el agua, aire y suelo.

Diagnostico

El hongo *M. fijiensis*, daña los tejidos foliares de los bananos comerciales donde para combatir la proliferación de la enfermedad se requiere de una diversidad de productos agroquímicos. Para esto se realizó un escrutinio y selección de *P. fluorescens* productoras de metabolitos secundarios que ejerzan una actividad antagónica. La producción de estos metabolitos secundarios, es necesario corroborar la actividad antagónica hacia *M. fijiensis*, para su aplicación *in vitro*.

Pronostico

En este trabajo de investigación es necesario identificar y obtener rizobacterias con producción de metabolitos secundarios, que lideren un efecto antagónico hacia *M. fijiensis* en condiciones *in vitro*. El problema estaría basado al no verificar actividad antagónica por los sobrenadantes hacia la germinación de las ascosporas del hongo y la inhibición de crecimiento de micelio del mismo.

1.1.2 Formulación del Problema

¿Cuál de los sobrenadantes obtenidos de las rizobacterias de *P. fluorescens* mantienen actividad antagónica hacia *M. fijiensis*?

1.1.3 Sistematización del Problema

¿Cuál es el efecto de los metabolitos secundarios sobre la germinación de las ascosporas?

¿Qué tratamiento tendrá mayor efecto antagónico hacia el crecimiento micelial de *M. fijiensis*?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Identificar rizobacterias nativas de *Pseudomonas* spp. de actividad antagonista hacia el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Aislar *Pseudomonas* spp de la rizósfera de cultivares endémicos de Musáceas.
- Identificar por caracteres morfológicos y bioquímicos de la *Pseudomonas* spp nativas.
- Obtener el producto por amplificación del gen ARN ribosomal 16S de *Pseudomonas* spp nativas.
- Verificar los sobrenadantes producidos por *Pseudomonas* spp con mayor actividad antagonista a *Mycosphaerella fijiensis in vitro*.

1.3 Justificación

A nivel mundial el banano, es considerado uno de los cultivos comerciales de mayor trascendencia socio-económica debido a que, por un lado, sus frutos constituyen un alimento básico para millones de personas; por otro lado, constituye una fuente generadora de altos ingresos económicos (Bornacelly, 2009). Las plantaciones comerciales de banano están sometidas al efecto de una serie de problemas fitosanitarios entre los cuales se destaca la Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, al cual se caracteriza por daños directos que ocasiona en el follaje de la planta y por los efectos indirectos sobre la cantidad y calidad de la fruta ocasionando pérdidas entre el 40 y 100 % o, en su defecto, incremento considerable de los costos de producción por el mayor número de ciclos que es necesario aplicar, cada año, para contrarrestar la agresividad del patógeno. (Belalcázar & Merchán, 1991).

La necesidad de buscar alternativas que sean viables para productores dan la iniciativa para evaluar la actividad antagonista de rizobacterias, que beneficiarían en el futuro a un gran número de productores y comercializadores, ya que se daría a conocer un método para combatir o controlar al agente causal de la enfermedad Sigatoka negra como es el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

Tomando en cuenta el alto índice de incidencia y severidad de Sigatoka negra en nuestro país y en los otros países productores de Musáceas, se hace necesario el estudio de alternativas de producción que sean sostenibles y sustentables. Al impulsar la utilización de biocontroladores en la agricultura se ofrece una alternativa para beneficiar los aspectos fisiológicos que favorecen el desarrollo de las plantas, así como también la reducción del uso de agroquímicos y por consiguiente asegurar la biodiversidad y salud humana.

CAPITULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Marco Referencial

2.1.1 Musáceas

Las musáceas se cultivan alrededor de 10 millones de hectáreas, principalmente por pequeños agricultores en países tropicales, constituyéndose en un rubro de importancia socio-económica, capaz de generar gran movimiento de divisas en los mercados nacionales e internacionales, y su importancia, no solo está basada en su uso como postre, con alto valor nutritivo y energético, sino también como viandas, que forman parte de la dieta humana. Son alimentos básicos para más de 400 millones de personas (Del Valle, 2006).

2.1.1.1 Clasificación

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Zingiberales

Familia con tres géneros y cerca de 42 especies: *Musa* (35 especies), *Ensete* (7 especies), *Musella* (1 sola especie *Musella lasiocarpa*). Algunos géneros son cultivados a través de los trópicos como producto alimenticio y algunas veces como ornamentales.

2.1.1.2 Características

Son hierbas monoicas, terrestres, de grandes a gigantes, el tallo subterráneo, fuerte y grueso (Stevens, Ulloa, Pool, & Montiel, 2001). Las hojas son simples, las vainas largas y sobrepuestas hasta formar un “pseudotallo” de tamaño que va desde los 0.6 hasta 10 metros, pecioladas, oblongas, enteras y ampliamente elípticas con una nervadura paralelipinnadas (Hammel, Grayum, & Zamora, 2003). La inflorescencia son espiciformes que crecen desde el corno a través del pseudotallo y parecen terminales, flores encima a lo largo del eje principal, abrazadas por brácteas grandes (Stevens, Ulloa, Pool, & Montiel, 2001). La fruta es una baya carnosa con el pericarpio fuerte (Hammel *et al.* , 2003).

2.1.1.3 Géneros

Existen el género *Ensete* estas mueren después de la floración; *Musella* es una planta pequeña de unos 60 cm de altura y la base del pseudotallo es de 15cm de diámetro; *Musa* es el género de mayor importancia económica a nivel mundial, se reconoce fácilmente por sus laminas foliares grandes, espiralmente dispuestas y pinnadas nervadas, y flores unisexuales. Dentro del mismo género se encuentran especies de gran importancia, estas son:

Musa acuminata: se las conoce como guineo, banano enano, guineo colorado, guineo de seda, entre otros. Presentan hábitat de bosques húmedos, de 0 a 1200 metros de altura. Presentan pseudotallos de 3-7 metros, hojas con peciolo glauco, inflorescencia horizontal con brácteas ovaladas rojo brillante a violeta. Frutos maduros generalmente de 8-13 por 1,5-3cm de color amarillo rara vez rojos (Hammel *et al.* , 2003).

Musa x paradisiaca balbisiana: se les llama plátano, guineo negro, entre otros. Presentan hábitat de bosques húmedos, ampliamente cultivada en plantaciones y patios de 0-1300 metros de altura, pero también son idóneos para prosperar en partes más secas. Pseudotallos de 4-8 metros, inflorescencia horizontal o curvada hacia abajo con flores estériles, brácteas purpuras débilmente ribeteadas, frutos maduros 12-15 cm de verdes a amarillos (Hammel *et al.* , 2003). Las musáceas son susceptibles a la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, siendo esta el principal limitante en el aspecto del crecimiento de la planta y la producción a nivel mundial.

2.1.2 Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*)

La Sigatoka negra es una enfermedad que deteriora el área foliar de la planta, retrasa la floración y la cosecha y reduce tanto el llenado del racimo como la vida verde de la fruta (Lepoivre, 2003). A diferencia de la respiración, la tasa de fotosíntesis aparente, generalmente decrece en las hojas infectadas. (Belalcázar & Merchán, 1991). Las esporas de *M. fijiensis* germinan especialmente sobre la superficie abaxial de las hojas, penetran con sus hifas los estomas e inician con ello un proceso rápido de colonización del mesófilo foliar en los genotipos susceptibles. La penetración mecánica del ostiolo por parte del

hongo compromete el proceso de la fotosíntesis al reducir la conductividad estomática de la cual depende la tasa fotosintética (Belalcázar & Merchán, 1991). Esta vía de entrada de *M. fijiensis* a las hojas ocurre aún en los cultivares que muestran una alta resistencia a la enfermedad (Lepoivre, 2003). En las enfermedades foliares, cada uno de los procesos que gobiernan el flujo de carbono vegetal (fotosíntesis, respiración, transporte) pueden ser afectados, con el resultado final de favorecer la economía del carbono del parásito involucrado (Daly, 1976).

2.1.2.1 Agente Causal

El agente causal de la Sigatoka negra de bananos y plátanos (*Musa* spp.), presenta en su ciclo de vida, un estado perfecto que es la fase ascógena o sexual y un estado imperfecto que es la fase conídica o asexual. El hongo *M. fijiensis*, es el estado perfecto y pertenece a la clase Ascomycetate; el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, es el estado imperfecto y pertenece a la clase Hyphomycetae (Orozco, Rodríguez, & James, 2005).

2.1.2.2 Estado Sexual

Se caracteriza por la formación de pseudotecios, espermagonios y ascosporas. El pseudotecio y espermagonio ocurren en proporciones variables durante los estados 2 y 3 de desarrollo de los síntomas. Los espermagonios son más abundantes en el envés de la hoja y frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomática: constituyen la parte masculina y en estado maduro contienen espermatida en forma de bastoncillos o varillas hialinas que actúan como gametos, que fertilizan a los peritecios que aparecen en los estados 5 y 6 del desarrollo de la enfermedad (Meredith & Lawrence, 1969).

Los pseudotecios son estructuras anfígenas, globosas con un ostiolo esférico papilado, de paredes pardo oscuras y células poligonales, ligeramente hundidos en el tejido de la hoja. Se presentan más frecuentemente en el envés de las hojas y en su estado maduro contienen numerosas ascas bitunicadas que contienen ocho ascosporas cada una, como resultado del proceso sexual (Orozco *et al.*, 2005).

Las ascosporas son hialinas, fusiformes, biseradas, septadas con una constricción leve al nivel del septo y clavadas en el asca con la parte más grande o prominente de la célula. El

tamaño de las ascosporas es de 11.5 a 15.6 x 2.5 a 5.0 μm con un promedio de 13.7 x 3.7 μm (Mulder & Stover, 1976). Germinan en ambos lados de la superficie de las hojas y penetran al tejido del hospedero a través de los estomas.

Las hojas infectadas densamente, liberan las ascosporas durante un periodo de dos a cuatro semanas más que cuando las hojas se cortan (saneamiento) y se colocan en el suelo (Marín, Romero, & Guzmán, 2003). Las ascosporas son la fuente principal de inóculo de la enfermedad (Stover, 1980), puesto que son diseminadas por el viento y depositadas principalmente en la hoja y en las cuatro hojas más jóvenes de la planta (Marín, Romero, & Guzmán, 2003).

En relación a las características de las colonias provenientes de ascosporas cultivadas *in vitro* en medio papa-dextrosa-agar (PDA), se ha observado que después de 14 días de crecimiento a una temperatura de 26°C y con un fotoperiodo de 12 h, presentan un color gris-oscuro a blanco rosado, de forma esférica o con zonas irregulares y una consistencia algodonosa o compacta con manejo rústico, semintensivo o intensivo (Orozco *et al.*, 2005).

2.1.2.3 Estrategias para el Control de Sigatoka Negra

a) Control químico

El control químico de la enfermedad está fundamentado en la utilización de productos fungicidas los cuales deben ser aplicados estratégicamente según su modo de acción. Los fungicidas deben ser aplicados en mezclas con aceite mineral para aprovechar el efecto fungistático de este. Los métodos de aplicación de los tratamientos pueden ser terrestres con la utilización de motobombas y aplicaciones aéreas, con avionetas o helicópteros. Ambos métodos tienen ventajas y desventajas que pueden ser aprovechadas y corregidas, según conveniencia del productor (Stover R. , 1986).

b) Control mecánico

Las practicas agronómicas juegan un papel fundamental importante en el estado fisiológico y sobre el ambiente microclimático dentro de las plantaciones, que puedan crear condiciones desfavorables a la enfermedad. Las más importantes son:

Deshije: Esta práctica consiste en la eliminación de todos los hijos y rebrotes que puedan alterar la densidad de población deseada y lograr una frecuencia en la producción de cada unidad o cepa (Tumbaco & Jimenez, 2010).

Saneamiento: La poda sistemática cada siete o diez días de hojas o fracciones con lesiones maduras, reduce el periodo durante el cual estas hojas producen inóculos y tienen un importante impacto en la calidad de ascosporas que potencialmente alcanzan las nuevas hojas que emergen. Las hojas podadas depositadas en el suelo se descomponen rápidamente y como promedio, se acorta la duración del periodo de producción de ascosporas de estas entre seis y ocho semanas, en relación con las que quedan colgantes en las plantas. Además de esto, la superposición de hojas en el suelo reduce mecánicamente la superficie esporulativa de las hojas, reduciendo la disponibilidad del inóculo (Tumbaco & Jimenez, 2010).

Manejo y distribución de desechos: el material vegetal de desecho, producto de prácticas de deshije, deshoje y restos de cosecha, es conveniente repicarlos y distribuirlos uniformemente dentro de la plantación y evitar al amontonamiento para contribuir así a la descomposición rápida que reintegrara materia orgánica al suelo, además de favorecer la retención de humedad y retardar el crecimiento de las malezas (Tumbaco & Jimenez, 2010).

c) Control biológico

Investigaciones dirigidas al desarrollo de métodos de control biológico para la Sigatoka negra han sido limitadas porque los controles químicos, que son altamente efectivos y económicos, están ampliamente disponibles a los productores comerciales. Aunque los métodos de control biológico son deseables principalmente para la protección del ambiente, su aplicación con éxito probablemente será difícil porque la Sigatoka negra es una enfermedad policíclica y el tejido susceptible del bananero está presente todo el año. Se han probado varias bacterias epífitas (incluyendo *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia spp*) para el control de *M. fijiensis*, pero aun la investigación del control biológico está en sus etapas preliminares (Bashan & Holguin, 1998).

En el Ecuador existen aproximadamente unas 150.000 ha de banano, ubicadas en la región Litoral o Costa, particularmente en las provincias de Los Ríos (45.000 ha), Guayas (43.000 ha) y El Oro (44.000 ha); unas con alta tecnología y otras de mediana a baja tecnología, infectadas con Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). La variabilidad del clima ha hecho que la Sigatoka negra tenga un comportamiento diverso. Por lo que, la enfermedad ha sido más severa en las plantaciones comerciales de la provincia de Los Ríos mientras que es menos, en las de El Oro. Sin embargo, en los últimos dos años la situación ha sido a la inversa (Rivas & Rosales, 2003).

Después de la presencia de la corriente de El Niño en el Ecuador en el año 1998, la Sigatoka negra se puso muy agresiva y como consecuencia de ello, muchos programas de control de la enfermedad, fracasaron; y las bananeras virtualmente se quemaron, perdiéndose mucha fruta para la exportación; con consecuencias económicas graves para la economía de los productores (Rivas & Rosales, 2003). Con estos antecedentes se tuvo como uno de sus principales objetivos determinar nuevas alternativas de control para esta enfermedad, siendo una de ellas el control biológico e impulsar la utilización de biocontroladores como son las rizobacterias (García, 2007).

2.1.3 Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés, que viene de la denominación Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) tienen tres características: 1) capacidad para colonizar la raíz, 2) sobrevivir y multiplicarse en microhábitats asociados a la superficie radical en competencia con la microbiota nativa, al menos con tiempo para expresar su actividad promotora de crecimiento y 3) poseer capacidad para promover dicho desarrollo (García, 2007).

Estos microorganismos del suelo son capaces de producir efectos benéficos en estadios tempranos de las especies vegetales, mejorando el desarrollo de la biomasa de las raíces y brotes en plantas, aumentando la germinación de las plántulas, vigor, altura, contenido de nutrientes, presencia de clorofila, acelerando el tiempo de floración y brindando protección frente a fitopatógenos radicales. Entre los géneros bacterianos que han sido descritos como PGPR se encuentran *Pseudomonas* y *Bacillus* (Weller, 1988.).

También se las define como las bacterias de vida libre, encontradas en la rizósfera de las plantas como PGPR, éstas demostraron ser organismos altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar sus defensas frente a otros microorganismos causantes de enfermedades (Bach, Díaz, Ferreira , & Laurent, 2007).

Dado al gran desarrollo que en las últimas décadas han tenido los estudios relacionados con este tipo de bacterias y su uso en la agricultura, se ha propuesto la separación en dos grupos, uno que enmarca solamente a las bacterias que inciden en el crecimiento vegetal y que se han dado a llamar Bacterias Promotoras del Crecimiento (PGPB, por sus siglas en inglés, que viene de la denominación Plant Growth Promoting Bacteria) y otro que incluye aquellas bacterias que controlan fitopatógenos, ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta y a las que se les denominan Biocontrol-PGPB. Esta forma de clasificación permite la inclusión en el primer grupo a aquellas bacterias asociativas, fijadoras de nitrógeno. La polémica en cuanto a los términos continúa y por el momento, se sigue reconociendo, de forma general, a este tipo de bacterias beneficiosas como PGPR (Bashan & Holguin, 1998).

Uno de los requerimientos más importantes para que una bacteria sea considerada como PGPR es el tiempo de permanencia en la rizósfera después de la inoculación. Una población introducida que declina rápidamente en el tiempo, tendrá una baja habilidad de competencia con la flora nativa. Otra característica, no menos importante, es la posibilidad de colonizar la superficie de las raíces para ejercer un efecto fisiológico directo sobre el crecimiento de las plantas. Por último, que esas PGPR utilizadas no provoquen daño ni al suelo, ni a las plantas, ni a los animales y al hombre (Bach & Díaz, 2009).

Desde hace varias décadas, se vienen desarrollando estudios sobre cómo y porqué estas PGPR son beneficiosas a las plantas. Se conoce que la estimulación se desarrolla a través de dos mecanismos fundamentales, uno directo y otro indirecto (Bashan & Holguin, 1998).

Estimulación directa: El metabolito producido por la bacteria es capaz de estimular el crecimiento del vegetal. A través de este mecanismo se desarrollan procesos tales como:

- **Fijación de nitrógeno.** Las leguminosas tienen la capacidad de establecer una asociación simbiótica con las bacterias de la familia Rhizobiaceae comúnmente conocidas como Rhizobius. Estas bacterias inducen en la planta la formación de estructuras especializadas, denominadas nódulos, en donde se alojan como simbioses intracelulares y fijan nitrógeno atmosférico que es utilizado por la planta (Bach & Díaz, 2009). Por medio del manejo de los sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno (Rhizobium-leguminosa, Frankiacasuarina, Anabaena-Azolla) es posible contribuir al enriquecimiento de la fertilidad del suelo. Existen otras PGPR de vida libre capaces de reducir el nitrógeno atmosférico. Tal es el caso de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Beijerinckia*, entre otras. Todas ellas además, poseen otros mecanismos tan o más importantes con los cuales aumentan la productividad de los cultivos (Bach & Díaz, 2009).

- **Producción de sustancias reguladoras del crecimiento.** El desarrollo vegetal se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas que activan o inhiben determinados procesos fisiológicos. Estas sustancias se denominan fitohormonas, que se definen como reguladores producidos por las plantas y que a bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de éstas. Dentro de las fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas se destacan las auxinas, las giberelinas y las citoquininas (Bach *et al.*, 2007). La respuesta a cada una de ellas está condicionada por factores externos e internos como la edad de la planta, el estadio fisiológico y las condiciones ambientales, entre otras. Los mecanismos aún no están muy definidos ya que no hay un modo único de acción para cada sustancia (Bach & Díaz, 2009).

Estimulación indirecta: La estimulación es indirecta cuando la bacteria es capaz de liberar una o varias sustancias o metabolitos que intervienen en procesos que mejoran el crecimiento vegetal (Bashan & Holguin, 1998). Los mecanismos fundamentales de estimulación indirecta se pueden resumir en los siguientes:

– **Producción de sustancias que movilizan nutrientes (ácidos orgánicos, enzimas, aminoácidos, entre otras).** Estas sustancias son liberadas al medio y son capaces de movilizar elementos nutricionales como el hierro, el fósforo y el aluminio. Ejemplo de ello, lo constituyen las bacterias solubilizadoras de fósforo, las cuales a través de la secreción de ácidos orgánicos, solubilizan el fósforo mineral y mediante la acción hidrolítica de las enzimas fosfatasas, mineralizan el fósforo orgánico (Bashan & Holguin, 1998).

- **Producción de antibióticos.** La capacidad de las PGPR de generar sustancias antibióticas pueden producir dos efectos antagónicos entre sí: Los procesos inhibitorios que retardan el desarrollo y elongación de las raíces y los que aumentan el crecimiento por inhibición de patógenos (Bashan & Holguin, 1998).
- **Producción de sideróforos.** Los sideróforos son sustancias de bajo peso molecular que tienen alta afinidad por el hierro. En condiciones de escasez de hierro, las bacterias productoras de estas sustancias, secuestran al elemento, convirtiéndolo en factor limitante para grupos de microorganismos patógenos hierro-dependiente (Bashan & Holguin, 1998).
- **Producción de sustancias que inducen la resistencia sistémica en algunas plantas.** Las bacterias PGPR amplifican el mecanismo de la planta para la defensa frente a diferentes enfermedades, fundamentalmente en aquellas que la tienen latente o de expresión lenta (Bashan & Holguin, 1998).
- **Síntesis de sustancias con actividad para el control de patógenos.** Síntesis de enzimas que hidrolizan la pared de algunos hongos que son patógenos y otras sustancias que controlan el desarrollo de plagas (Bashan & Holguin, 1998).

2.1.3.1 Utilización de las PGPR en la Agricultura

La inoculación con bacterias beneficiosas proviene de finales del siglo XIX, donde la práctica de mezclar suelo inoculado de forma natural con semillas, se convirtió en un método recomendado para la inoculación de leguminosas en los Estados Unidos. Más tarde, se registró la primera patente (NITRAGIN) para inoculación de leguminosas con *Rhizobium* sp. y se desarrollaron productos con cepas de *Bacillus megaterium* y *Azotobacter* sp. En los años 70 ocurren los dos mayores descubrimientos relacionados con la tecnología de inoculación: Redescubrimiento del *Azospirillum* y la acción de los grupos de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, como agentes de control biológico (Bach, Díaz, Ferreira , & Laurent, 2007).

2.1.3.2 *Pseudomonas* sp.

Estas bacterias pertenecen al Filo: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Pseudomonadales, Familia: Pseudomonadaceae y Genero: *Pseudomonas*. Sus especies pueden dividirse en dos grandes grupos: fluorescentes y no fluorescentes (Mathus, 2007).

2.1.3.3 *Pseudomonas fluorescens*

Dentro de los microorganismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal se encuentran *Pseudomonas fluorescens* que son bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, cuyas dimensiones están entre 0.5-1.0 x 1.5-5µm, presentan movilidad gracias a que poseen varios flagelos polares, no producen esporas, tienen un metabolismo energético estrictamente aerobio y una nutrición quimiorganótrofa que no requiere factores de crecimiento (Palleroni, 2005).

Sintetizan gránulos de polihidroxiálcanoatos que sirven de reserva de material celular. Producen pioverdina, que es un pigmento soluble en agua, presenta fluorescencia bajo luz ultravioleta, su producción es estimulada cuando el hierro es limitante en el medio, lo que ayuda a sintetizar sideróforos (Arvid , Porto, & Vilariño, 2007). Las condiciones para su crecimiento óptimo son una temperatura entre 25 y 30 °C y pH neutro. Su hábitat generalmente en el suelo y agua, sin embargo, puede estar asociados con alimentos putrefactos (Pérez & Leguizamon, 1998).

2.1.3.4 Mecanismos de Acción de *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens se destaca por su falta de frecuencia de aparición en la rizósfera de las plantas y entre sus mecanismos de acción se encuentran:

Inducción de resistencia sistémica (IRS)

Pueden inducir diferentes mecanismos en las plantas como:

- Inducción de genes de defensa en las plantas colonizadas.

- Acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR-1, PR-2, PR-3) y compuestos fenólicos que contiene grupo o-hydroxio.
- Producción de fitoalexinas.
- Incremento de la actividad peroxidasa, lisozima, fenilalanina amonio liasa (PAL) y ácido salicílico.

La presencia de lipopolisacáridos en las paredes de las células bacterianas que actúan como elicitores e inducen la resistencia frente a ciertas enfermedades (Vidhyasekaran, 2004).

2.1.3.5 Producción de Reguladores de Crecimiento Vegetal

P. fluorescens tiene la capacidad de sintetizar o cambiar la concentración de ciertas sustancias promotoras del crecimiento vegetal, tales como ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas y etileno que pueden facilitar la absorción de nutrientes presentes en la solución del suelo (Vidhyasekaran, 2004).

2.1.3.6 Colonización

Se sabe que *P. fluorescens* se adapta fácilmente al suelo para sobrevivir y colonizar el sistema radicular de las plantas. Este mecanismo inicia con el movimiento flagelar, a mayor motilidad habrá mejor colonización y el grado de infección dependerá de la especie vegetal a la que se asocia y de las condiciones de crecimiento (Pérez, Arias, & Altieri, 2000)

A la vez se presume que la movilidad de flagelos en la rizósfera es influenciada por los exudados radicales (iones, oxígeno libre, agua, enzimas, aminoácidos, mucílago, compuestos fenólicos, entre otros). Esta interacción conocida como quimiotaxis permitirá a las bacterias adherirse a la superficie radical, formar microcolonias o biofilms discontinuos entre los surcos de las células de la epidermis (Bowers, 2003).

Por otra parte, ciertas cepas tienen la capacidad de colonizar endofíticamente, es decir desplazarse entre los espacios intercelulares de las células epidérmicas y de la corteza (Bais, Weir, Perry, & Vivanco, 2006).

2.1.4 Identificación Morfológica de las Bacterias

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos (Henry, 2005). El aislamiento de bacterias en cultivo puro, está compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color (Prescott, Harley, & Lein, 2002).

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. La forma está determinada por los bordes y el grosor de colonia. El borde puede ser liso, entero e irregular; la colonia, plana, convexa o elevada. Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo puede ser de ayuda en el proceso de identificación (Henry, 2005).

2.1.5 Identificación Bioquímica de las Bacterias

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas (Henry, 2005). Otras pruebas requieren para su incubación previa de 18 a 48 h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Henry, 2005).

2.1.5.1 Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios son productos de bacterias que tienden a ser biosintetizados después de que la tasa de crecimiento. Aunque se desconoce en la mayoría de los casos, la función del metabolito secundario, la bioactividad de estos compuestos ha sido explotada

como medicamentos, veneno, agentes saborizantes en alimentos, fitohormonas y otros de aplicación industrial (Chaparro, 2010).

Los metabolitos secundarios poseen las siguientes características:

- Son productos naturales elaborados por grupos microbianos pertenecientes a ciertas especies.
- Generalmente sintetizados como compuestos químicos con diversidad estructural por ejemplo: Alcaloides, flavonoides, Benzoquinonas, glucósidos, tetraciclas, aminoazúcares, etc.
- Parece que no se encuentran relacionados con los procesos de las vías biosintéticas de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polímeros.
- En su mayoría son excretados al exterior, lo que puede estar relacionado con la eliminación de material toxico.
- Producción de compuestos estructurales de cubiertas fúngicas.
- Captación de minerales indispensables para otros microorganismos, lo que los hacemos competitivos.
- La formación de señales de diferenciación (esporulación y acumulación de productos de reserva).
- La producción de elementos que contribuya a la colonización de espacio y nutrientes (antibióticos y toxinas) (Chaparro, 2010).

a) Hidrólisis de la gelatina

Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en la célula bacteriana, por lo que primero deben ser degradadas a polipéptidos y finalmente hasta

aminoácidos, que entrarán en la célula. La gelatina, proteína de estructura sencilla, es un colágeno desnaturalizado que tiene poco valor nutritivo, pero se usa para detectar la actividad proteolítica. Con este test se determina la capacidad de un organismo para producir enzimas de tipo proteolítico, gelatinasas, que licúan la gelatina (UTFSM, 2010). La capacidad de una bacteria de producir proteasa se puede correlacionar con el grado de patogenicidad o virulencia, ya que la enzima permite moverse a través del tejido conectivo en el cuerpo (Vega, 2010).

b) Cianuro de Hidrogeno (HCN)

El cianuro es un inhibidor potente del citocromo c oxidasa, el componente terminal de la cadena respiratoria aerobia en muchos organismos y de varias otras metaloenzimas importantes (Solomonson, 1981).

En *Pseudomonas* spp., la biosíntesis del HCN es catalizada por la enzima de la membrana que limitan la sintasa del HCN, que forma HCNB y CO₂ de glicina (Castric, 1977). La enzima es sensible al oxígeno molecular y sólo parcialmente ha sido purificado por una *Pseudomonas* (Wissing & Andersen, 1981); por lo tanto, poco se sabe acerca de la de la reacción bioquímica enzimática. En *P. fluorescens*, la estructura del gen *hcnABC* que codifican la sintasa HCN se agrupan y probablemente forman un operón (Laville, Blumer, Von , Gaia, Défago, & Hass, 1998). A partir del análisis de secuenciación de datos de los nucleótidos, se puede concluir que la sintasa del HCN esencialmente funciona como una glicina deshidrogenasa/oxidasa (Blumer & Haas, 2000).

2.1.6 Gen del ARN ribosómico 16S

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica de los procariotas (Drancourt, Bollet, & Raoult, 2000).

El ARNr se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el

ARNr 18 S es la macromolécula equivalente. Sus secuencias se encuentran altamente conservadas, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen variaciones que se concentran en zonas específicas (Mignard & Flandrois, 2006).

El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos (Goto, Hara, & Sadie, 2000).

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. En microbiología clínica la identificación molecular basada en ADNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnica resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo (Goto *et al.*, 2000).

2.1.7 Actividad Antagonista de *Pseudomonas* spp *in vitro*

Las rizobacterias que pertenecen al grupo de *Pseudomonas* y especialmente las fluorescentes, son bacterias de gran importancia como colonizadores vegetales (Campbell, 1989). Su importancia radica en que ellas usualmente producen un efecto benéfico sobre las plantas, bien sea como promotores del crecimiento vegetal (Van Overbeek & Van Elsas, 1995) o como inhibidores de crecimiento de algunos hongos o bacterias fitopatógenas (De La Cruz, Poplawsky, & Wiese, 1992).

Los mecanismos sugeridos para lograr tal inhibición incluyen la producción de antibióticos (Hammer & Van Pee, 1997), la producción de compuestos quelantes del hierro (Coyler & Mount, 1984), producción de enzimas (Hammer & Van Pee, 1997) y competencia por sitios nutricionalmente favorables (o ricos en nutrientes) (Suslow & Schroth, 1982).

En el cultivo de fréjol la aplicación de *P. fluorescens* ZUM80 suprimió significativamente el crecimiento de los patógenos *Colletotrichum lindemuthianum* y de aguacate *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phytophthora cinnamomi* (Araya, 2004). La aplicación al suelo de *P. protegens* cepa CHAO produce pioverdines y Ácido salicílico

(SA) e induce resistencia en tabaco contra el virus de la necrosis del tabaco (TNV) (Maurthofer, Hase, & Defago, 1994). La aplicación de PGPR provee resistencia sistémica hacia el virus del mosaico del pepino (CMV) en el cultivo de tomate (Zenhder, Klooper, & Yao, 2001).

Los antibióticos como *pioluteorina* (Plt), *pirrolnitrina* (Prn), *ácido fenazina-1-carboxílico* (PCA) y *2,4- diacetilfloroglucinol* (2,4 DAPG), son los principales controladores biológicos de hongos y bacterias. Por aislamientos directos y técnicas moleculares se ha demostrado que estos antibióticos son producidos en la rizósfera y desempeñan un rol en la supresión de patógenos de plantas en el suelo (Raaijmakers, Weller, & Thomashow, 1997).

CAPÍTULO III

MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Localización

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y de Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

Cuadro 1 Características agroclimáticas y distribución geográfica de zonas de recolección de muestras

Zonas de recolección de las muestras	Condiciones del suelo de los cultivos endémicos				Características agroclimáticas			
	Cultivos endémicos	Localización	Suelo	Topografía	Temperatura (°C anual)	Heliofanía (horas mensual)	Precipitación (mm anual)	Humedad relativa (% mensual)
Los Ríos-Quevedo	Plátano Dominicó	Lat S 01° 01'' Long O 79° 47'' 73 msnm	Franco arcilloso	Regular	24,61	58,57	2441	2441
	Banano Morado y plátano Barraganete	Lat S 01° 20' Long O 79° 45' 34 msnm	Franco arcilloso	Regular	25	60,8	2500	2500
Los Ríos - Patricia Pilar	Plátano Dominicó	Lat O 0° 57' Long O 79° 37' 180 msnm.	Franco limoso-arenoso	Irregular	26,4	53,23	2335	2335
Bolívar - Las Naves	Banano Orito, Almendro y plátano Maqueño	Lat S 1° 28' Long O 79° 31'	Franco arenosa	Ondulada y quebrada	22	74,88	2500	2500
Cotopaxi - La Maná	Banano Morado	Lat S 0° 56' Long O 79° 13' 220 msnm	Arcilloso	Irregular	23	75.7	3000	3000

Fuente: (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial, 2014)

3.2 Tipo de Investigación

Se utilizó el método experimental comparando información existente en la literatura y ensayos anteriores sobre agentes antagonistas, con los resultados que se esperan alcanzar en la identificación concreta de la bacteria eficaces hacia el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

3.3 Método de Investigación

En la investigación se aplicaron los métodos deductivos, analítico y de observación teniendo en cuenta la literatura mencionada en este proyecto.

3.4 Fuentes de Recopilación de Información

Las fuentes utilizadas para la obtención de información fueron secundarias ya que se obtuvieron de: revistas, publicaciones, libros e internet.

3.5 Diseño de la Investigación

a) Diseño para evaluación de germinación de ascosporas

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de los sobrenadantes de las *Pseudomonas* spp hacia el hongo *M. fijiensis*, generando 10 tratamientos de cuatro repeticiones cada uno con dos unidades experimentales.

Cuadro 2 Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	30
Tratamientos	9
Total	39

Elaborado: Autora

b) Diseño para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial de *M. fijiensis*

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de los sobrenadantes de las *Pseudomonas* spp hacia el hongo *M. fijiensis*, generando seis tratamientos de tres repeticiones cada uno con dos unidades experimentales.

Cuadro 3 Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	12
Tratamientos	5
Total	17

Elaborado: Autora

c) Diseño para evaluación de inhibición de crecimiento en diámetro de micelio *M. fijiensis*

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de los sobrenadantes de las *Pseudomonas* spp hacia el hongo *M. fijiensis*, generando seis tratamientos de tres repeticiones cada uno con dos unidades experimentales.

Cuadro 4 Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	12
Tratamientos	5
Total	17

Elaborado: Autora

Las variables en estudio a evaluarse serán sometidas al análisis de varianza y se empleará la prueba de Duncan al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se utilizó Stat Graphics para el correspondiente procesamiento estadístico.

3.5.1 Manejo del Experimento

3.5.1.1 Aislamiento e Identificación de *Pseudomonas* spp de Cultivares Nativos de *Musáceas*

Se recolectó diez muestras de raíces de plantas perteneciente a la familia '*Musáceas*' de cultivares nativos de las provincias; Cotopaxi (banano Morado), Los Ríos (banano Morado, plátano Barraganete y plátano Dominico) y Bolívar (banano Orito, banano Almendro, y plátano Maqueño). Las muestras de raíces fueron almacenadas en bolsas plásticas y transportadas al laboratorio. Las raíces fueron lavadas dos veces con agua estéril y se depositaron en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de tampón (50 ml de agua destilada, 0,01 % de Tween 40) bajo una agitación de 200 rpm por 10 min. Las muestras fueron ubicadas en una solución amortiguadora de fosfato y sal [PBS; K_2PO_4 - KH_2PO_4 10 mM, NaCl 0,14 M, pH 7,2] por 10 min (Canchignia, 2014). Las raíces se cortaron en segmentos de 2 cm acorde a (Souza, Marjan, & Raaijmakers, 2003).

Las muestras de tejido radicular de cada procedencia fueron ubicadas en el medio selectivo King B Liquido (Peptona 20gr, fosfato de potasio 1.5gr, sulfato de magnesio 1.5gr, glicerol 15ml/ 1L), por 24 horas, procediendo al muestreo de 10 μ l del cultivo bacteriano. Se recuperó 4 μ l del crecimiento bacteriano diluido en agua ultra pura al 0.004 %, la muestra fue plaqueada en caja Petri con King B solido (agar 15gr/ 1lt), incubadas a 27 °C por 24 h. Procediendo a la evaluación de los caracteres morfológicos de colonia: circular, puntiforme, irregular y fusiforme; borde de la colonia: entera, ondulado, lobulado y filamentoso; y elevación de la colonia: plana, convexa y elevada (Anexo 1).

3.5.1.2 Selección de Colonias Fluorescentes y Extracción de ADN genómico

Las bacterias fueron seleccionadas por pigmentación fluorescente en King B bajo luz ultravioleta (Kuarabachew, Assefa, & Hiskias, 2007). Las colonias positivas para fluorescencia fueron inoculadas individualmente en placas Petri con King B sólido. Para la extracción de ADNg, la bacteria fue incubada en medio líquido King B a 28 °C en agitación de 150 rpm por 24 h. Se recuperó 1800 μ l de los aislados bacterianos, centrifugado a 10.0 x g por 1 min. Se extrajo el ADNg bacteriano empleando el sistema

MOBIO (USA), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Anexo 2). El ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa, haciendo uso de buffer TAE 1x [Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0,5M].

3.5.1.3 Amplificación y Recuperación del ARN ribosomal 16S

La amplificación de bandas de *Pseudomonas* spp se realizó por PCR, tomando como molde el ADNg extraído previamente. Se llevó a cabo utilizando los partidores universales 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-ACG GCTACCTTGTTACGACTT-3') (Hernández, Morgante, & Seeger, 2008), que amplifica una región específica de la subunidad ribosomal 16S con 1500 pb. El volumen final de cada reacción de PCR fue de 60 µl y contiene 12 µl Buffer (1X), 3.6 µl de MgCl₂, 3 µl de dNTP's, 3 µl / Cada primer, 2.4 µL de Taq pol, 3 µl de ADN, 32.04 µl de H₂O.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 94°C por 2 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C por 30 segundos a 58°C por 30 segundos y 1' 45" minutos a 72°C y una elongación final de 72°C por 5 minutos y 4°C por 5 minutos. (Gachon, Mingam, & Charrier, 2004). Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa, haciendo uso de buffer TAE 1x [Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0,5M]. El producto amplificado se purificó empleando el kit Invitrogen PureLink™. (GERMANY), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Anexo 3).

3.5.1.4 Detección de Proteasa en *Pseudomonas* spp

Las bacterias crecieron en medio King-B líquido a 27 °C por 24 horas a 200 rpm, se recuperó 20µL del crecimiento bacteriano, inoculadas en placas Petri con el medio Gelatin (4g peptona, 1g extracto de levadura, 12g gelatina, 15g agar por litro). Las placas fueron incubadas a 27°C por 48 horas y evaluados por la actividad degradante que es visible a través de la formación de halos claros alrededor de la zona inoculada (Harry & Smith, 2010). Se utilizó cepas control: *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4, *P. fluorescens* WCS 417 y *Bacillus subtilis* ATCC 55405.

3.5.1.5 Identificación del Cianuro de Hidrogeno (HCN) en *Pseudomonas* spp con Actividad Proteolítica

La detección de HCN se realizó por PCR, tomando como molde el ADN_g extraído previamente. Se llevó a cabo utilizando los partidores específicos PM2 (5' TGCGGCATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCTGG 3') y PM7-26R (5' CCGCTCTTGATCTGCAATTGCAGGCC 3') (Svercel, Duffy, & Défago, 2007), con una amplificación de 570 pb. El volumen final de cada reacción de PCR fue de 25 µl y contiene 12.5 µl Platinum SuperFi Green (2X), 1.25 µl/Cada primer, 5 µL de SuperFi (5X), 2 µL de ADN, 3 µL de H₂O.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 94°C por 2 min, para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C por 30 seg a 60 °C por 30 seg y 1 min a 72°C y una elongación final de 72°C por 10 min (Gachon, Mingam, & Charrier, 2004). Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa, haciendo uso de buffer TAE 1.5x [Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0,5M].

3.5.1.6 Obtención de Sobrenadantes de *Pseudomonas* spp con Actividad Proteolítica

Las bacterias crecieron en 50 ml del medio King B líquido a 150 rpm a 27 °C por 48 h, posteriormente centrifugado en tubos falcon de 15 ml a 300 x g por 3 min. Se recuperó el sobrenadante descartando el pellet, este proceso de centrifugación se realizó tres veces. El sobrenadante fue ubicado en tubos eppendorf de 1,5 ml para otro proceso de centrifugación a 10 x g por 3 min. Los sobrenadantes fueron filtrados empleando Nalgene Syringe de 0.2 µm y posteriormente sometidos a un choque térmico de 15 min a 90°C y 15 min a -40°C (Anexo 4).

3.5.1.7 Aislamiento e Identificación de *M. fijiensis*

Se recolectó hojas de musáceas infectadas con Sigatoka negra en estadios 5 o 6. Las muestras fueron limpiadas con hipoclorito y agua estéril 3 veces, las muestras fueron ubicadas en cámaras húmedas por 24 h para la maduración de las ascas y estas procedan

a descargar las ascosporas (Anexo 5). Se cortaron segmentos de hojas de 5 cm², grapadas en papel filtro (10-15 µm) húmedo. Fueron colocadas sobre la tapa de cajas Petri, la base contenía agar agua al 2 %. Las cajas se incubaron por 16 h a temperatura ambiente (Peláez, Vásquez, & Díaz, 2006). Los sitios de descarga de las ascosporas fueron localizados y marcados utilizando un microscopio Olympus BX10. Se “pescaron” las ascosporas con una jeringa de insulina, luego cada ascospora fue inoculada en el medio PDA para la obtención de cultivos monoascospóricos del hongo (Peláez, Vásquez, & Díaz, 2006).

La identificación de *M fijiensis* se realizó por PCR mediante el ADN_g, fue extraído a partir del micelio del hongo empleando el kit QIAGEN-Start Protocol (USA) (Anexo 6), se utilizó el primer específico MF137 (5'GGCGCCCCCGGAGGTCTCCTT 3') y el primer inespecífico R635 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') (Jeger, 1993) que codifica para una región conservada situada en la subunidad 25S del DNA ribosomal (Johanson A. , 1994) con una amplificación de 1018 pb.

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos de 1,5 ml de capacidad con un volumen final de 25 µl que contiene: 12.5 µl Platinum SuperFi Green (2X), 1.25 µl/Cada primer, 5 µl de SuperFi (5X), 2 µl de ADN, 3µl de H₂O. La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 95 °C por 5 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de: 95 °C por 1 minuto a 60°C por 1 minuto y 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 5 minutos y. Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y se tiñó con Bromuro de etidio (0,5 ug/ml) (Johanson A. , 1994).

3.6 Instrumento de Investigación

Estos fueron procedimientos experimentales, análisis de documentos y registro de datos.

3.7 Tratamientos Evaluados

a. Tratamiento para germinación de ascosporas

Para este tipo de investigación se estableció 10 tratamientos y 4 repeticiones.

Cuadro 5 Tratamientos y concentración para germinación de ascosporas

	Tratamientos	Concentración
1	<i>P. fluorescens</i> , cepa BO3-4	0.2 ml
2	<i>P. fluorescens</i> , cepa PM3-14	0.2 ml
3	<i>P. fluorescens</i> , cepa BA4-19	0.2 ml
4	<i>P. fluorescens</i> , cepa PB3-6	0.2 ml
5	<i>P. fluorescens</i> , cepa PM3-8	0.2 ml
6	<i>B. subtilis</i> ATCC 55405	0.2 ml
7	<i>P. fluorescens</i> , cepa WCS417	0.2 ml
8	<i>P. veroni</i> R4	0.2 ml
9	<i>P. protegens</i> , cepa CHA0	0.2 ml
10	Sin bacterias	

Elaborado: Autora

b. Tratamiento para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial

Para este tipo de investigación se estableció 6 tratamientos y 3 repeticiones.

Cuadro 6 Tratamientos y concentración para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial

	Tratamientos	Concentración
1	<i>P. fluorescens</i> , cepa PM3-8	90 µl
2	<i>P. fluorescens</i> , cepa PM3-14	90 µl
3	<i>P. fluorescens</i> , cepa BA4-19	90 µl
4	<i>P. veronii</i> , cepa R4	90 µl
5	<i>P. protegens</i> , cepa CHA0	90 µl
6	Sin bacterias	

Elaborado: Autor

c. Tratamiento para evaluación de inhibición de crecimiento en diámetro de micelio *M. fijiensis*

Para este tipo de investigación se estableció 6 tratamientos y 3 repeticiones.

Cuadro 7 Tratamientos y concentración para evaluación de inhibición de crecimiento en diámetro de micelio *M. fijiensis*

	Tratamientos	Concentración
1	<i>P. fluorescens</i> , cepa PM3-8	0.2 ml
2	<i>P. fluorescens</i> , cepa PM3-14	0.2 ml
3	<i>P. fluorescens</i> , cepa BA4-19	0.2 ml
5	<i>P. veronii</i> , cepa R4	0.2 ml
5	<i>P. protegens</i> , cepa CHA0	0.2 ml
6	Sin bacterias	

Elaborado: Autora

3.7.1 Ensayo antagonista a Germinación de Ascosporas de *M. fijiensis*

De las muestras de tejido foliar de 5 cm², se seleccionó el material con descargas de ascosporas del hongo. Las muestras fueron ubicadas en la placa Petri superior y la base contenía 9.8 ml de agar al 2 % con 0.2 ml del sobrenadante. Se incubaron las placas a 27°C y se evaluó a las 18, 24 y 48 horas. En la base de la caja Petri se adhirió una hoja de acetato milimetrada (5 mm), para efectuar el conteo de las ascosporas germinadas. El porcentaje de germinación se determinó contando 10 ascosporas por cada 0.5 cm² en el microscopio óptico bajo el lente BX10 (Anexo 7).

3.7.2 Ensayos antagonistas Evaluados por Absorbancia al Desarrollo Micelial de *M. fijiensis*

Se recuperó 0.5 cm del micelio cultivados en placas de PDA y re-suspendidas en 500 µl de agua ultra pura, macerando el micelio usando una punta de 1ml en forma de mortero, fue agitado por vortex. La concentración de fragmentos miceliales fueron ajustado con agua a 10 x 10⁴ /ml. (Vásquez & Guzmán, 2009), verificado por cámara Neubauer (fondo del campo central de 0.1 mm y superficie de conteo 0.0025 mm²), en microscopio Olympus BX41 (Canchignia, 2014). Se evaluó el efecto de los sobrenadantes sobre el crecimiento micelial al 10 %, añadiendo 720 µl del medio Sabourand; 90 µl de la suspensión micelial y 90 µl de la concentración de los sobrenadantes de *Pseudomonas* spp con actividad proteolítica. La solución fue ubicada

en cubetas (12x12x45 mm), utilizando 90 µl micelio y 810 µl del medio Sabourand como punto de inicio para la evaluación. El crecimiento micelial fue medido por el aumento de absorbancia determinado en un espectrofotómetro (UNICO) a 600 nm evaluados por 7, 11, 15, 19 y 22 días

3.7.3 Ensayo Antagonista de Inhibición de Crecimiento en Diámetro de Micelio *M. fijiensis*

La evaluación de inhibición de crecimiento se evaluó al 2 % del sobrenadante de *Pseudomonas* spp, en cajas Petri con 9.8 ml de PDA y 0.2 ml del sobrenadante. Fueron ubicados tres discos de agar de 1cm de diámetro del micelio de *M. fijiensis*, incubadas a 27°C. Evaluando el porcentaje de inhibición micelial desde el borde del tarugo hasta el crecimiento del hongo a los 6, 8 y 12 días mediante la fórmula:

$$\% \text{ inhibicion} = \frac{\text{crecimiento del testigo} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{crecimiento del testigo}} \times 100.$$

3.8 Recursos Humanos y Materiales

3.8.1 Material de Laboratorio

- Tubos eppendorf 1,5 ml (6 paquetes)
- Tubos falcon 15 ml
- Tubos de PCR
- Guantes quirúrgicos
- Juego de micro-pipetas (1000 µl, 200 µl, 20 µl y 2 µl)
- Puntas amarillas (200 µl) (10 paquetes)
- Puntas azules (1000 µl) (7 paquetes)
- Kit de extracción de ADN MIO BIO Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, EE.UU.) (3 kits de 50 unidades)
- Kit de purificación de PCR Invitrogen
- Kit de extracción Dneasy Plant QIAGEN
- Filtros de 0,2 µm
- Cubetas para medir turbidez

- Placas Petri desechables (200 unidades)
- Espectrofotómetro
- Electroforesis
- Termociclador

3.8.2 Reactivos de Laboratorio

- Agar (200 g)
- K₂P₀₄ (500 g)
- KH₂PO₄ (500 g)
- MgSO₄ x 7H₂O (500 g)
- Peptona (1000 g)
- Dextrosa (50 g)
- Difco Gelatin (100 g)
- Extracto de Levadura (20g)
- Papa Dextrosa Agar (PDA 400 g)
- Agarosa (50g)
- TRIS (20g)
- EDTA (20g)
- Cloruro de sodio (10g)
- SDS (10g)
- Ácido clorhídrico (5 ml)
- Alcohol 99 (40 L)
- Agua ultra pura libre de Rnasa (1000 ml)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Aislamiento e Identificación de *Pseudomonas* spp de Cultivares Endémicos de Musáceas

Los aislados bacterianos provenían de cultivares endémicos al género *Balbisiana* y *Acuminata*, recuperando 50 cepas de *Pseudomonas* desde la rizósfera. Se obtuvieron diez aislados bacterianos de muestras de raíces del banano Morado (BMR1-1, BMR1-2, BMR1-6, BMR2-1, BMR2-2, BMR2-3, BMR2-4, BMR2-11, BMR2-12, BMR4-2), siete cepas provenientes del banano Orito (BO3-13, BO3-2, BO3-15, BO3-16, BO3-17, BO4-4, BO3-4), nueve aislados bacterianos del de plátano Maqueño (PM3-9, PM3-5, PM3-14, PM4-5, PM3-8, PM4-14, PM4-13, PM4-8, PM5-7), ocho cepas del de banano Almendro (BA5-3, BA4-12, BA4-15, BA4-19, BA4-24, BA5-4, BA4-21, BA5-11).

Cuadro 8 Obtención de cepas de *Pseudomonas* desde muestras de raíces de Musáceas

PROVINCIA	CANTÓN	MUSACEAS	CANT. BACTERIAS	CEPAS
LOS RIOS	Quinsaloma	Banano Morado <i>Musa acuminata</i> 'Red Dacca'	10	BMR1-1, BMR1-2, BMR1-6, BMR2-1, BMR2-2, BMR2-3, BMR2-4, BMR2-11, BMR2-12, BMR4-2
BOLIVAR	Las Naves	Banano Orito	7	BO3-13, BO3-2, BO3-15, BO3-16, BO3-17, BO4-4, BO3-4
BOLIVAR	Las Naves	Plátano Maqueño	9	PM3-9, PM3-5, PM3-14, PM4-5, PM3-8, PM4-14, PM4-13, PM4-8, PM5-7
BOLIVAR	Las Naves	Banano Almendro	8	BA5-3, BA4-12, BA4-15, BA4-19, BA4-24, BA5-4, BA4-21, BA5-11
LOS RIOS	Patricia Pilar	Plátano Dominico <i>Musa cavandanaish</i>	8	PD4-25, PD5-2, PD4-7, PD4-11, PD4-20, PD4-26, PD5-12, PD5-10
COTOPAXI	La Mana	Banano Morado	4	BMCM2-13, BMCM2-14, BMC4-23, BMC4-9
LOS RIOS	Quinsaloma	Plátano Barraganete <i>Musa paradisiaca</i>	4	PB5-6, PB4-6, PB3-6, PB4-1

Elaborado: Autora

Los ocho aislados bacterianos del plátano Dominicó (PD4-25, PD5-2, PD4-7, PD4-11, PD4-20, PD4-26, PD5-12, PD5-10), cuatro cepas de banano Morado (BMCM2-13, BMCM2-14, BMC4-23, BMC4-9) y cuatro aislados bacterianos del plátano Barraganete (PB5-6, PB4-6, PB3-6, PB4-1) (Cuadro 8).

4.1.2 Identificación por Caracteres Morfológicos y Bioquímicos de *Pseudomonas* spp.

De la rizósfera de cultivares endémicos del género *Acuminata* y *Balbisiana*, fueron seleccionados 29 y 21 bacterias respectivamente. La evaluación de los caracteres morfológicos de las 50 cepas, para formación de colonia: 39 de ellas son circular, ocho cepas son puntiforme, una cepa de forma irregular y dos cepas son fusiforme. Para la forma del borde se observaron 44 aislados de borde entero, cuatro cepas de borde ondulado, una cepa con borde lobulado y una cepa de borde filamentosos. Para la elevación de la colonia bacteriana 32 cepas presentaron una elevación plana y 18 aislados tienen una elevación convexa (Cuadro 9).

De las 50 bacterias fueron seleccionadas 20 cepas con pigmentación fluorescente, a cuatro cepas bacterianos de banano Morado (BMR2-2, BMR2-4, BMR2-12, BMR4-2), dos cepas de banano orito (BO4-4, BO3-4), tres cepas de plátano Maqueño (PM3-14, PM4-5, PM3-8), tres cepas de banano Almendro (BA5-3, BA4-12, BA4-19), tres cepas de plátano Dominicó (PD4-25, PD5-2, PD4-7), dos cepas de banano Morado (BMC4-23, BMC4-9) y tres cepas de plátano Barraganete (PB4-6, PB3-6, PB4-1) (Cuadro 9).

Estas cepas fueron seleccionadas para la detección de proteasa, de las cuales cinco aislados bacterianos mostraron a las 24 h una degradación de la gelatina alrededor y bajo de la zona de inoculación (*P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* BA4-19, *P. fluorescens* PB3-6. Las rizobacterias controles con actividad antagonista como: *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* W417. Estas bacterias presentaron un aumento del diámetro con zonas degradadas, a medida que la incubación y el tiempo se extendieron a 48 h (Figura 1).

Cuadro 9 Identificación morfológica y bioquímica de *Pseudomonas* spp

BACT.	MUSACEAS ENDEMICAS		FORMA DE COLONIA					FORMA DE BORDE					ELEVACION			FLUOREST.	PRTASA	H C N	BACT.	MUSACEAS ENDEMICAS		FORMA DE COLONIA					FORMA DE BORDE					ELEVACION			FLUOREST.	PRTASA	H C N
	ACU	BALB	Cr.	Pt.	Ir.	Fs.	Et	Od	Lb	Fl	Pl	Cv	El	ACU	BALB					Cr.	Pt.	Ir.	Fs.	Et	Od	Lb	Fl	Pl	Cv	El							
BMR1-1	+			+			+				+			-				PM4-13		+	+				+			+			-						
BMR1-2	+			+			+				+			-				BA5-3	+		+				+			+			+						
BMR1-6	+		+				+				+			-				PM4-8		+	+					+			+		-						
BMR2-1	+		+				+				+			-				BA4-12	+		+				+			+			+						
BMR2-2	+		+				+				+			+				BA4-15	+				+			+		+	+		-						
BMR2-3	+		+				+				+			-				BA4-19	+		+				+			+		++		++					
BMR2-4	+			+			+				+			++				BA4-24	+		+				+			+		-							
BMR2-11	+		+				+				+			-				BA5-4	+		+				+			+		-							
BMR2-12	+			+			+				+			+				PD4-25		+	+				+			+		-							
BMC2-13	+			+			+				+			-				BA4-21	+		+				+			+		+							
BMC2-14	+			+			+				+			-				PD5-2		+			+			+		+		+		+					
BO3-15	+		+					+				+		-				PD4-7		+	+				+			+		+							
BMR4-2	+		+				+					+		+				BMC4-23	+		+				+			+		+		+					

Bact: bacteria, Acu: *Acuminata*, Balb: *Balbisiana*, Cr: circular, Pt: puntiforme, Ir: irregular, Fs: fusiforme, Et: entero, Od: ondulado, Lb: lobulado, Fl: filamentoso, Pl: plana, Cv: convexa, El: elevada. Fluorest: fluorescente. Prteasa: proteasa.

+: normal ++: mayor producción

BACT.	MUSACEAS ENDEMICAS		FORMA DE COLONIA					FORMA DE BORDE					ELEVACION					FLUOREST.	PRTASA	H C N	BACT.	MUSACEAS ENDEMICAS		FORMA DE COLONIA					FORMA DE BORDE					ELEVACION					FLUOREST.	PRTASA	H C N
	ACU	BALB	Cr.	Pt.	Ir	Fs	Et	Od	Lb	Fl	Pl	Cv	El	ACU	BALB	Cr.	Pt.					Ir	Fs	Et	Od	Lb	Fl	Pl	Cv	El											
BO3-16	+		+				+					+		-				BMC4-9	+		+				+			+		+											
BO3-17	+		+				+					+		-				PD4-11		+	+				+			+		-											
BO3-13	+		+				+					+		-				PD4-20		+	+				+			+		-											
BO3-2	+		+				+					+		-				PD5-10		+	+				+			+		-											
PM3-5		+	+				+					+		-				PB5-6		+	+				+			+		-											
PM4-5		+		+			+					+		+				PM5-7		+	+				+			+		-											
PM3-8		+		+			+					+		++		++	+	PB4-6		+	+				+			+		+											
PM3-14		+	+					+				+		++		++	+	PB3-6		+	+				+			+		++		++	+								
PM4-14		+	+				+				+			-				PB4-1		+	+				+			+		+											
P. fluo CHA0			+				+				+			++		++	+	P. fluo W417			+				+			+		++		++									
P. vroni R4			+				+				+			++		+		B. subtilis					+			+		+													

Bact: bacteria, Acu: *Acuminata*, Balb: *Balbisiana*, Cr: circular, Pt: puntiforme, Ir: irregular, Fs: fusiforme, Et: entero, Od: ondulado, Lb: lobulado, Fl: filamentoso, Pl: plana, Cv: convexa, El: elevada. Fluorest: fluorescente, Prteasa: proteasa.

+: normal ++: mayor producción

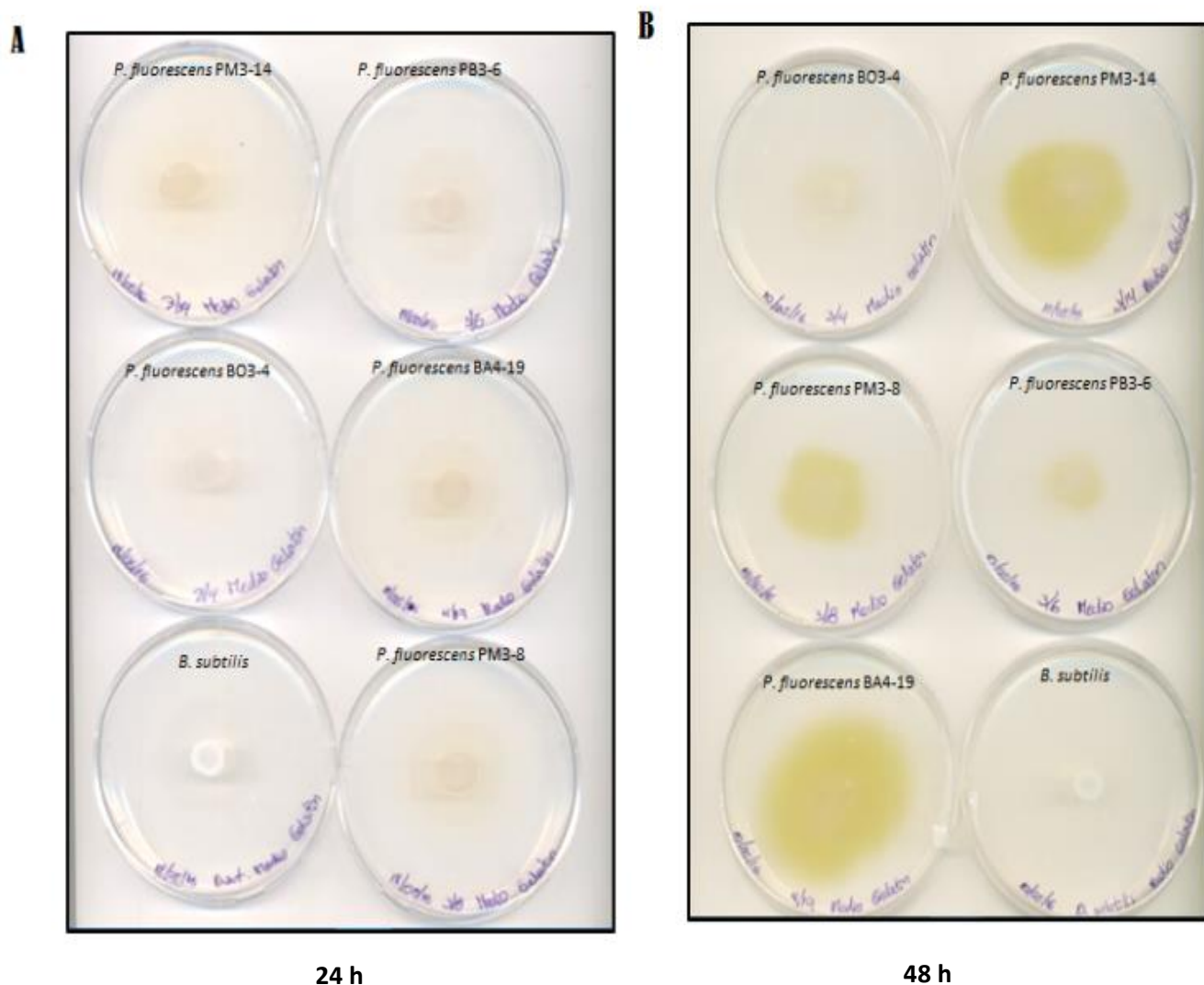


Figura 1 Detección de la enzima proteasa en *Pseudomonas fluorescens*. A y B, se visualizaron los aislados bacterianos en placas Petri con agar-gelatina incubadas por 24h y 48h a 27°C.

La presencia del gen *hcnABC* que codifica la enzima sintasas responsable de la producción de HCN (Haas & Defago, 2005), fue analizado a partir del DNA genómico de los aislados que presentaron la enzima proteasa y la cepa de referencia *P. protegens* CHA0. Con el empleo de los partidores (PM2 y PM7-26R), se genera un amplicón de 570pb del gen *hcnABC*, para las cepas *P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* PB3-6 y *P. protegens* CHA0, sin producto de amplificación en las cepas *P. fluorescens* BA4-19 y *P. veronii* R4 (**Figura2**).

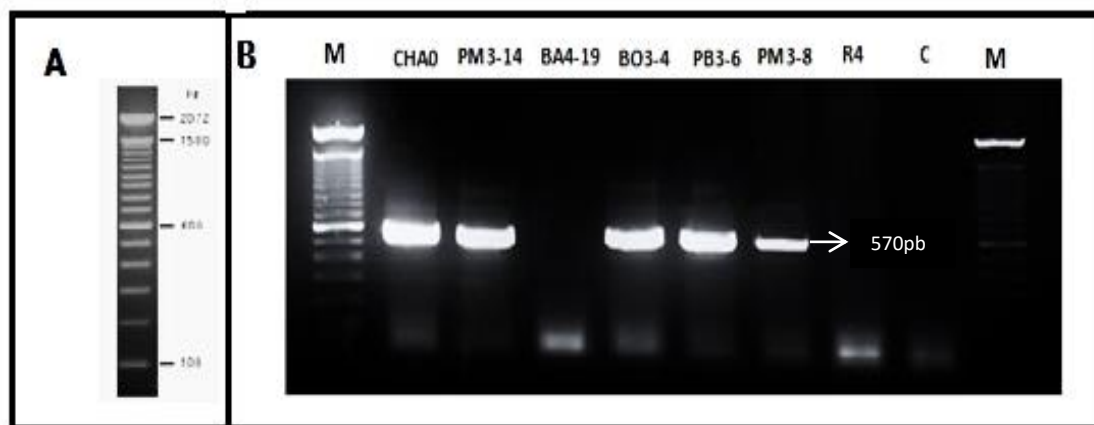


Figura 2 Amplificación del gen *hcnABC* por PCR en *P. fluorescens*. A, Lader 100pb. B, Carril M, marcadores de masa molecular; carriles CHA0, PM3-14, BA4-19, BO3-4, PB3-6, PM3-8, R4: corresponde a ADN genómico de los aislados de *Pseudomonas*; carril C, control agua.

4.1.3 Amplificación y Recuperación del Amplicón de 1500 pb al Gen del ARN ribosomal 16S

El gen del ARN ribosomal 16S fue amplificado por PCR a partir de DNA obtenido de los aislados bacterianos fluorescentes, para ello se utilizaron partidores universales 8F y 149R descritos por Hernández *et al.*, (2008). Se obtuvo un fragmento de 1500 pb, correspondiente al tamaño del gen ARNr 16S (Figura 3).

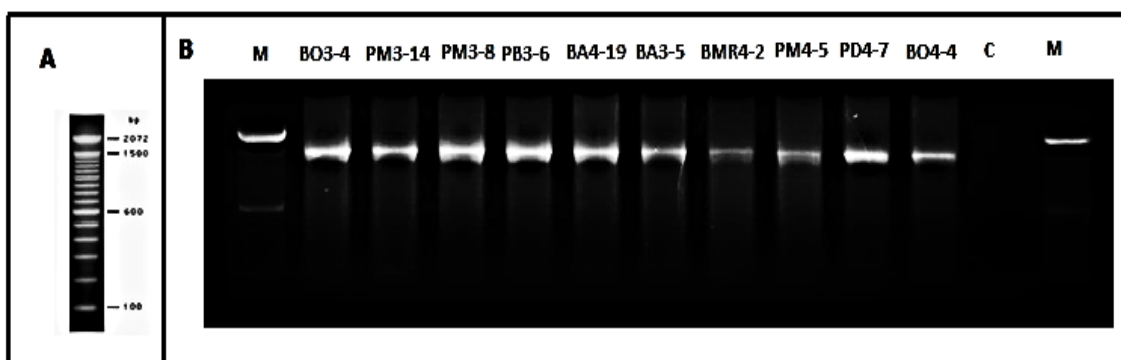


Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra la amplificación del ARNr 16S mediante PCR de 10 *P. fluorescentes*. A, Lader 100 pb. B Carriles: M, marcador de peso molecular; BO3-4; PM3-14; PM3-8; PB3-6; BA4-19; BA3-5; BMR4-2; PM4-5; PD4-7, aislados de *P. fluorescentes*; C control con agua.

Se realizó la recuperación del amplicón de 1500 pb del gen ARNr 16S, con el empleo del kit Invitrogen Pure Link (Germany) Los resultados de la purificación, fueron

ubicadas en un nuevo gel de agarosa, para su verificación al amplicón de 1500 pb, productos que serán empleados para su secuenciación nucleotídica, para en el futuro realizar un análisis filogenético (Figura 4).

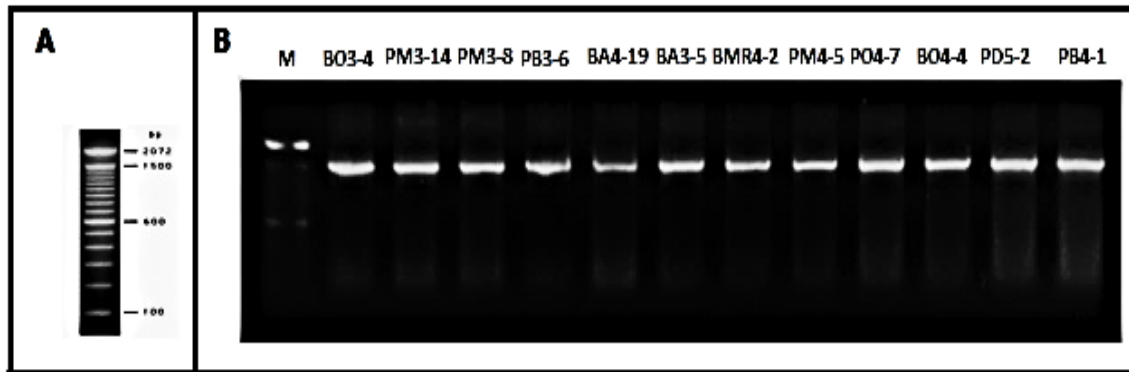


Figura 4 Electroforesis del gen ARNr 16S purificado. A, Lader 100 pb. B, Carriles: M, marcador de peso molecular; BO3-4; PM3-14; PM3-8; PB3-6; BA4-19; BA3-5; BMR4-2; PM4-5; PD4-7; BO4-4; PD5-2; PB4-1, aislados de *P. fluorescentes*.

4.1.4 Aislamiento e Identificación del Hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Se realizó el aislamiento de *M. fijiensis* a partir de hojas infectadas de banano y plátano, en estadios 5 o 6. La germinación de las ascosporas se llevó a cabo a las 18 horas después de la descarga; esta fue bipolar, con tubos germinativos rectos o ligeramente curvos. Se evidenciaron los cultivos monoascospóricos de ascosporas observados entre 4 - 6 días de incubación sobre PDA a 27°C. La morfología de las colonias fue uniforme: fueron compactas, su color inicialmente fue de una tonalidad gris y posteriormente se tornaba blanca y una consistencia algodonosa (Figura 5).

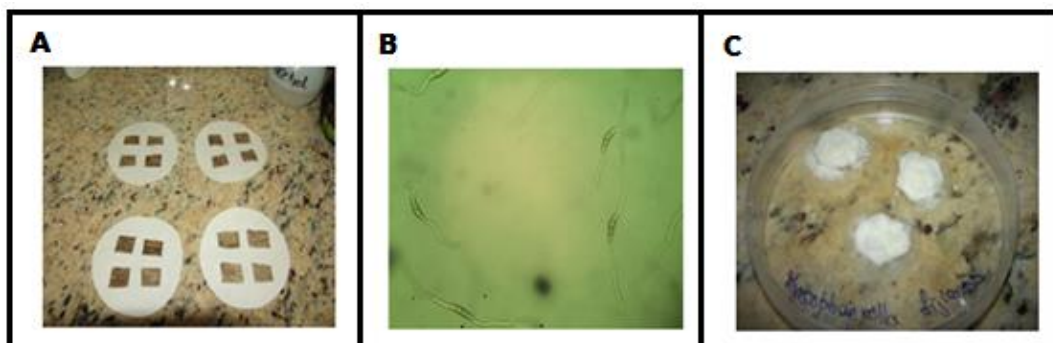


Figura 5 Aislamiento de cultivos monoascospóricos de *M. fijiensis*. A, muestras de hojas de musáceas infectadas con Sigatoka negra en estadio 5-6. B, germinación de ascosporas a las 18 horas después de la descarga. C, cultivos monoascospóricos de *M. fijiensis* a los 15 días de incubación a 27°C.

El ADNg fue extraído de los aislamientos de cultivos monoascospóricos de *M. fijiensis* e identificado por PCR, empleando los primer específicos MF137 y R635 (Johanson, 1994), con un producto de amplificación de 1018 pb. La especificidad de la reacción fue determinada al no observar productos de amplificación inespecífica en el control con el hongo *Fusarium oxysporum* (Figura6).

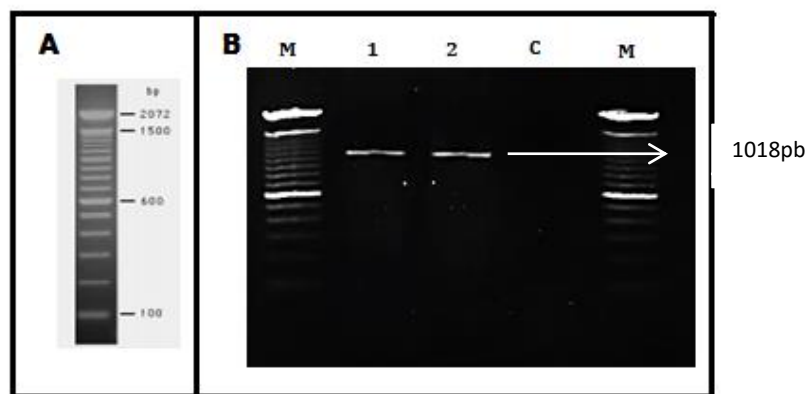


Figura 6 Identificación de *M. fijiensis* mediante PCR. A, Marcador molecular Lader 100bp B, identificación mediante PCR de *M. fijiensis*: Carriles: M, marcador de peso molecular; 1 y 2, *M. fijiensis*; C, *F. oxysporum*.

4.1.5 Evaluación del Efecto Antagonista de los Sobrenadantes en la Germinación de Ascosporas de *M. fijiensis*

En condiciones *in vitro* se desarrolló un escrutinio para analizar el efecto de los sobrenadantes de las bacterias que presentaron actividad proteolítica: (*P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* BA4-19, *P. fluorescens* PB3-6, *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* W417) sobre la germinación de ascosporas. Los ensayos antagónicos se realizaron al 2 % y evaluados por 18, 24 y 48 h después de las descargas de ascosporas.

El menor porcentaje de germinación de ascosporas se verificó en los sobrenadantes de las cepas *P. fluorescens* (PM3-14, BA4-19 y PM3-8) con 2.5, 7.5 y 8.75 % de germinación. La cepa control *P. protegens* CHA0 se observó un 2.5 % de germinación de ascosporas, la cepa *P. veronii* R4 ejerció un efecto antagonista menor, causando el 12.5 % de germinación, sin la aplicación de sobrenadantes se verificó 91.25 % de germinación. Las cepas de *P. fluorescens* (BO3-4 y PB3-6) y *P. fluorescens* WCS 417 y *B. subtilis* generaron germinación $\geq 15\%$, para su evaluación a 18 h.

La evaluación a 24 h después de las descargas, en los sobrenadantes de las cepas *P. fluorescens* (PM3-14, PM3-8 y BA4-19), obtuvieron menor porcentaje de germinación de ascosporas con 7.5, 16.25 y 20%. A diferencia de las *P. fluorescens* (BO3-4 y PB3-6) generaron una germinación ≥ 22.5 %. Los controles *P. protegens* CHA0 se verifica 8.75 % de germinación la cual indica que presento mayor efecto antagonista, la cepa *P. veronii* R4 con 23.75 % de germinación, *P. fluorescens* WCS 417 con 18.75 % de germinación y *B. subtilis* presenta 25% de germinación, mientras sin aplicación de sobrenadantes presento 100 % de germinación.

La evaluación a 48 h con los sobrenadantes de los aislados bacterianos *P. fluorescens* (PM3-14, BA4-19 y PM3-8) se verificó la menor germinación de ascosporas con 12.5, 25 y 25 %. A diferencia de las *P. fluorescens* (BO3-4 y PB3-6) que generaron una germinación ≥ 36.25 %. Con las cepas controles *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 se observó el 16.25 y 38.25 % de germinación de las ascosporas. *P. fluorescens* WCS 417 y *B. subtilis* presento 30 y 36.25 %, sin aplicación de sobrenadantes presento 100 % de germinación.

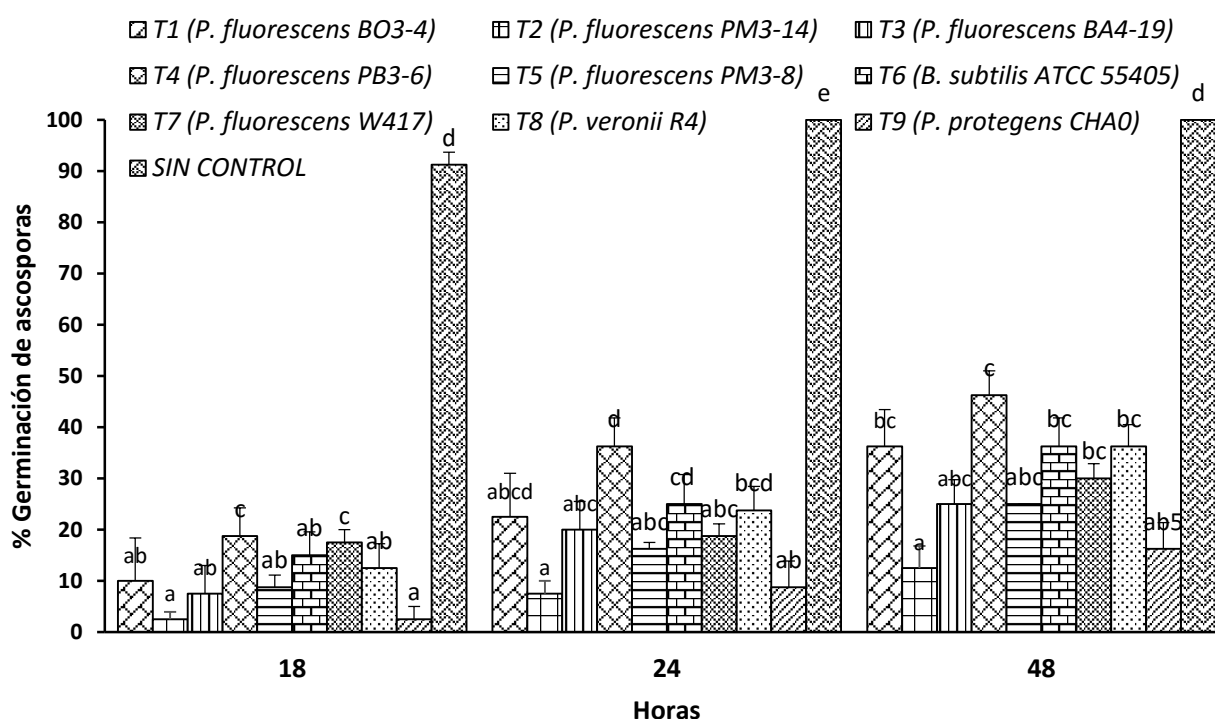


Grafico 1 Evaluación del efecto de sobrenadantes de *Pseudomonas* en la germinación de ascosporas. Todos los tratamientos fueron evaluados hasta las 48h de germinación de ascosporas. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

Estos resultados permitieron definir a los aislados bacterianos que tienen mayor actividad antagonista, las cepas nativas *P. fluorescens* (PM3-14, BA4-19 y PM3-8) y las cepas *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 que ejercen una germinación menor al 30 %.

La evaluación del efecto de los sobrenadantes a las ascosporas se observaron anomalías en sus caracteres morfológicos. Las cepas *P. fluorescens* PM3-14 y *P. protegens* CHA0 presentaron ascosporas sin germinar e hinchazón en ellas (Figura 7 A-B). Los aislados bacterianos *P. fluorescens* PM3-8 y *P. fluorescens* BA4-19 mostraron una elongación anormal y un solo tubo germinativo, con ascosporas hinchadas (Figura 7 C-D). La cepa *P. fluorescens* PB3-6 presento ambos tubos germinativos pero con mal formación en ellos, mientras que sin la aplicación del sobrenadante, mostraron los tubos germinativos bipolar característico (Figura 7 E-F).

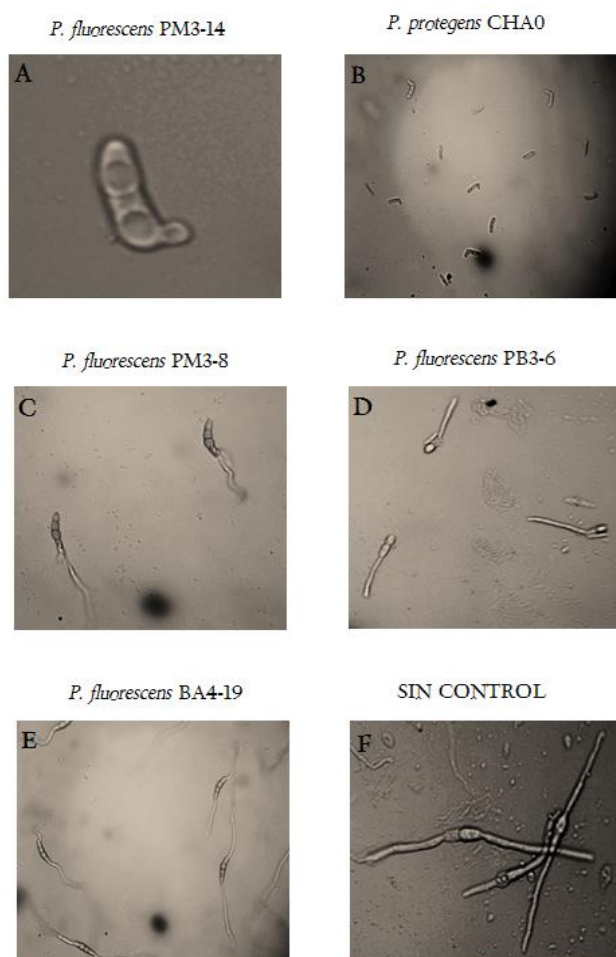


Figura 7 Efecto de los sobrenadantes en la germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*. A, *P. fluorescens* PM3-14; B, *P. protegens* CHA0; C, *P. fluorescens* PM3-8; D, *P. fluorescens* PB3-6; E, *P. fluorescens* BA4-19; F, sin control. Las ascosporas fueron observadas bajo el microscopio a 40x después de las 48 horas post incubación con el respectivo tratamiento.

4.1.6 Inhibición de Crecimiento Micelial de *M. fijiensis*

Se desarrolló un escrutinio para analizar el efecto de los sobrenadantes de las bacterias que presentaron actividad proteolítica: (*P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* BA4-19, *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4) sobre la actividad antagonista al crecimiento micelial de *M. fijiensis*. Los ensayos se realizaron al 10 % y evaluados por 7, 11, 15, 19 y 22 días.

El menor crecimiento micelial se verificó con la cepa *P. protegens* CHA0 que presentó una DO de 0.07. Las cepas *P. fluorescens* PM3-8 y *P. veronii* R4 tienen un efecto inhibitorio al desarrollo del tejido micelial con 0,42 y 0.47 de DO. Las cepas *P. fluorescens* 3-14 y *P. fluorescens* BA4-19 mostraron un crecimiento micelial ≥ 0.53 de DO. Sin aplicación del sobrenadante, mostró una DO de 0.59 observando el desarrollo de tejido micelial, para su evaluación a los 7 días.

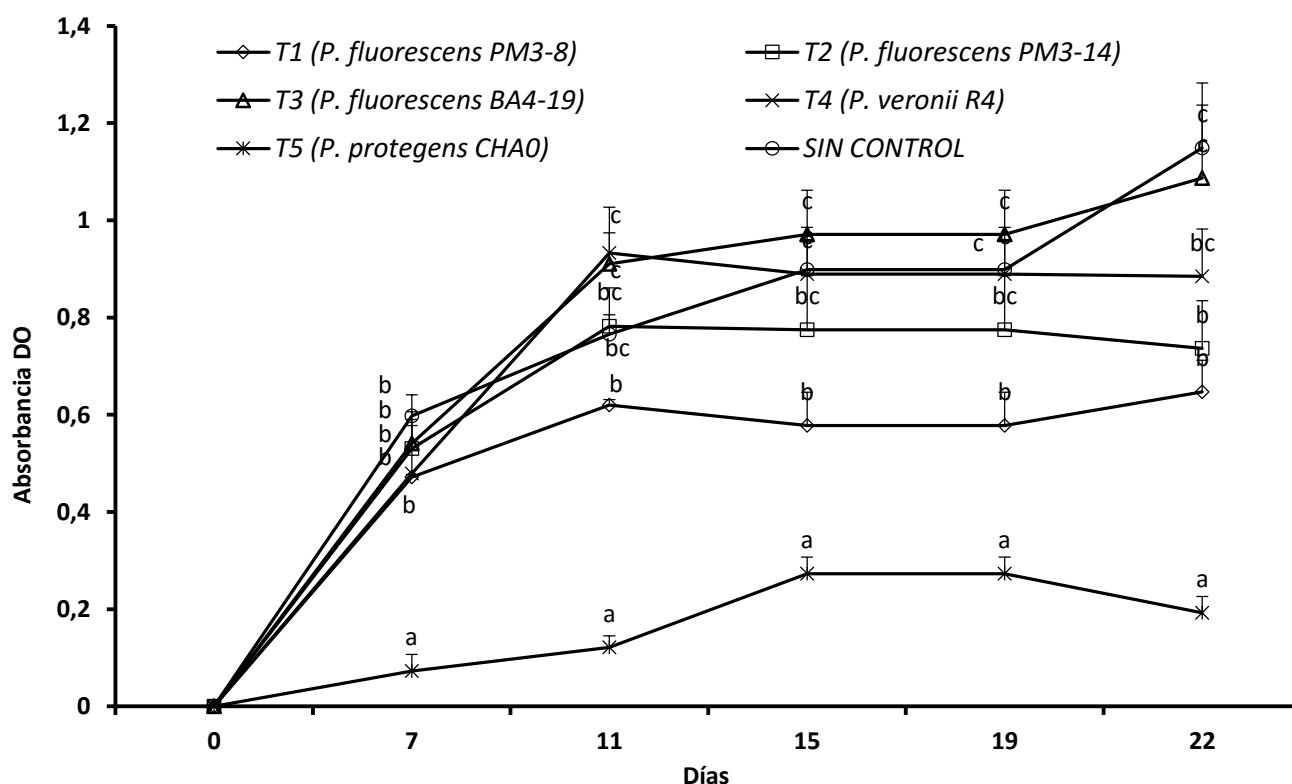


Grafico 2 Evaluación del crecimiento micelial de *M. fijiensis* mediante OD. A, evaluación del efecto de los sobrenadantes de las cepas PM3-8, PM3-14, BA4-19, *P. veronii* R4, *P. protegens* CHA0 y sin control durante 22 días. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

La evaluación a 11 días, se verifica el efecto inhibitorio al crecimiento micelial del hongo por *P. protegens* CHA0 con una DO de 0.12, mientras que las cepas *P. fluorescens* PM3-8, retarda la formación de tejido micelial con una DO de 0.62. Lo observado por efecto de los sobrenadantes de *P. fluorescens* 3-14 y *P. fluorescens* BA4-19 mostraron un crecimiento micelial acelerado con una DO de 0.78 y 0.91. Sin la aplicación del sobrenadante presento una de DO 0.76. La cepa control *P. veronii* R4 mostro el menor efecto antagonista de crecimiento micelial con una de DO 0.93.

La evaluación a los 15 días, se comprueba el efecto inhibitorio al crecimiento micelial del hongo por *P. protegens* CHA0 con una DO de 0.27 indicando que creció el micelio en comparación los 11 días, mostrando mayor efecto antagonista hacia el crecimiento micelial. La cepa *P. fluorescens* PM3-8 retrasa la formación dl tejido micelial con una DO de 0.57, mientras que el efecto observado de los sobrenadantes *P. fluorescens* 3-14 y *P. fluorescens* BA4-19 mostraron un crecimiento micelial acelerado con una DO de 0.57 y 0.97. El efecto del sobrenadante de la cepa control *P. veronii* presento un decrecimiento micelial con una DO 0.88. Sin la aplicación del sobrenadante presentó una DO de 0.89.

La evaluación a los 19 días, se verifica el efecto inhibitorio al crecimiento micelial del hongo por *P. protegens* CHA0 con una DO de 0. 27 mostrando que no hubo aumento de crecimiento micelial desde el día 11, teniendo mayor efecto antagonista. La cepa *P. fluorescens* PM3-8 no presenta variación del crecimiento de tejido micelial con una DO de 0.57, mientras que el efecto observado de los sobrenadantes *P. fluorescens* 3-14 y *P. fluorescens* BA4-19 mostraron un crecimiento micelial acelerado con una DO de 0.77 y 0.97. El efecto del sobrenadante de la cepa control *P. veronii* presento un crecimiento micelial con una DO 0.88. Sin la aplicación del sobrenadante presentó una DO de 0.89, no se observa variación en el crecimiento micelial.

Se comprueba el efecto de inhibición al crecimiento micelial del hongo por *P. protegens* CHA0 con una DO de 0.19. La cepa *P. fluorescens* PM3-8 presenta un crecimiento de tejido micelial con una DO de 0.64 mostrando efecto antagónico hacia el micelio. Lo observado por efecto de los sobrenadantes de *P. fluorescens* 3-14 y *P. fluorescens* BA4-19 mostraron un crecimiento micelial acelerado con una DO de 0.73 y 1.08. La cepa

control *P. veronii* R4 mostro un crecimiento micelial con una de DO 0.93. Sin la aplicación del sobrenadante presento una de DO 1.14, para su evaluación a los 22 días.

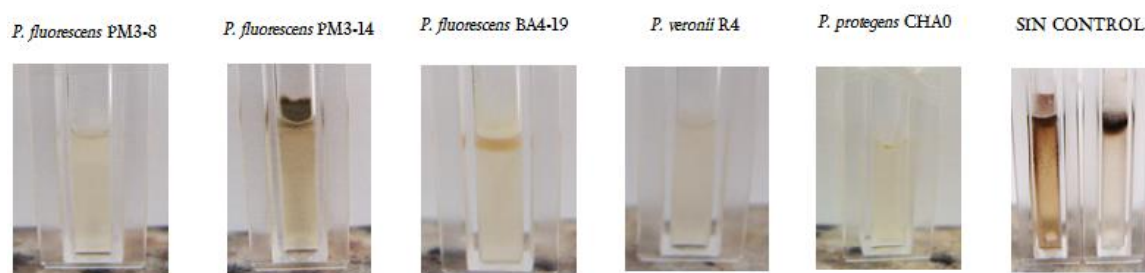


Figura 8 Crecimiento micelial de *M. fijiensis* en cubetas de espectrofotómetro para medir el DO.

4.1.7 Efecto Antagónico del Sobrenadante al Crecimiento en Diámetro del Micelio *M. fijiensis*

Las pruebas de inhibición de crecimiento micelial revelaron que algunos sobrenadantes muestran actividad antifúngica contra *M. fijiensis* en diferentes grados. Se verifica que los sobrenadantes de los aislados bacterianos *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* BA4-19 muestran una mayor actividad antagónica con 76.10 y 60.98 % de inhibición de crecimiento. *P. veronii* R4, *P. fluorescens* PM3-14 y *P. fluorescens* PM3-8 con un efecto inhibitorio de 13.8, 52.38 y 52.54 %. Sin aplicación del sobrenadante se observa un desarrollo normal del micelio, evaluados a los seis días de incubación.

Se observó a los 8 días que las cepas *P. protegens* CHA0 mostraron 66.4% de inhibición presentando mayor actividad antagónica que los aislados bacterianos *P. veronii* R4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* BA4-19 y *P. fluorescens* PM3-8 con un efecto inhibitorio de 12.98, 34.83, 41.43 y 43.90 % respectivamente. Sin la aplicación del sobrenadante se observa un desarrollo normal del micelio. La cepa *P. protegens* CHA0 presento mayor actividad antagónica con 54.64 % que los aislados bacterianos *P. veronii* R4, *P. fluorescens* BA4-19, *P. fluorescens* PM3-14, y *P. fluorescens* PM3-8 con un efecto inhibitorio de 24.79, 26.38, 26.4 y 34.51 % respectivamente. Sin la aplicación del sobrenadante se observa un desarrollo normal del micelio, evaluados a los 12 días (Grafico 2).

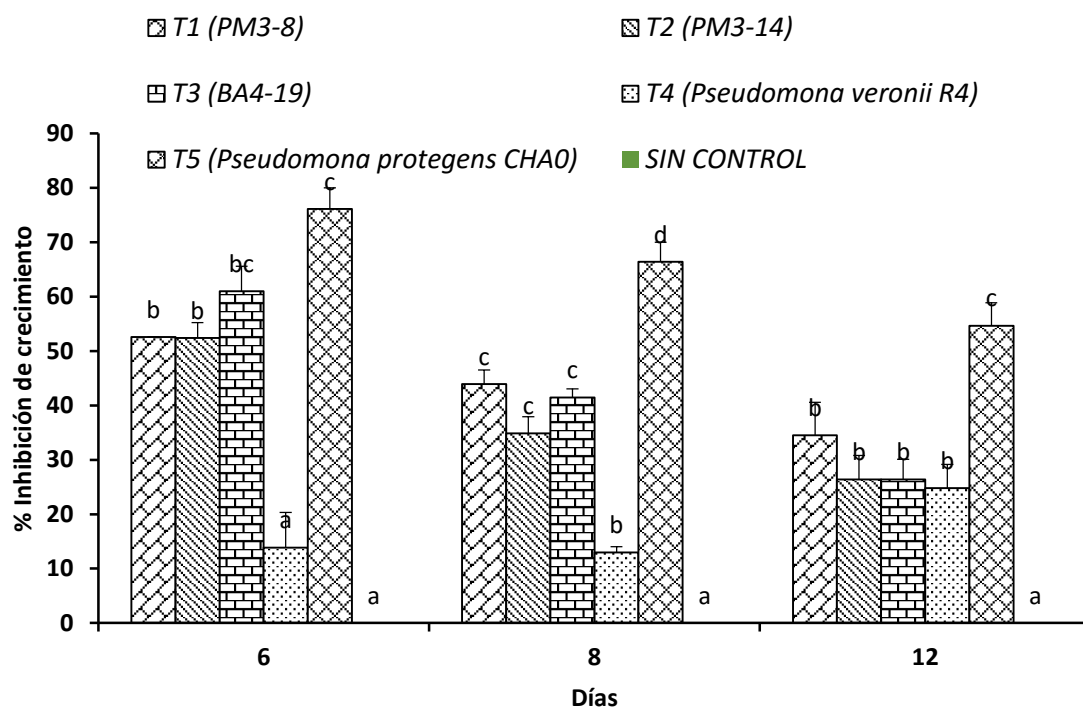


Grafico 3 Inhibición de crecimiento micelial de *M. fijiensis*. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan).

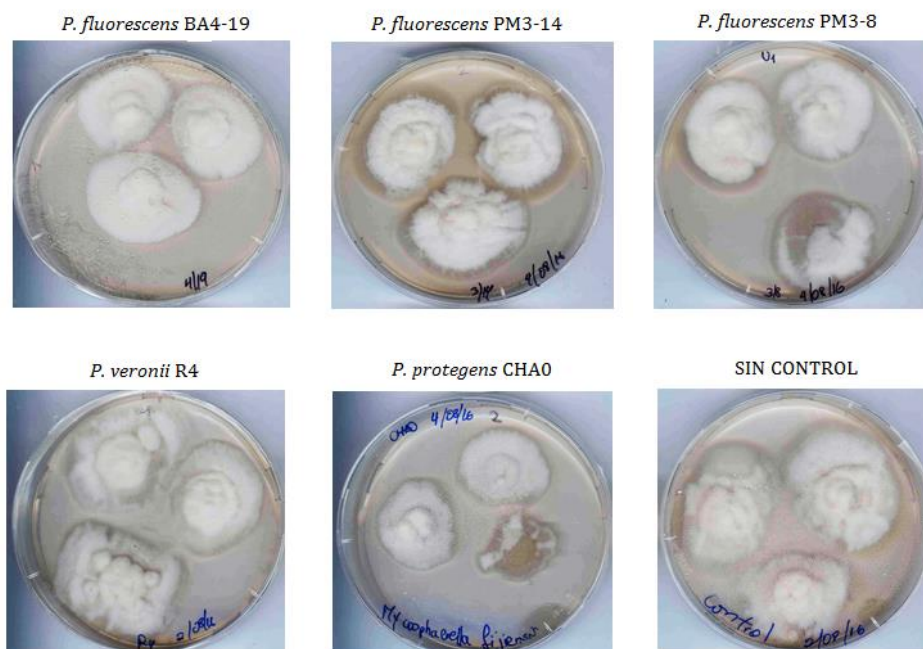


Figura 9 Inhibición de crecimiento micelial de *M. fijiensis* en placas de Petri a los 12 días de inoculación.

4.2 Discusión

4.2.1 Aislamiento e Identificación de Cultivo de Cepas de *Pseudomonas* desde Muestras de las Raíces de Musáceas

El suelo es considerado como un almacén de la actividad microbiana. Las funciones de los microorganismos del suelo son fundamentales para el proceso de descomposición y el ciclo de nutrientes. Juegan un papel importante en los procesos del suelo que determinan la productividad de la planta. El presente trabajo inicio con la búsqueda e identificación de cultivos endémicos de Musáceas que no presenten reducción en producción y con baja incidencia de la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Bajo este esquema se recolecto muestras de raíces de varias zonas, para obtener una mayor probabilidad de recuperar aislados bacterianos nativos de *P. fluorescens*, que presenten actividad antagonista hacia el hongo.

Se estableció una colección de *Pseudomonas* que comprenden 50 cepas de la rizósfera de Musáceas (Cuadro 8). Germida y Silicano, (2001) informan haber realizado diferentes aislamientos de la rizósfera de maíz, demostrando en todos los casos la presencia abundante de *Pseudomonas fluorescens*, asimismo Ross *et al.*, (2000) en un estudio de diversidad genética de la rizósfera de diferentes variedades de trigo encontró al género *Pseudomonas* predominado en dos localidades geográficas diferentes y Hebbar *et al.*, (1992) demostró que las *Pseudomonas* son los microorganismo antagonistas más frecuentemente aislados de suelos, representando las poblaciones en un 88 % de la microbiana total.

4.2.2 Evaluación por Caracteres Morfológicos y Bioquímicos de las *Pseudomonas* spp.

La identificación morfológica de los aislados bacterianos crecidos en medios King B se caracterizaron por poseer colonias circulares, puntiformes e irregular con bordes enteros, ondulados y filamentoso, y presentan elevación plana y convexa. Coincidiendo con Fages y Lux, (1991) en el cultivo de girasol y corroborados por Hernández *et al.*,

(2002) en el cultivo del maíz, se escogieron estas características morfológicas como distintivas para el estudio de este género. Sinha y Simon, (2013) aislaron 168 cepas en la cual 165 tenían 26 caracteres en común; colonias circulares con bordes enteros característicos del género *Pseudomonas*.

Los metabolitos secundarios son un componente clave de la respuesta a defensa de *Pseudomonas* de suelo contra patógenos. En la identificación bioquímica se logró la obtención de 20 aislados bacterianos que emiten fluorescencia igual a *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* WCS417 (Cuadro 9). Las *Pseudomonas* sp., perteneciente a las rizobacterias promotoras de crecimiento ha recibido una destacada atención debido a la doble función de estas bacterias tales como en la promoción de crecimiento de las plantas y al control de enfermedades (Pikovskaya, 2012).

Cook *et al.*, (1995) informo que las bacterias *P. fluorescens* asociadas con plantas particularmente han sido investigados para la supresión de enfermedades en los cultivos. Los aislados bacterianos mostraron producción de metabolitos secundarios tales como la proteasa y HCN. Las cepas *P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* BA4-19, *P. fluorescens* PB3-6, *P. protegens* CHA0, *P. veronii* R4 y *P. fluorescens* W417, dieron positiva para la proteasa presentando una degradación en la zona de inoculación después de las 48h. Coincidiendo con Smith y Goodner (1958) indican que se las *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 presentan degradaciones en las zonas de inoculación tratándose en parte, con la multiplicación de los organismos y, en parte, con la elaboración de la enzima, ya sea por la secreción o en la disolución de los microorganismos. Así mismo Whaley *et al.*, (1982) muestra que en la zona de inoculación de la cepa *P. protegens* CHA0, la gelatina fue despejada inmediatamente alrededor y debajo de las bacterias.

Los aislados bacterianos *P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* PB3-6 *P. protegens* CHA0, mediante la identificación de PCR mostraron producción del metabolito secundario HCN, que genero un amplicón de 570pb. Concordando con Svercel *et al.*, (2007) que obtuvo un amplicón de 570pb de longitud para las 57 cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. protegens* CHA0 utilizando el método de PCR. Se sabe que las *Pseudomonas* sp. producen compuestos volátiles

tales como los metabolitos HCN, proteasa y la producción de sideróforos (Tripathi & Johri, 2002).

Afsharmanesh *et al.*, (2010) sugieren que el crecimiento de hongos se inhibe principalmente por la producción de HCN y producción de proteasa. Paramageetham y Prasada (2012) indican que las *Pseudomonas fluorescens* aparte del potencial control biológico mediante la producción de HCN poseen otras propiedades funcionales como solubilización de fosfato mineral, la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y la actividad enzimática.

4.2.3 Obtención de Bandas del ARN ribosomal 16S

El gen 16S fue amplificado por PCR a partir del DNA de los aislados bacterianos que mostraron fluorescencia, producto de la amplificación se obtuvo un fragmento de 1500 pb y se purificó los productos de PCR para remover el exceso de primers y nucleótidos. Coincidiendo con Barry *et al.*, (1990) describe en su literatura que los productos de amplificación del gen 16S corresponden a los 1500 pb. Valderas (2012) mostro que el gen 16S fue amplificado por PCR a partir de ADN obtenido desde las cepas del género *Bacillus*, producto de la amplificación obtuvo un fragmento de 1500pb. Distintas investigaciones han revelado que la secuencia del gen ARNr 16S presenta regiones conservadas y entre ellas se encuentran regiones que son variables, que han sido útiles para la diferenciación de género y especie en bacterias (Jensen, Webster, & Straus, 1993) .

4.2.4 Aislamiento e Identificación de *M. fijiensis*

Se obtuvieron cultivos monoascospóricos del aislamiento del hongo *M. fijiensis* a partir de hojas infectadas de banano y plátanos en estadio 5 - 6. Las ascosporas presentaron tubos germinativos ligeramente curvos y rectos. Las colonias mostraron una morfología uniforme: fueron compactas, su color inicialmente fue de una tonalidad gris y posteriormente se tornaba blanca y una consistencia algodonosa (Figura 5). Concordando con Vásquez *et al.*, (2009) las ascosporas muestran una germinación bipolar y con tubos germinativos rectos y ligeramente curvos. Romero *et al.*, (1999) las

ascosporas presentan constricción en el septo, bipolar y tubos germinativos rectos. Las colonias presentaron inicialmente una tonalidad gris olivácea y posteriormente se tornaba blanca, rosada o café oscuro. Orozco *et al.*, (2005) indica que los cultivos monoascospóricos presentan un color gris-oscuro a blanco rosado, de forma esférica o con zonas irregulares y una consistencia algodonosa o compacta con manejo rústico, semi-intensivo o intensivo.

La identificación de los aislamientos monoascospóricos de *M. fijiensis* mediante la técnica de PCR obtuvo un producto de 1018pb (Figura 5) en concordancia con Jeger (1993) cuando fue realizada la prueba del DNA de *M. fijiensis* con los partidores R6 y MF137, obtuvo un amplicón de 1018pb. Así mismo Surridge *et al.*, (2003) indica que las muestras de DNA obtenidas de hojas lesionadas de Sigatoka desde África del sur produjeron una banda de 1018pb en gel al 1% con *M. fijiensis*.

4.2.5 Efecto Antagónico de los Sobrenadantes en la Germinación de Ascosporas de *M. fijiensis*

Las *Pseudomonas fluorescentes* han sido utilizadas para el control de Sigatoka negra, para mejorar el crecimiento de la planta y suprimir el crecimiento del patógeno (Vidhyasekaran, 2004). En este ensayo fueron probadas las ocho cepas de *P. fluorescens* y *B. subtilis* para ver su efecto antagónico hacia *M. fijiensis in vitro*. Entre las nueve cepas examinadas, *P. fluorescens* PM3-14, *P. protegens* CHA0, *P. fluorescens* PM3-8 y *P. fluorescens* BA4-19 y *B. subtilis* obtuvieron menor porcentaje de germinación de ascosporas. Concordando con Ceballos (2009) en la pruebas de inhibición de germinación de ascosporas, encontró que las cepas con mayores porcentajes de inhibición fueron *B. subtilis* con 77% de inhibición. El potencial que presentan las PGPR se ha enfocado en su capacidad de producir compuestos antifúngicos contra muchos patógenos Han *et al.*, (2003).

Las ascosporas presentaron anomalías en sus caracteres morfológicos: hinchazón en las ascosporas, mostraron una elongación anormal y un solo tubo germinativo y otras ascosporas no germinaron. Resultados similares son encontrados por Vásquez *et al.*, (2009) con una concentración de 80µg/ml del péptido IC75 causó anomalías en la

elongación del tubo germinativo de las ascosporas, otras ascosporas no hubo germinación. Así mismo Ceballos (2009) reveló que las cepas de *B. subtilis* con actividad antagonista afecta la estructura de las ascosporas generando deformaciones y abultamientos en ellas. Gómez (2013) mostró que a concentraciones de 5% la urea y 10% de del ácido acético la germinación de ascosporas oscila entre el 50 y 80 %. Esto sugiere nuevamente que los metabolitos que están producen las bacterias poseen una naturaleza anfifílica que puede intervenir en la integridad de membrana biológicas formando poros que generan perturbaciones osmóticas y en muchos casos el rompimiento de la membrana (Ongena & Jacques , 2008)

4.2.6 Inhibición de Crecimiento Micelial de *M. fijiensis*

En este ensayo se encontraron efectos de reducción de crecimiento micelial de *M. fijiensis* con los diferentes extractos estudiados en condiciones *in vitro*. Los sobrenadantes de las cepa *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* PM3-8 obtuvieron menor crecimiento de tejido micelial, mientras que *P. fluorescens* PM3-8 y *P. veronii* R4 no tuvieron un mayor efecto antagónico. La cepa *P. fluorescens* BA4-19 tuvo el menor efecto antagonista, estimulando el crecimiento micelial de *M. fijiensis*. Coincidiendo con Ceballos (2009) obtuvo inhibición de crecimiento en microplatos con medio líquido con cepas de *B. subtilis* UA321, aunque en comparación con medio sólido este no presento mayor actividad antagonista. Así mismo Vásquez (2009) reveló que algunos péptidos muestran actividad anti-fúngica contra *M. fijiensis*, los valores de péptidos en la cepa 205001 estaban en un rango de 3.06 a 239.61 g/ml.

4.2.7 Efecto Antagónico del Sobrenadante al Crecimiento en Diámetro del Micelio *M. fijiensis*

El efecto inhibitorio que presentaron las cepas evaluadas sobre el crecimiento del hongo, se atribuye a la producción de metabolitos difusibles por las bacterias, los cuales, al entrar en contacto con el hongo, impiden su desarrollo radial normal (Fernando, Nakkeran, & Zhang, 2006). Los sobrenadantes de las cepa *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* PM3-8 mostraron mayor porcentaje de inhibición de

crecimiento micelial. Ceballos (2009) registra que *B. subtilis* EA0946 presentaron mayores porcentajes de inhibición en pruebas de microplatos y observo la disminución en el crecimiento del micelio cuando es cultivado en medio solido ya que el hongo tiene mayor área de contacto superficial con los metabolitos antimicrobianos. Asimismo Urrea (2010) obtuvo diferentes grados de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (G1) con cepas de rizobacterias del genero *Pseudomonas*, mostrando porcentajes iguales o superiores a 27%, esto se evidencio también en la periferia o bordes de crecimiento activo del hongo, donde los metabolitos difusibles secretados por las bacterias entraban en contacto con el micelio.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se logró el aislamiento de 50 cepas del género *Pseudomonas*, de las cuales se seleccionaron 20 *Pseudomonas fluorescens* que emiten fluorescencia.
- Las *Pseudomonas fluorescens* tienen en su mayoría colonias circulares, borde entero y elevación plana.
- La identificación bioquímica presenta ocho cepas de *Pseudomonas* con producción de proteasa: *P. fluorescens* (PM3-8, PM3-14, BA4-19, BO3-4, PB3-6), *P. veronii* R4, *P. fluorescens* W417 y *P. protegens* CHA0; y cinco cepas mostraron la producción del antibiótico HCN: *P. fluorescens* BO3-4, *P. fluorescens* PM3-14, *P. fluorescens* PM3-8, *P. fluorescens* PB3-6 *P. protegens* CHA0.
- La amplificación del gen ARN ribosomal 16S de *Pseudomonas fluorescens* obtuvo un producto de amplificación de 1500 pb.
- Las bacterias provenientes de la rizósfera de *Musáceas*, presentan actividad antagónica *in vitro* contra *M. fijiensis*, gracias a la producción de metabolitos secundarios tales como la proteasa y HCN, que alteran la germinación de ascosporas y el desarrollo del micelio.
- Los sobrenadantes de las cepas *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* PM3-14 ejercieron mayor actividad antagónica hacia la germinación de ascosporas con valores de 9.15 y 7.50 %.
- La actividad antagónica de los sobrenadantes *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* PM3-8 ejerció mayor control en el crecimiento del tejido micelial con una OD de 0.19 y 0.64.
- Los sobrenadantes de las cepas *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* PM3-8 presentaron mayor actividad antagónica con 54.64 y 34.51 % hacia al crecimiento en diámetro del micelio de *M. fijiensis*.

5.2 Recomendaciones

- Probar las bacterias seleccionadas en este estudio, frente a diferentes aislamientos de *M. fijiensis* tanto *in vitro* como *in vivo*, con el fin de establecer si estas presentan un amplio espectro antagónico.
- Probar las rizobacterias seleccionadas en diferentes temperaturas, pues estos parámetros influyen en la capacidad biocontroladora de las PGPRs.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1 Bibliografía

- Afsharmanesh, H., Ahmandzadesh, M., Javan , N., & Behboudi, K. (2010). Characterization of the antagonistic activity of a new indigenus strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from onion Rhizosphere . *Journal of plant pathology*, 92(1): 187-194.
- Araya, M. (2004). Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en fréjol común. Montpellier: INIBAP. 79-102 p.
- Arvid , J., Porto, M., & Vilariño, A. (2007). Characterization of Phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas* from the Rhizosphera. *Curr Microbiol*, 56, 73-79.
- Bach, T., & Díaz , M. (2009). Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal en la Agricultura. *Asociación Latinoamericana de Rhizobiología*, 12, 34-38.
- Bach, T., Díaz, M., Ferreira , A., & Laurent, A. (2007). Estudio de las características de promoción del desarrollo vegetal de *Pseudomonas fluorecens* utilizada en el biofertilizante Rizofos. *Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelo* (pág. 151). Córdoba: RELAR.
- Bais, h., Weir, T., Perry, L., & Vivanco, J. (2006). The role of root exudantes in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *The Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-236.
- Barry, T., Colleran, G., & Glennon, M. (1991). The 16S-23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify aubacteria. *Genome*, 1: 51-56.
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications biocontrol-PGPB . *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1225-1228.
- Belalcázar, S., & Merchán, V. (1991). Control de enfermedades. el cultivo de banano en el trópico. Colombia. 243-297 p.
- Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol*, 173: 170-177.

- Bornacelly, H. (2009). Estudio del ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* en tres clones de banano (Musa AAA) en tres regiones de la zona bananera del Magdalena. Universidad Nacional de Colombia. p 70.
- Bowers, J. (2003). Colonization of pea taproots by *Pseudomonas fluorescens*. Effect of soil temperatures and bacterial motility. *Microbiology*. 275-277 p.
- Campbell, R. (1989). Biological control of microbial plant pathogens. New York: Cambridge University Press. 112-158 p.
- Canchignia, F. (2014). Aislamiento y caracterización de cepas *Pseudomonas fluorescens* y estudio de sus efectos antagonistas hacia el nematodo *Xiphinema index* y promotor del desarrollo de vid 'Thompson Seedless'. Chile. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. p 103.
- Castric, P. (1977). Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *Journal Bacteriology*, 130: 826-831.
- 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. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. p 135.
- Chaparro, A. (2010). Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. p 116.
- Cook, R., Thomashow, L., Weller, D., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92: 4197-4201.
- Coyler, R., & Mount, M. (1984). Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvested soft root diseases. 26: 356-359.
- Daly, J. (1976). Carbon balance of disease plants: Changes in respiration, photosynthesis and translocation. Berlin: Springer. 450-479 p.
- De La Cruz, A., Poplawsky, R., & Wiese, M. (1992). Biological suppression of potato ring rot by *fluorescent Pseudomonas*. *Plant Disease*, 58: 198-199.

- Drancourt, M., Bollet, C., & Raoult, D. (2000). 16 S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*, 38: 362-363.
- Echeverría, M. (2015). Comportamiento Agronómico y productivo del orito, solo o asociado a otras Musáceas. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. p 71.
- Fages, J., & Lux, B. (1991). Identification of bacteria isolate from roots of sunflower cultivated in French soil. *Pionner France mais*, 4: 125-129.
- Fernando, W., Nakkeran, S., & Zhang, Y. (2006). Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of plant Diseases. *Biocontrol and Biofertilization*, 70: 67-108.
- Gachon, C., Mingam, A., & Charrier, B. (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies. *Journal of Bacteriology*, 55: 1445-1454.
- García, R. (2007). Efecto de la inoculación con rizobacterias del crecimiento de las plantas (PGPR) sobre el crecimiento y la eficiencia. Buenos Aires. 85-89 p.
- Germida, J., & Silicano, S. (2001). Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern recent and ancient wheat cultivars. *Biology and Fertility of soil*, 33(5), 410-415.
- Gómez, M. (2013). Efectos de las condiciones de incubación y de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Costa Rica: Instituto tecnológico de Costa Rica. p 99.
- Goto, K., Hara, Y., & Sadie, Y. (2000). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Pseudomonas* spp. *Microbiol*, 46: 1-8.
- Haas, D., & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol*, 3: 307-319.
- Hammel, B., Grayum, M., & Zamora, N. (2003). Manual de Plantas de Costa Rica. Gimnospermas y Monocotiledóneas. *Missouri Botanical Garden Press*, 2: 120.

- Hammer, D., & Van Pee, K. (1997). Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Paleontología Electrónica*, 6: 21-24.
- Han , S., Jiyong, P., Sung, W., Kee , C., Gung, L., Soo, B. (2003). Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The journal of microbiology*, 41(3), 196-210.
- Harry, L., & Smith, J. (2010). Detection of bacterial gelatinases by Gelatin-Agar plate methods. *Food Research* , 76: 662-665.
- Hebbar, K., Davey, A., Merrin, J., McLoughlin, T., & Dart, P. (1992). Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme* a soil borne-fungalpathogen:colonization of rhizosphere and roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 989-997.
- Henry, J. (2005). Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. Últimas tendencias en identificación. Madrid: Salvat. 204-209 p.
- Hernández, A., Planas , R., Martín, G., & Santander, J. (2002). Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) en suelo Ferrático Rojo. *Cultivos Tropicales*, 23(1), 5-9.
- Hernández, M., Morgante, V., & Seeger, M. (2008). Novel s-triazine-degrading bacteria isolated from agricultural soils of Chile for herbicide bioremediation. *11*: 1-7.
- Jeger, M. (1993). Use the PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *97*(6), 670-674.
- Jensen, M., Webster, J., & Straus, N. (1993). Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Plasmidase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 945-952.
- Johanson, A. (1994). The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathology*, 43: 701-707.
- Kuarabachew, H., Assefa, F., & Hiskias, Y. (2007). Evaluation of Ethiopian isolates of *Pseudomonas fluorescens* AS biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Agriculture Slovenica*, 2: 125-135.

- Laville, J., Blumer, C., Von , S., Gaia, V., Défago, C., & Hass, D. (1998). Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal Bacteriology*, 180: 3187-3196.
- Lepoivre, P. B. (2003). Banana- *Mycosphaerella fijiensis* interactions. Costa Rica: INIBAP. 151-159 p.
- Marín, D. H., Romero, R. A., & Guzmán, M. (2003). Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87: 208-222.
- Mathus, S. (2007). *Pseudomonas* spp. whit antifungal and anti mycosparella activity. *Journal Bacteriology*, 9(2), 425-434.
- Maurthofer, M., Hase, C., & Defago, G. (1994). Induction os systematic resistance of tabacco to TMV by the root colonizing *Pseudomonas fluorecens* strain CHA0, *Journal Bacteriology*, 84: 139-146.
- Meredith, D., & Lawrence, J. (1969). Musáceas. *Transactions of the British Mycological Society*, 52: 459-476.
- Mignard, S., & Flandrois, J. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification a 30-month experiment. *Microbiol Methods*, 67: 574-581.
- Mulder, J., & Stover, R. (1976). *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. *Transactions of British Mycological*, 67: 77-82.
- Ongena, M., & Jacques , P. (2008). *Bacillus* lipopeptides versatile weapons for plant disease bicontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125.
- Orozco, M., Rodríguez, C., & James, A. (2005). La biología de *Mycosphaerella fijiensis* y su interacción con *Musa* spp. *Black sigatoka in México*, 10: 33-37.
- Palleroni, N. (2005). *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2: 323-370.
- Paramageetham, C., & Prasada , G. (2012). Morphological, Biochemical and Functional characterization of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from forest litter of seshachalam Hill range. *Pure and Applied Microbiology*, 3(1), 1-3.

- Peláez, J., Vásquez, T., & Díaz, D. (2006). Use of a microtiter well dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis*. *Facultad Nacional de Agronomía*, 59(2), 3425-3433.
- Pérez, C., Arias, A., & Altieri, N. (2000). Uso de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para el control de enfermedades. *Agrociencia*, 4(1), 41-47.
- Pérez, N., & Leguizamon, C. (1998). Interacciones entre micorrizas nativas, *Pseudomonas* fluorescentes y calcio en el manejo de *Fusarium* spp. *Cenicafé*, 49(3), 211-223.
- Pikovskaya, R. (2012). Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17: 302-370.
- Prescott, L., Harley, J., & Lein, D. (2002). Microbiología. España: Mcgraw-Hill. 110-115 p.
- Raaijmakers, J., Weller, M., & Thomashow, S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 881-887.
- Rivas, G., & Rosales, F. (2003). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Guayaquil: INIBAP. p 180.
- Romero, M., Díaz, T., Castañeda, D., & Arango, R. (1999). Diagnostico por PCR del complejo Sigatoka negra en Colombia. *Facultad Nacional Agrarias de Medellín*, 72(2), 141-152.
- Romero, R. (2003). The spread, detection and impact of black leaf streak disease and other *Mycosphaerella* species in the 1990s. Costa Rica. *Plant Disease*, 86:200-210.
- Ross, I., Alami, I., Harvey, P., Achouak, W., & Ryder, M. (2000). Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related *Pseudomonas* isolated from wheat field soils in South Australia. *Appl Environmental Microbiology*, 66(4), 1609-1616.

- Smith, H., & Goodner, K. (1958). Detection of bacterial gelatinases by helatin-agar plate methods. *Departament of Bacteriology and Immunology*, 76: 662-665.
- Solomonson, L. (1981). Cyanide as a metabolic inhibitor . *Cyanide in biology*, 11-28.
- Souza, J., Marjan, B., & Raaijmakers, J. (2003). Biochemical, genetic and zoosporicidal propeties of cyclid lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 12: 7161-7172.
- Stevens, W., Ulloa, C., Pool, A., & Montiel, O. (2001). Flora de Nicaragua. Angispoermas . *Missouri Botanical Garden Press*, 85(2), 1235-1250.
- Stover, R. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease. Mycological Society*. 750-756p.
- Stover, R. (1986). Disease management strategies and survival of the banana industry. *Phytopathology*, 91:83-91.
- Surridge , A., Viljoen, A., Crous, P., & Wehner, F. (2003). Identification of the pathogen associated with Sigatoka disease of banana in South Africa. *Australian Plant Pathology*, 32(27), 815-3191.
- Suslow, T., & Schroth, M. (1982). Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Protección de Plantas*, 72: 199-206.
- Svercel, M., Duffy, B., & Défago, G. (2007). PCR amplification to hydrogen cyanide biosynthetic locus hcnAB in *Pseudomonas* spp. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 209-213.
- Tripathi, M., & Johri, B. (2002). In vitro antagonistic potential of fluorescent *Pseudomonas* and control of sheath blight of maize caused by *Rhizoctonia solani*. *Indian Journal of Microbiology*, 42: 207-214.
- Tumbaco, J. & Jiménez, M. (2010). Evaluación del efecto sobre Sigatoka negra, en hojas separadas de banano, *Cavendish* (variedad Williams), del extracto de *Melaleuca alternifolia* en 3 zonas del Litoral Ecuatoriano. Escuela Superior Politécnica del Litoral. p 8.

- Urrea, R. (2010). Evaluacion in vivo e in vitro de bacterias aisladas de la rizosfera de Uchuva (*Physalis peruviana*) como biocontroladoras de *Fusarium oxysporum*. Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada. p 106.
- UTFSM. (2010). Pruebas bioquímicas y aislamiento. *Laboratorio de introduccion a la microbiologia*, p 21.
- Valderas, K. (2012). Caracterización de cepas de *Bacillus* aisladas de muestras de miel y de colmena mediante la secuenciación del gen Ribosomal 16S. 12: 79.
- Van Overbeek, L., & Van Elsas, J. (1995). Root exudate induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Journal Microbiology*, 85: 53-64.
- Vásquez, L., Guzmán, F., Patarroyo, M., & Arango, R. (2009). In vitro evaluation of antimicrobial peptides against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and their interaction with some chemical fungicides. *Facultad Nacional Agraria Medellín*, 62(2), 5063-5069.
- Vega, E. (6 de Marzo de 2010). *Características fisiológicas bacterianas*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Practica6.2PruebasBioquimicas_21633.pdf
- Vidhyasekaran, P. (2004). Concise encyclopedia of plant pathology. Haworth Press. 246-252 p.
- Weller, D. (1988.). Biological control of soil borne plant pathogen in the rhizosphere with bacteria. *Phytopathology*, 26: 379-469.
- Whaley, D., Dowell, J., Wanderlinder, L., & Lombard, G. (1989). Gelatin Agar Medium for Detecting Gelatinase Production by Anaerobic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(2), 224-229.
- Wissing, F., & Andersen, K. (1981). The enzymology of cyanide production from glycine by a *Pseudomonas* species . *Cyanide in biology*, 275-288.
- Zenhder, G., Klooper, J., & Yao, C. (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *Plant Disease*, 90: 391-396.

Financiamiento

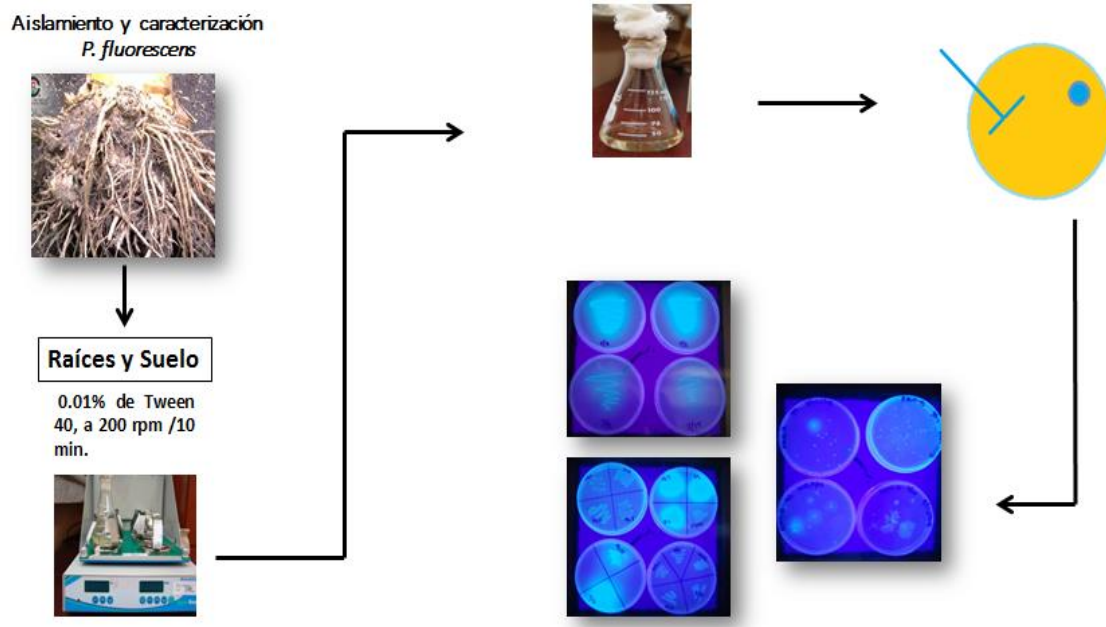
Financiamiento para el desarrollo del proyecto de investigación “Potencial antagonista de rizobacterias nativas y comerciales del género *Pseudomonas fluorescens*, frente al hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis* del cultivo de *Musáceas*” por Fondo Competitivo de Investigación Científica y tecnológica “FOCICYT”. En el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

CAPITULO VII

ANEXOS

7.1 Anexos

Anexo 1. Identificación de caracteres morfológicos y selección de *P. fluorescens*



Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN bacteriano

Detailed Protocol (Describes what is happening at each step)

Please wear gloves at all times

1. Add 1.8 ml of microbial (bacteria, yeast) culture to a 2 ml Collection Tube (provided) and centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. Decant the supernatant and spin the tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature and completely remove the media supernatant with a pipette tip.

What's happening: This step concentrates and pellets the microbial cells. In some cases it may take longer to completely pellet the cells. It is important to pellet the cells completely and remove all the culture media in this step.

2. Resuspend the cell pellet in 300 µl of MicroBead Solution and gently vortex to mix. Transfer resuspended cells to MicroBead Tube. What's happening: The MicroBead Solution contains salts and a buffer which stabilizes and homogeneously disperses the microbial cells prior to lysis.

3. Check Solution MD1. If Solution MD1 is precipitated, heat the solution at 60°C until the precipitate has dissolved. Add 50 µl of Solution MD1 to the MicroBead Tube.

What's happening: Solution MD1 contains SDS and other disruption agents required for cell lysis. In addition to aiding in cell lysis, SDS is an anionic detergent that breaks down fatty acids and lipids associated with the cell membrane of several organisms. If it gets cold, it will precipitate. Heating at 60°C will dissolve the SDS and will not harm the SDS or the other disruption agents. In addition, Solution MD1 can be used while it is still warm.

4. Optional: To increase yields, to minimize DNA shearing, or for difficult cells, see Alternative lysis methods in the "Hints & Troubleshooting Guide" section before continuing. What's happening: This optional step can lead to better performance in some cases. We recommend using only one of these methods for any individual prep.

5. Secure MicroBead Tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog# 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes. (See "Hints & Troubleshooting Guide" for less DNA shearing).

What's happening: This step creates the combined chemical/ mechanical lysis conditions required to release desired nucleic acids from microbial cells. Many cell types will not lyse without this chemically enhanced bead beating process. The vortex action is typically all that is required, however, more robust bead beaters may also be used. In most cases the times may be shorter with other devices but you may run the risk of increased DNA shearing. This process is compatible with fast prep machines.

6. Make sure the 2 ml MicroBead Tubes rotate freely in the centrifuge without rubbing. Centrifuge the tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. CAUTION: Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.

What's happening: The cell debris is sent to the bottom of the tube while DNA is remains in the supernatant.

7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

8. NOTE: Expect 300 to 350 µl of supernatant.

What's happening: The volume to expect will vary depending on the size of the original cell pellet from step 1.

9. Add 100 µl of Solution MD2, to the supernatant. Vortex for 5 seconds. Then incubate at 4 °C for 5 minutes.

10. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

What's happening: Solution MD2 contains a reagent to precipitate non-DNA organic and inorganic material including cell debris and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.

11. Avoiding the pellet, transfer the entire volume of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided). Expect approximately 450 µl in volume.

What's happening: The pellet at this point contains non-DNA organic and inorganic materials, including cell debris and proteins. For the best DNA quality and yield, avoid transferring any of the pellet.

12. Shake to mix Solution MD3 before use. Add 900 µl of Solution MD3 to the supernatant and vortex for 5 seconds.

What's happening: Solution MD3 is a highly concentrated salt solution. It sets up the high salt condition necessary to bind DNA to the Spin Filter membrane in the following step.

13. Load about 700 µl into the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds at room

temperature. Discard the flow through, add the remaining supernatant to the Spin Filter, and

centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. NOTE: A total of 2 to 3 loads for each sample processed are required. Discard all flow through liquid.

What's happening: DNA is selectively bound to the silica membrane in the Spin Filter device. Contaminants pass through the filter membrane, leaving only the DNA bound to the membrane.

14. Add 300 µl of Solution MD4 and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

What's happening: Solution MD4 is an ethanol based wash solution used to further clean the DNA that is bound to the silica filter membrane in the Spin Filter. This wash solution removes residues of salt, and other contaminants while allowing the DNA to stay bound to the silica membrane.

15. Discard the flow through.

What's happening: This flow through is waste containing ethanol wash solution and contaminants that did not bind to the silica Spin Filter membrane.

16. Centrifuge at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

What's happening: This step removes residual Solution MD4 (ethanol wash solution). It is critical to remove all traces of wash solution because it can interfere with downstream DNA applications.

17. Being careful not to splash liquid on the spin filter basket, place Spin Filter in a new 2 ml Collection Tube (provided).

18. Add 50 µl of Solution MD5 to the center of the white filter membrane.

What's happening: Placing the Solution MD5 (elution buffer) in the center of the small white membrane will make sure the entire membrane is wetted. This will result in more efficient release of bound DNA

19. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

What's happening: As the Solution MD5 (elution buffer) passes through the silica membrane, DNA is released, and it flows through the membrane, and into the Collection Tube. The DNA is released because it can only bind to the silica Spin Filter membrane in the presence of salt. Solution MD5 is 10mM Tris pH 8 and does not contain salt.

20. Discard Spin Filter. DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required. We recommend storing DNA frozen (-20 °C).

Anexo 3. Protocolo del kit de purificación Pure-Link Invitrogen

PureLink® Quick Gel Extraction Kit Catalog

Intended Use for research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use. Excising and Dissolving the Gel

1. Equilibrate a water bath or heat block to 50°C.
2. Excise a minimal area of gel containing the DNA fragment of interest.
3. Weigh the gel slice containing the DNA fragment using a scale sensitive to 0.001 g.
4. Add Gel Solubilization Buffer (L3) to the excised gel in the tube size indicated in the following table: Gel Tube Buffer L3 Volume $\leq 2\%$ agarose 1.7-mL polypropylene 3:1 (i.e., 1.2 mL Buffer L3: 400 mg gel piece) $>2\%$ agarose 5-mL polypropylene 6:1 (i.e., 2.4 mL Buffer L3: 400 mg gel piece)
5. Place the tube with the gel slice and Buffer L3 into a 50°C water bath or heat block. Incubate the tube at 50°C for 10 minutes. Invert the tube every 3 minutes to mix and ensure gel dissolution. Note: High concentration gels ($>2\%$ agarose) or large gel slices may take longer than 10 minutes to dissolve.
6. After the gel slice appears dissolved, incubate the tube for an additional 5 minutes.
7. Optional: For optimal DNA yields, add 1 gel volume of isopropanol to the dissolved gel slice. Mix well.
8. Purify the DNA using a Centrifuge or Vacuum Manifold (see the following pages).

Purifying DNA Using a Centrifuge

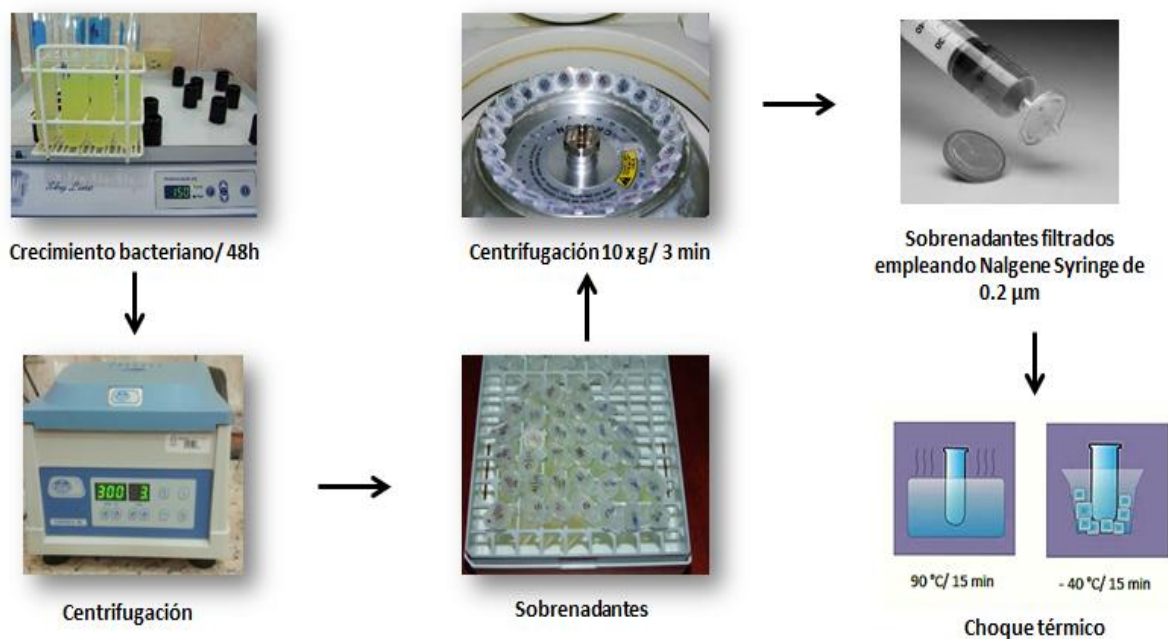
Before Starting

Add ethanol to the Wash Buffer (W1) according to the label on the bottle.

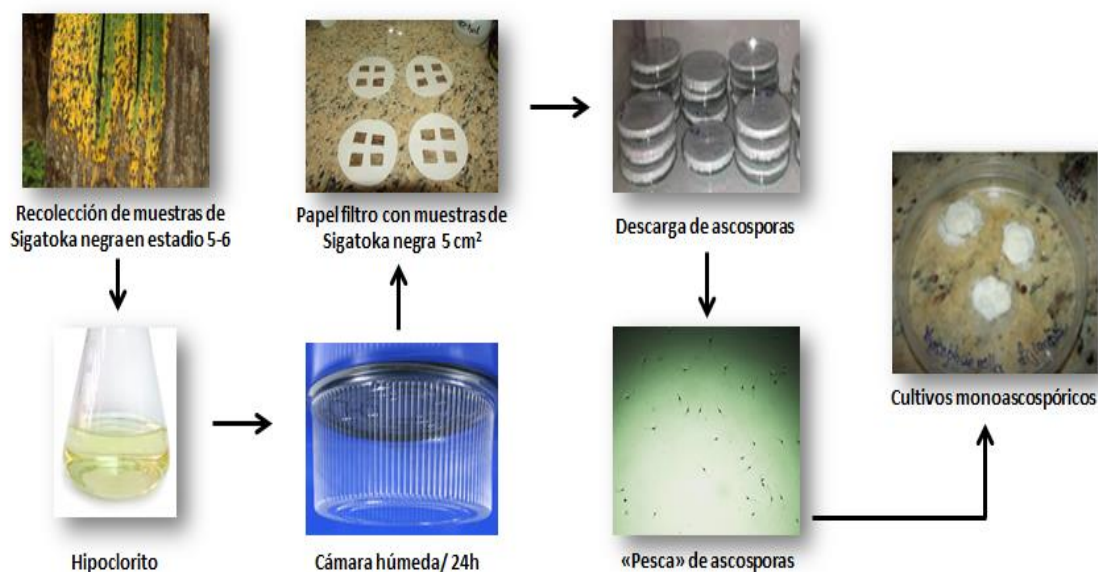
1. Load. Pipet the dissolved gel piece onto a Quick Gel Extraction Column inside a Wash Tube. Use 1 column per 400 mg of agarose gel. Note: The column reservoir capacity is 850 μ L.
2. Bind. Centrifuge the column at $>12,000 \times g$ for 1 minute. Discard the flow-through and place the column into the Wash Tube.

3. Wash. Add 500 μ L Wash Buffer (W1) containing ethanol to the column.
4. Remove Buffer. Centrifuge the column at $>12,000 \times g$ for 1 minute. Discard the flow-through and place the column into the Wash Tube.
5. Remove Ethanol. Centrifuge the column at maximum speed for 1–2 minutes. Discard the flow-through.
6. Elute. Place the column into a Recovery Tube. Add 50 μ L Elution Buffer (E5) to the center of the column. Incubate the tube for 1 minute at room temperature.
7. Collect. Centrifuge the tube at $>12,000 \times g$ for 1 minute.
8. Store. The elution tube contains the purified DNA. Store the purified DNA at 4°C for immediate use or at -20°C for long-term storage.

Anexo 4. Obtención de los sobrenadantes de las *Pseudomonas fluorescens*



Anexo 5. Aislamiento del hongo *M. fijiensis*



Anexo 6. Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year. For more information, please refer to the DNeasy Plant Handbook, which can be found at www.qiagen.com/handbooks. For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting „

Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C). „

If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrates.

„

Add ethanol to Buffer AW and Buffer AP3/E concentrates. „ Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser, or a mortar and pestle.

2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation. Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
3. Add 130 μ l Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
4. Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.
7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. Discard the flowthrough.
9. Add another 500 μ l Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g. Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
11. Add 100 μ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. 12. Repeat step 11.

Anexo 7. Conteo de germinación de ascosporas

